

Viral Hepatit Seyrinde Serum Lizozom Enzim Değişiklikleri

Tülay BAKIR
Şükran KARACADAĞ
Hasan TELATAR
Behiç ONUL
Zeki DURUSU

SERUM ACTIVITY OF LYSOSOMAL
ENZYMES IN THE COURSE OF VIRAL
HEPATITIS

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalları, Ankara

Geliş Tarihi: 10 Kasım 1984

ÖZET

Karaciğer doku zedelenmeleri ve nekrozunda lizozom enzimleri önemli rol oynamaktadır. Viral hepatitin seyri sırasında lizozom enzimlerindeki değişikliklerin incelenmesi amacı ile 23 viral hepatitli hastada (8'inde HBsAg pozitif) ve 17 sağlıklı kişide bu enzimlerin serumdaki aktivitesi tayin edilmiştir. Katepsin D, asit fosfataz, asit ribonukleaz, a-mannozidaz, fi-glukoronidaz enzimlerinin hastalığın klinik dönemleri ve transaminazlarla uyumlu bir gidiş gösterdiği saptanmıştır. Başlangıçta kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olan lizozom enzim aktivitesinin, giderek normale, hattâ bazı enzimlerin normalin altındaki değerlere düştüğü izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lizozom enzimleri, serum, viral hepatit

T Kİ Tıp Bil Araşt Dergisi C.3, S.1, 1985, 37-41

Lizozom enzimleri bakımından organizmanın en zengin organı karaciğerdir (5, 17, 25). Karaciğer hücrelerinin açlık, hipoksi, endotoksinler veya çeşitli toksik maddelere maruz kalması halinde lizozomlar uyarılarak aktiviteleri artmaktadır (11, 26, 32). Karaciğer hücre zedelenmesine neden olan etken çok güçlü ise, lizozom zarları zedelenerek enzimler kontrolsüz şekilde sitoplazmaya, oradan da hücre dışı sıvılara boşalmakta, böylece hücre zedelenmesinin şiddetlenmesine ve genişlemesine yol açmaktadır (1, 2, 18, 21, 22, 24, 26, 39). Lizozomların aktivasyonuna neden olan diğer bir etken virüslerdir (6, 19). Deneysel fare hepatitinde, karaciğer lizozom enzim aktivitesinin hücre zedelenmesinin şiddeti ile orantılı olarak aktive olduğu bildirilmiştir (11). Viral enfeksiyonlara konak cevabının hazırlanmasında da önemli rolü olan lizozomların (20, 34). insan viral hepatiti seyrinde gösterdiği değişikliklerin

SUMMARY

Lysosomal enzymes have an important role in the pathogenesis of liver tissue injury and necrosis. Our present study concerns the lysosomal enzyme activity in the clinical course of viral hepatitis. We determined several lysosomal enzymes in the serum of 23 patients with viral hepatitis (HBsAg was positive in 8 patients) and 17 healthy subjects. Cathepsin D, acid phosphatase, acid ribonuclease, a-mannosidase and fi-glucuronidase enzyme levels were found to be correlated with the activity of the disease and transaminases. These enzymes have significantly higher activity than the control values at the onset of the disease. In the recovery stage, lysosomal activity decreased to the normal or even below values.

Key Words: Lysosomal enzymes, serum, viral hepatitis

T J Res Med Sci V.3, N.1, 1985, 37-41

incelenmesi amacı ile bu çalışma plânlanmıştır.

MATERYEL VE METOD

Çalışma, 23 viral hepatitli hastada ve 17 sağlıklı kişide yapılmıştır*. Ankara Tıp Fakültesi enfeksiyon hastalıkları kliniğinde yatan ve iyileşme döneminde poliklinikte izlenen hastalar arasından, sarılığının başlangıcı 15 günü geçmemiş, daha önce hiç sarılık geçirmemiş, viral hepatit dışında hastalığı ve ilaç-alkol alışkanlığı olmayan, kortikosteroid veya immunosüpresif tedavi verilmemiş olanlar seçildi. Hasta grubu haftalık aralarla, 5-9 hafta süre ile izlendiler.

Hasta ve kontrol grubunda, gece yarısı açlığını

*Çalışma Uluslararası V. Karaciğer Hastalıkları Sempozyumu'nda tebliğ edilmiştir (Mayıs 1984, İstanbul).

takiben venöz yolla alınan kan örnekleri 2-3 dakika bekletilip santrifüj edildi ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanarak enzimatik çalışmaları 48 saat içinde bitirildi.

Hasta ve kontrol grubunda HB_sAg ve Anti-HB_s, radyoimmunoassay ile CIS, AUK-3 ve CIS, AB-AUK-3 kitleri kullanılarak, serum GOT, GPT, total ve direkt bilirubin düzeyleri Sigma test reaktif setleri ile tayin edildi.

Hasta ve kontrol grubunun serum örneklerinde, sitozolik nötral proteinaz (18, 23) ve lizozom enzimlerinden katepsin D (18, 23), asit fosfataz (37), β -glukoronidaz (15), asit ribonukleaz (4, 10, 21), a-mannozidaz (9, 28) aktiviteleri tayin edildi.

BULGULAR

Kontrol grubundaki 17 kişide HB_sAg ve Anti-HB_s negatif bulundu. 23 viral hepatitli hastanın, 8'inde HB_sAg ve 3 ünde anti-HB_s pozitifliği.

Serum GOT, GPT, total ve direkt bilirubin düzeyleri, hasta grubunda viral hepatit için beklenen seyri gösterdi (Tablo—I).

Sitozolik nötral proteinaz, 17 sağlıklı kişide ortalama 8.9 ± 3.0 /jg/ml ölçüldü. Hasta grubunda sadece 1. hafta değerleri kontrol grubundan istatistiksel farklı bulundu. Nötral proteinaz aktivitesi daha sonraki haftalarda gittikçe azalarak, 9. haftada kontrol grup ortalamasının altına düştü (Tablo—II).

Tablo — 1
Viral hepatitli hastalarda serum GOT, GPT, total ve direkt bilirubin düzeyleri
(Ortalama \pm SD)

	SGOT	SPGT	T. Bilirubin	D. Bilirubin
	u/ml	u/ml	% mg	% mg
1. Hafta	437 \pm 229	844 \pm 539	9.6 \pm 3.4	6.1 \pm 2.1
	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
2. Hafta	503 \pm 404	691 \pm 364	10.2 \pm 7.0	5.8 \pm 4.6
	n = 16	n = 16	n = 16	n = 16
3. Hafta	386 \pm 279	615 \pm 348	5.6 \pm 3.7	3.6 \pm 2.7
	n = 16	n = 16	n = 15	n = 15
4. Hafta	192 \pm 200	336 t 355	6.0 \pm 6.1	3.8 \pm 2.7
	n = 16	n = 17	n = 16	n = 15
5. Hafta	126 \pm 147	201 \pm 271	4.6 \pm 4.6	2.9 \pm 3.0
	n = 15	n = 14	n = 15	n = 15
6. Hafta	63 \pm 73	120 \pm 131	3.1 \pm 2.1	1.7 \pm 1.5
	n = 13	n = 12	n = 13	n = 13
7. Hafta	50 \pm 27	47 \pm 20	3.0 \pm 2.3	1.7 \pm 1.8
	n = 5	n = 8	n = 8	n = 8
8. Hafta	28 \pm 18	45 \pm 24	0.9 \pm 0.6	0.3 \pm 0.2
	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
9. Hafta	30 t 15	31 \pm 20	0.9 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3
	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5

Tablo – II
Kontrol Grubu ve Viral Hepatitli Hastalarda (Ortalama ± SD) Serum Nötral Proteinaz ve Lizozom Enzim Düzeyleri (µg/ml)
p değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır

	Kontrol Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta	9. Hafta
Nötral proteinaz µg/ml	8,9 ± 2,0 n = 17	10,8 ± 4,5 n = 9 p < 0,10	9,2 ± 4,6 n = 16 Anlamsız	10,4 ± 4,3 n = 15 Anlamsız	7,0 ± 3,9 n = 15 p < 0,10	7,0 ± 3,8 n = 16 p < 0,05	4,8 ± 3,4 n = 13 p < 0,05	3,7 ± 3,0 n = 9 p < 0,05	4,5 ± 2,3 n = 5 -	3,5 ± 2,9 n = 4 -
Katepsin D µg/ml	9,4 ± 2,5 n = 17	20,2 ± 5,4 n = 9 p < 0,01	19,0 ± 5,9 n = 16 p < 0,01	17,4 ± 6,0 n = 16 p < 0,01	13,5 ± 3,0 n = 15 p < 0,01	9,5 ± 4,6 n = 16 Anlamsız	9,6 ± 4,8 n = 13 Anlamsız	6,9 ± 5,0 n = 11 p < 0,10	7,1 ± 1,1 n = 8 p < 0,005	5,0 ± 2,2 n = 5 -
Asit fosfataz µg/ml	3,8 ± 0,3 n = 17	8,2 ± 0,7 n = 9 p < 0,01	7,0 ± 1,3 n = 16 p < 0,01	6,6 ± 1,4 n = 17 p < 0,01	6,2 ± 1,2 n = 15 p < 0,01	5,7 ± 1,0 n = 17 p < 0,01	5,8 ± 0,9 n = 12 p < 0,01	4,4 ± 0,8 n = 9 p < 0,01	3,7 ± 0,6 n = 8 p < 0,10	4,4 ± 0,7 n = 5 -
Asit ribonükleaz µg/ml	0,4 ± 0,3 n = 17	11,7 ± 2,8 n = 9 p < 0,005	8,7 ± 3,2 n = 16 p < 0,005	7,4 ± 3,1 n = 16 p < 0,005	5,0 ± 2,3 n = 15 p < 0,005	3,8 ± 2,7 n = 17 p < 0,005	3,1 ± 2,0 n = 11 p < 0,005	1,9 ± 1,7 n = 11 p < 0,025	1,3 ± 0,9 n = 8 p < 0,01	0,8 ± 0,5 n = 5 -
α-mannozidaz µg/ml	11,4 ± 4,1 n = 17	16,5 ± 7,3 n = 9 p < 0,05	17,9 ± 7,9 n = 16 p < 0,01	17,3 ± 6,5 n = 16 p < 0,01	14,2 ± 6,0 n = 15 p < 0,05	12,7 ± 6,0 n = 11 Anlamsız	9,6 ± 6,7 n = 11 Anlamsız	10,9 ± 6,4 n = 9 p < 0,05	9,0 ± 2,7 n = 6 p < 0,05	7,0 ± 2,6 n = 5 -
β-glukoronidaz µg/ml	6,9 ± 3,2 n = 17	12,9 ± 2,0 n = 9 p < 0,025	11,6 ± 2,4 n = 15 p < 0,01	10,4 ± 2,9 n = 15 p < 0,01	9,3 ± 2,6 n = 16 p < 0,025	8,5 ± 2,9 n = 14 p < 0,05	6,6 ± 1,9 n = 12 Anlamsız	4,9 ± 2,0 n = 10 p < 0,05	4,1 ± 0,5 n = 7 p < 0,05	3,3 ± 0,1 n = 5 -

Lizozom asit proteinazı katepsin D ise, kontrol grubunda ortalama 9.4 ± 2.5 ug/ml bulundu. Hasta grubunda katepsin D düzeyi 5. haftada normal değerlere ulaştı. 7. haftadan sonra ise, kontrol grubundan daha düşük aktivite gösterdiği saptandı. (Tablo- II).

Asit fosfataz enzimi, kontrol grubunda ortalama 3.8 ± 0.3 Mg/ml bulundu. Bu enzimin aktivitesi haftalar boyunca azalmakla birlikte, genel olarak kontrol grubuna göre anlamlı yüksek seyretti (Tablo—II).

Asit ribonukleaz'ın serum aktivitesi, kontrol grubunda ortalama 0.4 ± 0.3 ug/ml kadar küçük değerlerde ölçüldü. Viral hepatitli hastalarda, kontrol grubuna göre belirgin yüksek aktivite saptandı. Haftalar boyunca tedrici azalmaya rağmen, 9. haftada bile enzimin normal kontrol düzeyine ulaşamadığı görüldü (Tablo- II).

tv-mannozydaz enziminin serum düzeyi, kontrol grubunda ortalama 11.4 ± 4.1 mg/ml bulundu. Hasta grubunda ilk 4 hafta kontrollere göre anlamlı yüksek aktivite ölçüldü. 5. haftadan itibaren enzim düzeyi giderek azaldı ve 7. haftada kontrol grubun altında değerlere indi (Tablo—II').

Serumda β -glukoronidaz enzim düzeyi kontrol grubunda 6.9 ± 3.1 /ug/ml ölçüldü. Hasta grubunda 5 hafta boyunca kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olan enzimin aktivitesi azalarak, 7. haftadan itibaren normalin altında bulundu (Tablo—II).

Lizozom enzimlerinin, bilirubin, GOT, GPT, total ve direkt bilirubin, nötral proteinaz ile korelasyonları doğrusal bulundu.

TARTIŞMA

Lizozomlar asit ortamda hidroliz yapabilen çeşitli enzimlerle dolu hücre organelleridir (12, 27, 36). Buldukları hücrenin fonksiyonu ile uyumlu miktar ve yapıda enzim içeren bu organellerin aktivitesi normal koşullarda sınırlıdır. Ancak hücre zedelenmesine yol açan çeşitli etkenler lizozomların da aktive olmasına yol açarlar (7, 8, 12, 16, 22, 26, 27, 29, 30, 32, 35, 36). Lizozomların hücre zedelenmelerindeki asıl rolü henüz tartışma konusudur. Lizozom değişiminin hücre zedelenmesini başlatan

primer olay olduğunu kabul edenler yanında, lizozom aktivasyonunu zedelenmiş hücredeki otofajiyi yansıtan sekonder bir olay olarak ileri sürenler de vardır (13, 27, 36).

Yüksek dozda karbontetraklorür, tiyoasetamid, dimetilnitrozamin ve amanita falloides verilerek ratlarda ağır karaciğer zedelenmesi meydana getirildiğinde, lizozom enzimlerinin karaciğer dokusu ve serumdaki aktivitelerin gelişen karaciğer nekrozu ile orantılı şekilde yükseldiği saptanmıştır. Bazı deneylerde enzim artışı bir bekleme dönemi olmaksızın ve hücre nekrozunun morfolojik belirtileri ortaya çıkmadan önce meydana gelmiştir (1-3, 24, 26, 29, 32, 39).

Viral etkenler de lizozomları aktive etmektedir (6, 11, 19, 29, 31). Sitomegalovirus ve herpes simplex virusu farelere inokule edildiğinde, lizozom enzimlerinin enfeksiyonun aktivite dönemleri ile uyumlu değişiklik gösterdiği saptanmıştır (14, 31, 33). Farelerde MHV-3 virusu ile hepatit geliştirildiğinde, lizozomların 24 saat içinde aktive olduğu ve bu aktivasyonun gelişen hücre nekrozu ile pozitif ilişki gösterdiği bildirilmiştir (11). Fulminan seyirli viral hepatit vak'alarında plazmada lizozom enzim aktivitesinin yükseldiği ve bu yükselmenin ölümle sonlanan vak'alarda çok daha fazla olduğu görülmüştür (18).

Çalışmamızda lizozom enzimlerinin aktivitesinin viral hepatitin klinik seyri ve transaminazlarla uyumlu olarak değiştiğini saptadık. Yine incelediğimiz bazı enzimler giderek kontrol grubun altında aktivite gösterdi. Enzim düzeyindeki azalma, enzimlerin karaciğer doku aktiviteleri bilinmediğinden izah edilememiştir. Enzimin dokudaki total aktivitesi veya soluble kısmı azalmış olabilir. Transaminazların serum düzeyinin yüksek olması membran permeabilitesinin henüz düzelmediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, transaminazların membran permeabilitesindeki hafif değişikliklerde bile serbestleşmeleri (38), lizozom enzimlerinin ise daha ağır hücre zedelenmesi yansıtmaları, karaciğer hücre zedelenmelerinin takibi ve prognozunun tayininde, lizozom enzimlerinin doku ve serumdaki aktivitelerinin ölçülmesinde yararlı olabileceğini ileri sürebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Alpers DH, KJ Isselbacher: The effect of carbon tetrachloride on rat liver lysosomes. *Bioch Bioph Acta*, 137 : 33-42, 1967.
2. Argman RC, DJ Loegering and JJ Smith: Changes in plasma levels of lysosomal and non-lysosomal enzymes during hemorrhagic hypotension. *Proc Soc Exp Biol Med*, 149(4) : 1029-31, 1975.
3. Baccino FM, D Cantino, and MF' Zuretti, Studies on the hepatotoxicity of A. phalloides in the rat. I. Liver cell vacuolation. *Exp Mol Path*, 24 : 156-75, 1976.
4. Barret AJ, MF" Heath: Lysosomal enzymes, Lysosomes: a laboratory handbook, Dingle JT, ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp: 19-145, 1977.
5. Van Berkel TJC, JK Krujitad, and JF Köster: Identity and activities of lysosomal enzymes in parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver. *Eur J Bioch*, 58 : 145-52, 1975.

6. Bienz K, D Egger, and DA Wolff: Virus replication, cytopathology, and lysosomal enzymes response of mitotic and interphase Hep-2 cells infected with polio virus. *J Virol*,(1194) : 565-74, 1973.
7. Briggs MH, M Briggs: Serum activity of lysosomal enzymes in relationship to contraceptive steroid dose. *Curr Med Res Opinion* 3(4) : 203-5, 1975.
8. Burton R, and JB Lloyd: Latency of some glycosidases of rat liver lysosomes. *Biochj*, 160 : 631-38, 1976.
9. Concnie J, AJ Hay: Mammalian glycosidases. *Bioch J*, 87 : 354-61, 1963.
10. Crook EM, AD Mathies, and BR Rubin: Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of eytidine 2'-3'-phosphate. *Biochj*, 74:234, 1960.
11. Datta DV, WA Jones, and KJ Isselbacher: Lysosomal injury in murine viral hepatitis. *Gastroenterology*, 52(5) : 828-36, 1967.
12. Duve DC, and R Wattiaux: Functions of lysosomes. *Ann Rev Phys*, 28 :435-492, 1966.
13. Ericsson JLE: Mechanism of cellular autophagy. In: Dingle JT, ed. *Lysosomes in biology and pathology*. North Holland Pub. Company, Amsterdam, London, Vol. 2, pp: 345-94, 1969.
14. Fire DL, RS Lake, and EH Ludwig: Host cell lysosomal response to liver strains of herpes simplex virus. *J Virol*, 5(2) : 226-29, 1979.
15. Fishman WH: /5-glucuronidase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzyme analysis*, pp: 869-74, 1965.
16. Givney AMC, SG Bradley: Enhanced lysosomal enzyme activity in mouse cells treated with bacterial endotoxin *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 155 :390-4, 1977.
17. Glaumann H, and BF Triumph: Lysosomal degradation of cell organelles. IV. Heterophagocytosis and acute inflammation in liver after intravenous injection liver-cell plasma membranes. *Exp Mol Path*, 25 :371-89,1976.
18. Gove CD, AN Wardle, and R Williams: Circulating lysosomal enzymes and acute hepatic necrosis. *J Clin Path* 34 : 13-16, 1981.
19. Hara K, and T Nozima: *In vitro* reaction between lysosomes and influenza virus. *Exp Cell Res*, 72:361-69, 1972.
20. Illaria SJ, S Jagelman, AJ Suckling, and HE Webb: Cerebral lysosomal enzyme levels and the immune response to infection with avirulent semliki forest virus in nu/nu (athymic) and conventional mice. *J Physiol*, 293 : 29 p, 1979.
21. Iturriaga II, I Posalaki, and E Rubin: Aggravation of hepatic necrosis by lysosomal injury. *Exp Mol Path*, 10 : 231-39, 1969.
22. Kerry JFR: Lysosomal changes in acute liver injury due to Heliotrine. *Path Bact*, 93 : 167-74, 1967.
23. Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr and RJ Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J BiolChem*, 193 : 265-75, 1951.
24. Matsumoto Y, T Suga: Changes in lysosomal enzymes in experimental hepatic damage. *Chem Phar Bull*, 26(1) : 226-33, 1978.
25. Mazzei HR, F Bertini: The development of lysosomal apparatus. *J Cell Phys*, 95 : 269-74, 1978.
26. Mori K, K Takagi, M Morena, N Akagi: Lysosomal enzyme in endotoxic shock. *Surg GynObs*, 152(4): 427-32, 1981.
27. Noyan A: Lizozom ve fonksiyonlan. In: Noyan A, ed. *Fizyoloji Ders Kitabı*, pp. 56-71.
28. Ockerman PA, P Kohlin: Tissue acid hydrolase activities in Gaucher's disease. *Sen J Clin Lab Invest*, 22 :62-64, 1968.
29. Pagliaro L, F Giglio, S Lemoli, A Catania and P Cite-rella: (3-glucuronidase and acid phosphatase activities of lysosomal preparations from human liver tissue obtained by needle biopsy from subjects with acute hepatitis and cirrosis. *J Lab Clin Med*, 63:977-85, 1964.
30. Reiner RC, AR Tanner, AH Keyhani, R Wright: A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clin Exp Immunol*, 43:376-80, 1981.
31. Ruebner BH, T Hirano, R Slussen: Cytomegalovirus infection viral ultrastructure with particular reference to the relationship of lysosomes to cytoplasmic inclusions. *Am J Path*, 48 : 971089, 1966.
32. Slater TF: Lysosomal changes in experimentally induced liver injury. *Proc Roy Soc Med*, 59:877-79, 1966.
33. Smith JDYC, E Harver: Herpes simplex virus human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. *J Virology*, 26(1) : 102-130, 1978.
34. Suckling AJ, S Bateman, HE Webb: Brain lysosomal glycosidase activity in mice during the immune response to an encephalitogenic virus infection. *Bioch Soc Trans*, 4(2) : 326-28, 1976.
35. Weismann G: Labilization on stabilization of lysosomes, *Fed Pro*, 23 : 1038-44, 1964.
36. Weismann G.: Lysosomes, *N Eng Med* 273(20): 1084-90, 1975.
37. White LW, MM Erickson, SC Stevens: The determination of phosphorus. *Chem Clin Lab* 4. ed,pp: 136-137, 1976.
37. White LW, MM Erickson, SC Stevens: The determination of phosphorus. *Chem Clin Lab* 4. ed, pp: 136-137, 1976.
38. Wilkinson HJ: Chemistry of enzymes of diagnostic interest III, Hydrolases, In: *The principles and practice of diagnostic enzymology*, Wilkinson HJ ed, pp: 154-156, 1976.
39. Zuretti MF, Baccino MM: Studies on the hepatotoxicity of A. phalloides II. Biochemical analysis of the lysosomal changes. *Exp Mol Path*, 24 : 176-92, 1976.