

---

# Bruselloz Olgularında Eritrosit İçi ve Lenfosit İçi Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri

Aysun BAY KARABULUT\*, Emine SÖNMEZ\*\*, Yaşar BAYINDIR\*\*\*, Engin M. GÖZÜKARA\*

\* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, MALATYA

\*\* Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

\*\*\* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

## ÖZET

Bu çalışmada, bruselloz tanısı konmuş 60 hastada eritrosit içi ve lenfosit içi glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerine bakıldı. Tedavi öncesi (grup I: 20 hasta), tedavi sırasında (grup II: 20 hasta), tedavi sonrası (grup III: 20 hasta) ve sağlıklı kişilerden kontrol grubu (grup IV: 20 kişi) olmak üzere 4 grup incelendi. Eritrosit içi GSH-Px aktivitesi grup I'de  $95.07 \pm 16.57$ , grup II'de  $99.95 \pm 16.63$ , grup III'de  $118.42 \pm 33.72$  ve grup IV'de  $128.03 \pm 39.53$  U/g hemoglobin olarak tespit edildi. Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi grup I'de  $742.02 \pm 14.32$ , grup II'de  $681.08 \pm 9.12$ , grup III'de  $545.86 \pm 8.30$  ve grup IV'de  $558.09 \pm 11.73$  U/mg protein olarak bulundu. Eritrosit içi GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüktü ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ( $p < 0.05$ ). Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre (grup III dışında) tüm gruplarda yüksekti. Tedavisini tamamlamış grup (grup III) dışında I ve II. gruplarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p < 0.05$ ). Sonuç olarak; tedavi alan veya almayan tüm bruselloz olgularında eritrosit içi GSH-Px aktivitesi düşük, lenfosit içi GSH-Px aktivitesi yüksek bulundu. Lenfosit içi GSH-Px enzimi bruselloz immünyanıt ve tedaviye cevapta primer rol oynayan enzimlerden biridir.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz, Eritrosit, Lenfosit, Glutatyon peroksidaz

## SUMMARY

### Intraerythrocytic and Intralymphocytic Glutathion Peroxidase Enzyme Activities in Patients with Brucellosis

In this study, the activities of intraerythrocytic and intralymphocytic glutathion peroxidase enzymes (GSH-Px) were determined in 60 patients with brucella infection. There were 4 groups, each containing 20 individuals. In group I (20 patients) enzyme activities were measured before treatment, in group II (20 patients) during treatment and in group III (20 patients) after treatment. Group IV (20 people) served as control group and included healthy individuals. The intraerythrocytic GSH-Px activity was  $95.07 \pm 16.57$ ,  $99.95 \pm 16.63$ ,  $118.42 \pm 33.72$ , and  $128.03 \pm 39.53$  U/g haemoglobin in groups I to IV, respectively. The intralymphocytic GSH-Px activity was  $742.02 \pm 14.32$ ,  $681.08 \pm 9.12$ ,  $545.86 \pm 8.30$ , and  $558.09 \pm 11.73$  U/mg protein in groups I to IV, respectively. The GSH-Px activity in erythrocytes were lower in all groups when com-

pared to the control group, there was a statistically significant difference between the patient and the control groups ( $p < 0.05$ ). The intralymphocytic GSH-Px activities were higher except group III in all groups when compared to the control group. The difference in groups I and II was statistically significant ( $p < 0.05$ ) except treated group (group III). In conclusion, intraerythrocytic GSH-Px enzyme activities were lower in all patients with brucellosis, and intralymphocytic GSH-Px enzyme activities were higher in all cases. The intralymphocytic GSH-Px plays an important role in both the immune response to brucellosis and the response to the treatment.

**Key Words:** Brucellosis, Erythrocyte, Lymphocyte, Glutathion peroxidase

Bruselloz; insanlara geçebilen evcil ve yabancı hayvanların (zoonoz) hastalığıdır<sup>[1]</sup>. Bu hastalık; 1887'de Bruce tarafından *Brucella melitensis*'in tespitinden bugüne kadar görülmüştür<sup>[2]</sup>. Daha sonra *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* ve daha yeni olarak da deniz memelilerinde tespit edilen *Brucella maris*'in tiplendirilmesi ile suşlarda bir artış gözlenmiştir<sup>[2]</sup>. Etkili kontrol önlemlerine rağmen bruselloz birçok ülkede önemli bir sağlık ve ekonomik yük olarak görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre; 100 ülkede yılda 500.000'in üzerinde bruselloz vakası vardır<sup>[3]</sup>.

Deri, konjunktiva, farenks veya akciğer epitel hücrelerine penetre olduktan sonra; brusella bakterileri ilk önce aşırı nötrofil cevabı oluştururlar. Nötrofiller ve doku makrofajları tarafından organizmanın alımından sonra bölgesel lenf nodlarına yayılım olur. Lenf nodlarında konağın defans sistemi etkili olmazsa, bakteriyemi meydana gelir. Bakteriyemi, serbest dolaşan organizmaların nötrofiller tarafından fagositozuna, primer olarak dalak, karaciğer ve kemik iliği lokalizasyonu ve granülom oluşumuna eşlik eder. Brusella türleri nötrofil oksidatif yıkım aktivitesini inhibe edebilir. Brusellaya karşı konak defansında humoral faktörler önemli olabilir. Aglutine olabilen spesifik antikorların yokluğunda bile; normal insan serumu brusella için bakterisidaldir. Bu antikorlar opsonik aktiviteye sahiptir. Fakat koruyucu immünitinin gelişimi ile korelasyon göstermez. İntraselüler yerleşim serumun öldürücü etkisinden bakteriyi kurtarabilir. Brusellozda mononükleer fagositler ve hücrel immünitinin rolü de gösterilmiştir<sup>[3]</sup>.

Virülan brusellanın eliminasyonu aktive makrofajlara bağlıdır. Bununla birlikte; protein antijenlere T-helper tip 1 hücrel cevabın gelişimi gereklidir. Virülansın önemli bir determinantı fagolizozom füzonunu inhibe eden adenin ve guanin monofosfatın üretimi, miyeloperoksidaz halid sistemin degranülasyonu ve aktivasyonu ile tümör nekroz faktörün üretimidir. Sonuçta; canlı kalan pur E mutantlarda bu inhibitörlerin üretimi engellenir. Cu-Zn süperoksit

dismutazın intraselüler infeksiyonun erken fazında önemli bir rol oynadığına inanılır<sup>[3-8]</sup>.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir antioksidan enzimdir. Bu çalışmayı, bruselloz tanısı konan olgularda eritrosit içi ve lenfosit içi GSH-Px'in araştırılmasının hem tedavinin etkinliği hem de hastalığın patogenezinin değerlendirilmesinde önemli olacağını düşünerek planladık.

## MATERYAL ve METOD

### Hastalar

**Grup I:** Klinik ve laboratuvar (Wright aglütinasyonu  $> 1/160$  ve kan veya kemik iliği kültüründe *Brucella* spp. üretilmiş) olarak kesin bruselloz tanısı almış ve tedavi verilmemiş,  $30 \pm 15$  yaşları arasındaki 20 hastadan oluşturulmuştur.

**Grup II:** Bruselloz tanısı olan ve rifampisin (1 x 600 mg, oral) ile doksisisiklin (2 x 100 mg, oral) tedavisinin 3. haftası tamamlanmış,  $30 \pm 15$  yaşları arasındaki 20 hastadan oluşturulmuştur.

**Grup III:** Bruselloz tanısıyla 6 haftalık rifampisin (1 x 600 mg, oral) ile doksisisiklin (2 x 100 mg, oral) tedavisini tamamlamış,  $30 \pm 15$  yaşları arasındaki 20 hastadan oluşturulmuştur.

**Grup IV:** Kontrol grubu; Turgut Özal Tıp Merkezi'ne gelen antioksidan tedavi kullanmayan, alkol kullanmayan, ilave bir hastalığı bulunmayan,  $30 \pm 15$  yaşları arasındaki 20 sağlıklı bireyden oluşturulmuştur.

### Lenfosit ve Eritrosit Numunelerinin Hazırlanması

Lenfositleri 1968'de Boyum tarafından yapılmış olan yöntemle diğer hücrelerden Histopaq 1077 aracılığıyla ayırdık<sup>[9]</sup>. Hastalardan ve kontrol grubundan 10 mL heparinize kan kübital median venlerden alındı. Alınan kanlar cam tüplere önce 2 mL Histopaq-1077 konarak üzerine yavaşça  $45^\circ$  açı ile ilave edildi. Kanlar  $400 \times g$ 'de  $+4^\circ C$ 'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki plazma kısmı pastör pipeti ile ayrı bir ependorfa alınarak  $-40^\circ C$  de saklandı.

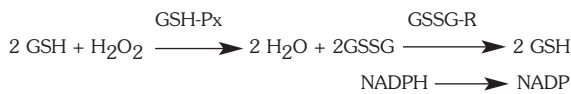
Eritrosit tabakasının üzerindeki "buffy coat" kısmı atılarak alttaki kısmın üzerine pH'sı 7 olan 10 mL PBS ilave edildi. Yine lenfosit tabakası üzerine de 10 mL PBS'den ilave edilip, 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üzerindeki kısım atılarak alttaki kısmın üzerine yine PBS ilave edilerek 2 defa daha santrifüj edildi. Eritrositler soğuk su ile 5 kat dilüe edildikten sonra vorteks ile karıştırılıp -40°C'de çalışıncaya kadar saklandı.

Lenfositler için alttaki mononükleer hücre tabakası olan tabaka, Histopaq'ın içine girilerek temiz bir tüpe alındı. Bu lenfosit tabakası üzerine de 10 mL PBS'den ilave edildikten sonra 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üzerindeki kısım atıldı, alttaki kısmın üzerine yine PBS ilave edilerek 2 defa daha santrifüj edildi. Lenfositler 0.5 mL PBS ile saklandı. 30 mW/cm<sup>2</sup>, 2 MHz 30 cycle'de 72 MS/D'de 10 saniye aralıklarla 3 defa sonifiye edildikten sonra 10.000 x g'de ultrasantrifüj ile santrifüj edildikten sonra üstteki kısım alınarak çalışıldı [10,11]. Lenfositlerde protein tayini için "Lowry" yöntemi kullanıldı [12].

### Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi Ölçümü

GSH-Px, in vitro olarak redükte glutasyonun oksidasyonu aracılığıyla hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Oluşan okside glutasyonun tekrar redükte formuna dönüşmesi için, glutasyon redüktaz ve redükte NADP (NADPH)'nin okside formuna dönüşmesi gerekir. Bu, ancak ortamda bulunan NADPH varlığında gerçekleşir. Böylece ortamda azalan NADPH'in miktarı bize GSH-Px'in aktivitesini gösterir.

NADPH, 340 nm'de maksimum absorbans verdiği için, GSSG-R aktivitesi devam ettikçe NADPH azalma miktarı ile ortamdaki GSH-Px aktivitesini hesaplayabiliriz [13].



**Kullanılan reaktifler:** EDTA'lı fosfat tampunu: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 L hazırlayıp içerisine 5 mL'lik EDTA ilave edildi), 1 mM NaN<sub>3</sub> (sodyum azid), 2 mM GSH (redükte glutasyon), 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mM NADPH, 1.2 U/mL GSSG redüktaz.

**Deneyin yapılışı:** Eritrosit numuneleri için 100 kat dilüsyonlu numuneler, lenfosit numuneleri için 5 kat dilüe numuneler kullanıldı. Kör tüpüne 2.67 mL

EDTA'lı PBS, test tüplerine 2.65 mL EDTA'lı PBS, bütün tüplere 100 µL GSH, 100 µL NADPH, 10 µL GSH redüktaz, 10 µL NaN<sub>3</sub>, ilave edildikten sonra test tüplerine 20 µL numune eklenip 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm'de distile su ile sıfırlanıp her tüpe 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilip reaksiyon başlatılarak hemen 3 dakika süresince absorbans azalması takip edilecek şekilde okunmaya başlandı.

**Hemoglobin tayini:** Daha önce hazırlanan 1/50 sulandırılmış hemolizat 5000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Sonrasında daha önceden 1-18 g/dL arasındaki konsantrasyonda hazırlanan standart grafiğine göre OLYMPUS-AU 600 cihazında Drabkins solüsyonu ile çalışıldı.

**1 Ünite GSH-Px:** Bir dakikada okside olan NADPH'in µmol cinsinden miktarıdır.

Spesifik aktivite için ise bulunan sonuçlar eritrosit numuneleri için g/Hb'ye bölündü, böylece sonuç U/g Hb olarak bulundu. Lenfosit için bulunan sonuçlar ise mg/proteine bölündü, böylece sonuç U/mg protein olarak hesaplandı.

One-Way Anova ve LSD (en küçük önemde farklılık) testi kullanılarak gruplar karşılaştırıldı.

### BULGULAR

Eritrosit içi GSH-Px aktivitesi grup I'de 95.07 ± 16.57, grup II'de 99.95 ± 16.63, grup III'te 118.42 ± 33.72 ve grup IV'te 128.03 ± 39.53 U/g Hb olarak tespit edildi (Tablo 1). Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi grup I'de 742.02 ± 14.32, grup II'de 681.08 ± 9.12, grup III'te 545.86 ± 8.30 ve grup IV'te 558.09 ± 11.73 U/mg protein olarak bulundu (Tablo 2). Eritrosit içi GSH-Px aktiviteleri kontrole göre anlamlı derecede düşük (p < 0.05), lenfosit içi GSH-Px aktiviteleri ise tedavisi tamamlanmış grup (grup III) hariç anlamlı derecede yüksek bulundu (p < 0.05).

### TARTIŞMA

Bruselloz hastalarda immünpatogenez ve tedaviye yanıtta sitokinler ve hücre içi enzim sistemlerinin etkisiyle ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmekte olup henüz mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır [1,2,4].

GSH-Px hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu bir antioksidan enzim olup hücre içi savunma mekanizmasında rol almaktadır [13]. Hepatit C enfeksiyonlarında kronik vakalarda özellikle lenfosit içi glutasyon eksikliği olduğu tespit edilmiştir. Bu durum kronik HCV'li hastalarda yüksek glutasyon döngü-

**Tablo 1. Eritrosit içi GSH-Px aktiviteleri**

Grup	GSH-Px U/gHb	% Aktivite	p
• Grup I	95.07 ± 16.57	-25.7	< 0.05
• Grup II	99.95 ± 16.63	-21.9	< 0.05
• Grup III	118.42 ± 33.72	-7.5	< 0.05
• Grup IV (kontrol)	128.03 ± 39.53	0	

**Tablo 2. Lenfosit içi GSH-Px aktiviteleri**

Grup	GSH-Px U/mg protein	% Aktivite	p
• Grup I	742.02 ± 14.32	32.9	< 0.05
• Grup II	681.08 ± 9.12	22.3	< 0.05
• Grup III	545.86 ± 8.30	2.19	> 0.05
• Grup IV (kontrol)	558.09 ± 11.73	0	

süne bağlanmıştır. Akut vakalarda yükseldiği, tedavi gören HCV'lilerde normale yaklaştığı vurgulanmaktadır<sup>[14,15]</sup>.

Çeşitli infeksiyonlarda ve brusellozlu olgularda hücre içi enzim çalışmaları devam etmekte olup literatürde lenfosit içi ve eritrosit içi GSH-Px aktivitesinin birlikte araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda Tablo 1'de görüldüğü gibi eritrosit içi GSH-Px aktiviteleri; bruselloz tanısı almış hastalarda (grup I) kontrole göre %25.7 oranında azalmış, tedavi altındaki hastalarda (grup II) %21.9 oranında azalmış, tedavi bitiminde (grup III) ise %7.5 oranında azalmış bulundu. Bu sonuçlar, istatistiki olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ). Tablo 2'de görüldüğü gibi lenfosit içi GSH-Px aktivitesi, brusellozlu hastalarda (grup I) kontrole göre %32.9 oranında artmış, tedavi altındaki hastalarda (grup II) %22.03 oranında artmış, tedavi bitiminde ise (grup III) %2.19 oranında artmış bulundu. Burada da grup I ve grup II ile kontrol arasında istatistiki fark anlamlıydı ( $p < 0.05$ ).

Sonuç olarak, brusellozlu hastalarda eritrosit içi GSH-Px seviyesi tedavi alan ve almayan gruplarda kontrol grubuna göre düşük iken ( $p < 0.05$ ), lenfosit içi GSH-Px seviyesi yüksek bulunmuştur (grup III hariç,  $p < 0.05$ ). Lenfosit içi GSH-Px enzimi brusellozlu hastalarda immünyanıtta ve tedaviye yanıtta rol alır. İmmünpatogenezin daha iyi anlaşılabilmesi için kronik tedavi almamış brusellozlu vakalarda ve tedavi protokollüne glutatyon ilave edilen çalışmalarda lenfosit içi ve eritrosit içi GSH-Px enzim aktivitelerinin irdelenmesi gerekir; kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Edward JY. *Brucella species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2386-92.
- Corbel MJ. Brucellosis: An overview. First International Conference on Emerging Zoonoses. Emerging Infectious Diseases, France 1997;3:198.
- Salata RA. Brucellosis. In: Goldman BR (ed). Cecil Textbook of Medicine. 21<sup>st</sup> ed. London: WB Saunders Company, 2000:356-400.
- Zhan Y, Cheers C. Differential activation of brucella-reactive CD4 + cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995;63:969-95.
- Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J. Live *Brucella* spp. fail to induce tumour necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect Immun 1994;62:5267-74.
- Durbay G. Protective antigens in brucellosis. Annales de l'Institut Pasteur, Microbiologie 1987;138:84-7.
- Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and intracellular survival of the bacteria. J Infect Dis 1986;154:464-70.
- Bricker BJ, Tabatabai LB, Judge BA, Deyoe BL, Mayfield JE. Cloning, expression and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn dismutase. Infect Immun 1990;58:2933-9.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968;21:77-90.
- Kunze-Mühl E. Observation on the effect of X-ray alone and in combination with ultrasound on human chromosomes. Hum Gen 1981;57:257-60.
- Seshi B. Discovery of novel hematopoietic cell adhesion molecules from human bone marrow stromal cell membrane protein extracts by a new cell-blotting technique. Blood 1994;83:2399-409.

12. Lowry O, Roseburgh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
13. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70:158-69.
14. Beloqui O, Preto J, Suarez MGB, Qian CH, Garcia N, Civeira MP. N-acetyl cystein enhances the response to interferon- $\alpha$  in chronic hepatitis C: A pilot study. Journal of Interferon Research 1993;13:279-82.
15. Matiushin BN, Loginov AS, Iakimchuk GN, Tkachev VD. Activity of blood antioxidant enzymes in chronic liver damage. Vopr Med Khim 1995;41:54-6.

**Yazışma Adresi:**

Dr. Aysun BAY KARABULUT  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
MALATYA

Makalenin Geliş Tarihi: 21.06.2001

Kabul Tarihi: 08.10.2001

**HASTANE İNFEKSİYONLARI KONGRESİ 2002**[www.hikong2002.org](http://www.hikong2002.org)*11-14 Nisan 2002**Sheraton Hotel, ANKARA***Bilimsel Sekreteryaya****Dr. Mehmet Ali ÖZİNEL**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı  
35100 Bornova, İZMİR  
Tel: 0232 388 66 23 / 127  
Faks: 0232 464 42 32  
e-mail: ozinel@med.ege.edu.tr

**Dr. Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı  
İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi  
06100 Sıhhiye, ANKARA  
Tel: 0312 311 12 71  
Faks: 0312 310 41 79  
e-mail: yesim.c@turk.net