

Karbontetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzim ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri

Seval YILMAZ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.B.D., Elazığ-TÜRKİYE

İbrahim Halil BAHÇECİOĞIU

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahiliye A.B.D., Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.08.1998

Özet: Bu çalışmada, karbontetraklorür ile karaciğer sirozu oluşturulan ratlarda lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehid (MDA) ve antioksidant savunma sistemindeki değişiklikler incelenerek hastalıkla olan ilişkileri araştırıldı.

Karaciğer sirozu, wistar albino erkek ratlara 6 hafta süre ile haftada 3 kez (0,15 gr/100 gr vücut ağırlığı) karbontetraklorürün subkutan olarak verilmesiyle oluşturuldu. Karaciğer dokusunda Malondialdehid düzeyi Yagi yöntemine, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, pirüvat kinaz aktiviteleri ise Beutler yöntemine göre çalışıldı.

Sirozlu grubun karaciğer malondialdehid düzeyleri kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$), glutatyon peroksidaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktiviteleri düşük bulundu ($p<0,05$). Pirüvat kinaz aktivitesinde istatistik açıdan anlamlı bir farklılık saptanamadı ($p>0,05$).

Sonuç olarak; sirozun antioksidant savunma sisteminde değişikliklere ve değişikliklerin de oksidatif stres ve peroksidasyona yol açabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Siroz, lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, pirüvat kinaz.

Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Pyruvate Kinase Activity in Rats With Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis

Abstract: Changes in the level of malondialdehyde (MDA, a degradative product of lipid peroxidation) and in the antioxidant defense system in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis were studied, in order to determine whether there is any relation between these parameters and the disease.

Liver cirrhosis was induced in Wistar-Albino rats by carbon tetrachloride (0.15 gr/100 gr body weight) which was injected subcutaneously three times a week for six weeks. In the liver, the level of tissue malondialdehyde was analysed according to Yagi's method; and glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase activities according to Beutler's method.

The level of liver malondialdehyde in the group with cirrhosis was significantly higher than in the control group ($p<0.05$). Glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was significantly lower in the group with cirrhosis than in the control group ($p<0.05$). The difference was not statistically significant for pyruvate kinase activity ($p>0.05$).

Thus, we consider that cirrhosis causes changes in the antioxidant defense system and it can lead to oxidative stress and peroxidation.

Key Words: Cirrhosis, lipid peroxidation, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase.

Giriş

Kronik karaciğer hastalıkları, hepatosellüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır (1). Siroz, karaciğerin anatomik yapısının fibrozis ve nodülleşme sonucu bozulması olarak tanımlanmaktadır. İlerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığıdır. Değişik etiyolojik nedenlerle ortaya çıkan hastalığın seyri etiyolojiye bağımlı değildir (2).

Karbontetraklorür (CCl_4), deneysel karaciğer sirozunu oluşturmaya amacıyla yaygın olarak kullanılan ve prooksidant aktivitesi bilinen bir maddedir (1, 3). CCl_4 , hepatic granülsüz endoplazmik retikulumda (NADPH)-sitokrom P_{450} elektron transport zincirini kullanan karışık fonksiyonlu sitokrom oksidaz kompleksi tarafından haloalkan serbest radikallerine (CCl_3 ve $CCl_3O_2^{\bullet}$) metabolize edilir (4). Oluşan bu maddeler membranlarda lipid peroksidasyonu başlatarak hepatotoksik CCl_4 'e yol açar (5, 6).

Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan) poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonu, biyolojik zararların özelliklerinde ciddi hücre hasarlarına yol açan değişiklikler yaparak hastalık patogenezinde önemli bir rol oynarlar (3, 7, 8).

Organizmalar oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı endojen koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler (9). Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz [G-6-PD (E.C.1.1.1.49)], oksijen sitotoksitesine karşı hücrel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir antioksidant enzimdir (10). Glutasyon peroksidaz [GSH-Px (E.C.1.11.1.9)] eritrositlerde oksidan strese karşı etkili antioksidant olup hidrojen peroksit ve lipid peroksitlein redüksiyonunu kataliz eden, tetramerik yapılı, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir (11). Pirüvat kinaz (E.C.2.7.1.40) glikolizin son aşamasında fosfoenolpirüvatı, pirüvik asite dönüştüren bir enzimdir (12).

GSH-Px ve G-6-PD enziminin organizmada bulunuşu bilhassa klinik açıdan önemli olup, GSH-Px ile G-6-PD aktivitesi çeşitli hastalıklara ve fizyolojik durum değişimlerine bağlı olarak normalden sapmalar gösterebilmektedir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksid düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır (13, 14).

Çalışmada; karbondioklorür ile kronik karaciğer yetmezliği oluşturulmuş ratların karaciğer dokusunda, lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehid düzeyinin siroza bağlı değişiminin gözlenmesi ve GSH-Px, G-6-PD, pirüvat kinaz enzimlerinin toksik bir madde olan CCl₄'den ne ölçüde etkilendiklerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Metod

Çalışmada 180-240 gr ağırlığında Wistar-Albino cinsi toplam 30 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol grubu (n=15) ve siroz oluşturulacak grup (n=15) olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubu olarak kullanılan gruptaki ratlara haftada 3 kez olmak üzere 6 hafta süreyle yalnızca zeytin yağı (olive oil) 0,15 ml/100 gr canlı ağırlık hesabıyla subkutan enjekte edildi.

Karaciğer hasarı oluşturulacak ratların herbirine 0,15 gr/100 gr canlı ağırlık olacak şekilde zeytin yağında 3/4 oranında (v/v) hazırlanmış karbondioklorür 6 hafta boyunca haftada 3 kez olmak üzere subkutan olarak uygulandı. Aynı laboratuvar şartlarında tutulan kontrol ve deney grupları 6 hafta sonunda en son yemlemeden 12 saat sonra eter anestezisi altında kesildi ve karaciğer doku örnekleri alındı. Karaciğer dokuları bekletilmeden soğuk serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) ile yıkanarak MDA düzeyi ve enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla işlendi.

Karaciğer dokusunda MDA tayini, Yağı (15)'den modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu metod lipid peroksidasyonun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitürik asitin reaksiyonu temeline dayanmaktadır. MDA, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansının 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile lipid peroksidasyonun derecesi saptanmaktadır. GSH-Px aktivitesi Beutler (16), pirüvat kinaz aktivitesi 340 nm'de NADH'nin azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan (17) ve G-6-PD aktivitesi NADP'nin NADPH'a indirgenmesi esasına dayanan kinetik yöntem (18) ile çalışıldı. Spesifik aktivite ise U/mg protein olarak verildi. Doku protein miktarı Lowry (19) yöntemi ile yapıldı. Sonuçlar Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirildi.

Bulgular

Tablo 1'de kontrol ve sirozlu ratların karaciğer dokusu ortalama MDA düzeyi ve pirüvat kinaz aktiviteleri gösterildi. Karaciğer dokusunda MDA düzeyi sirozlu grupta 522,83±257,09 nmol/g protein, kontrol grubunda ise 234,20±76,85 nmol/g protein olarak saptandı.

GSH-Px, G-6-PD ve pirüvat kinaz aktiviteleri siroz oluşturulmuş grupta sırasıyla 12,70±4,55 U/mg protein, 0,25±0,15 U/mg protein, 5,12±1,34 U/mg protein kontrol grubunda ise 23,29±8,00 U/mg protein, 0,43±0,17 U/mg protein, 4,25±1,32 U/mg protein olarak bulundu.

Tablo 1. Kontrol ve Siroz Oluşturulmuş Ratlarda MDA Düzeyleri ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri

	n	MDA (nmol/g protein)	Pirüvat Kinaz (U/mg protein)
Kontrol	15	234,20±76,85	4,25±1,32
Siroz	15	522,83±257,09	5,12±1,34
p		p<0,05	p>0,05

Sirozlu grupta, kontrol grubuna göre MDA düzeyinde istatistiki olarak anlamlı artış ($p<0,05$) gözlenirken, GSH-Px, G-6-PD aktivitelerinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 2). Pirüvat kinaz aktivitesinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

Tartışma

Oksijen serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonu farklı hepatik yangısal hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (20). Lewis ve Paton (21), süperoksit radikali ve singlet oksijenin lipid peroksidasyon yoluyla karaciğer hasarı oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Cluet ve ark. (22) ratlara deneysel olarak 3 gün süreyle fenobarbiton ve CCl_4 verildiğinde CCl_4 'ün alken (etan, pentan) salgısına yol açtığını, fakat fenobarbitonun endojen lipid peroksidasyonda etkili olmadığını bulmuşlardır. Fenobarbiton ve CCl_4 kombine etki ile ratlarda karaciğer sirozuna neden olmaktadır. Her iki ksenobiotik, hepatik antioksidant enzim olan katalaz, GSH-Px enzimlerini ve lipid peroksidasyonu etkilemektedir.

Bu çalışmada sirozlu grupta kontrol grubuna göre pirüvat kinaz aktivitesinin değişmediği ($p>0,05$), ancak MDA düzeyinin anlamlı düzeyde artarken ($p<0,05$), GSH-Px, G-6-PD aktivitelerinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). CCl_4 'e maruz kalan rat hepatositlerinde MDA oluşumu artar ve karaciğerde yağlı dejenerasyonla birlikte sentrilobuler nekroz gözlenir (23).

Kaynaklar

1. Armbrust, T., Batusic, D., Ringe, B. and Ramadari, G.: Mast Cells Distribution in Human Liver Disease and Experimental Rat Liver Fibrosis. Indications for Mast Cell Participation in Development of Liver Fibrosis. *J Hepatol.* 1997; 26: 1042-1054.
2. Sherlock, S. and Dooley, J.: Diseases of the Liver and Biliary System. Hepatic Cirrhosis. (9th Ed) London, Blackwell Scientific Publications. 371-384, 1987.
3. Aleynik, I.S., Leo, A.M., Ma, Y., Aleynik, K.M. and Lieber, S.C.: Polyenylphosphatidylcholine Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation while it Attenuates Liver Fibrosis. *J. Hepatol.* 1997; 27: 554-561.
4. McLean, E.K., McLean, A.E. and Sutton, P.M.: Instant Cirrhosis. An Improved Method for Producing Cirrhosis of the Liver in Rats by Simultaneous Administration of Carbon Tetrachloride and Phenobarbitone. *Br J. Exp. Pathol.* 1969; 50(5): 502-506.

Tablo 2. Kontrol ve Siroz Oluşturulmuş Ratlarda GSH-Px ve G-6-PD Aktiviteleri.

	n	GSH-Px (U/mg protein)	G-6-PD (U/mg protein)
Kontrol	15	23,29±8,00	0,43±0,17
Siroz	15	12,70±4,55	0,25±0,15
p		p<0,05	p<0,05

Sirozda oluşan lipid peroksidasyonu ve antioksidant enzimlerindeki değişikliklerin karaciğerde meydana gelen hasarın derecesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir.

Nadkarni ve ark. (24) deneysel olarak siroz oluşturulmuş ratlarda; hepatik lipid peroksidasyonunun karaciğer sirozunun patogeneğini direk olarak etkileyebileceğini ve hepatik lipid peroksidasyonda artış olmaksızın da sirozun gelişebileceğini ileri sürmüşlerdir. Sirozda hepatik süperoksit dismutaz-katalaz sistemi bozulduğundan hepatik membran makromoleküllerinde oksijen serbest radikalleri (O_2^* , OH, singlet oksijen, H_2O_2) direk bağlanamaz.

Recknagel (25), CCl_4 'ün yol açtığı karaciğer hasarının genellikle karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada CCl_4 ile oluşturulan karaciğer yetmezliğinde gözlenen bulgular Recknagel'in bildirdiği sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Yapılan bir başka çalışmada, CCl_4 verilmesinden 3 saat sonra karaciğer homojenatında lipid peroksidasyon önemli derecede arttığı saptanmış, intrasellüler fraksiyonlar ve mikrozomal fraksiyonda MDA düzeylerinde artış olduğu mitokondrial fraksiyonlarda ise olmadığı gösterilmiş ve homojenattaki artışın mikrozomal fraksiyondaki artıştan köken aldığı gösterilmiştir (19).

Çalışmada elde edilen bulgular sirozda GSH-Px ve G-6-PD enzim düzeylerindeki düşmeye bağlı olarak süperoksit radikallerinin aşırı düzeyde biriktiğini ve serbest radikallerin siroz gibi karaciğer hastalıklarının patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

5. Rikans, L.F., Hornbrook, K.R. and Cai, Y.: Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity as a Function of Age in Female Fischer 344 Rats. *Mech. Ageing Dev.* 1994; 20: 89-99.
6. Ganeshsunder, D.N. and Nympha, B.D.: Hepatic Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis Rats. *Biochem Med and Metabol Biol.* 1988; 40: 42-45.
7. Bruce, A.F. and Crapo, J.D.: Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest.* 1982; 47(5): 412-426.
8. Köse, K. and Dođan, P.: Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi.* 1992; 340-350.
9. Akkuř, I.: Antioksidan Savunma Sistemleri. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimosza Yay. Konya. 42-61; 1995.
10. Gözükara, E.M.: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Özellikleri, Metabolik ve Klinik Açından Önemi. *Biyokimya Dergisi.* 1978; 2-17.
11. Mccay, P.B., Gibson, D.D., Fong, K.L. and Hornbrook, K.R.: Effect of Glutathione Peroxidase Activity on Lipid Peroxidation in Biological Membranes. *Biochim. Biophys Acta.* 1976; 431-459.
12. Erdahl, K.N.: Studies on the Regulation of Rat Liver Pyruvate Kinase and Fructose-1, 6-biophosphatase. *Upsala J. Med. Sci.* 1987; 92: 217-232.
13. Schaeffer, F. and Stainer, R.Y.: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, Kinetics and Molecular Properties. *Arc. Microbiol.* 1978; 116-119.
14. Ursini, F., Mairorino, M., Valente, M., Ferri, L. and Gregolin, C.: Purification from Pig Liver of a Protein which Protects Liposomes and Biomembranes from Peroxidative Degradation and Exhibits Glutathione Peroxidase Activity on Phosphatidylcholine Hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 710: 197.
15. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Ann Biochem.* 1979; 95: 351-358.
16. Beutler, E.: Red Cell Metabolism. Grune and Stratton, New York, 2nd, 1975.
17. Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Löhr, G.W., Ramot, B and Valentine, W.N.: International Committee for Standardization in Haematology. Recommended Methods for the Characterization of Red-Cell Enzyme Analysis. *Br J Haematol.* 1977; 35: 331-340.
18. Beutler, E.: Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, New York, London, 67-69; 1975.
19. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.: Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193-265.
20. Mezes, M., Par, A., Neneth, P. and Javor, T.: Comparative Investigations on Vitamin A Level of Plasma in Some Rheumatic Diseases. *Int J. Clin. Pharmacol. Res.* 1986; 6: 333-338.
21. Lewis, K. and Paton, A.: Could Superoxide Cause Cirrhosis. *Lancet II.* 1982; 24, 2(8291): 188-189.
22. Cluet, J.L., Biosset, M. and Boudene, C.: Effect of Pretreatment with Cimetidine or Phenobarbital on Lipoperoxidation in Carbon Tetrachloride-and Trichloroethylene-Dosed Rats. *Toxicology.* 1986; 38: 91.
23. Özenirler, S., Dinçer, S., Akyol, G., Öz, I., Kandilci, U. and Babül, A.: CCl₄'ün Oluřturduđu Karaciğer Hasarına Ginkgo Biloba'nın Etkisi. 13. UGK Antalya, Sözlü Bildiriler, 1996; 138.
24. Nadkarni, G.D., Pestonjamas, K.N. and Soman, C.S., Indian, J.: Efficacy of Propylthiouracil Treatment in Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis in Rats. *Gastroenterol.* 1986; 5: 183-186.
25. Recknagel, R.O.: Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 1967; 19: 145-208.