

Tıkanma Sarılığı ve Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)

OBSTRUCTIVE JAUNDICE AND PLATELET ACTIVATING FACTOR (PAF)

Dr. Ahmet ÇOKER*, Dr. Işıl ÇOKER****, Dr. Eray KARA**,
Dr. Sedat KARADEMİR*, Dr. Afig HUSEYİNOV***, Dr. İbrahim ASTARÇIOĞLU*

(*) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (**) Genel Cerrahi ABD, (***) Çocuk Sağlığı ve Hast. ABD, (****) SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, İZMİR

ÖZET

Amaç : Bu çalışmada tıkanma sarılığında periferik kan lökositleri ile Kupffer hücrelerinin in vivo spesifik uyarıya karşı sentezlediği ve salgıladığı PAF düzeylerinin farklılığı araştırılmıştır.

Durum Değerlendirmesi : Son yıllarda tıkanma sarılığında enflamatuvar reaksiyonların oluşmasında fosfolipidlerden oluşan yeni enflamatuvar mediatörlerin rolü tartışılmaktadır. Bu mediatörlerin başında immunolojik veya nonimmunolojik uyarılma sonucu sentezlenen ve salınan trombosit aktive edici faktör (PAF) yer almaktadır.

Yöntem : 7 denekten(rat) oluşan kontrol, sham, sarılık ve mannitolu sarılık gruplarında karaciğer biyopsisi ve plazma örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerde HPLC ile pürifikasyon sonrasında RIA yöntemi ile PAF düzeyleri ölçülmüştür.

Çıkarımlar : Sarılıklı ve mannitol verilmiş sarılıklı grupta saptanan doku ve plazma PAF düzeyleri kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Mannitol grubunda düzeyler mannitolsüz sarılıktan daha düşüktür.

Sonuç : Bu çalışmanın sonucu, mekanik tıkanma sarılığı nedeni ile opere edilecek veya tedavi uygulanacak hastada immun inflamasyonun olduğu, preoperatif dönemde bunun baskılanmasının girişim sonrası seyri düzeltilebileceğidir. Mannitol bir baskılama aracı olabilir.

Anahtar kelimeler : PAF, sarılık, karaciğer, mannitol

SUMMARY

Platelet Activating Factor (PAF), is a unique phospholipid with a broad range of biological activities that may be relevant in the development of inflammatory reactions. PAF has been suspected to play an important role in liver pathophysiology. In this study, in experimental jaundice model, PAF levels were measured in liver tissue and plasma and possible effect of mannitol on this mediator. The experimental model consisted of 7 rats of control group (CG), 7 rats of sham operation (SG), and 7 rats of obstructive jaundice created by ligating common bile duct. The last group was mannitol treated jaundiced group (MJG) and all animals in this group received 20% mannitol in dose of 2 ml/day, intraperitoneally, following common bile duct ligation. A week later all animals were sacrificed and collected plasma and liver tissue samples. PAF levels were measured by radioimmunoassay technique. Liver tissue PAF levels (pg/mg tissue protein) were 72 ± 18 in the CG, 183 ± 51 in JG, 84 ± 17 in SG, and 124 ± 36 in MJG. Plasma levels were 460 ± 13 , 1600 ± 40 , 560 ± 19 , and 1200 ± 23 in same order respectively. In both sample types, MJG and JG values are significantly different from CG and SG as well. MJG levels are also different from JG. These results showed that plasma and liver tissue PAF levels are increased in experimental obstructive jaundice; and activation of this mediator contribute

to the ongoing liver injury. Mannitol may improve or lesser this damage.

Keywords : PAF, jaundice, liver, mannitol

Son yıllarda tıkanma sarılığında enflamatuvar reaksiyonların başlatılması ve skar oluşumuna kadar ilerleyen süreçte, Kupffer hücreleri veya endotel hücrelerinin membran yapısında yer alan fosfolipidlerden oluşan enflamatuvar mediatörlerin rolleri vurgulanmaktadır. Bu mediatörlerin başında immunolojik veya nonimmunolojik uyarılma sonucu sentezlenen ve salınan, 1-0-alkil-2-asetil-sn-glişero-3-fosfokolin kimyasal yapısında olan ve hücre aracılığı ile yayılan sinyal transmisyonundan sorumlu olan trombosit aktive edici faktör (PAF) yer almaktadır (1,2,3).

Tıkanma sarılığının veya endotoksinin uyarımı sonucu bir yandan kompleman aktivasyonu ve polimorfonükleer lökositlerin (PNL) kemotaksisi, diğer yandan karaciğer parankimine infiltre olan PNL'ler nedeni ile endotel hücrelerden PAF ve diğer enflamasyon mediatörleri salınımı başlar (3). Enflamasyon zincirinin devamı ile PNL'ler, lizozomal enzimleri ile bakterileri öldürürken, konakçıya zararlı olacak süperoksit radikalleri de ortama salarlar (3,4,5,6). Hücre ölümü sonrasında ortaya çıkan toksik enflamatuvar ajanlar parankime yayılarak hasarı daha da arttırırlar. Kültür ortamında da Kupffer ve endotelial hücrelerinden salınan PAF'ın, hepatik sinusoidal ve parankimal hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştırdığı gösterilmiştir (4).

Sonuç olarak karaciğer parankim hasarlanmasının oluşumunda enflamasyon zincirinin çalışmaya başlaması ile PNL kemotaksis ve aktivasyonu sonrasında, başta PAF olmak üzere çeşitli mediatörlerin sentez ve salınımının anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada; tıkanma sarılığında kan lökositleri ile Kupffer hücrelerinin in vivo spesifik bir uyarı olan tıkanma sarılığına karşı sentezlediği ve salgıladığı PAF düzeylerinin farklılığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada 6 haftalık ve ortalama ağırlıkları 118.46 ± 1.72 gr arasında değişen 21 Sprague – Dawley türü erkek rat kullanılmıştır. Tüm denekler standart yem ve su ile beslenmiş,

cerrahi girişim öncesinde bir gece aç bırakılmışlardır.

Deney ve gruplar :

Grup 1 (Sarılık - SG) (n = 7): Bu gruptaki ratlarda eter anestezisi sonrasında orta hat kesisi ile girişim yapılmış, daha sonra koledok kanalı bağlanıp kesilerek tıkanma sarılığı oluşturulmuştur.

Grup 2 (Sham – ShG) (n=7) : Bu grupta ise laparotomi sonrasında koledok kanalı disseke edilip aşkıya alınmış, daha sonra tekrar serbest bırakılarak karın kapatılmıştır.

Grup 3 (Kontrol – KG) (n=7): Kontrol grubu olan 3.grupta ise normal koşullarda beslenen 7 rat kullanılmıştır.

Grup 4 (Mannitol – MG)(n=7): Dış safra yolu bağlandıktan sonra 2 ml/gün %20 mannitol intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Deney yapıldıktan bir hafta sonra tüm ratlar, eter anestezisi ile uyutularak sakrifiye edilmişlerdir. Orta hat kesisi ile karın ve göğüs boşlukları açılarak intrakardiyak 2 ml. heparinli kan alınmıştır. Kan örnekleri +4 °C ve 1500 g'de 5 dakika süre ile santrifüje edilerek plazmaları ayrılmıştır. Karaciğer dokusundan da 1 cm³ kadar biyopsi örnekleri alınmış ve tampon solusyonu (PBS = Phosphate buffer saline) içinde korunarak, kan örnekleri ile -70 °C 'lik derin dondurucuda laboratuvar çalışmasına kadar saklanmışlardır.

Karaciğer dokusunda ve plazmada PAF ölçümü:

Dokular ve kan örnekleri Amberlit XAD-2 kolonları ile ayrıldıktan sonra yüksek basınçlı likid kromatografi - HPLC (Waters 625 LC system MA, USA) ile pürifiye edilmiştir. Her örnekten elde edilen kuru ekstrakt, 20 µl asetonitril / metanol / fosforik asit (130: 5: 1.5) karışımında çözüldükten sonra Silasorb Si 60 5u analitik kolona (250x2.0 mm ID Alltech, USA) enjekte edilmiştir. Akış hızı 0.2 ml / min, dalga boyu UV detektörde 210 nm dir Elusyon ve retansiyon zamanları sentetik 1 – 0 – hexadecyl – 2 – 0 –

TABLO 1: DENEYDE ELDE EDİLEN DOKU VE PLAZMA PAF DÜZEYLERİ

Rat	K/PI	K/D	Sh/PI	Sh/D	S/PI	S/D	M/PI	M/D
1	440	64	528	76	1538	172	1234	142
2	412	58	512	78	1586	178	1218	114
3	584	88	648	92	1656	190	1090	124
4	518	82	644	96	1698	206	1200	136
5	468	74	584	86	1616	190	1166	112
6	426	62	504	72	1546	178	1310	106
7	372	76	500	88	1578	166	1188	134
Ortalama	460±13	72±18	560±19	84±17	1600±40	183±51	1200±23	124±36

Değerler pg/mg doku protein ve pg/ml olarak verilmiştir (K:kontrol, Sh:Sham, S: Sarılık, M: Mannitol gruplarını göstermektedir.

acetyl – sn – glycerol - 3 - phosphocholine kullanılarak saptanmıştır. HPLC eluatları 16-18 dakikalar arasında UV detektör çıkışından toplanıp, kuruyuncaya kadar likit nitrojen altında evapore edilmiş, RIA prosedürü ile analiz edilinceye kadar tekrar -70 °C de saklanmıştır.

PAF RIA Prosedürü: Kurutulmuş örneklerden kantitatif PAF ölçümü spesifik PAF (3H) scintillation proximity assay kit (TRK-990, Amersham Life Science, UK) kullanılarak yapılmıştır. Analizden önce tüm örnekler kit working assay buffer ile çözülüp vortex edilmiştir. Tüm örnekler çift çalışılmıştır. PAF ölçümü RIA kiti ile içinde bulunan prosedüre göre yapılmıştır. Reaksiyon sonunda oluşan serbest 3H işaretli PAF ölçümleri likit sintilasyon sayacında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar pg/mgdoku olarak değerlendirilmiştir.

İstatistik analizler "t test" kullanılarak yapılmış, $p < 0.001$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

SONUÇLAR

Karaciğer dokusunda ölçülen ortalama PAF düzeyleri (pg/mg doku protein) kontrol grubunda 72 ± 18 iken, sarılıklı grupta 183 ± 51 , sham grubunda ise 84 ± 17 olarak bulunmuştur. Mannitol grubunda bu değer 124 ± 36 'dir.

Plazma düzeyleri ise aynı sıra ile gruplarda 460 ± 13 , 1600 ± 40 , 560 ± 19 ve 1200 ± 23 olmuştur. Sarılıklı grupve mannitol grubunda saptanan doku ve plazma PAF düzeyleri kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Mannitollu ve mannitolsuz sarılık gruplarının değerleri de anlamlılık derecesi daha az olmak üzere ($p <$

0.005) birbirinden farklıdır.

Gruplarda saptanan PAF düzeyleri Tablo 1'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

TARTIŞMA

PAF başta lökositler olmak üzere RES hücrelerinin ve mast hücreleri ile eosinofil lökositlerin membranlarından salgılanan güçlü bir otakoid medyatör olup immün reaksiyonun ve inflamasyonun tüm aşamalarına etkisi gösterilmiştir (2,3,4). Karaciğerdeki PAF'ın Kupffer hücrelerinden salındığı ancak hepatositler üzerine de etkili olduğu, ayrıca leukotrien (LT) metabolizmasını indükleyerek inflamasyonu başlattığı in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (7,8,9). Hepatositlerle karşılaşan eksojen [3H]alkyl-PAF, hızla [3H]lyso-PAF haline dönüşür ve ilk beş dakika içinde plazma membranının dış yüzeyinde hızla miktarı yükselir. Çok az bir kısmı hücre içine girer ve aktif değildir. İn vitro olarak da kanıtlanan bu bulgu, PAF'ın ortama salındığını veya ortamda bulunduğunu, ölçülen PAF'ın da aktif PAF olduğunu göstermektedir. Yapısal PAF antagonistleri de hepatositlerden salgılanan PAF'ı bloke ettiği ve ortamda hiç PAF kalmadığının gösterilmesi de (8,9) hepatositlerin spesifik olarak PAF ile ilişkisinin kanıtıdır. Köken olarak ayrıca endotel hücresi ve makrofajlardan salgılanabilir. Ancak seçkin PAF reseptörleri hepatosit yüzeyinde olmayıp sadece Kupffer hücrelerinde gösterilmiştir (9,10). Bu bulgular, PAF'ın hepatosit kaynaklı olduğu ve Kupffer hücresine etki etmek üzere programlandığını kanıtlamaktadır. Metabolik bu ilişki, normal ve sarılık gibi patolojik olaylarda değişiklikler gösterir.

LTB4 ve peptid LT'ler PAF etkisi ile ortaya çıkar ve birbirlerinin etkisini güçlendirirler. Hüseyinov ve ark. nın daha önceki çalışmalarında infeksiyöz ve immün inflamatuvar reaksiyonlarda LTB4 salgılandığı, bu salgılanmanın immün olaylarda PAF etkisi ile olduğu gösterilmiştir. Bu aynı zamanda peptid LT salınımının da nedenidir. LTB4 ve PAF ikisi birden çok güçlü kemotaktik etki gösterirler. İnfiltrate olan lökositler de, başta nötrofil ve makrofaj olmak üzere ya degranule olarak ya da PAF'ın yaptığı gibi hücre içinde aktive olarak hücre hasarına neden olurlar.

Enfeksiyonlu hastalarda da sentezlenen PAF'ın önemli miktarı hücre içinde kalmaktadır. PAF'ın önemli miktarının hücre içinde kalması diğer intakt hücrelerin ve mikrovasküler yatak endotel hücrelerinin hasarlanmasına neden olabilir. Bu da inflamatuvar reaksiyonun süregelmesine neden olan faktörlerden birisidir. Bu nedenle tıkanma sarılığında lökositler ve Kupffer hücrelerinin membran fonksiyonlarının bozulduğu, hepatositten salınan PAF artışı ile Kupffer hücresi üzerine etki ile ortaya çıktığı söylenebilir. Tıkanma sarılığında karaciğerde olan metabolik değişikliklerin de başlangıcı PAF ve indüklediği inflamasyon olabilir. Bizim çalışmamızda karaciğer hücre dokusunda PAF düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunması, tıkanma sarılığında karaciğerde immün bir inflamasyonun meydana geldiğini düşündürmektedir.

Nitekim Chao ve ark, karaciğer zararlanması ve yangısında PAF'ın major otakoid sinyal yanıtlarında önemli rol oynadığını kanıtlamışlardır (10). Zhou ve Chao, bir haftalık tıkanma sarılıklarında dokuda normalin 6 misli PAF konsantrasyon artışı olduğunu, serumda ise bunun değişmediğini göstermişlerdir (10,14). Bu yazarlar, PAF'ın lokal üretimini sorumlusu olarak da Kupffer hücresi ile, portal endotoksin ilişkisini göstermektedirler. O halde çalışmamızda ölçülen PAF düzeyleri, karaciğer dokusu için Kupffer hücresi kaynaklı, serum için endotel ve makrofaj kaynaklıdır.

O zaman tıkanma sarılıklarında olası karaciğer doku zararlanmasında PAF antagonistlerinin yararlı olacağı düşünülebilir. Ancak teorik olarak olası gözükken bu düşünce deneysel olarak kanıtlandığı gibi (9) in vivo ortamlarda gerçekleşmemektedir. Verilen antagonistler PAF reseptörleri yerine periferde yer alan benzo-diazepin reseptörleri tarafından yakalanmakta ve etkisi azalmaktadır. Bu nedenle PAF antagonistlerinden ancak selektif olanları veya

bu etkiyi başka mekanizmalarla önleyen mannitol gibi ajanları kullanmak (11) daha doğru olacaktır. Mannitolun buradaki etki mekanizması glutasyon rezervlerini zenginleştirmek olabilir. Glutasyonun hepatositleri peroksidatif zararlanmadan koruduğu daha önce gösterilmiştir (12). Mannitolun ayrıca bilindiği gibi; iskemi – reperfüzyon ya da infeksiyon gibi etkenlerle ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri üzerine scavenger etkisi bulunmaktadır (16,17,18). Bu etkilerini hücre şişmesini engelleyerek "no-reflow" fenomeni ile ya da "potentistatic" mekanizma ile yapmaktadır. Ayrıca Meade ve ark (15) akut bilier tıkanmalarda karaciğer hasarının daha çok iskemi reperfüzyon benzeri olduğunu, kronik tıkanmalarda ise inflamatuvar mekanizmaların daha geçerli olduğunu göstermiştir (15).

Bu çalışmanın kliniğe uyarlanabilecek sonucu ise, mekanik tıkanma sarılığının nedeni ile opere edilecek veya tedavi uygulanacak hastada immün inflamasyonun olduğu, preoperatif dönemde bunun baskılanmasının girişim sonrası seyri düzeltebileceğidir.

KAYNAKLAR

1. *Comprehensive Surgery- J. Am. Coll. Surg. Fall 1994, Chapter 11*
2. *Hagmann W, Hacker HJ, Buchholz U, Resident mast cells are the main initiators of anaphylactic leukotriene production in the liver, Hepatology, 1992; 16(6): 1477-1484.*
3. *Masaki N, Ohta Y, Shirataki H, et al, Hepatocyte membrane stabilization by Prostaglandins E1 and E2 : Favorable effects on rat liver injury, Gastroenterology, 1992; 102 : 572-576.*
4. *Tran-Thi TA, Cyufko K, Henninger H et al, Studies on synthesis and degradation of eicosanoids by rat hepatocytes in primary culture, J of Hepatology, 1987; 5 : 322-331.*
5. *Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P, Platelet Activating Factor(PAF) A Review of its effects, Antagonists and possible future clinical implications (Part I), Drugs, 1991; 42 (1) : 9– 29.*
6. *Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P, Platelet Activating Factor(PAF) A Review of its effects, Antagonists and possible future clinical implications (Part II), Drugs, 1991; 42 (2) : 174 – 204.*
7. *Noda S, Masumi S, Moriyama M, Kannan Y, Ohta M, Sugano T, Yamate J, Population of hepatic macrophages and response of perfused liver to PAF during production of thioacetamide*

- induced cirrhosis in rats, *Hepatology* 1996; 24 (2): 412 – 418.
8. Svetlov SI, Howard KM, Miwa M, Flickinger BD, Olson MS, Interaction of PAF with rat hepatocytes : uptake, translocation, metabolism, and effects on PAF – acetylhydrolase secretion and protein tyrosine phosphorylation, *Arch – Biochem – Biophys.* 1996 Mar 1 ; 327 (1) : 113 – 22.
 9. Svetlov SI, Barton JM, Olson MS, The specific binding of the PAF receptor antagonist WEB 2086 and benzodiazepine flunitrazepam to rat hepatocytes, *Life Sci*, 1996; 58 (5) : PL 81 – 6.
 10. Chao W, Olson MS, PAF : receptors and signal transduction, *Biochem J*, 1993 Jun 15; 292 (Pt 3) : 617 – 629.
 11. Coker A, Coker I, Huseyinov A, Yuceyar H, Kara E, Sökmen S, Karademir S, Astarcioglu İ, The role of PAF in obstructive jaundice model, *Americas HPB Congress –99 Ft. Lauderdale FL, USA Abstract Book.*
 12. Çevikel H, Yüzer Y, Çoker A, Yılmaz F, Kılıç M, Mitochondrial glutathion metabolism and effects of somatostatin and mannitol on glutathione mechanism in an experimental obstructive jaundice model, *2nd world Congress of the International HPB Association, Bologna, Italy 1996, Abstract book.*
 13. Svendsen P, Hau J eds, *Handbook of Laboratory Animal Science Vol II, Ch 16, pp:229-270, CRC Press, BocaRaton, FL, USA, 1994.*
 14. Zhou W, Chao W, Levine BA, Olson MS, Role of Platelet- activating factor in hepatic responses after bile duct ligation in rats, *Am J Physiol*, 1992, 263 (5Pt1) : G587-592.
 15. Meade CJ, Birke F, Metcalfe S, Watson C, Jamieson N, Neid C, Serum PAF-acetylhydrolase in severe renal or hepatic disease in man : relationship to circulatory levels of PAF and effects of nephrectomy or transplantation, *J. Lipid Mediat. Cell Signal*, 1994, 9(3): 205-215.
 16. Nishihira J, Ishibashi T, Takeichi N, Sakamoto W, Nakomura W, A role for oxygen radicals in rat monocytic leukemia cell differentiation under stimulation with platelet-activating factor, *Biochim Biophys Acta* 1994, Feb 17, 1220 (3) : 286 –290.
 17. Hansson R, Johansson S, Jonsson O, et al, Kidney protection by pretreatment with free radical scavengers and allopurinol : renal function at recirculation after warm ischemia in rabbits, *Clinical Sci*, 1986, 71 : 245 – 251.
 18. Lutz TA, Bouteillier S, Scharrer E, Hyperpolarization of the rat hepatocyte membrane by 2,5-anhydro-D-mannitol in vivo, *Life Sci*, 1998, 62 (16) : 1427-1432.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr. Ahmet ÇOKER
DEÜTF Genel Cerrahi AD
İnciraltı 35340, İZMİR