

Ratlarda Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde Mannitolün Karaciğer Glutasyon Metabolizmasına Etkisi: Sintigrafik Çalışma

THE EFFECT OF MANNITOL ON LIVER GLUTATHIONE METABOLISM IN EXPERIMENTAL CHRONIC OBSTRUCTIVE JAUNDICE: A SCINTIGRAPHIC STUDY

Mehmet Hakan ÇEVİKEL¹, Gökhan İÇÖZ², Funda YILMAZ³, Yusuf DUMAN⁴, Yıldırım YÜZER²

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, Aydın

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, İzmir

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, İzmir

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp AD, İzmir

ÖZET

Amaç: Kronik tıkanma sarılığı modelinde karaciğer glutasyon rezervleri ve mannitol uygulamasının buna olan etkilerini araştırmak.

Durum Değerlendirmesi: Karaciğer, tıkanma sarılığında en çok zarar gören organlardan biridir ve glutasyon rezervleri olumsuz etkilenmektedir. Tıkanma sarılığında karaciğerin oksidatif kapasitesini ve durumunu saptamak için invazif olmayan bir yöntem mevcut değildir.

Yöntem: 29 albino Wistar erkek rat randomize olarak dört gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol grubu, Grup 2 Sham operasyonu grubu idi. Grup 3 ve 4'te ise kronik kolestaz ana safra kanalı çift bağlanıp kesilerek sağlandı. Postoperatif dönemde 21 gün beklenerek sekonder bilier siroz bulguları oluşturuldu. 4. gruba sarılığın 14. gününden itibaren yedi gün süreyle intraperitoneal mannitol tedavisi uygulandı. Tüm deneklere 21. gün Tc^{99m} ile işaretli glutasyon enjekte edildikten sonra tüm vücut sintigrafileri ve karaciğerler total olarak çıkarıldıktan sonra karaciğer sintigrafileri yapıldı. Sarılığın karaciğer üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla serum bilirubin, alkalen fosfataz ölçümü ve karaciğer dokularında histopatolojik inceleme yapıldı.

Çıkarımlar: Sarılık oluşturulduktan sonra kontrol ve Sham operasyonu grupları hariç tüm deneklerde serum bilirubin, alkalen fosfataz düzeylerinde artış (P<0.001) ve karaciğerde sekonder bilier siroza ait bulgular (p<0.01) gözlemlendi. Mannitol tedavisi histopatolojik hasar üzerine olumlu bir etki göstermemesine rağmen karaciğer glutasyon tutulumunu artırdı (P<0.05).

Sonuçlar: Sonuçlarımız deneysel tıkanma sarılığı modelinde mannitol uygulamasının karaciğer glutasyon rezervlerine olumlu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: tıkanma sarılığı, glutasyon, mannitol

SUMMARY

The effects of mannitol on liver glutathione reserves in an obstructive jaundice model with or without glutathione treatment were investigated. Twenty-nine wistar albino rats were randomized into four groups. Groups 3 and 4 underwent common bile duct ligation while group 1 was reserved as the native control group and group II as the sham operation group. Mannitol was administered to group 4 intraperitoneally for 7 days after 14th day of the

established jaundice. All rats had a follow up period of 21 days. After Tc 99^m signed glutathione injection all subjects underwent whole body scintigraphy and after hepatectomy was carried out all underwent a liver scintigraphy. To evaluate the effect of jaundice on the liver, samples were collected from blood and bilirubin and alkaline phosphatase levels were assessed. Liver tissue was assessed histopathologically. After obstructive jaundice was formed, all subjects, except group 1 and 2, were observed having increased serum bilirubin and alkaline phosphatase levels ($p<0.001$) and having changes according secondary biliary cirrhosis ($p<0.01$). Although mannitol treatment has not revealed any positive effect histopathologically, the liver has increased the glutathione up-take ($p<0.05$). The data of this study on the effect of mannitol injection on liver glutathione reserves in an obstructive jaundice model was confirmed to be affirmative.

Key words: obstructive jaundice, glutathione, mannitol

Ana safra kanalı ligasyonu karaciğer parenkim hasarı ve sekonder bilier siroz gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda hücre içi kalsiyum homeostazı bozulmakta, mitokondriyal hasar ve ATP düzeylerinde azalma olmaktadır. Açığa çıkan serbest oksijen radikalleri de karaciğer parenkim hasarına katkıda bulunmaktadır.^[1] Karaciğer, glutatyonun vücutta en çok bulunduğu organlardan biridir ve daha çok periportal hepatositlerde bulunur.^[2] Tıkanma sarılığı antioksidan enzim aktivitelerinin azalması ile de sonuçlanmaktadır. Karaciğer okside/redükte glutatyon (GSSG/GSH) oranı artmaktadır.^[3]

Mannitolün henüz prospektif çalışmalarla yararı kanıtlanmamış olmasına rağmen tıkanma sarılıklı olgularda preoperatif ve intraoperatif kullanımının postoperatif renal fonksiyonları koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir.^[4,5] Mannitol ayrıca iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı etkiye sahiptir. Bunu da hiperozmolar etkisiyle ödemi çözerek ve serbest oksijen radikallerini indirgeyerek lipid peroksidasyonunu azaltarak sağlamaktadır.^[6-9]

Halen tıkanma sarılığında karaciğerin oksidatif kapasitesini ve durumunu saptamak için invazif olmayan bir yöntem mevcut değildir. Bu çalışmada ratlarda tıkanma sarılığı modelinde karaciğer glutatyon rezervlerini ve mannitolün karaciğer glutatyon rezervlerine olan etkisini sintigrafik olarak araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ağırlıkları 100-150 gram arasında değişen 29 adet erkek albino Wistar rat kullanıldı.

Denekler 4 gruba ayrıldı:

Grup 1: Kontrol (n=7),

Grup 2: Sham operasyonu (n=7),

Grup 3: Tıkanma sarılığı (n=8),

Grup 4: Tıkanma sarılığı + mannitol tedavisi (n=7) şeklindeydi.

Kontrol grubuna hiçbir müdahale yapılmazken, Sham operasyonu grubuna sadece laparotomi ve ana safra kanalı eksplorasyonu, tıkanma sarılığı gruplarına da koledok eksplorasyonu ve ligasyonu uygulandı. 4. gruba postoperatif 14. günden itibaren 7 gün süreyle mannitol 2 ml/gün intraperitoneal olarak uygulandı.

Tüm cerrahi girişimler steril olmayan, ancak temiz şartlarda ve eter anestezisi altında gerçekleştirildi. Laparotomiler orta hat kesisi ile yapıldı. Ana safra kanal ligasyonu 5/0 ipekle, batın kapamaları ise 3/0 ipeklerle yapıldı. Denekler postoperatif 2. saatten itibaren 21 gün boyunca standart yem ve su ile beslendiler.

Sintigrafik çalışma:

Glutatyon, USA Sigma firmasından temin edildi. 20 mg glutatyon 2 ml distile su içinde eritildi. Buna 0.3 mg SnCl₂H₂O (Kalay klorür-hidrojen peroksit) (0.3 ml su içinde) eklendi. 0.5 molar NaOH ile pH 5 olacak şekilde ayarlandı. Karışım 0.22 mm membran filtresinden steril vial içine süzüldü. 500 Mbq Tc^{99m} perteknetat olarak 1-2 ml bu vial e eklendi. Karışım birkaç saniye çalkalandı ve deneklere uygulandı. Postoperatif 21. gün Tc^{99m} ile işaretli glutatyon ortalama 1-1.5 mCi dozunda tüm deneklere intrakardiyak olarak enjekte edildi. 1 saat sonra aktivite dağılımını değerlendirmek için tüm vücut sintigrafileri yapıldı. Glutatyonun karaciğer tarafından up take'i için 6 saat beklendi ve relaparotomiler yapıldı. Karaciğerler total olarak çıkartıldı ve tartıldı. Gamma kamera ile her karaciğerdeki aktivite tutulumu sayıldı. Count olarak gösterildi. Denekler arasındaki ağırlıktan doğan farkları ekarte etmek amacıyla karaciğerde tutulan aktivite, verilen aktivitenin %'si olarak hesaplandı:

Karaciğer aktivite tutuş % = Karaciğer glutatyon uptake'i / verilen net aktivite x100x2*

(*Tc^{99m} glutatyonun yarı ömrü 6 saat olduğu için bulunan değer 2 ile çarpıldı).

Karaciğerler arası ağırlık farkını ekarte etmek için de bulunan değer karaciğer ağırlığına bölünerek 1 g karaciğer dokusu tarafından tutulan aktivite hesaplandı: Karaciğer aktivite tutuluş % / Karaciğer ağırlığı = % aktivite tutuluş / 1 g karaciğer dokusu.

Biyokimyasal analiz:

Denekler eter anestezisi altında tüm kanları karciyak ponksiyon ile alınarak sakrifiye edildiler. Kan örnekleri 3000 devir/dak ile 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Rutin alkale fosfataz (U/L) ve total bilirubin (%mg) düzeyleri çalışıldı.

Histopatolojik değerlendirme:

Karaciğerler rutin doku incelemesine tabi tutuldular. Kesitler hematoksilin eozin ile boyandı. Safra kanalı proliferasyonu, bilier piece meal nekrozu ve bridging nekrozu araştırıldı ve aşağıdaki şekilde derecelendirildi:

- Yok: 0
- Tüm portal alanların %25'inden az ise: +
- Tüm portal alanların %25-50'si ise: ++
- Tüm portal alanların %50-75'i ise: +++
- Tüm portal alanların %75'inden fazla ise: ++++

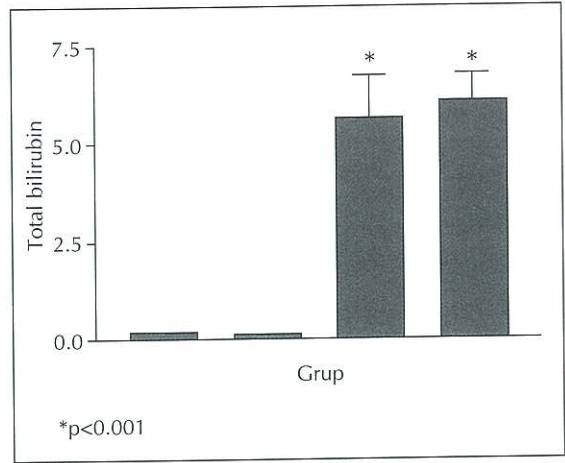
İstatistikî analiz:

Karaciğer glutatyon tutulum seviyeleri, serum alkale fosfataz ve bilirubin düzeyleri açısından gruplar arası tek yönlü varyans analizi ve grupların ikili karşılaştırılması ise Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Histopatolojik değerlendirme sonuçları ise gruplar arası Kruskal-Wallis, grupların ikili karşılaştırılması Dunn çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Tüm testlerde *p* değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

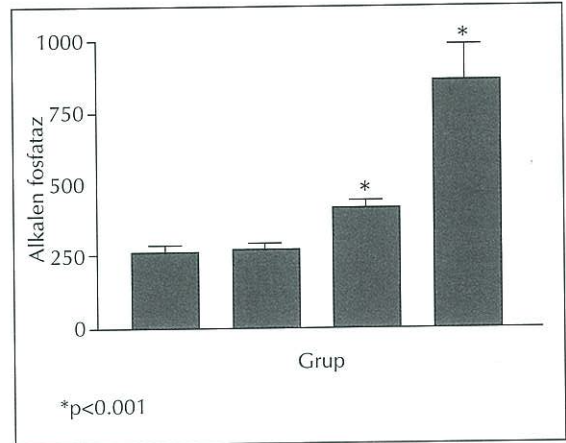
SONUÇLAR

Total bilirubin ve alkale fosfataz ve değerleri kronik tıkanma sarılığı gruplarında, kontrol gruplarına göre daha yüksek bulundu (*p*<0.001), (Grafik 1, 2).

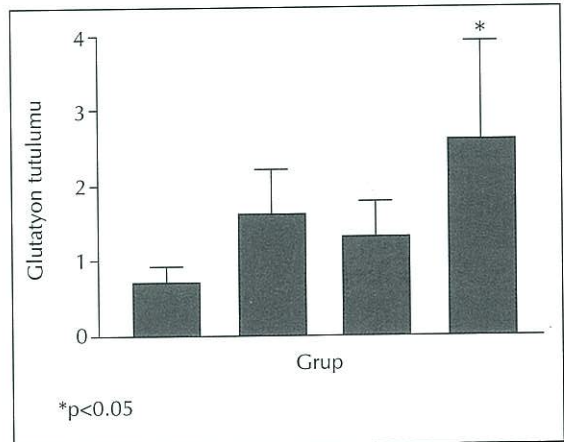
Glutatyon tutulumu (% aktivite tutuluş / 1 g karaciğer dokusu) değerleri açısından mannitol tedavisi uygulanan 4. grupta, 1. gruba (kontrol) ve 3.



Grafik 1. Serum total bilirubin seviyeleri.



Grafik 2. Serum alkale fosfataz seviyeleri.



Grafik 3. Ortalama karaciğer Tc^{99m} tutulum değerleri (%/1 g karaciğer dokusu).

gruba (kronik tıkanma ikteri) göre anlamlı derecede artma saptadık (*p*<0.05), (Grafik 3).

Histopatolojik değerlendirmede ise kontrol ve

Sham operasyonu grupları tamamen normal iken, safra kanalı proliferasyonu, bilier piece meal nekrozu ve bridging nekrozu son iki grupta anlamlı derecede fazla idi ($p<0.01$), (Tablo 1).

Mannitol tedavisinin karaciğer fonksiyon testleri ve histopatolojik hasar üzerine herhangi bir etkisi saptanmadı ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Hücrel glutatyon sitozol ve mitokondri olmak üzere birbirinden metabolik olarak bağımsız iki havuzda bulunmaktadır.^[10] Mitokondri katalaz içermediğinden antioksidasyon işlemi büyük ölçüde glutatyon-glutatyon peroksidaz sistemine bağlıdır. Mitokondriyal glutatyon havuzu önemli bir serbest radikal indirgeyici sistemdir ve mitokondriyi oksidatif stresten korumaktadır.^[11] Ancak mitokondride glutatyon sentezi için gerekli enzimler yoktur ve glutatyonu ATP'ye bağımlı bir mekanizma ile sitozolden almak zorundadır.^[12] Sonuç olarak mitokondriyal glutatyon havuzu mitokondriyal ve hepatoselüler fonksiyon ile yakından ilişkilidir.

Tıkanma sarılığının tedavisinde karaciğer glutatyon metabolizması ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda değişik sonuçlar elde edilmiştir. Singh ve arkadaşları tıkanma sarılığında karaciğer vitamin E ve glutatyon düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir ve ana safra kanalı ligasyonu antioksidan/prooksidan dengenin serbest radikallerin artışı

şı yönüne kayması ile sonuçlanmaktadır.^[13] Benzer şekilde katalaz, sitozolik ve mitokondriyal süperoksit dismutaz, glutatyon S-transferaz, sitozolik ve mitokondriyal glutatyon peroksidaz seviyeleri azalmakta, lipit peroksidasyonu artmaktadır. N-asetilsistein kullanımı lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır ve antioksidan enzim seviyelerini yeterli düzeyde tutmaktadır.^[14]

Baron ve arkadaşları da tıkanma sarılıklı ratlarda karaciğerde lipit peroksidasyonunun belirgin olarak arttığını, vitamin E ve troloksun bunu belirgin derecede azalttığını göstermişlerdir. Bunun sonucu olarak okside glutatyon oranı, karaciğer ve kan total glutatyon düzeyleri artmaktadır. Araştırmacılar bunun glutatyonun *de novo* sentezindeki artışa bağlı olarak gerçekleştiğini belirtmektedir.^[15] Tıkanma sarılıklı hastalarda eritrositlerin oksidatif kapasitesi azalmakta, özellikle eritrosit glutatyon, süperoksit dismutaz katalaz seviyelerinde belirgin düşme görülmektedir. Bu bulgular sarılığın tedavisi ile normale dönmektedir.^[16] Benzer şekilde karaciğer glutatyon düzeylerinin saptanması da tıkanma sarılığının karaciğerde yapmış olduğu oksidatif hasarı göstermek bakımından yararlı olabilir.

Ancak yukarıdakilere zıt olarak, Hirota ve arkadaşları ise deneysel geriye dönüşlü bilier obstrüksiyon modelinde koledok ligasyonu ile plazma bilirubin seviyelerindeki artışa paralel olarak karaciğer glutatyon düzeylerinde artış olduğunu, sarılıklı

Tablo 1. Tıkanma sarılığı gruplarında histopatolojik bulgular

Denek	*Safra kanal proliferasyonu		*Piece meal nekrozu		*Bridging nekrozu	
	TS	TS+M	TS	TS+M	TS	TS+M
1	++++	++++	+++	+++	++	+++
2	+++	++++	+	+++	+	+++
3	++++	++++	+++	+++	+++	+++
4	++++	++++	+++	+++	++	+++
5	++	+++	+	+++	+	++
6	++++	+++	+++	++	+++	++
7	++++	++++	+++	+++	+++	+++
8	++++		+++		+++	

TS: Tıkanma sarılığı, TS+M: Tıkanma sarılığı+Mannitol

* Kontrol gruplarıyla karşılaştırma $p<0.01$

rekanalize edildiğinde ise glutasyon düzeylerinin önce azaldığını, sonra normale döndüğünü göstermişlerdir. Yine intravenöz olarak bilirubin enjeksiyonu yapıldığında doza bağımlı olarak karaciğer glutasyon seviyelerinde artış olmaktadır. Bunu, artmış bilirubin düzeylerinin glutasyonun hepatik sekresyonunu azaltmasına bağlamışlardır.^[17]

Bizim çalışmamızda karaciğer glutasyon düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmemesine rağmen histopatolojik olarak karaciğerde belirgin parenkimal hasar varlığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak karaciğer glutasyon seviyelerinin azalmış olması gerektiğini düşünüyoruz. Çalışmamızda herhangi bir tedavi uygulamadığımız 3. grupta Tc^{99m} ile işaretli glutasyonun karaciğer tarafından tutulmasında azalma saptamış olmamıza rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Mannitol özellikle iskelet kası ve karaciğerde iskemik reperfüzyon hasarını azaltıcı rol oynamaktadır.^[18] Mannitolün deneysel tıkanma sarılığında karaciğer Kupffer hücre fonksiyonlarını da olumlu etkilediği ve karaciğer parenkimindeki anti-ödem etkisiyle tıkanma sarılığındaki hücresel hasara olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.^[19] Tıkanma sarılığında karaciğer hücre mitokondrilerinde ödem ve kristalarda distorsiyon olmaktadır. Aynı zamanda serbest oksijen radikallerinden hidroksil radikali üretimi de artmaktadır. Mannitol tedavisi mitokondrilerdeki ödemi azaltarak hidroksil radikali oluşumunu belirgin derecede önlemektedir.^[20] Biz de mannitol tedavisi uyguladığımız grupta Tc^{99m} ile işaretli glutasyonun karaciğer tarafından tutulmasında anlamlı bir artış saptadık. Bunun da mannitolün ödemi ve serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltıcı etkisi sonucu olduğunu düşünüyoruz.

Bütün bu çalışmalarda tıkanma sarılığında karaciğer glutasyon düzeylerinin azaldığı, lipid peroksidasyonunun ve mitokondriyal oksidatif stresin arttığı, karaciğer glutasyon düzeyleri direkt olarak doku homojenizatlarında çalışılarak gösterilmiştir. Bu yöntemin hastalarda uygulanması teknik açıdan oldukça zor olduğundan, biz bu çalışmada klinikte uygulanabilirliği açısından glutasyonu Tc^{99m} ile işaretleyerek karaciğer glutasyon metabolizmasını araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda karaciğerdeki tıkanma sarılığına bağlı bulguları histopatolojik olarak kanıtladık. Basit obstrüksiyon grubunda glutasyon up take'inde hafif bir azalma olduğunu gösterdik. Mannitol uygulanan obstrüksiyon grubunda glutasyon up take düzeyleri kont-

rol ve tıkanma sarılığı gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Mannitol tedavisinin de karaciğer hücrelerinde ödem ve oksidatif hasar azaltılması sonucunda glutasyon rezervlerini artırarak yararlı olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Pathophysiology of liver disease, mechanism of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000; 4:357-385.
2. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens, M. The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:715-744.
3. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000; 33:742-750.
4. Gubern JM, Sancho JJ, Simo J, Sitges-Serra A. A randomized trial on the effect of mannitol on postoperative renal function in patients with obstructive jaundice. *Surgery* 1988; 103:39-44.
5. Govil D, Anand AC, Mishra MC, Kapur BM, Tandon RK. Renal functions in obstructive jaundice: a pre and post operative assessment. *J Assoc Physicians India* 1993; 41:151-153.
6. Magovern GJ, Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation* 1984; 70:191-195.
7. Smithen C, Christodoulou J, Killip T, Brachfeld N. Metabolic and hemodynamic consequences of mannitol following myocardial anoxia. *Am J Physiol* 1975; 229:847-852.
8. Vander Heide RS, Sobotka PA, Ganote CE. Effects of the free radical scavenger DMTU and mannitol on the oxygen paradox in perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19:615-625.
9. Wickens DG, Atkins LG, Fuller BJ, Hobbs KEF, Dormandy TL. Free radicals in hypothermic rat heart preservation-prevention of damage by mannitol and desferrioxamine. *Free Radic Res Commun* 1987; 4:195-198.
10. Massini A, Galesi D, Giovanni F, Trenti T, Ceccarelli D. Membrane potential of hepatic mitochondria after acute cocaine administration in rats. The role of mitochondrial reduced glutathione. *Hepatology* 1997; 25:385-390.
11. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4668-4672.
12. Martensson J, Meister A. Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione

- and is prevented by giving glutathione monoesters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 471-475.
13. Singh S, Shackleton G, Ah Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the bile duct ligated rat. *Gastroenterology* 1992; 103:1623-1629.
 14. Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997; 27:363-370.
 15. Baron V, Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:173-180.
 16. Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Haematologia (Budap)* 2000; 30:91-96.
 17. Hirota M, Sugi K, Inoue M. Dynamic aspects of glutathione metabolism in obstructive jaundice. *J Gastroenterol* 1994; 29:588-592.
 18. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postischaemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8:326-331.
 19. Çoker A, Çoker İ, Hüseyinov A, Sökmen S, Karademir S. Is mannitol effective against platelet-activating factor (PAF)-induced liver damage in obstructive jaundice? *Hepatogastroenterology* 2001; 48:1134-1137.
 20. Tsai LY, Lee KT, Liu TZ. Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:732-737.

KATKIDA BULUNANLAR

Çalışmanın düşünülmesi ve planlaması:

Dr. Yıldırım Yüzer, Dr. Hakan Çevikel

Verilerin elde edilmesi:

Dr. Yıldırım Yüzer, Dr. M. Hakan Çevikel,
Dr. Funda Yılmaz, Dr. Yusuf Duman

Verilerin analizi ve yorumlanması:

Dr. Yıldırım Yüzer, Dr. Hakan Çevikel

Yazının kaleme alınması:

Dr. Hakan Çevikel, Dr. Gökhan İçöz

İstatistik değerlendirme:

Dr. Yıldırım Yüzer

YAZIŞMA ADRESİ

M. Hakan ÇEVİKEL

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı, 09100 Aydın

Telefon: 0256- 212 35 52

Faks: 0256- 212 01 46

E-posta: cevikelh@superonline.com