

Rat Lenfoid Organlarda Gavaj Etanol Uyarılı Oksidatif Stres ve Sitokin Cevaplar

Erdal İnce², Sibel Akyol¹, Turgut Ulutin², Halil Tunali¹

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Öz

Amaç: Bu çalışmada etanolün dalak, timus, lenf bezlerini içeren lenfoid dokularda ve karaciğer üzerine oksidatif strese bağlı antioksidan düzeyleri ve TH1 [Tümör Nekrozis alfa (TNF- α), İnterlökin-2 (IL-2), İnterferon gama (IFN- γ)] sitokin cevaplarına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda 40 adet wistar sıçan kullanıldı ve kontrol ve gavaj yöntemi uygulanmış annelerin 10 ve 30 günlük yavrularından oluşan 4 grup oluşturuldu. Dokularda oksidatif stres düzeyini ölçmek için lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu, hücre içi antioksidan düzeylerini tespit için glutatyon (GSH) miktarı, Glutatyon peroksidaz (GP), Glutatyon redüktaz (GR), Glutatyon S Transferaz (GST), katalaz (CAT), Süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesi, TH1 sitokin cevapların incelenmesi için TNF- α , IL-2, IFN- γ seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Gavaj etanol uygulanmış annelerin 10 ve 30 günlük yavruların lenfoid ve karaciğer dokularındaki lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu tüm dokularda anlamlı olarak artış, tüm dokularda GP, GR, CAT, SOD aktivitelerinde ve GSH, düzeylerinde anlamlı olarak azalma, GST aktivitelerinde artış gözlemlendi. TH1 cevaplarında, TNF- α hem 10 hem de 30 günlük yavrularda anlamlı olarak artmış, IFN- γ düzeyleri ise azalmış olarak tespit edildi. IL-2 düzeyleri 10 günlük yavrularda azalma gösterirken 30 günlük yavrularda ise anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları etanolün ratların lenfoid ve karaciğer dokularında oksidan/antioksidan dengeyi değiştirerek oksidatif stresi oluşturduğunu ve inflamatuvar sitokinlerin artışına yol açtığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, TH1 sitokin cevaplar, lenfoid dokular, etanol

Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 2018, 42(1):86-93

Gavage ethanol induced oxidative stress and cytokine response in rat lymphoid organs

Abstract

Objectives: The purpose of the study was to investigate the relationship between ethanol, oxidative stress, the protective capacity of the antioxidant defense system and TH1 [Tumor Necrosis alpha (TNF- α), Interleukine-2 (IL-2), Interferon gamma (IFN- γ)] cytokine response in lymphoid organs such as the spleen, thymus, lymph nodes and also liver of rats.

Methods: Forty wistar rat were included in the study. Four groups included control and treated with gavage ethanol 15 d and 30 d respectively. For measurement of oxidative stress in the lymphoid tissues were determined using lipid peroxidation and protein oxidation, intracellular antioxidant status were assayed glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), glutathione S transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) activity and TH1 cytokine responses were assayed TNF- α , IL-2, IFN- γ levels.

Results: In lymphoid tissues and liver of 10-30 d old offsprings of gavage ethanol-administrated pregnant rats, levels of lipid peroxidation and protein oxidation were established a significant increased and in intracellular antioxidant capacity markedly decreased levels of GSH, GP, GR, CAT, SOD and GST activities were increased in all tissues. In TH1 responses, TNF- α levels were increased but IFN- γ levels were decreased in both of groups. IL-2 levels were decreased in 10 day offsprings. No change in IL-2 levels were found in 30 day offspring.

Conclusion: Ethanol metabolism causes oxidative stress not only in liver but also in lymphoid organs. Oxidative stress produced by the toxic injury plays an important role in this response through up-regulation of inflammatory cytokines.

Keywords: Oxidative stress, TH1 cytokine responses, lymphoid tissues, ethanol

Cerrahpaşa Journal of Medicine, 2018, 42(1):86-93

Alındığı Tarih: 6 Eylül 2017

Yazışma Adresi (Address): Prof. Dr. Halil Tunali

İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Cerrahpaşa 34098 İstanbul

e-posta: tuhal@istanbul.edu.tr

Alkol alınımlı tüm dünyada gittikçe artan sosyo-medikal önemli sorunların başında gelmektedir. Alınan alkolün türüne, miktarına ve süresine göre karaciğer başta olmak üzere tüm sistemler üzerine toksik etkilidir ve organizmada değişik hastalık tabloları oluşturabilir. Bu hastalıkların başında alkolik karaciğer hastalığı, siroz, pankreatit, gastrointestinal kanamalar, karaciğer, solunum ve sindirim sistemi kanserleri gelmektedir [1]. Bu bilgilere ilaveten birçok deneysel hayvan model ve insan çalışmalarında etanolün, plasentayı kolayca geçen ve fetal dokulara ulaşabilen teratojenik bir ajan olduğu gösterilmiştir. Hamilelik sırasında tüketilen maternal etanolün fetüste oluşturduğu intrauterin gelişim bozukluğu, merkezi sinir sistemi ve beyin fonksiyon bozuklukları ve malformasyonları, kalp ve iskelet sistemi anormallikleri gibi birçok klinik bulguları içeren toksik cevaplar fetal alkol sendromu (FAS) adı altında toplanmıştır [2].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, alkol alınımlına bağlı olarak gözlenen bu hastalık tablolarının patogenezinde, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı artışı, azalan hücrel antioksidan miktarı sonucu birçok dokuda özellikle karaciğerde artan oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir [3]. Gastrointestinal yoldan hızla emilen etanolün yaklaşık %90'ı karaciğer dokusunda başlıca üç yolak üzerinden (hücre sitozolünde bulunan alkol dehidrogenaz, endoplazmik retikulumda bulunan mikrozomal enzimler ve peroksisomlarda bulunan katalaz yolakları) metabolize olarak, önce asetaldehit (AT) ve sonra asetata okside olur. Bir mikrozomal enzim sistemi olan P450 2E1(CYP2E1) alkol gibi birçok toksik maddenin metabolize edilmesinde önemli rol oynarlar. CYP 2E1 aktivasyonu ve katalitik döngüsü sırasında oluşan alkol metabolitleri özellikle AT ve ROS ileri derecede toksik ve reaktif maddeler olup, metabolik, oksidatif, immünotoksik, proinflamatuvar ve profibrotik birçok olumsuz olayın başlamasına sebep olurlar [4]. Aşırı AT üretimi, alkile olmuş nükleoproteinlerin onarımının inhibisyonuna, bazı enzimlerin aktivasyonunun azalmasına yol açtığı, mitokondrial hasar sonucu ortamda NADH ve süperoksit anyon artışına bağlı oluşan lipid peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) ve 4 hidroksi-2-nonenal aldehit (HNE) gibi toksik maddelerin oluşumu ve birikimi birçok çalışmada not edilmiştir [5]. Aynı zamanda karaciğerde, gama-glutamil transferaz enziminin uyarılmasıyla glutatyonun (GSH) bir prekürsörü/metaboliti olan sisteinin artışı da gözlemlenmiştir [6].

AT, proteinin üçüncü ve dördüncü yapısıyla ve diğer makromoleküllerle etkileşimi sonucu oluşan hibrit bile-

şikler; organizmada neo-antijenler olarak tanınır ve humoral ve adaptif hücrel immün cevapların artışına yol açarak alkol uyarılı karaciğer hasarına direkt olarak katıldığı ve bu bozukluğun ilerlemesinde rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir [7]. Hem insan hem de hayvan çalışmalarında bu bileşikler dolaşım yoluyla karaciğer dışında, beyin, pankreas, kas ve kalbi içeren diğer dokularda da ulaşarak buralarda da depolanabildiğinden dolayı bu organlarda etanol uyarılı hastalıkların gelişim patogenezinde başlıca rol oynayabileceği de not edilmiştir [8].

ROS direkt olarak nuklear kapa B faktör gibi transkripsiyon faktörlerini de aktive eder ve interlökin 1 beta (IL-1 β), IL6, IL8 ve Tümör Nekrozis alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin salınması ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu arttırarak hücre nekrozuna hatta hücre ölümü (apoptosis) ne neden olabilir [9].

Lenfoid dokular vücudu enfeksiyonlara, yabancı maddelere ve kanser hücrelerine karşı savunmadaki immün fonksiyonlarla ve lenfatik sistemlerle ilişkilidir [10]. Bu bilgilere ek olarak, immün sistem hücreleri artmış ROS üretimi sayesinde birçok önemli fonksiyonu gerçekleştirmesinden dolayı antioksidan sistem değişimlerine karşı hassasiyet gösterirler [11].

Oksidan/antioksidan denge immün fonksiyonların belirlenmesinde, hücrel protein ve nükleik asitlerin ve membran lipid fonksiyonları ve bütünlüğünün korunmasında, immün hücrelerin gen ekspresyonunun sinyal transdüksiyonunun kontrolünde önem taşır [12]. Bundan başka immün sistem hücrelerin plazma membranları yüksek oranda doymamış yağ asitleri içermektedir ve bundan dolayı bu hücrelerde diğer hücrelerden daha yüksek oranda antioksidan içermektedir [13]. Buna rağmen maternal etanolün lenfoid dokular ve antioksidan miktarları üzerine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Sitokinlerin çeşitli karaciğerde çeşitli fonksiyonları düzenleyici rolü olduğu bilinse de, karaciğer dışında fetal lenfoid dokuların da sitokinlerin potansiyel bir kaynağı olup olmadığını ve etanol uyarılı oksidatif strese bağlı doku hasarı mekanizmasındaki rolünü de araştırmak istedik. Bundan dolayı bu çalışmamızda lenfoid dokularda oksidatif stres tayini için lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu, hücre içi antioksidan düzeylerini tespit için glutatyon (GSH) miktarı, Glutatyon peroksidaz (GP), Glutatyon redüktaz (GR), Glutatyon S Transferaz (GST), katalaz (CAT), Süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesi, ölçüldü. TH1 sitokin cevapların incelenmesi için Tümör Nekrozis alfa (TNF- α), İnterlökin-2 (IL-2), İnterferon gama (IFN- γ) seviyeleri ölçüldü.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda kontrol ve gavaj etanol uygulanmış a/a dişi Wistar albino sıçanların 10 ve 30 günlük yavrularından;

1. Kontrol gebelerin 10 günlük yavruları (n=10) (C10)
2. Kontrol gebelerin 30 günlük yavruları (n=10) (C30)
3. Gavaj Etanol uygulanan gebelerin 10 günlük yavruları (n= 10) (G10)
- 4- Gavaj Etanol uygulanan gebelerin 30 günlük yavruları (n= 10) (G30)

Olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Sıçanlar 21 ± 2 °C deki odalarda hepsi aynı ışık periyotlarında bırakıldı. Yavrular anne sütü ve adli-bidum yemle beslendiler. Gavaj yöntemi uygulanan gruba 2 ay boyunca günde kg başına 6 g gelecek şekilde %30 etanol verildi. Bu uygulamaların ardından gebe bırakıldılar ve gebelik süresince de etanol verilmesine devam edildi. Kandaki etanol düzeyleri KANGA 3 MTH yöntemiyle ölçüldü.

TH1(TNF- α , IL-2 , IFN- γ) Sitokin Değişimleri

Gebelik süresi bitiminden 10 ve 30 günlük yavruların kuyruklarından alınan venöz kan örneklerinde; TH1(TNF- α , IL-2 , IFN- α) düzeyleri Elisa yöntemiyle tayin edildi.

Oksidatif Stres Ölçümünde Kullanılan Biyokimyasal Belirleyiciler

Homojenizasyon: Çalışmamızda kontrol, ve gavaj yöntemi uygulanmış anne ve 10 ve 30 günlük yavrularının timus, lenf, karaciğer, ve dalak dokuları alındıktan sonra 0.15 M KCl ile yıkandı. Dokular lipit peroksidasyonu ve GSH düzeyini, GP, GR, GST, GS aktivitesini ölçümlemlerini incelemek amacıyla; 0.15 M KCl, 0.125 M NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄, 20 mmol Tris (pH 7.4) ile protein oksidasyonu değerlerini saptamak için; HEPES (10 mmol/L, pH 7.4) içine NaCl (137mmol/L), KCl (4.6 mmol/L), KH₂PO₄ (1.1 mmol/L), MgSO₄ (0.6 mmol/L), leupeptin (0.5İg/mL), peptasin (0.7İg/mL), fenil metil sülfonil florit (40 İg/mL), aprotinin (0.5 İg/mL) ve etil diamin tetraasetik asit (1.1 mmol/L) içeren solüsyonlarla homojenize edildi.

Lipit Peroksidasyonu: Uchiyama ve Mihara'nın yöntemine göre yapıldı [14]. Sonuçlar MDA/mg protein olarak hesaplandı.

Protein Oksidasyonu: Protein karbonil miktarı 2.4 dinitrofenildihidrazin prosedürüne göre ölçüldü [15]. Sonuçlar nmol karbonil/mg protein olarak hesaplandı.

Protein Ölçümü: Lowry yöntemine göre hesaplandı.[16]

Enzimatik ve Non Enzimatik Antioksidan Düzeylerin Ölçümü

İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçümü: Beutler metodu uygulandı [17]. Sonuçlar nmol/mg protein olarak hesaplandı.

Glutasyon Peroksidaz (GP) enzim aktivitesini ölçümü: Paglia ve Valentin'in yöntemine göre yapıldı [18]. Sonuçlar İmol NADPH/dak/mg protein olarak hesaplandı.

Glutasyon Redüktaz (GR) enzim aktivitesinin ölçümü: Beutler metoduna göre yapıldı [19]. Sonuçlar İmol NADPH/dak/mg protein olarak hesaplandı.

Glutasyon S transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçümü: Habig ve ark.[20]'nın yöntemine göre yapıldı. Sonuçlar İmol CDNB/dak/mg protein olarak hesaplandı.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü: Sinha metoduna göre yapıldı [21]. Birim İmol H₂O₂/dak/mg protein olarak hesaplandı.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçümü: SOD enzim değerleri Sun ve ark.[22] modifiye ettiği metotla belirlendi. SOD aktivitesi unite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

İstatiksel analizler: Bütün bulgular $\pm$ SE olarak ifade edildi. Dataların istatiksel analizlerinde Tukey-Kramer multiple karşılaştırma testini takiben oneway ANOVA testi uygulandı.

Bulgular

Tablo 1'de gösterildiği üzere TH1 cevaplar kontrol gruplarıyla kıyaslandığında; G10 ve G30 gruplarında TNF- α değerlerinde anlamlı artış gözlemlendi. IL-2 değerleri, G10 grupta anlamlı azalma saptanırken, G30 grupta istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. G10 ve G30 gruplarında IFN- γ değerleri anlamlı azalma gösterdi. Oksidatif stres ölçümünde kullandığımız lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonu kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, G10 ve G30 grupların tüm dokularında anlamlı artış tespit ettik (Tablo 2 ve 3). GSH değerleri,

Tablo 1. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavrularında TH1 [Tümör Nekrozis alfa (TNF- α), İnterlökin-2 (IL-2), İnterferon gama (IFN- γ)] değerleri.

Gruplar	TNF- α (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IFN γ (pg/ml)
Kontrol 10	3.7 $\pm$ 1.6	75.4 $\pm$ 3.2	850 $\pm$ 25
Gavaj 10	6.5 $\pm$ 1.8 ^a	63.0 $\pm$ 3.2 ^a	520 $\pm$ 17 ^c
Kontrol 30	2.99 $\pm$ 0.8	76.0 $\pm$ 3.4	900 $\pm$ 10
Gavaj 30	5.54 $\pm$ 1.8 ^b	70.0 $\pm$ 2.6	640 $\pm$ 16 ^c

Ölçüm değerleri, ortalama $\pm$ SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 2. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) (nmol MDA/mg protein) ölçüm değerleri.

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	1.37 $\pm$ 0.45	2.85 $\pm$ 0.66	1.12 $\pm$ 0.37	2.56 $\pm$ 0.68	3.37 $\pm$ 1.15
Gavaj 10	3.47 $\pm$ 0.89 ^b	6.33 $\pm$ 1.02 ^c	2.69 $\pm$ 1.1 ^b	7.12 $\pm$ 1.23 ^c	7.55 $\pm$ 2.44 ^c
Kontrol 30	0.94 $\pm$ 0.37	2.37 $\pm$ 0.45	1.84 $\pm$ 0.71	3.01 $\pm$ 1.52	1.37 $\pm$ 0.45
Gavaj 30	2.45 $\pm$ 0.96 ^b	6.68 $\pm$ 1.27 ^c	3.19 $\pm$ 1.77 ^a	7.34 $\pm$ 2.78 ^c	3.47 $\pm$ 1.34 ^c

Ölçüm değerleri, ortalama $\pm$ SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 3. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında protein oksidasyon (nmol karbonil/mg protein) ölçüm değerleri.

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	1.25 $\pm$ 0.66	1.77 $\pm$ 0.54	0.54 $\pm$ 0.14	0.79 $\pm$ 0.48	0.82 $\pm$ 0.39
Gavaj 10	3.44 $\pm$ 1.67 ^c	3.18 $\pm$ 0.74 ^a	1.88 $\pm$ 0.54 ^c	2.64 $\pm$ 1.06 ^b	2.47 $\pm$ 0.67 ^b
Kontrol 30	1.86 $\pm$ 0.54	2.21 $\pm$ 0.64	1.6 $\pm$ 0.73	1.21 $\pm$ 0.67	1.11 $\pm$ 0.57
Gavaj 30	3.27 $\pm$ 1.77 ^a	4.25 $\pm$ 0.55 ^a	3.43 $\pm$ 1.24 ^b	3.34 $\pm$ 1.51 ^a	2.25 $\pm$ 1.05 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama $\pm$ SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

G10 ve G30 grubun tüm dokularında anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Tablo 4). Enzimatik antioksidan düzeylerde ise GP, GR, SOD, CAT aktivasyonu, G10 ve G30 gruplarında kontrol gruplarına göre, tüm dokularda anlamlı derecede azalma görülürken (Tablo 5-8), GST değerleri her iki grubun tüm dokularında anlamlı artış tespit edildi (Tablo 9).

Tartışma

Etanol metabolizması sırasında hücrelerde antioksidan savunmanın yetersiz kalışına bağlı olarak aşırı ROS artışı, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu sonucu gelişen hücre hasarı mekanizmalarında rol oynayan başlıca etyolojik faktördür. Karaciğer, etanol oksidasyonunun başlıca alanıdır ve P450 izoformları özellikle P450 2E1(CYP2E1) vasıtasıyla gerçekleşen etanol oksidasyonu

Tablo 4. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında indirgenmiş glutatyon (GSH) ölçüm değerleri (İmol/mg protein).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	5.25±1.67	34.5±6.65	8.07±2.33	7.86±2.17	4.86±0.94
Gavaj 10	2.01±0.56 ^c	12.5±3.75 ^c	3.25±0.87 ^c	3.05±1.02 ^c	1.98±0.47 ^c
Kontrol 30	3.13±0.97	23.6±6.55	7.14±2.55	5.68±1.47	3.76±0.72
Gavaj 30	1.22±0.37 ^c	15.96±4.4 ^a	3.67±0.96 ^c	2.87±0.89 ^b	2.05±0.37 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama ± SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 5. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında glutatyon peroksidaz (GP) aktivitesi ölçüm değerleri (İmol NADPH/dak/mg protein).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	8.59±2.33	15.78±5.40	17.6±5.84	11.2±2.74	13.5±3.68
Gavaj 10	3.44±1.31 ^c	7.65±1.24 ^b	4.5±0.78 ^c	5.18±1.27 ^c	4.72±0.93 ^c
Kontrol 30	10.78±2.42	16.39±6.42	16.67±4.67	13.5±3.63	15.54±5.67
Gavaj 30	5.45±0.74 ^b	12.63±4.52 ^a	9.77±1.48 ^b	6.25±1.78 ^c	10.61±3.09 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama ± SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 6. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi ölçüm değerleri (İmol NADPH/dak/g doku).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	2.66±0.72	1.91±0.63	1.67±0.43	1.81±0.63	0.94±0.26
Gavaj 10	0.85±0.42 ^c	0.68±0.37 ^c	0.58±0.27 ^c	0.75±0.27 ^c	0.39±0.8 ^c
Kontrol 30	3.79±1.23	2.85±0.85	2.25±0.75	2.34±0.66	1.16±0.43
Gavaj 30	1.29±0.36 ^c	1.53±0.61 ^a	0.97±0.27 ^c	0.97±0.28 ^c	0.66±0.20 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama ± SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 7. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüm değerleri (ünite/mg protein).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	2.81±0.54	5.28±1.43	3.31±0.98	2.42±0.43	3.98±1.19
Gavaj 10	1.26±0.17 ^c	2.27±0.68 ^c	1.48±0.29 ^c	0.99±0.26 ^b	1.11±0.31 ^c
Kontrol 30	3.87±0.93	6.79±2.64	4.55±1.56	4.06±1.77	4.19±1.35
Gavaj 30	1.85±0.57 ^c	4.07±1.67 ^a	2.02±1.32 ^b	2.06±0.33 ^a	1.97±0.48 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama ± SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- p<0.05, b- p<0.01, c- p<0.001

Tablo 8. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında katalaz (CAT) aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{dak/mg protein}$).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	36.1±9.27	50.51±15.66	40.4±13.42	35.8±12.33	38.7±9.22
Gavaj 10	12.42±2.92 ^c	22.98±5.72 ^c	16.9±5.43 ^c	11.8±4.36 ^c	15.2±5.63 ^c
Kontrol 30	44.67±11.18	60.87±17.28	49.7±16.88	54.91±17.22	44.69±10.52
Gavaj 30	22.0±7.11 ^c	37.34±9.65 ^a	28.62±8.65 ^c	39.07±13.24 ^a	27.09±6.34 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama $\pm$ SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- $p<0.05$, b- $p<0.01$, c- $p<0.001$

Tablo 9. Gavaj yöntemi uygulanmış gebelerin 10 ve 30 günlük yavruların dokularında glutatyon S transferaz (GST) aktivitesi ölçüm değerleri ($\mu\text{mol NADPH}/\text{dak/mg protein}$).

Gruplar	Beyin	Karaciğer	Timus	Dalak	Lenf Nodülleri
Kontrol 10	8.59±2.33	11.78±5.40	17.6±5.84	11.2±2.74	13.5±3.68
Gavaj 10	13.44±1.31 ^c	30.65±1.24 ^c	34.5±0.78 ^c	25.18±1.27 ^c	24.72±0.93 ^c
Kontrol 30	10.78±2.42	16.39±6.42	16.67±4.67	12.5±3.63	15.54±5.67
Gavaj 30	15.45±0.74 ^b	32.63±4.52 ^a	39.77±1.48 ^b	26.25±1.78 ^c	30.61±3.09 ^a

Ölçüm değerleri, ortalama $\pm$ SE olarak tanımlandı. Gavaj 10, kontrol 10 ve gavaj 30, kontrol 30 gruplarına göre istatistiksel anlamlılık değerleri; a- $p<0.05$, b- $p<0.01$, c- $p<0.001$

nu sonucu artan AT oluşumu ve oksidatif stresin karaciğer hastalıklarının patogeneğinde rol oynadığı birçok çalışmanın sonucunda doğrulanmıştır [23]. Artmış lipid peroksidasyonu; apoptoz ile hücre yıkımının yanı sıra, dokuda stellat hücre aktivasyonu ve fibroblast çağılması ile kollojen sentezinin artmasına neden olmaktadır [24]. Çalışmalarda sadece alkolle fibrosis ve sirozun geliştirilemediği belirtilmektedir [25]. Bu nedenle çalışmamızda histopatolojik değişiklikler yerine, alkolün oluşturduğu hücre hasarı ve oksidatif stresin değerlendirilmesi planlanmıştır.

Bizim çalışmamızın sonuçları, önceki çalışmaları desteklediği gibi, etanol uyarılı oksidatif hasarın yalnızca karaciğer dokusunda değil, etanolün metabolize edilmediği lenfoid dokularda da oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte, etanolün membran ve proteinler üzerine direkt etkileri de bulunmaktadır. Etanol, çeşitli iyon kanalı, nörotransmitter ve sinyal proteinlerinin hidrofobik kısmına bağlanarak fonksiyonlarını da etkilediği gösterilmiştir [26]. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, birçok enzimin yapısal değişimine ve fonksiyonel inaktivasyonuna da yol açabilir [25]. Bu görüş açısı altında protein karbonil grupların oluşumu diğer oksidatif modifikasyonlardan daha büyük miktarlarda gerçekleşir.

Bu yüzden, protein karbonil miktarları oksidatif stres, yaşlanma ve hastalıklar esnasında protein oksidasyonu ölçümünde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. GSH, antioksidan glutatyon enzimlerine substrat olarak iş görmesi, serbest radikal yakalayıcı özelliğe sahip oluşu ve protein sülfidril grupların korunmasında, protein ve DNA sentezinde ve enzim düzenlenmesinde başlıca rol oynaması nedeniyle hücre için yaşamsal öneme sahiptir [27]. Birçok çalışmada, GSH'un alkol uyarılı dokü hasarının onarımında rol aldığı, gerek etanol alınımı gerekse gavaj yöntemi uygulanmış birçok deneysel hayvan model çalışmalarında lipid peroksidasyonu artışıyla beraber anlamlı şekilde GSH değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir [28].

GSH değişimine bağlı olarak antioksidan savunma sistemi enzimlerinden GP, GR ve GST aktivitesinde de değişim olması muhtemeldir. Çalışmamızda G10 ve G30 gruplarında tüm dokularda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu yanında, GSH, GP ve GR aktivitesinde azalma, GST aktivitesinde artış gözlemlendi. SOD süperoksit radikalleri hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen radikallere dismutasyon yoluyla dönüştürür. CAT ve GP H_2O_2 'i indirger. Bu yüzden bu enzimler dioksijen aracı-

lara karşı savunmada birbirini destekler biçimde çalışmaktadır. SOD; CAT, GP enzimini, süperoksit anyonun neden olabileceği aktivasyonu azaltma etkisine karşı korurken CAT ve GP, SOD'ı H_2O_2 'in neden olabileceği inaktivasyona karşı korur. Bu enzim aktivitelerindeki azalma, bu enzim sistemi arasındaki dengeyi bozar ve dokularda ROS artışına neden olabilir [29]. Bu bilgilere ilaveten, lenfoid dokular yüksek miktarda doymamış yağ asiti içerir, bundan dolayı oksidatif hasara oldukça hassastır. Bundan başka, bu hassasiyet yeni doğanların lenfoid dokularında antioksidan savunma miktarının az oluşu ve redoks aktif metal iyonların oluşumunda artışla da ilişkilidir [30]. Biyolojik sistemlerde, oksidasyon ve inflamasyonun birbirleriyle bağlantılı olduğu bilinmesine rağmen, hamilelik sırasında alkol alınımına bağlı fetüs ve yeni doğanlarda doku hasarı oluşumunda, oksidatif stres oluşumu ve siokin salınım cevapları arasındaki bağlantıyı araştıran çalışma sayısı azdır [31]. Artmış TNF- α , IFN- γ , IL-1 ve IL-12 miktarları endotoksemiyle oluşan hasar üzerine çok önemli rolleri olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir [32]. Karaciğerde en etkili immün-efektör olan kupffer hücreleri inflamatuvar araçlara karşı cevap olarak TNF- α ve diğer proinflamatuvar sitokinleri üretir. TNF- α , alkol uyarılı karaciğer bozukluğunun gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Kupffer hücreleri TNF- α üretimi için başlıca kaynaktır, akut ve kronik alkol çalışmalarında TNF- α üretiminin oksidatif stresle olan ilişkisine dikkat çekilmiştir [33]. Bir TNF indüksiyonu hepatik inflamasyonunda oluşan en erken olaylardan biri olarak düşünülmektedir, inflamatuvar hücrelerin hepatositleri etkileyip onların öldürülmesini tetikleyen diğer bir sitokin şelalesini uyarır ve fibrinogenesi içeren yara-iyileştirici cevapları başlatır [34]. IFN- γ immün cevapla ilgili bütün hücre tiplerini etkileyen immünregülatör sitokinler arasında özel bir yeri bulunmaktadır. IFN- γ fonksiyonlarının en önemlisi makrofaj ve nötrofiller tarafından sitokinler salınımını düzenler. IFN- γ , TNF- α sentezini arttırır, IL-10 sentezini azaltır [35]. Bu bilgilere ilaveten, alkole bağlı karaciğer bozukluklarının %75'inde interlökin (IL) -1,6,8 ve TNF- α düzeylerinde artış tespit edilmiştir [36]. Bizim bulgularımızda da TH1 yanıtın karaciğer ve lenfoid dokularda artan oksidatif strese paralel olarak değiştiği gözlemlendi.

Çalışmamızdaki bulgular, bu faktörlerin işlevinin yalnızca karaciğerde sınırlı olmayıp, karaciğer hücrelerinden salınıp, dolaşım yoluyla ekstra hepatik doku hasarı mekanizmalarına da katıldığı, antioksidan kapasitesinin azalmasına bağlı olarak, immün cevapların değiştiği hipotezini desteklemektedir [37].

Kaynaklar

1. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006;65:278-290.
2. David P, Subramaniam K. Prenatal alcohol exposure and early postnatal changes in the developing nerve-muscle system. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005;73: 897-903.
3. Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 2003;124: 778-790.
4. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol & Med* 2008;44:723-738.
5. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2009;29:141-154.
6. Rouach H, Fatacciolli V, Gentil M et al. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997;25:351-355.
7. Mottaran E, Stewart SF, Rolla R et al. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Rad Biol & Med* 2002;32:38-45.
8. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002;32: 303-308.
9. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF alpha generation in kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles MAPKs and NF kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:849-853.
10. Hagymasi K, Blazovics A, Lengyel G, Kocsis I, Feher J. Oxidative damage in alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:49-53.
11. Wrona D. Neural-immune reaction: an integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006;172:38-58.
12. Bauminger S, Peleg S. Changes in immunological activity of rat lymphoid organs during pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 1978;32:179-185.
13. Hatman LJ, Kayden Hs. A high performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res* 1979;20:639-645.
14. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
15. Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.

16. Lowry OH, Rosebov NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
17. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. (3'th Edn) Grune&Stratton Newyork 1975;72-131.
18. Paglia DE, Valentine WN. Studies of the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab&Clin Med* 1967;70:158-168.
19. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973;179:588-590.
20. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-7139.
21. Shinha AK. Calorimetric assay of catalase. *Anal Biochem* 1972;47:389-394.
22. Marklund S, Marklund G. İnvolvement of superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-471.
23. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stres and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002;27:63-68.
24. Cubero FJ, Urtasun R, Nieto N. Alcohol and liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2009;29:211-221.
25. Park KJ, Kim HY, Chang BJ, Lee HH. Ameliorative effects of soy 11S protein on liver damage and hyperlipidemia in alcohol-fed rats. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1636-41.
26. Wilkemeyer MF, Sebastian AB, Smith SA et al. Antagonist of alcohol inhibition of cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3690-3695.
27. Rajamani R, Muthuvel A, Senthilvelan M, Sheeladevi R: Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve. *Toxicol Lett* 2006;165:265-273.
28. Kessova IG, Ho YS, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-Induced Liver Injury in Mice Lacking Cu-Zn-Superoxide Dismutase. *Hepatology* 2003;38:1136-1145.
29. Brown LA, Harris FL, Ping XD, Gauthier TW. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? *Alcohol* 2004;33:191-197.
30. Arzate AV, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism *Free Rad Biol & Med Medicine* 2009;47:424-430.
31. Jampana SC, Khan R. Pathogenesis of alcoholic hepatitis: Role of inflammatory signaling and oxidative stress. *World J Hepatol* 2011;27:3:114-117.
32. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN et al. Evidence for IFN- γ as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1992;149:1666-1670.
33. Szabo G, Mandrekar P, Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 β i, TNF- α , and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leu Biol* 1995;58:342-350.
34. Nakatani Y, Fukui H, Kitazawa T, Fujimoto M, Yamao J, Uemura M. Effect of Alcohol on the Secretion of Tumor Necrosis Factor- α by Macrophages in the Presence of Rat Serum. *Alcohol Clin & Exper Res Suppl* 2002;26:81-85.
35. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A et al. Activation of Nuclear Factor Kappa B and sytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30: 934-942.
36. Shakov AN, Woerly G, Car BD, Ryffel B. Interferon-g enhances tumor necrosis factor- α production by inhibiting early phase interleukin-10 transcription. *Eur Cytokine Netw* 1996;7:741-750.
37. Crapo JD. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage *Eur Respir J* 2003;22: (Suppl 44):4-6.