

DENEYSEL KARACİĞER SİROZUNDA PLAZMADA, ERİTROSİTLERDE VE APO-B İÇEREN LİPOPROTEİNLERDE OKSİDATİF DEĞİŞİKLİKLER

Serdar ÖZTEZCAN*, Semra DOĞRU ABBASOĞLU*, Zerrin CALAY**, Gülçin AYKAC TOKER, Müjdat UYSAL*

ÖZET

Çalışmamızda, sıçanlara 4 ay süreyle haftada 3 kez karbon tetraklorür (0.4 g/kg, periton içi) uygulayarak karaciğer sirozu oluşturuldu. Bu sıçanlarda, plazmada lipit peroksit düzeyleri değişmediği halde, protein karbonil içeriği arttı. Eritrosit zarlarında lipit peroksit düzeyleri ve total sülfidril grupları azaldı. Ayrıca, karaciğer sirozu oluşturulan sıçanların apo-B içeren lipoproteinlerinin (VLDL+LDL) lipit peroksidasyonuna duyarlılığında bir artış saptandı.

Anahtar kelimeler: Siroz, oksidatif stres, plazma, eritrosit zarları, apo B içeren lipoproteinler

SUMMARY

Oxidative changes in plasma, erythrocytes and apo-B containing lipoproteins in experimental cirrhosis. Liver cirrhosis was induced by three times weekly injections of carbon tetrachloride (0.4 g / kg body weight, i.p.) for a period of 4 months. According to our results, lipid peroxides did not change, but protein carbonyl content increased in plasma. Lipid peroxides and total sulfhydryl content decreased in erythrocyte membranes of cirrhotic rats. In addition, the susceptibility of apo-B containing lipoproteins (VLDL+LDL) to lipid peroxidation was observed to increase in cirrhotic rats.

Key words: Cirrhosis, oxidative stress, plasma, erythrocyte membranes, apo-B containing lipoproteins.

GİRİŞ

Kronik hepatitlerde ve karaciğer fibrozunun patojenezinde oksidatif değişimler etkin bir rol oynamaktadır (17). Kronik hepatitlerde ve sirozda karaciğerde prooksidan-antioksidan sistemde değişiklikler olduğu insanlarda (7,15,19) ve deney hayvanlarında (1,2,20,22) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu değişikliklerin plazma ve eritrositleri (7,13,15,19) de etkilediği bildirilmiştir. Buna dayanarak, prooksidan-antioksidan sistemdeki değişimleri plazma ve eritrositlerde inceleyerek karaciğer hasarındaki gelişimin izlenebileceği ileri sürülmüştür (13). Bununla birlikte, karaciğer sirozunda gerek karaciğerde (16), gerekse serum ve eritrositlerde (1,6) oksidatif stres oluşmadığını bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır.

Bilindiği gibi, serbest radikaller organizmada lipitlerin yanı sıra proteinleri ve DNA gibi molekülleri de etkilemektedir (10). Son yıllarda karaciğer sirozunda karaciğerde oksitlenmiş proteinlerin de arttığı ve bunun ölçümünün lipit peroksit düzeylerine oranla daha iyi bir gösterge olabileceği ileri sürülmüştür (20).

Karbon tetraklorür (CCl₄) deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda öncelikle kronik CCl₄ uygulaması ile siroz oluşturulan sıçanlarda plazma ve eritrositlerde lipitlerin ve proteinlerin oksidatif stresten ne oranda etkilendiği belirlenmek istendi. Ayrıca, plazma lipoproteinlerinin metabolizmasında karaciğer çok etkin bir görev yüklediği için, siroz oluşturulmuş sıçanlarda plazma lipop-

Mecmuaya geldiği tarih: 16.04.2001

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biokimya Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Cerrahpaşa, İstanbul

roteimlerinde de peroksidatif değişimler incelendi.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda, ortalama ağırlıkları 180-200 g olan Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Deney grubuna haftada 3 kez 0.4 g/kg dozunda CCl₄ (1:4 oranında mısır özü yağı ile karıştırıldı) 4 ay süre ile periton içi uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise mısır özü yağı verildi.

Plazmada transaminaz (ALT ve AST) aktiviteleri enzimatik yöntemlerle ölçüldü. Plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik⁽²¹⁾, plazma protein karbonil düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle saptandı⁽¹⁸⁾. Eritrositler hemoliz ayıracağı (10 mM Tris-HCl / 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.4) kullanılarak hemoliz edildi. Hemolizat 15000xg'de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen presipitat 2-3 kez aynı ayıraçla yıkılarak eritrosit zarları elde edildi. Eritrosit zarlarında MDA⁽³⁾, protein karbonil⁽¹⁸⁾ ve total sülfidril grubu⁽¹¹⁾ içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle tayin edildi. Protein tayinleri için Lowry ve ark.⁽¹²⁾ tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Apo-B içeren lipoproteinlerin [düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL)] lipid peroksidasyonuna duyarlılıklarının belirlenmesi için, LDL+VLDL fosfatungstat ve MgCl₂ kullanılarak çöktüldü ve daha sonra in vitro koşulda bakırla (ortamdaki bakırın son konsantrasyonu 50 µM) 3 saat süre ile 30 °C'de inkübe edilerek oluşan MDA düzeyleri ölçüldü⁽⁹⁾.

Histopatolojik incelemeler için karaciğer örnekleri %10'luk formalin içine konuldu ve kesitler

Hematoksilen-Eosin ve retikulum boyaları ile boyandı. İstatistiksel değerlendirmeler için Student t ve Mann Whitney- U testleri kullanıldı.

BULGULAR

a) CCl₄ uygulanan sıçanların tümünde siroz oluştu. CCl₄ uygulanan sıçanlarda histopatolojik olarak karaciğerde geniş fibroz bantlarla çevrelenmiş rejenerasyon nodülleri görüldü.

b) Karaciğer sirozlu sıçanların plazma, eritrosit zarları ve apo-B içeren lipoproteinlerinde elde edilen bulgular Tablo 1'de gösterildi.

TARTIŞMA

Serbest radikallerin organizmada oluşturduğu oksidatif değişimleri gösterebilmek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntem MDA dü-

Tablo 1. Kontrol ve sirozlu sıçanların plazmalarında ve eritrosit zarlarında malondialdehit (MDA), protein karbonil düzeyleri, VLDL+LDL'nin oksidasyona duyarlılığı ve total sülfidril içeriği (Ortalama ± SD)

	Kontrol (n=8)	Siroz (n=8)
PLAZMA		
AST (U / L)	131.0 ± 31.55	267.0 ± 49.89*
AST (U / L)	54.50 ± 8.50; (53.0)	94.37 ± 42.32; (75.0*)
MDA (nmol / mL)	4.66 ± 0.41	4.65 ± 0.37
Protein karbonil (nmol / mg protein)	0.693 ± 0.173	0.896 ± 0.216*
VLDL+LDL Oks. (nmol MDA / mL)	65.10 ± 14.10	90.0 ± 7.78*
ERİTROSİT ZARLARI		
MDA (nmol / mg protein)	1.60 ± 0.26	0.96 ± 0.38*
Total sülfidril (nmol / mg protein)	209.70 ± 58.56	98.62 ± 40.27*

() Medyan

*p<0.001; **p<0.01 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

zeylerinin ölçülmesidir. Son yıllarda tek başına MDA düzeyleri ölçümü ile oksidatif stresi belirlemenin yetersiz kaldığı, protein karbonil düzeyleri tayininin oksidatif stresi göstermede daha uygun bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir (5).

Çalışmamızda histopatolojik olarak siroz olduğunu belirlediğimiz sıçanların plazma MDA düzeyleri değişmediği halde, protein karbonil içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. Sundari ve ark. (20) ise, kronik CCl₄ uygulaması ile siroz oluşturulan sıçanların karaciğerinde gerek MDA ve gerekse protein karbonil içeriğini ölçmüşler, protein karbonil içeriğindeki artışın MDA düzeylerindeki artışa oranla çok daha belirgin olduğunu göstermişlerdir. Buna göre, karaciğer sirozunda plazmada protein karbonil gruplarındaki değişimin incelenmesinin MDA'ya oranla daha iyi bir gösterge olabileceği söylenebilir. Öte yandan, biyolojik örneklerde protein karbonil içeriği ölçbilmek için deney ortamında 2 mg/mL düzeyinde protein bulunması gerektiği, ancak 0.5 mg/mL'ye kadar protein düzeyleri ile de ölçüm yapılabileceği belirtilmektedir (18). Ancak çalışmamızda deney ortamına -elimizdeki ghost miktarı sınırlı olduğu için- 0.5-0.8 mg/mL düzeyinde protein koymamıza rağmen eritrosit zarlarında protein karbonil içeriğini ölçmek mümkün olamamıştır. Buna karşılık, eritrosit zarlarında MDA düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu azalmaya siroza bağlı olarak zar yapılarının çok doymamış yağ asidi içeriğinin azalması neden olabilir.

Hücre zarlarındaki yapısal proteinlerin ve enzimlerin sülfidril grupları oksidatif strese duyarlıdır (10). Bu nedenle eritrosit zarlarında proteinlere bağlı SH grupları ölçümü oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Gerçekten, bazı araştırmacılar karaciğer sirozunda gerek eritrosit ve gerekse karaciğer hücre zarında Na⁺-K⁺-ATPaz ve Ca⁺⁺-ATPaz gibi enzimlerin aktivitesinde

azalma bulduklarını ve bu azalmanın oksidatif strese bağlı olarak bu enzimlerin aktif bölgesindeki sülfidril gruplarının oksidasyonundan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (13,14). Çalışmamızda eritrosit zarlarında oksidatif stresin gerçek durumunu değerlendirebilmek amacıyla sülfidril içeriği tayini yapılmış ve eritrosit zarlarında sülfidril içeriğinin kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur.

Öte yandan, çalışmamızda apolipoprotein B içeren lipoproteinlerin (LDL+VLDL) in vitro koşulda bakırla inkübe edilerek lipit peroksidasyonuna duyarlılıkları belirlendi. Akut ve kronik karaciğer hasarlarında lipoproteinlerdeki oksidatif değişimler konusunda literatürde çok az bilgi vardır (4). Bilebildiğimiz kadarı ile deneysel siroz modelinde bu duyarlılık belirlenmemiştir. Sonuçlarımız sirozlu sıçanların lipoproteinlerinin de lipit peroksidasyonuna duyarlılığının arttığını açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, deneysel siroz oluşturulan sıçanlarda plazma, eritrosit ve plazma lipoproteinleri düzeyinde oksidatif stresin arttığı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M, Aykaç-Toker G: Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol Res* 36: 243 (1997).
2. Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağh Ö, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M: Taurine has protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Human Exp Toxicol* (baskıda) (2001).
3. Bidlac WR, Tappel AL: Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8:177 (1983).
4. Brunet S, Guertin F, Thibault L, Gavino V, Delvin E, Levy E: Iron-salicylate complex induces peroxidation, alters hepatic lipid profile and affects plasma lipoprotein composition. *Atherosclerosis* 129: 159 (1997).
5. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E: Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Res* 33: S99 (2000).
6. Clemens MR, Einsele H, Remmer H, Waller HD: Decreased susceptibility of red blood cells to lipid peroxidation in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Chim Acta* 145: 283 (1985).

7. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA: Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radical Biol Med* 21: 291 (1996).
8. Guarini P, Stanzial AM, Olivieri O, Casaril M, Galvani S, Pantalena M, Corrocher R: Erythrocyte membrane lipids and serum selenium in post-viral and alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta* 270: 139 (1998).
9. Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC: Susceptibility to copper-enhanced autoxidation of VLDL+LDL fractions from diabetic patients. *Biochem Mol Biol Intern* 32: 139 (1994).
10. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publications, Oxford, 3. baskı (1999), sayfa 246.
11. Kitajima H, Yamaguchi T, Kimoto E: Hemolysis of human erythrocytes under hydrostatic pressure is suppressed by cross-linking of membrane proteins. *J Biochem* 108: 1057 (1990).
12. Lowry OH, Rosebrugh NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 (1951).
13. Mourelle M, Franco MT: Erythrocyte defects precede the onset of CCl₄-induced liver cirrhosis: Protection by silymarin. *Life Sci* 48: 1083 (1990).
14. Muriel P, Bolanos J, Barral JM, Torres G: Effect of alpha-interferon on erythrocyte and hepatocyte plasma membranes derived from cirrhotic rats. *Pharmacology* 48: 63 (1994).
15. Mutlu-Türkoğlu Ü, Ademoğlu E, Türkoğlu S, Badur S, Uysal M, Toker G: The effects of interferon- α on serum lipid peroxidation and total thiol content in patients with chronic active hepatitis-C. *Res Commun Mol Pathol P* 96: 357 (1997).
16. Nadkarni GD, D'Souza N: Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Biochem Med Metab Biol* 40: 42 (1988).
17. Poli G, Parola M: Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radical Biol Med* 22: 287 (1997).
18. Reznick AZ, Packer L: Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol* 233: 357 (1994).
19. Suematsu T, Abe H: Liver and serum lipid peroxide levels in patients with liver diseases, "Lipid Peroxides in Biology and Medicine, editor: Yagi K, Academic Press, New York (1982)" sayfa 285.
20. Sundari PN, Wilfred G, Ramakrishna B: Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat? *Biochim Biophys Acta* 1362: 169 (1997).
21. Wasowicz W, Neve J, Peretz A: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 39: 2522 (1993).
22. Yalçın AS, Koçak-Toker N, Uysal M, Aykaç G, Sivas A, Öz H: Stimulation of lipid peroxidation and impairment of glutathione-dependent defence system in the liver of rats repeatedly treated with carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol* 6: 303 (1986).