

Sıçanlarda whey proteini ile oluşturulan glutatyon önkoşullandırmasının karaciğer sıcak iskemi/reperfüzyon hasarında hem oksijenaz-1 sistemi üzerine etkisi

The effect of glutathione preconditioning on heme oxygenase-1 system established by whey protein feeding on hepatocellular injury in a rat hepatic normothermic i/r injury model

Manuk N. Manukyan*, Yunus Yavuz*, İpek Erbarut**, Ayliz Veliöğlü Öğüncü***, Çiğdem Ataizi-Çelikel**, A. Süha Yalçın****, Bahadır M. Güllüoğlu*

Amaç:

Yüksek sistein içeren whey proteini ile önkoşullandırma sonrası artan GSH seviyelerinin sıçanlarda oluşturulan sıcak parsiyel İ/R modelindeki koruyucu etkinliği ve hem oksijenaz-1 (HO-1) sistemi ile olan etkileşimini araştırmak.

Durum Değerlendirmesi:

Karaciğer cerrahisinde en önemli klinik problemlerden birisi iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının oluşmasıdır. Sıcak İ/R hasarında Kupffer hücreleri tarafından salınan serbest oksijen radikalleri akut hepatosellüler hasar oluşturmaktadır. Bir antioksidan olan glutatyon (GSH)'nin bu hasarı engellediği bilinmektedir.

Yöntem:

Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan dört grup oluşturuldu. İki SHAM grubundan birinde sıçanlar whey proteini ile (WHEY SHAM; n=6) diğeri ise standart yem (STD SHAM; n=6) ile üç hafta süre ile beslendi. Kontrol grubunda standart yem ile beslenen sıçanlara (KONTROL İ/R; n=16) ise 45'er dakikalık sürelerle selektif klempaj yöntemi ile sıcak İ/R hasarı oluşturuldu. Aynı cerrahi işlem üç hafta whey proteini ile önkoşullandırılan gruba da uygulandı (WHÖK İ/R; n=16). İ/R hasarı oluşturulan her iki gruptaki sıçanların yarısı (n=8) öldürülmeden yedi günlük sağkalımları takip edildi. Sıçanların kanlarından SGOT, SGPT, karaciğer dokularında ise GSH, malondialdehit (MDA), HO-1 gen ekspresyonu ölçümü ile apoptotik indeksin (AI) de hesaplandığı histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Bulgular:

WHEY SHAM grubunda GSH değerlerinin STD SHAM grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği saptandı. KONTROL İ/R grubunda STD SHAM grubuna göre serum SGOT ve SGPT değerleri ile karaciğer dokusundaki MDA seviyesi ve AI'deki gözlenen artışları istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Yine bu parametrelerin WHÖK İ/R grubunda KONTROL İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Ancak her iki grup arasında bir haftalık sağkalım açısından fark olmadı. WHÖK İ/R grubunda KONTROL İ/R grubuna kıyasla GSH miktarının arttığı ancak buna karşın HO-1 gen ekspresyonu düzeylerinin ise anlamlı olarak düşük olduğu saptandı.

Sonuç:

Karaciğer İ/R hasarında whey proteini ile önkoşullandırma dokuda GSH miktarını artırarak koruyucu etki göstermektedir. Ancak GSH miktarındaki artış diğer bir antioksidan olan HO-1 enzim sistemini baskılamaktadır.

Anahtar Kelimeler:

Karaciğer İ/R, iskemi/reperfüzyon, önkoşullandırma, whey, glutatyon, hem oksijenaz-1

Makalenin Geliş Tarihi : 02.04.2008

Makalenin Kabul Tarihi : 11.07.2008

* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD,

İSTANBUL

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD,

İSTANBUL

***Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü, İSTANBUL

****Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, İSTANBUL

Yardımcı Doç. Dr. Manuk N. MANUKYAN

Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi AD, Maltepe / İSTANBUL

Tel: (0216) 399 97 50

e-posta: manukyanmanuk@yahoo.com

Karaciğer rezeksiyonları sırasında sıklıkla başvurulan Pringle manevrasının, karaciğer dokusunda iskemiye neden olduğu ve daha sonra reperfüzyon sırasında hücre hasarına ve organ yetmezliğine giden akut inflamatuvar bir yanıtı yol açtığı bilinmektedir (1).

Sıcak iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarında ilk iki saat içinde Kupffer hücreleri tarafından indüklenen bir oksidatif stres durumu oluşur. Bu fazda Kupffer hücreleri tarafından salınan superoksit anyonları ile hidrojen peroksitin salınımı sonucu akut hepatosellüler hasar ortaya çıkar (2). Oksijen varlığında serbest radikaller plazma ve organel membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olduğundan endoplazmik retikulum, mitokondriyon ve diğer mikrozomal birimlerin hasara uğramasına yol açarlar. Serbest radikallerin net etkisi ortaya çıkışları ile elimine edilmeleri arasındaki dengeye dayalıdır. Buna göre hücre koruyucu enzimlerin varlığı ve miktarına bağlı olarak dokular serbest radikal hasarından az veya çok etkilenirler. Antioksidanlar ise bu hasara karşı koruyucu olarak işlev görürler (3).

Kesilmiş sütün sıvı kısmı, süt serumu ya da peynir altı suyu (whey) olarak bilinir. Peynir altı suyunda çözünür halde bulunan proteinler de süt serumu proteinleri (SSP) olarak adlandırılır. Süt serumu, β-laktoglobulin, α-laktalbumin, serum albumin ve immunoglobulinlerden oluşan biyoaktif bir protein karışımıdır. SSP, sütün diğer protein fraksiyonlarına göre daha fazla sistein içermektedir(4). SSP konsantreleri ile ve diyet yoluyla fazla miktarda alınan sistein hücre içinde glutatyon (GSH) sentezini artırır (5,6). Böylece antioksidan savunma mekanizmasının daha etkin çalışmasını sağlar (6).

Diğer bir koruyucu mekanizma hem oksijenaz-1 enzim (HO-1) sistemidir. Bu sistem sayesinde hem konsantrasyonu azalır, bilirubin ve biliverdin gibi antioksidan ürünler oluşur. Toksik demir (Fe) ferritine katılır ve hasar vermesi önlenir. Karbon monoksit (CO) artışı ile vazodilatasyonda artış ve apoptozda azalma görülür (7).

Daha önceki çalışmalarda GSH'un üretiminin engellenmesinin HO-1 ekspresyonunun artmasına ve dolayısı ile İ/R hasarının önlenmesine yol açtığı gösterilmiştir (7). Ancak GSH üretiminin artışı sağlandığında HO-1 enziminin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik olacağı konusunda bir bilgi yoktur. Ancak, GSH miktarının artırılmasının karaciğerde oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (8).

Bu çalışmanın amaçları arasında, klinik uygulamalara benzer bir model olduğu düşünülen selektif klempaj yöntemi ile oluşturulan sıcak (normo-

termik) karaciğer İ/R hasarında; 1. sıçanları whey proteini ile beslemenin oluşturulacak İ/R hasarı öncesi GSH miktarında artış sağlama yolu ile bir önkoşullandırma ortamı sağlayıp sağlamadığını, 2. oral yol ile sağlanan GSH önkoşullandırmasının karaciğer İ/R hasarını önleyici/tedavi edici etkinliğini, 3. bu modelin mekanizması dahilinde önkoşullandırma ile ortamda artışı sağlanan GSH ile HO-1 enzim sistemi arasındaki ilişkiyi araştırmak ve ortaya koymak yer almaktadır.

Gereç ve Yöntem

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmış olan bu proje, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya, Fizyoloji ve Patoloji Anabilim Dalları ile İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı ve Sağlık Meslek Yüksek Okulu laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 220-280 gr. olan altı aylık Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları 12 saat gece, 12 saat gündüz olmak üzere %40 nem ve 20°C sıcaklığa sahip ortamda tutuldu. Cerrahi işlem sırasında deneklerin vücut sıcaklıkları elektrikli battaniye ile sabit tutulmaya çalışıldı.

Whey Besininin Hazırlanması

Deneyde denature edilmemiş peynir altı suyunun pastörizasyon, evaporasyon ve kristalizasyonu sonrası püskürtme tekniği ile hazırlanan whey konsantresi (Sütaş A.Ş., Karacabey, Bursa) kullanıldı. Toz şeklindeki whey konsantresi standart sıçan yemi tozu ile 1:1 oranda karıştırıldı. Elde edilen karışıma %15'i kadar su eklenerek hamur haline getirildi ve pellet formu verildi. Whey besini etüvde 40°C de dört saat bekletilerek kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

Hayvanların Beslenmesi ve Önkoşullandırma

Standart sham (STD SHAM) grubundaki sıçanlar ile sağkalım analizi

için iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulduktan sonra sağ bırakılan tüm hayvanlara (KONTROL İ/R ve WHÖK İ/R) yedi gün süre ile pellet formundaki standart ticari yem 6 gr/100 gr vücut ağırlığı/gün olacak şekilde verildi.

Whey grubundaki tüm hayvanlar (WHEY SHAM ve WHÖK İ/R) iskemi-reperfüzyon hasarı öncesi üç hafta boyunca +4°C'de korunan karışımdan günlük olarak hazırlanan whey içerikli pelletler ile 6 gr/100 gr vücut ağırlığı/gün miktarında beslendi.

Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarının Oluşturulması ve Örnekleme

Çalışmamızda sıçanların anestezisi ketamin 100 mg/kg (Ketalar®, Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul) ve klorpromazin 30 mg/kg (Largactil, Eczacıbaşı Rhone Poulenc, İstanbul) intraperitoneal olarak verilerek sağlandı. Karın ön duvarının tıraş edilmesini takiben orta hat kesisi yapıldı. Portal alan diseke edildikten sonra medyan ve sol ön loba giden vasküler pediküle sarafin mikrokrips yerleştirilerek selektif klempaj ile sıcak iskemi oluşturuldu. Bu işlemin ardından karın ön duvarı 3/0 ipek ile (Doğsan, İstanbul) kapatıldı. 45 dakikalık iskemi süresini takiben hafif eter anestezisi altında insizyon tekrar açıldı ve daha önce yerleştirilen mikrokrips alınarak reperfüzyon sağlandı. Karın tekrar aynı yöntemle kapatıldı ve 45 dakikalık reperfüzyon zamanını takiben hafif eter inhalasyon anestezisi altında relaparotomi sonrası karaciğer medyan ve sol ön lobları örnekleme amaçlı rezeke edildi. Daha sonra intrakardiyak ponksiyon ile kan alınarak ötenazi gerçekleştirildi. Doku örnekleri sıvı azot içerisinde donduruldu ve -70°C'de saklandı. Alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri -20°C'de saklandı. Doku örneklerinde GSH ve MDA düzeyleri, HO-1 gen ekspresyonu, serum örneklerinde ise SGOT ve SGPT çalışıldı.

Deney Grupları

1) Standart yem ile beslenen SHAM grubu (STD SHAM; n=6): Üç hafta boyunca standart yem ile beslenen sıçanlarda çalışma parametrelerinin normallerinin belirlenmesi amacı ile deney protokolüne uygun anestezi altında sadece laparotomi yapılarak doku ve kan örneklemeleri yapıldı.

2) Whey proteini ile beslenen SHAM grubu (WHEY SHAM; n=6): Üç hafta boyunca 1:1 oranında whey konsantresi ile zenginleştirilmiş yem ile beslenen sıçanlarda deney protokolüne uygun anestezi altında sadece laparotomi yapılarak doku ve kan örneklemeleri yapıldı.

3) Standart yem ile beslenerek karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı gerçekleştirilen grup (KONTROL İ/R; n=16): Üç hafta süre ile standart yem ile beslenen sıçanlara üçüncü haftanın sonunda 45'er dakikalık iskemi ve reperfüzyon işlemi uygulandı. Bu hayvanların 8 adedinde toplam 90 dakikalık İ/R işlemi sonrası ötenazi uygulanarak doku ve kan örneklemeleri yapıldı. Bu gruptaki diğer 8 hayvana ise bir haftalık süre ile sağkalım takibi yapıldı. Takipler süresince bu sıçanlar standart yem ile beslendi.

4) Whey proteini ile beslenerek önkoşullandırma yapılan ve iskemi/reperfüzyon hasarı gerçekleştirilen grup (WHÖK İ/R; n=16): Üç hafta süre ile 1:1 oranında whey konsantresi ile zenginleştirilmiş yem ile beslenen sıçanlara 45'er dakikalık iskemi ve reperfüzyon işlemi uygulandı. Bu hayvanların sekiz adedine toplam 90 dakikalık İ/R işlemi sonrası ötenazi uygulanarak doku ve kan örneklemeleri yapıldı. Bu gruptaki diğer sekiz hayvana ise bir haftalık süre ile sağkalım takibi yapıldı. Takipleri süresince bu sıçanlar standart yem ile beslendi.

Biyokimyasal Analizler

Karaciğer transaminazlarının (SGOT/SGPT) ölçümü

Kanda SGOT ve SGPT değerleri otoanalizörde Roche Cobas Integra 700 sistemi kullanılarak ölçüldü.

Malondialdehit düzeyi ölçümü

Karaciğer homojenatlarında lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA düzeyleri TBARS testi ile belirlendi. Supernatanta tiyobarbitürik asit eklendikten ve 15 dakika süre ile kaynar su banyosunda tutulduktan sonra oluşan rengin absorbansı UV-vis spektrofotometrede (Shimadzu UV-8110) 532 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar dilüsyon sabiti ile düzeltildikten sonra nmol/g doku şeklinde ifade edildi (9).

Total glutasyon düzeyi ölçümü

Karaciğer dokularında total GSH düzeyi modifiye Ellman prosedürü ile belirlendi. Elde edilen supernatan ditiyonitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona sokulduktan sonra oluşan rengin absorbansı UV-vis spektrofotometrede (Shimadzu UV-8110) 412 nm dalga boyunda okundu. Dilüsyon sabiti ile düzeltilen sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ şeklinde ifade edildi (10).

Hem Oksijenaz-1 Gen Ekspresyonu Ölçümü

Hafif devinimli gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu

RNA izolasyonunu takiben hemoksijenaz miktar tayini amacı ile daha önceden tanımlanmış olan HO-1 mRNA primeri (5'-ACTTTCAGAAGGGTCAGGTGCC-3' -TTGAGCAGGAAGGCGGTCTTAG-3') kullanıldı. Beş basamaklı bir protokol benimsendi (11):

- 1- Ters transkripsiyon: 61°C'de 20 dakika 1 siklus,
- 2- Denatürasyon: 95°C'de 2 dakika 1 siklus,
- 3- Amplifikasyon: 95°C'de 19 saniye 45 siklus,
- 4- Erime eğrisi analizi: 95°C'de 20 saniye 1 siklus,
- 5- Soğutma: 40°C'de 30 saniye 1 siklus.

İşlem sırasında bir negatif kontrol ve dört standart kullanıldı. Standart eğrinin oluşumu test edildi. Sonuçlar replikasyon adedi olarak verildi .

Tablo 1: Apoptoz indeksi.

Apoptoz indeksi	Apoptotik hücre sayısı
0	0
1	1-2
2	3-5
3	6-8
4	8 den çok

Histopatolojik İnceleme

%10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda fikse edilmiş karaciğer doku örnekleri konsantrasyonları giderek artırılan etil alkol solüsyonları içerisinde dehidrate edildi. Toluene ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülen parçalardan mikrotom yardımı ile 5 μm kalınlığında kesitler alındı.

Morfolojik değerlendirme

Kesitler semikuantitatif değerlendirme amacı ile HE, Masson – Trikrom ve Gomori retükilin boyası ile boyandı. Apoptoz, hepatosellüler atrofi, sinüzoidal dilatasyon ve gözlenebilen diğer morfolojik değişiklikler (peliyozis, granülom, fokal nodüller hasar) açısından tüm kesitler zonal dağılım göz önüne alınarak değerlendirildi.

Apoptoz indeksi ölçümü

Apoptoz, izole hücrelerde hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, kromatin marginasyonu, nükleer ve sitoplazmik fregmantasyon, apoptotik cisimcik oluşumu ile karakterize morfolojik değişiklikler göz önüne alınarak değerlendirildi.

Apoptoz açısından zon 3 olarak tanımlanan perisantral alan incelendi. Örneklerin tümünde beş farklı büyütme alanındaki apoptotik hücreler sayıldı. Hepatosit kodonları ve sinüzoidlerde sayılan tüm apoptotik hücrelerin beşe bölünmesi ile bir büyük büyütme alanındaki apoptotik hücre sayısı belirlendi ve bu apoptotik indeks (AI) olarak yorumlandı (Tablo 1) (12-13).

Sağkalım Analizi

İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan iki grupta sekizer hayvan reperfüzyon sonrası öldürülmedi, yedi gün süre ile gözlem altında tutuldu. Sıçanlar, bu süre boyunca standart yem ile beslendiler. Gözlem altındayken ölen sıçanların kaydı tutuldu.

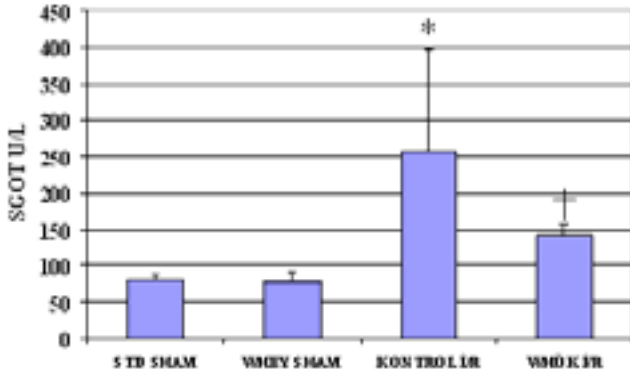
İstatistik

Sonuçların tümü ortalama \pm standart sapma (SS) şeklinde verildi. Gruplar arası farklar “Bağımsız İki Grupta Eşit Varyanslı t Testi” ile araştırıldı. Sağkalım karşılaştırılması ise “Kaplan – Meier” testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistik analizleri SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD) programı yardımı ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

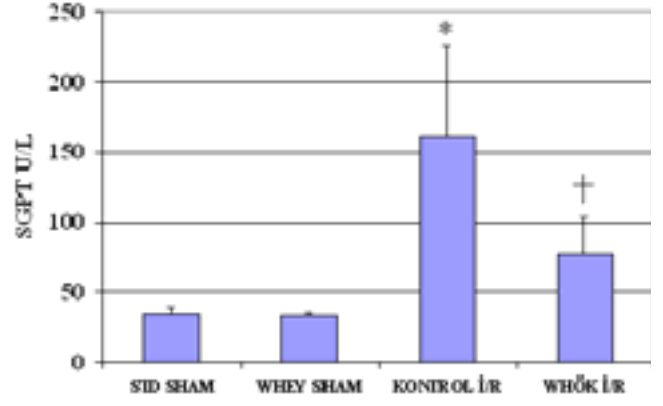
Serum SGOT ve SGPT Düzeyleri

Deneklerin kan örneklerinde incelenen SGOT ve SGPT değerlerinde whey ile beslenen SHAM grubunda standart yem ile beslenen SHAM grubuna kıyasla anlamlı fark olmadığı görüldü. İ/R yapılan kontrol grubunda ise SGOT ve SGPT değerlerinin STD SHAM grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği saptandı. Whey ile önkoşullandırılan İ/R grubunun SGOT ve SGPT değerleri KONTROL İ/R grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 1,2).



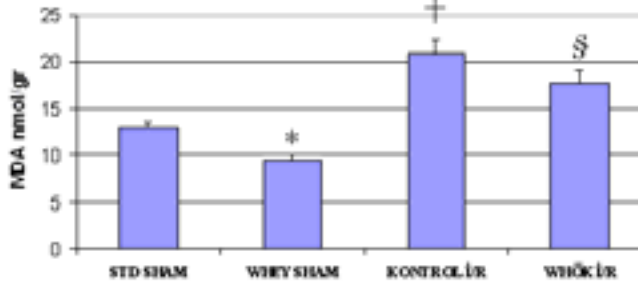
*STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.011, †KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.039

Şekil 1: Serum SGOT düzeyleri.



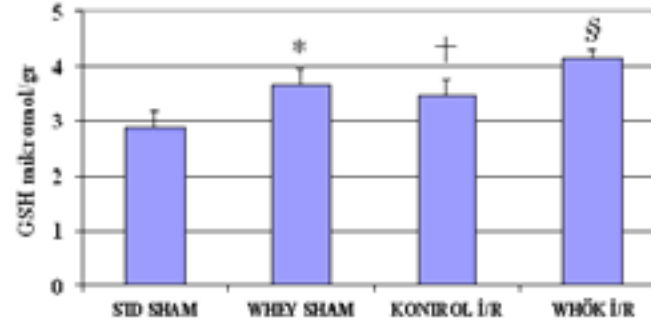
*STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.001, †KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.005

Şekil 2: Serum SGPT düzeyleri.



*STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.001, †STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.001, ‡KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.001

Şekil 3: Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri.



*STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.002, †STD SHAM grubuna kıyasla; p=0.005, ‡KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.001

Şekil 4: Karaciğer dokusu glutatyon düzeyleri.

Karaciğer Dokusu

Malondialdehit Düzeyleri

Deneklerin karaciğer doku örneklerinde incelenen MDA değerlerinin whey ile beslenen SHAM grubunda standart yem ile beslenen SHAM grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. İ/R yapılan kontrol grubunda ise MDA değerlerinin STD SHAM grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği saptandı. Whey ile önkoşullandırılan İ/R grubunun MDA değerleri ise KONTROL İ/R grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 3).

Karaciğer Hücre İçi Total Glutatyon Düzeyleri

Deneklerin karaciğer doku örneklerinde bakılan GSH değerlerinin

whey ile beslenen SHAM grubunda standart yem ile beslenen SHAM grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. İ/R yapılan kontrol grubunda ise GSH değerlerinin STD SHAM grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği bulundu. Whey ile önkoşullandırılan İ/R grubunun GSH değerleri ise KONTROL İ/R grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4).

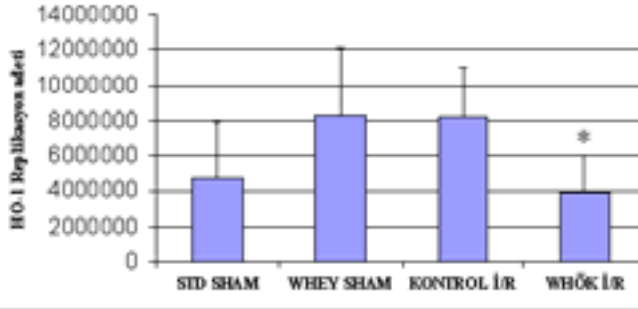
Karaciğer Dokusunda Hem Oksijenaz-1 Geni Ekspresyonu Düzeyleri

Deneklerin karaciğer doku örneklerinde incelenen HO-1 geni replikasyon sayısının whey ile beslenen SHAM grubunda standart yem ile beslenen SHAM grubuna kıyasla anlamlı farklı-

lık göstermediği görüldü. İ/R yapılan kontrol grubunda ise HO-1 ekspresyonunun STD SHAM grubuna kıyasla sınırdaki farklı olmadığı bulundu. Whey ile önkoşullandırılan İ/R grubuna ait HO-1 ekspresyon sıklığının ise KONTROL İ/R grubuna oranla anlamlı derecede düşük olduğu saptandı (Şekil 5).

Histopatolojik Değerlendirme Morfolojik değerlendirme sonuçları

Deneklerin karaciğer dokularından alınan ve HE ile boyanan kesitlerde SHAM gruplarında normal karaciğer dokusu görüldü (Şekil 6,7). Standart yem ile beslenen KONTROL İ/R grubunda perisantral alanda artmış hepatosellüler atrofi, sinüzoidal

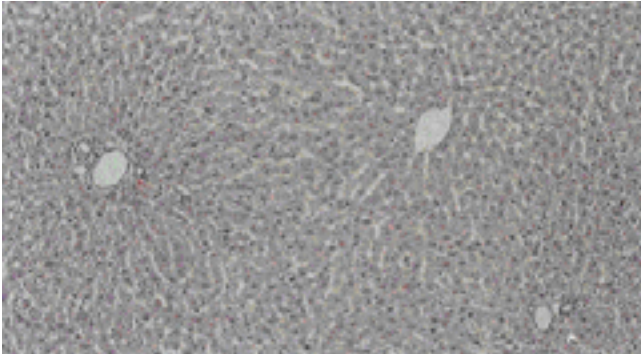


*KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.004

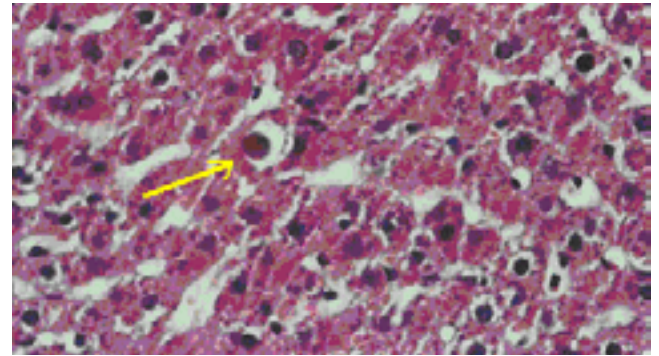
Şekil 5: Karaciğer dokusu HO-1 geni replikasyon adetleri.



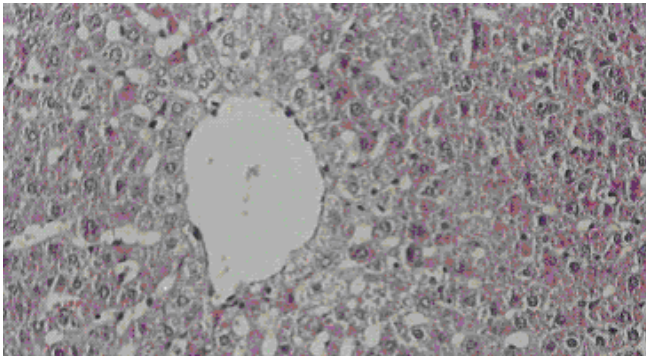
Şekil 6: STD SHAM grubundaki sıçanlarda histopatolojik olarak karaciğer dokusunun görünümü. (HE, x10 orjinal büyütme).



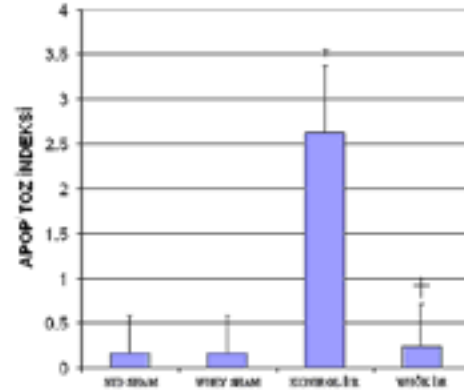
Şekil 7: WHEY SHAM grubundaki sıçanlarda histopatolojik olarak karaciğer dokusunun görünümü. (HE, x10 orjinal büyütme).



Şekil 8: KONTROL İ/R grubundaki sıçanlarda histopatolojik olarak karaciğer dokusunun görünümü. Okla işaretli belirgin apoptotik hücreler görülmekte (HE, x10 orjinal büyütme).



Şekil 9: WHÖK İ/R grubundaki sıçanlarda histopatolojik olarak karaciğer dokusunun görünümü. (HE, x10 orjinal büyütme).



*STD SHAM grubuna kıyasla; p=0,001 , †KONTROL İ/R grubuna kıyasla; p=0.001

Şekil10: Karaciğer dokusunda apoptotik indeks değerleri.

dilatasyon, peliyozis, onkotik nekroz ve belirgin apoptoz görüldü (Şekil 8). WHÖK İ/R grubunda ise hepatosellüler atrofi, sinüzoidal dilatasyon daha az oranda izlendi. Onkotik nekroz ve peliyozis hiçbir WHÖK İ/R grubu karaciğer kesitlerinde saptanmadı (Şekil 9).

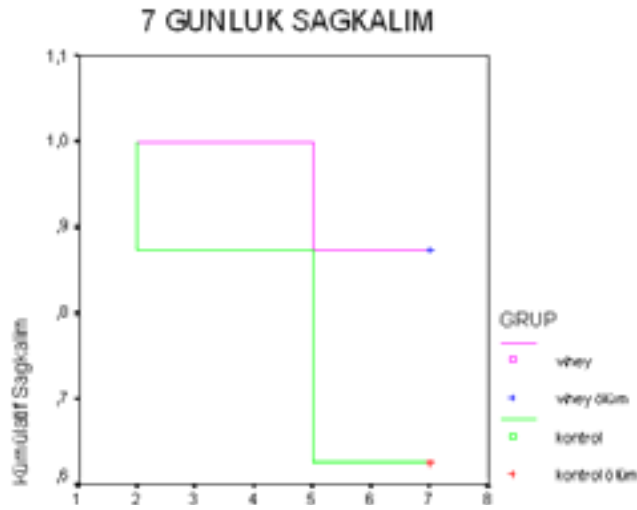
Apoptoz indeksi ölçüm sonuçları

Genel görünümü değerlendirmek amacı ile bakılan Aİ açısından whey ile beslenen SHAM grubu standart yem ile beslenen SHAM grubu arasında bir fark saptanmadı. Standart yem ile

beslenen kontrol İ/R grubunda STD SHAM grubuna kıyasla Aİ puanı anlamlı olarak yüksek bulundu. Whey ile önkoşullanan İ/R grubunun Aİ puanı ise KONTROL İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 2, Şekil 10).

Tablo 2: Deney gruplarındaki sıçanlara ait apoptotik indeks değerleri.

Hayvanlar	STD SHAM	WHEY SHAM	KONTROL İ/R	WHÖK İ/R
n: 1	0	0	2	0
n: 2	0	1	2	0
n: 3	0	0	4	0
n: 4	0	0	2	0
n: 5	1	0	3	0
n: 6	0	0	2	0
n: 7			3	1
n: 8			3	1
Ortalama±SS	0,17±0.41	0,17±0.41	2,63±0.74	0,25±0.46



Şekil 11: Her iki İ/R deney grubuna ait sağkalım grafiği (p=0.24)

Sağkalım Sonuçları

Üç hafta süre ile whey ile zenginleştirilmiş yemle beslenerek önkoşullandırma yapılan WHÖK İ/R grubundaki sıçanların yedi günlük takibinde bir adet sıçanın öldüğü KONTROL İ/R grubunda ise toplam üç adet sıçanın öldüğü izlendi. Her iki grup arasında yedi günlük sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 11).

TARTIŞMA

Bu çalışma, kolay ve klinik olarak uygulanabilir bir yöntem olan whey proteini ile beslenmenin ve bu şekilde GSH önkoşullandırması sağlamanın karaciğer İ/R hasarı üzerine etkisini in-

celemektedir. Karaciğer hasarı, temel parametreler olan SGOT, SGPT, MDA değerleri ve histolojik olarak Aİ ile ölçülmüş ve yedi günlük sağkalım analizi yapılmıştır. GSH önkoşullandırması ile karaciğer İ/R hasarının engellendiğini ilk kez gösteren bu çalışmada, HO-1'in olası rolü ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda sıçanları üç hafta süresince whey proteini ile beslemenin WHEY SHAM grubunda STD SHAM grubuna kıyasla GSH değerlerini anlamlı olarak yükselttiği ve anlamlı bir önkoşullandırma sağladığı görüldü.

Önkoşullandırma yapılmaksızın oluşturulan İ/R grubunda (KONTROL İ/R) STD SHAM grubuna kıyasla an-

lamlı olarak artmış serum SGOT, SGPT ve karaciğer dokusu MDA düzeyleri ve yine artmış apoptoz saptandı. Ayrıca KONTROL İ/R grubunda karaciğer dokusu total GSH değerlerinin arttığı ancak HO-1 değerlerinde anlamlı bir artış olmadığı görüldü.

Whey proteini ile önkoşullandırılan İ/R grubunda (WHÖK İ/R) standart yem ile beslenen gruba (KONTROL İ/R) kıyasla karaciğer İ/R hasarı bulgularında anlamlı düzeyde gerileme görüldü. Serum SGOT ve SGPT değerleri ile karaciğer dokusu MDA düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Histolojik incelemelerde ise whey ile önkoşullandırmanın İ/R grubunda hem genel morfolojik özellikler açısından daha az hasarı gösteren bulgular hem de apoptotik indekste anlamlı bir azalma saptandı. Ancak bu parametrelerdeki düzelmelere rağmen her iki İ/R grubu arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.

Karaciğer dokusu GSH değerlerine bakıldığında WHÖK İ/R grubunda KONTROL İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. HO-1 değerlerinin ise GSH önkoşullandırılması sağlanan İ/R grubunda KONTROL İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu görüldü.

Çalışmamızın en önemli dezavantajlarından biri kullandığımız önkoşullandırma yönteminin akut durumlarda uygulanmasının mümkün olmamasıdır. Bu sebeple çalışmamızın klinik uygulamalara yansımaları sadece planlı ameliyatlardan önce olabilir. Karaciğer dokularında histopatolojik değerlendirme morfolojik olarak yapılmış ve apoptoz miktarı ölçülmüştür. Aİ bakılması ucuz ve kolay bir yöntemdir, ancak parçalanmış DNA'ların terminal transferaz aracılığı ile dUTP-biotin kullanılarak işaretlenmesi yöntemine (TUNEL) üstünlüğü tartışmalıdır (13).

Whey ile beslenmenin etkilerinin ikinci haftada ortaya çıkmaya başladığı ve üçüncü haftada maksimum düzeye ulaştığı bilindiğinden çalışmamızda

deney hayvanları üç hafta boyunca whey verilerek önkoşullandırıldı (5). Bu önkoşullandırma klinik olarak da kolay uygulanabilecek bir yöntem olduğu için tercih edildi.

Deneklerde İ/R hasarı oluşturmak için sistemik vasküler konjesyon yapmaması, hipotansiyon oluşturmaması ve mezenterik dekompresyon gerektirmemesi nedeni ile selektif lobar iskemi modeli kullanıldı. Bu yöntemle sol lob anterior ve medial segmentlerde yaklaşık toplam karaciğer dokusunun %70'inde İ/R hasarı oluşturulmaktadır (14). İşlem sonrası ötenazi yapmadığımız sıçanlarda yedi günlük sağkalım analizi yapıldı.

Daha önce yapılan çalışmalarda, GSH'un direkt kendisi veya prekürsörü verilerek GSH artışı sağlanmış ve oluşturulan karaciğer İ/R hasarı modellerinde bu önkoşullandırmanın hasar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Glantzouris ve ark. (15) normotermik sıcak İ/R modellerinde GSH düzeyini arttırdığı bilinen bir prekürsör olan N-asetilsisteinin devamlı enjeksiyonunun etkisini araştırmış ve 150 mg/kg bolus ve 10 mg/kg/saatte devamlı infüzyon şeklinde verilen N-asetilsisteinin karaciğer enzimlerindeki yükselmeyi engellediğini ve intrahepatik mikrodolaşımı arttırdığını göstermişlerdir.

Yine bir başka çalışmada Schauer ve ark.(8) juguler vene 50 µmol GSH/saat/kg infüzyon yapılmasının sıcak karaciğer İ/R modellerinde SGOT ve SGPT değerlerini anlamlı olarak azalttığını ve bu uygulamanın sağkalımı uzattığını göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada karaciğerin histopatolojik incelemesinde GSH infüzyonunun herhangi bir etkisi gösterilememiştir.

Biz çalışmamızda, bu modellerden farklı olarak kliniğe uygulanmasının daha kolay olacağını düşündüğümüz beslenme yolu ile GSH düzeyini yükseltmeyi amaçladık ve diğer araştırmacılarla benzer biçimde karaciğer enzimlerindeki İ/R'a bağlı artışın azaltılabildiğini gördük.

Öte yandan, son dönemde İ/R hasarı çalışmalarında önemli yer tutmaya başlayan bir başka molekül HO-1'dir. HO-1'in hem konsantrasyonunu azaltıcı etkisi lipid peroksidasyonunu düşürmekte ayrıca artan CO de NO benzeri etkisi ve prositokin oluşumunu engelleyerek apoptozu azaltmaktadır (7).

Oksidatif stresi arttıran hipoksi, hipertermi ve radyasyon gibi etkenlerin HO-1'i aktive ettiği bilinmektedir (7). Bu nedenle HO-1 aynı zamanda oksidatif stresin önemli indikatörlerinden birisi olarak gösterilmektedir.

Oksidatif stres durumlarında artan en önemli antioksidan olan GSH, reaktif oksijen bileşiklerini etkisizleştirebilmek için hızla okside edilmektedir (6). GSH düzeyi ile HO-1 arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, GSH'un hücre içinde azalmasının bir diğer antioksidan olan HO-1 düzeyini arttıracığı varsayılmıştır. Bu hipotezi test etmek amacı ile GSH tüketici maddeler kullanılmış ve bunların HO-1 düzeyleri ile klinik bulgulara etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalardan birisinde, Andre ve ark.(16) GSH azaltıcı etki için L-butyonin-sulfoksimin kullanmışlar ve GSH düzeyinde düşüş sonrası RT-PCR ile yaptıkları ölçümlerde HO-1 gen ekspresyonunda artış göstermişlerdir. Horikawa ve ark. (17) yaptıkları renal İ/R çalışmalarında peritona enjeksiyon yolu ile verdikleri L-butyonin-sulfoksiminin HO-1 düzeyini arttırdığını ve beraberinde böbrek hasarının azaldığını saptamışlardır.

Bulger (18) ise hemin gibi antioksidanları arttırmanın HO-1'i yükselttiğini ve HO-1'in inflamatuvar süreci baskıladığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada, HO-1'in ekstremitelerde uygulanan deneysel İ/R işlemi sonrası arttığı ve bu artışın karaciğerde oluşan uzak organ hasarında apoptozu karşı koruyucu olduğu saptanmıştır (19).

HO-1'in karaciğer İ/R hasarı üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, McCarter ve ark.(19) HO-1'i inhibe etmenin sonuçlarını görmek amacı

ile iskemi oluşum zamanına paralel olarak HO inhibitörü kromyum mezo-porfirini 10 µ/kg dozdan periton içine vermişlerdir. İlk üç saatte alınan sonuçlarda karaciğer enzimleri ve apoptotik hücre sayısında belirgin artış olduğunu ancak inhibisyonun üçüncü saatte ortadan kalkması ile sürecin enzimlerde düşme ile devam ettiğini ve bunun HO-1'in İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini ispatladığını vurgulamışlardır. Kim ve ark.(20) ise sıçanlarda oluşturdukları karaciğer sıcak İ/R hasarında aktive olan Kupffer hücrelerini gadalonyum klorür ile inhibe etmişler ve bunun sonucunda HO-1 enzim düzeylerinde artış olmadığını göstermişlerdir. Bunu da Kupffer hücrelerinin bloke edilmesiyle ortama reaktif oksijen bileşikleri salınımının engellenmesi ve HO-1 enzim aktivasyonunun oluşmaması şeklinde açıklamaya çalışmışlardır. Bizim çalışmamızda da ortamda arttırılmış olan GSH miktarının sonradan oluşan İ/R hasarında ortaya çıkan Kupffer kaynaklı reaktif oksijen bileşiklerini yeterli miktarda etkisiz hale getirmesi (tampon etmesi) oksidatif stresi en azda tutmakta, bir başka antioksidan olan HO-1 enzim aktivasyonuna (upgrading) gerek duymamaktadır. Önceden ortamda arttırılmış olan GSH miktarının İ/R hasarı modelinde iyileştirici/koruyucu etkisi daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bizim modelimizde de gösterilmiştir. Bu şekilde oksidatif stresin en azda tutulmuş olması HO-1 enzim düzeyindeki kararlılığı açıklayabilmektedir.

Görüldüğü üzere yapılmış olan çalışmalarda ya bir antioksidan olan GSH'un inhibe edilmesi yolu ile HO-1 sisteminin verdiği yanıt araştırılmış veya HO-1'i inhibe etmenin ortaya çıkardığı hasarlar gösterilmiştir. Gerek GSH gerekse HO-1'in tek başına artışının apoptozu engellediği ve karaciğer enzimlerindeki artışın önüne geçtiği pek çok çalışmanın ortak sonucudur (8,16-20). Bu çalışmaların hepsinde inhibitör ajanlar damar yolu ile veya periton içine verilmiştir.

GSH artışının karaciğer dokusundaki HO-1 enzim sistemindeki yansıması henüz hiçbir çalışmada incelenmemiştir.

Bulgularımız ışığında iskemi ve travma HO-1'i artırıcı etkiye sahiptir. Fakat başka bir antioksidanın, bizim çalışmamızda GSH'nun, koruyucu etkisi devreye girdiği takdirde HO-1'in yine de karaciğer İ/R durumuna karşı yanıt verip vermeyeceği bugüne kadar bilinmemektedir.

Çalışmamız bir antioksidan olan GSH'nun diğer çalışmalardakine benzer bir biçimde lipid peroksidasyonu azaltıcı, apoptozu engelleyici ve karaciğer enzimlerindeki artışı düşürücü etkisini ortaya koymaktadır. Önkoşullandırma ile oluşturulan GSH artışının İ/R hasarı mekanizmasında bir diğer antioksidan olan ve oksidatif strese arttığı gösterilen HO-1 sisteminin aktivasyonunu engellediği çalışmamızın önemli bir bulgusu olmuştur.

Tüm bu bulgular İ/R hasarında önceden yeterli miktarda GSH artışı sağlandığında, GSH'un reaktif okside

Summary:

The effect of glutathione preconditioning on heme oxygenase-1 system established by whey protein feeding on hepatocellular injury in a rat hepatic normothermic I/R injury model

Purpose: Oxygen radicals which are produced during reperfusion phase play a central role for hepatocellular damage during ischemia/reperfusion (I/R) injury. Antioxidant strategies appear a promising approach to prevent I/R injury. In the present study, the effect of glutathione (GSH) preconditioning established by whey protein feeding on hepatocellular injury markers was assessed in a rat hepatic normothermic I/R injury model. The interaction between intracellular GSH content and heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme expression was also determined in order to understand the level of upgrading of HO-1 system in a high GSH content environment after preconditioning.

Material and Methods: Livers of female Sprague-Dawley rats were subjected to 45/45 minutes of normothermic I/R injury. A group of rats were fed by standard chow for a three week duration before I/R procedure (CONTROL I/R; n=16), whereas another group was fed by "whey" protein for preconditioning (WHPR I/R; n=16) during the same period. Two SHAM groups were constituted accordingly but rats were not subjected to I/R injury (STD SHAM and WHEY SHAM; n=6 in each). Following 45 minutes of reperfusion, serum transaminase levels as well as GSH, malondialdehyde (MDA) levels, apoptotic index (AI) and HO-1 gene expression in liver tissue were determined. Half of the animals in both injury groups were surveilled for a week without sampling.

Results: Intracellular GSH levels in WHEY SHAM group were significantly higher than those of STD SHAM group which indicated a successful preconditioning. Preconditioning by "whey" protein feeding prior to I/R injury (WHPR I/R) significantly ameliorated the increased levels of serum transaminase as well as liver MDA levels and AI in CONTROL I/R group. Survival of the rats in both injury groups were not different. "Whey" preconditioning also significantly increased GSH levels, whereas HO-1 expression was lower when compared to rats subjected to I/R injury without preconditioning.

Conclusion: Feeding with "whey" protein successfully resulted high GSH content in rat liver. Whey preconditioning ameliorated hepatic I/R injury. HO-1 enzyme seems to have a less important role in antioxidant defense system when GSH production was induced prior to I/R injury.

Key Words: Liver, ischemia/reperfusion, , whey, glutathione, heme oxygenase-1

jen türlerini etkisizleştirdiğini ve oksidatif stresi en aza indirerek HO-1 sisteminin devreye girmesini engellediğini göstermektedir. İ/R hasarı ile ilgili yapılacak çalışmalarda oksidatif stres durumlarında GSH'nun okside

edilmesi ile HO-1 enzim sisteminin birlikte aktive olmasının altında yatan mekanizmanın araştırılarak daha etkili bir önleyici stratejinin geliştirilmesine çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H et al. Inflammatory mechanism and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-173.
2. Jaeschke H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-G26.
3. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991, 91 (suppl 3c): 31S-38S.
4. Bounaus G, Batist G, Gold P. The immunoenhancing property of dietary whey protein: role of glutathione. *Clin Invest Med* 1989;12:154-161.
5. Öğünç AV, Manukyan NM, Cingi A ve ark. Süt serum proteinleri ile beslenmenin sıçanlarda yara yeri iyileşmesine etkisi. *Kocatepe Tıp Der* 2004;5:51-54.
6. Middleton N, Reid JR, Coolbear T et al. Proliferation and intracellular glutathione in Jurkat T cells with concentrated whey protein products. *Int Dairy J* 2003;13: 567-573.
7. Zuckerbraun BS, Bilal TR. Heme oxygenase-1. A cellular hercules. *Hepatology* 2003;37:742-743.
8. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004;239:220-231.
9. Haklar G, Yüksel M, Yalçın AS. Chemiluminescence in the measurement of free radicals: theory and application on a tissue injury model. *Marmara Med J* 1998;11:56-60.
10. Yalçın AS, Haklar G, Küçükkaya B ve ark. Chemiluminescence measurement for the detection of free radical species. In: Özben T, ed. *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*. Plenum Press, New York, pp. 385-390, 1998.
11. Choi BM, Kim YM, Jeong YR, et al. Induction of heme oxygenase-1 is involved in antiproliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:132-137.
12. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z et al. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 1992;52:377-382.
13. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis and why is it important? *BMJ* 2001;322:1536-1538.
14. Rozga J. Animal models of liver regeneration Ed: Souba WW, Wilmore DW, *Surgical Research*. pp. 703-708, USA, 2001.
15. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS et al. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2004;91:1330-1339.
16. Andre M, Felley-Bosco E. Heme oxygenase-1 induction by endogenous nitric oxide: influence of intracellular glutathione. *FEBS Letters* 2003;546:223-227.
17. Horikawa S, Yoneya R, Nagashima Y et al. Prior induction of heme oxygenase-1 with glutathione depletor ameliorates the renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *FEBS Letters* 2002;510:221-224.
18. Bulger EM, Garcia I, Maier RV. Induction of heme-oxygenase 1 inhibits endothelial cell activation by endotoxin and oxidant stress. *Surgery* 2003;134:146-152.
19. McCarter SD, Akya TG, Lu X, et al. Endogenous heme oxygenase induction is a critical mechanism attenuating apoptosis and restoring microvascular perfusion following limb ischemia/reperfusion. *Surgery* 2004;36:67-75.
20. Kim YH, Lee SM. Role of Kupffer cells via the vasoregulatory gene expression during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharma Res* 2004;27:111-117.

KATKIDA BULUNANLAR:

Çalışmanın düşünülmesi ve planlanması:

Bahadır Güllüoğlu, Manuk Manukyan

Verilerin elde edilmesi:

Manuk Manukyan, İpek Erbulut, Süha Yalçın

Verilerin analizi ve yorumlanması:

Bahadır Güllüoğlu, Manuk Manukyan, Yunus Yavuz, Aylin Öğünç, Çiğdem Çelikel

Yazının kaleme alınması:

Manuk Manukyan, Bahadır Güllüoğlu, Yunus Yavuz

İstatistiksel değerlendirme:

Manuk Manukyan, Bahadır Güllüoğlu