

Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutasyon, Serüloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi*

F. Çağlar ÇELİKEZEN Ali ERTEKİN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Van, Türkiye

Geliş tarihi: 15.09.2008

Kabul Tarihi: 18.10.2008

ÖZET

Bu çalışmada antineoplastik ajan olan bleomisin'in bir komplikasyonu olarak şekillenen akciğer fibrozisinin, lipid peroksidasyon markeri malondialdehit (MDA), antioksidan maddeler redükte glutasyon (GSH) ve serüloplazmin ile antioksidan vitaminler β -karoten ve retinol seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmada 15 Wistar- Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Akciğer fibrozisini oluşturmak için bleomisin hidroklorid 7.5 mg/kg oranında tek doz intratrakeal olarak kullanıldı. Yapılan analizlerde, kontrol değerlere göre MDA seviyelerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0.05$), β -karoten $p<0.05$ ve serüloplazmin ile retinol miktarlarındaki yükselmeler $p<0.001$, GSH miktarındaki düşüşler ise $p<0.001$ kadar anlamlı bulunmuşlardır. Sonuç olarak bleomisin'in sebep olduğu akciğer fibrozisinde malondialdehit, bazı antioksidan maddeler ile vitaminlerde görülen değişimler, hücrede oksidatif stres ile ilgili yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler

Bleomisin, Akciğer Fibrozisi, Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Maddeler

Investigation of the Levels of Lipid Peroxidation (MDA), Antioxidant Substances (Glutathione, Ceruloplasmin) and Antioxidant Vitamins (β -carotene and Retinol) in the Experimental Pulmoner Fibrosis in Rats

SUMMARY

The levels of MDA, antioxidant substances and antioxidant vitamins were studied on the experimental pulmonary fibrosis induced by a complication of bleomycine, an antineoplastic agent, in rats. In the study 15 male Wistar-Albino rats were used. The same animals values prior to the experimental treatment were considered as the control. To establish the experimental fibrosis, bleomycine hydrochloride was used intratracheally at a single dose of 7.5 mg / kg. After the fibrosis was performed, lipid peroxidation, antioxidant substances and vitamin analyses were carried out in the blood and serum. The levels of β -carotene, ceruloplasmin and retinol were found to be increased significantly ($p<0.001$) where as the increase in the MDA level was not significant ($p>0.005$) as compared the control data. However a significant decrease in the GSH level was observed ($p<0.001$). As a result the alterations observed in the antioxidants substances and vitamins in the pulmonary fibrosis caused by bleomycine might be an indication of cellular damage associated with the oxidative stress.

Key Words

Bleomycine, Pulmonary Fibrosis, Lipid Peroxidation, Antioxidant Substances

GİRİŞ

Polisiklik faaliyetler sonucu serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır (8). Antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres serbest oksijen radikallerinin biyolojik kaynakları içinde yer almaktadır (12). Bleomisin'in değişik kanser türlerinde etkili bir ajan olduğu bildirilmesine rağmen, yapılan farklı klinik çalışmalarda bleomisin kullanımına bağlı olarak zaman içerisinde interstisyal akciğer fibrozisine sebep olduğundan dolayı, kullanımının kısıtlanması gerektiği vurgulanmıştır (9).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelir (11). Serbest radikaller savunma sisteminin koruyucu etkisini

aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizma da zararlı etkiler meydana getirebilmektedir (3). Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir. Lipidlerin oksidasyonu sonucu lipid peroksil radikali, lipid alkoksil radikali, alkil radikali, lipid aldehyd vb. peroksidasyon ürünleri meydana gelir. Oluşan malondialdehyd hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (10).

Serbest radikallerin hücresel hasarını önlemek için vücutta birçok savunma sistemleri gelişmiştir. Bunlara antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek veya kısaca serbest radikalleri toplayarak lipid peroksidasyonunu ve hücre zararını engeller. Başlıca endojen antioksidanlar olarak süperoksid dismutaz,

Sorumlu araştırmacı: celikezen@hotmail.com

* Bu araştırma, aynı isimli Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir

glutasyon peroksidaz, katalaz, β - karoten, α -tokoferol, askorbik asit, glutasyon, serüloplazmin, transferin ve ferritin sayılabilir (16).

Bu çalışma, antikarsinojen bir ajan olarak kullanılan Bleomisin Hidroklorid' in organizma üzerinde özellikle akciğerlerde yaptığı yaygın fibrozise bağlı olarak lipid peroksidasyonu, serbest radikaller ve antioksidan maddelerden serüloplazmin, glutasyon, vitamin A ve β -karoten üzerine etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın materyalini 180-200 gr canlı ağırlığa sahip, 15 Wistar-Albino ırkı erkek rat oluşturdu. Ratlar deneme süresi adaptasyonları için bir hafta süreyle bekletildi. Deneme öncesi ve deneme süresince adlibitum beslenmeye tabi tutuldu ve önlerinde sürekli olarak içme suyu bulunduruldu.

Ratlarda deneysel akciğer fibrozisi oluşturabilmek için Bleomisin hidroklorid (Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) kullanıldı. Hayvanlar kapalı bir fanus içerisinde klorofom ile uyutulduktan sonra BLM hidroklorid uygulaması yapıldı. BLM hidroklorid, ratlara 7,5 mg/kg/canlı ağırlık oranında intratrakeal olarak tek doz şeklinde uygulandı (13). Denemeye başlamadan önce kontrol değerlerini elde etmek için direkt kalpten, usulüne uygun olarak kan örnekleri normal ve sitratlı tüplere alındı. Denemenin birinci ve ikinci haftası sonunda yine aynı şekilde kan örnekleri alındı. MDA ve GSH analizleri için sitratlı tam kan aynı gün çalışıldı. Serüloplazmin, Vit. A ve β -karoten ise bir gün sonra çalışıldı.

Malondialdehit ölçümleri tiyobarbitirik asit reaktivitesi metodu ile (3), glutasyon EDTA'lı tam kanın presipite edilmesinden sonra elde edilen sızıntının 5-5-dithio-bis-2 nitrobenzoik asit ile verdiği renk reaksiyonunun ölçülmesi esasına göre (5) ve serüloplazmin tayini ise değiştirilmiş Ravin metoduna göre (14) spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Retinol ve β -karoten ise etanol ve n-hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen filtratın 453 nm' de β -karoten, 325 nm' de retinol okumalarına dayanan Suzuki ve Katoh' un metoduna göre (17) UV spektrofotometrede gerçekleştirildi.

İnsancıl bir şekilde uyutulan ratlardan alınan ve +4 °C' de % 10 luk nötral formal çözeltisinde muhafaza edilen akciğer örneklerinin tespiti yapıldıktan sonra, bunlardan rutin histolojik işlemlerle parafin bloklar hazırlanarak 7 μ m kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hemotoksilen-eosin boyama tekniği ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (4).

Deneme grubu verileri ile kontrol grubu verileri karşılaştırıldı. Gruplar arası farkın önemi varyans analizi ile kontrol edildi, çoklu karşılaştırma için Duncan testi kullanıldı (2). Deneme ve kontrol verilerine ait değerler standart \pm standart error olarak tablolar halinde gösterildi.

BULGULAR

Deneme öncesi kontrol ve deneme grubu ratlara ait birinci ve ikinci hafta MDA, GSH ve serüloplazmin düzeyleri Tablo 1'de, vitamin A ve β -karoten düzeyleri ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Deneme öncesi kontrol ve deneme grubu ratların MDA, GSH ve serüloplazmin düzeyleri.

Parametre	n	Kontrol (X \pm SX)	1.Hafta (X \pm SX)	2. Hafta (X \pm SX)
MDA (nmol/ml)	6	0.712 \pm 0.552	0.932 \pm 0.288 ^b	1.196 \pm 0.222 ^b
GSH (mg/dl)	6	101.237 \pm 9.995	68.776 \pm 3.188 ^a	45.921 \pm 11.486 ^a
Serüloplazmin(%mg)	6	44.763 \pm 3.507	62.645 \pm 2.615 ^a	111.483 \pm 6.714 ^a

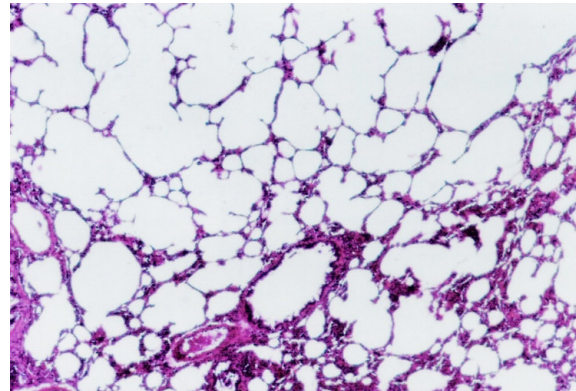
*^a p< 0.001 ^b p<0.05

Tablo 2. Deneme öncesi kontrol ve deneme grubu ratların vitamin A ve β -karoten düzeyleri.

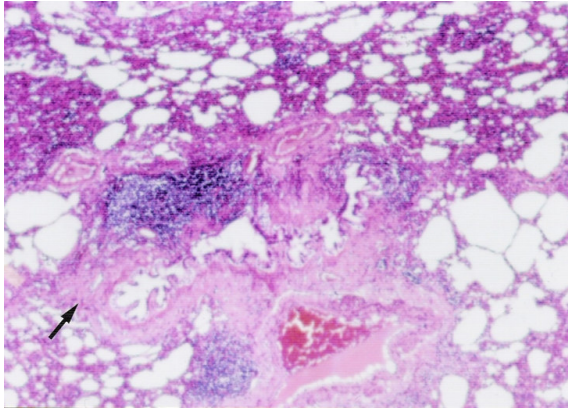
Parametre	n	Kontrol(X \pm SX)	1. Hafta (X \pm SX)	2. Hafta (X \pm SX)
Vit. A (μ g/dl)	6	28.986 \pm 2.186	30.396 \pm 1.845 ^a	56.218 \pm 0.892 ^a
B-karoten (μ g/dl)	6	38.643 \pm 5.724	43.551 \pm 1.818 ^b	57.855 \pm 2.953 ^b

*^a p< 0.001 ^b p<0.05

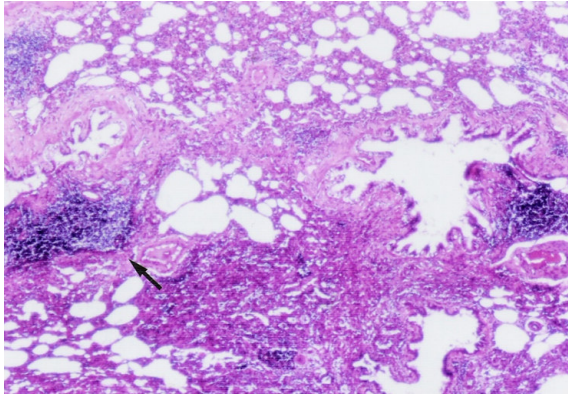
Histopatolojik bakıda, sağlıklı ratlara ait interalveoler septumların normal histolojik görünüşte olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Deneme grubu birinci hafta histopatolojik bulgularında, perikapiller damarlarda hiperemi, interstisyel alanlarda yer yer mononükleer hücre infiltrasyonları (Şekil 2), denemenin ikinci haftasında ise interalveoler septal dokuda ileri düzeyde fibröz bağ doku artışı, peribronşiyoller ve perivasküler alanlarda fokal lenfoid hücre infiltrasyonları (Şekil 3) gözlemlendi.



Şekil 1. Sağlıklı ratlara ait normal akciğer doku örneğinin histolojik görünümü (HE x 80)



Şekil 2. Orta derecede fibrozis ve perialveoler kapillarlarda hiperemi ve mononükleer hücre infiltrasyonları (1. Hafta, HE x 80)



Şekil 3. İnteralveoler septal dokuda ileri düzeyde fibrozis, peribronşiyoler fokal lenfoid hücre infiltrasyonları (2. Hafta, HE x 80)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Antioksidanlar, günümüzde içinde buldukları besinler, yaygın kullanım alanları sebebiyle ilgi çekmeye devam etmektedir. Antioksidanlar ortamda, okside edilebilen bir maddeye göre daha az miktarda bulunmalarına rağmen, o maddenin oksidasyonunu önleyen veya geçiktiren madde olarak tanımlanabilir. Antioksidanların fizyolojik rolü, kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin dokulara hasarını önlemektir. Oksidatif stres serbest radikaller yolu ile doku hasarlarına yol açmaktadır. En çok doku hasarına yol açan serbest radikaller hidroksil ve süperoksit radikalidir. Paraguat, parasetamol, bleomisin ve antrasiklinler gibi kimyasal maddeler de serbest radikal üretimi ile doku hasarına sebep olabilirler (18).

Oluşan bu serbest radikaller ile antioksidan sistemler arasında bir dengesizlik oluşursa, bu dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stres, lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere geniş kapsamlı bir alanda, moleküler hasarlara yol açarlar. Bu hasarlar, başta lipitlerde kısa zincirli aldehitler, hidroksitler ve hidroperoksitler oluştururken, aminoasitlerin ve nükleotidlerin modifikasyonuna neden olarak hücrelerin disfonksiyonlarına da sebebiyet vermektedir. Bu doku hasarlarını önleyen antioksidan koruyucu sistemlerden bazıları; antioksidan enzimler (katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz vb.), zincir bozan antioksidanlar (vitamin C, vitamin E, vitamin A, β -karoten, albümin, ürik asit vd.) ve flavonoidler

(meyve, sebze ve çayda bulunan antioksidanlar gibi) sayılabilir (7,15).

Yapılan bu çalışmada lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit miktarında kontrol verilerine göre uygulama grubunda saptanan değişmelerde (kontrol 0.712 ± 0.552 nmol/ml, 1. hafta 0.932 ± 0.288 nmol/ml ve 2. hafta 1.196 ± 0.222 mol/ml) hissedilir derecede artışlar gözlenmesine rağmen, istatistik açıdan herhangi bir anlam saptanamadı ($p>0.05$). Anlam saptanamaması belkide standart error'da gözlenen yüksekliklerden kaynaklanabilir. Antioksidan savunma elemanlarından olan redükte glutatyon miktarlarında saptanan değişmelerde (kontrol 101.237 ± 9.995 mg/ dl, 1. hafta 68.776 ± 3.188 mg/dl ve 2. hafta 45.921 ± 11.486 mg/dl) anlamlı düşmeler gözlendi ve düşmeler kontrol değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistik bakımdan $p<0.001$ düzeyinde bir önem arz etti.

Yine antioksidan sistem maddelerinden olan serüloplazmin miktarında saptanan değişmelerde (kontrol 44.768 ± 3.507 %mg, 1.hafta 62.645 ± 2.615 %mg ve 2. hafta 111.483 ± 6.714 %mg) gözlenen artışlarda ise $p<0.001$ kadar bir istatistik anlamın olduğu gözlendi (Tablo 1).

Kullanılan antineoplastik ajandan kaynaklanan oksidatif hasara bağlı olarak şekillenen lipit peroksidasyon ürünlerinde kısmi artma, antioksidan serum elemanlarından glutatyon seviyelerinde azalmalar ve serüloplazmin miktarındaki artmalar literatür verileriyle uyum göstermektedir (6).

Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan MDA organizma için oldukça zararlı bir maddedir ve oluşan bu MDA hücre membranlarındaki iyon değişimine etki ederek geçirgenliğin bozulması, DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik bir karekter kazanması gibi pek çok olumsuz etkilere sahiptir (10).

Hücre dışı bir antioksidan olan serüloplazmin süperoksit radikallerini nötralize ederken, aynı zamanda serbest oksijen radikallerini kendisine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici bir etkiye de sahiptir (3).

Serüloplazmin bu etkisini yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçlarla da desteklemektedir. Uygulama grubunda 1. ve 2. haftada MDA miktarında saptanan artışlara karşılık, serüloplazminde de her iki haftada düzenli artışlar gözlenmiştir ve bu gözlenen artışlar istatistiki bakımdan da anlamlı bulunmuştur.

Hücre içi bir antioksidan olan glutatyon, çok önemli bir antioksidan olmasının yanında ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesinde de görev alan bir maddedir. Glutatyon ve glutatyon peroksidazın yeterli aktivitelere sahip olmaları durumunda, bu hücrelerin ksenobiyotiklere ve oluşabilecek olası serbest radikallere karşı dirençleri artmaktadır. Eğer hücre içi aktivasyonlarında bir zayıflık var ise, hücre membranlarındaki poliansatüre yağ asitleri, serbest yağ asitleri tarafından daha kolay oksitlenip patolojik değişmelere maruz kalabileceklerdir (19).

Glutatyon antioksidan aktivitesini ortamdaki mevcut serbest radikallerle birleşip hücrenin oksidatif hasarını engelleyerek gösterirken diğer taraftan ise proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutarak, protein ve enzimlerde oluşabilecek inaktivasyonu engelleyerek göstermektedir (3).

Sunulan çalışmada hem bir antioksidan olan hem de biyotransformasyon mekanizmasında rol üstlenen glutatyon miktarlarındaki değişimler istatistik açıdan anlamlı bulundu.

Yapılan araştırmada, deneme öncesi kontrol amaçlı elde edilen antioksidan vitaminlerin verilerine göre, karşılaştırmalı olarak yapılan 1. ve 2. hafta analiz sonuçlarının istatistik analizlerinde, β -karoten miktarlarında gözlenen değişikliklerin (kontrol $38.643 \pm 5.724 \mu\text{g/dl}$, 1.hafta $43.551 \pm 1.818 \mu\text{g/dl}$ ve 2. hafta $57.855 \pm 2.953 \mu\text{g/dl}$) $p < 0.05$ düzeyinde bir önem arzettiği saptandı. Yine kontrol verilerine kıyasla vitamin A' da gözlenen değişimler (kontrol $28.986 \pm 2.186 \mu\text{g/dl}$, 1.hafta $30.396 \pm 1.845 \mu\text{g/dl}$ ve 2. hafta $56.218 \pm 0.892 \mu\text{g/dl}$) istatistik bakımdan $p < 0.001$ seviyelerinde bir anlam ifade etti (Tablo 2).

Yapılan çalışmada, antioksidan vitaminlerde gözlenen bu değişimler, olası serbest radikal ataklarından kaynaklanabilir. Bu da serbest radikallerin antioksidan savunma mekanizmalarını aşacak şekilde fazla oluştuklarını göstermektedir. Çünkü serbest radikallerin metabolizma üzerindeki zararlı etkileri bu mekanizmanın aşılması sonucunda şekillenmektedir.

β -karoten ve retinol antioksidan aktivitesini serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ve ortamdaki radikalleri toplayarak gerçekleştirmektedir (1).

Serbest radikaller pek çok hastalığın patogenesinde oldukça önemli rol oynarlar. Çoğu hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Ancak gözlenen bu artışın hastalığın bir sebebi mi yoksa sonucu olarak mı meydana geldiği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Sonuç olarak, bleomisin bildiren bir komplikasyonu olarak şekillenen akciğer fibrozisinde, lipid peroksidasyon ürünü malondialdehitte, antioksidan elemanlar glutatyon ve seruloplazminde, antioksidan vitaminler β -karoten ve retinolde gözlenen değişimler, hücrelerde oksidatif strese bağlı olarak dejenerasyonların şekillenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aalt B, Haesen RM, Doelman JA (1991): Oxidants and Antioxidants, State of Art., Am., J., Med., 91, 3-13.
2. Akgül A (1997): Tıbbi Araştırmalarda İstatistik Analiz Teknikleri, Yüksek Öğretim Kurulu Matbaası, Ankara.
3. Akkuş İ (1995): Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
4. Bancroft JD and Cook HJ (1984): Mammal of Histological Techniques, Livingstone C., New York.
5. Beutler E, Duran O, Kelly BM (1963): Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. J. Lab. Clin. Med., 61: 882-888.
6. Byung PY (1994): Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species, Physiol. Res., 74, 139-72.
7. De Zuwart LL, Meerman JN, Commendeur JM (1999): Biomarkers of Free Radical Damage Application in Experimental Animals and Human, Free Radical Biol. Med., 26, 202-26.
8. Doerr-Stevens JK, Liu J, Stevens GJ (1999): Induction of Cytochrome P-450 Enzymes After Repeated Exposure to 4-Uinylcyclohexone in B6C3F1 Mice, Drug Metab. Dispos., 27, 281-87.
9. Habib MP, Lackey DL, Lentz RC, Sobonya RE, Grad R, Earnest DL, Bloom JW (1993): Vitamin A Pretreatment and Bleomycine-Induced Rat Lung Injury, Research Commun Chem Pathology Pharmacol, 81,199-208.

10. Moslen MT (1994): Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phatogocytosis, Free Radicals in Diagnostic Medicine, Ed. D Armstrong, 1-15, Plenum Press, New York.
11. Özdem SS, Şadan G (1994): Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu ve Klinik Açısından Önemi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak. Derg. XI, 1, 63-71.
12. Özkan A ve Fışkın K (2004): Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidant Enzimler, Türk Hematolojisi-Onkolojisi Derg.,1, 4, 52-61.
13. Özyurt H, Sögüt S, Kart L (2004): Unhibitory Effect of Caffeic Acid Phanethyester on Bleomycine-Induced Lung Fibrosis in Rats, Clinica Chimica Acta, 339, 1-2, 65-75.
14. Ravin, HA (1956): Lancet, 1: 726. Alındı: Yenson M (1986): Klinik Biyokimya Ders Notları. Beta Yayın Ltd. Şti. İstanbul.
15. Rosenfeld ME (1998): Inflammation, Lipids and Free Radicals: Lessons Learned from the Atherogenic Process, Semin Repord. Endocrinal, 16, 249-61.
16. Sinclair AJ, Barnett AH and Junec J (1990): Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease, British J. Hospital Medicine, 43, 334-44.
17. Suzuki I, Katoh N (1990): A Simple and Cheap Method for Measuring Serum Vit. A in Cattle Using Only a Spectrophometer. Jpn. J. Vet. Sci., 52: 1281-1283.
18. Şan M (2002): Türk Kardiyoloji Derneği, Lipid Çalışma Derneği, Çukurova Üniv. Tıp Fak. Kardiyoloji ABD, Adana.
19. Yagi K (1994): Lipid Peroxides in Hepatic, Gastrointestinal and Pancreatic Disease, Free Radicals in Diagnostic Medicine, Edit. Armstrong D, Plenum Press, New York.