

ETANOL İLE OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER HASARINDA MELATONİNİN OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ

Halit CANATAN¹, Bilal ÜSTÜNDAĞ¹, İ.Halil BAHÇECİOĞLU¹, Fikret KARATAŞ²,
İbrahim H. ÖZERCAN¹

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.07.1999

Protective Effect of Melatonin on Oxidant and Antioxidant Systems in Ethanol-Induced Liver Damage

SUMMARY

Effect of exogenous Melatonin on oxidant and anti-oxidant systems in alcohol-induced liver damage was examined. 36 male rats were used in 3 groups, control (Group 1), ethanol-administration (Group 2), and ethanol and melatonin (10 mg/kg, i.p.) administration (Group 3). Liver damage was demonstrated histopathologically in Group 2 whereas livers from Group 3 showed a slight damage indicating melatonin's protective effect. There was a significant increase ($p<0.01$) in the level of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation (LPO) of Group 2 (11.04 ± 2.09 nmol/mg protein) compared to control group (6.74 ± 1.12 nmol/mg protein) whereas melatonin administrated group had MDA levels (7.97 ± 1.22 nmol/mg protein) close to control. There was an inverse correlation between liver damage and glutathion peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) levels. A significant increase ($p<0.001$) in liver selenium (Se) levels in Group 3 (2.20 ± 0.36 µg/gr wet tissue) compared to Group 2 (1.78 ± 0.35 µg/gr wet tissue) which was close to control (3.04 ± 0.33 µg/gr wet tissue) was observed.

In conclusion, melatonin causes a significant reduction in increased LPO levels, enhances anti-oxidant enzymes effectiveness in alcohol-induced liver damage. Tissue Se level seems to have an antioxidant contribution by affecting anti-oxidant enzymes.

Key words: Ethanol, Liver damage, melatonin, SOD, GSH-Px, Selenium

ÖZET

Bu çalışmada eksojen olarak verilen melatoninin alkole bağlı olarak oluşan karaciğer hasarında oksidan ve antioksidan sistemler üzerine olan etkisi incelendi. 36 erkek rat 3 gruba ayrıldı: grup 1 (Kontrol), grup 2 (Etanol verilen grup), grup 3 (Etanol + 10 mg/kg i.p.melatonin verilen grup). Grup 3 de melatoninin koruyucu etkisinin bir göstergesi olarak hafif bir karaciğer hasarı gözlenmesine rağmen etanol verilen grupta histopatolojik olarak belirgin bir hasar olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyleri açısından, grup 2 de (11.04 ± 2.09 nmol/mg protein) anlamlı bir artış olduğu ($p<0.01$), melatonin verilen grup 3 de ise MDA düzeylerinde (7.97 ± 1.22 nmol/mg protein) kontrol değerlerine (6.74 ± 1.12 nmol/mg protein) yakın bir azalma olduğu tespit edildi. Karaciğer doku hasarı ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve superoksid dismutaz (SOD) aktivite düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğu gözlemlendi. Karaciğer dokusu selenyum (Se) düzeylerinde ise

Grup 3 de (2.20 ± 0.36 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) grup 2 (1.78 ± 0.35 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) ile karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bir artış ($p < 0.001$) olduğu gözlemlendi ve kontrol (3.04 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) değerlerine yakın değerler elde edildi.

Sonuç olarak etkili bir antioksidan ajan olan melatoninin, çalışmamızda etanol uygulanmış ve karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda artmış olan lipid peroksit düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığı, doğal antioksidan enzimleri stimüle ederek onların etkinliklerini artırdığı ve ayrıca doku düzeyinde selenyumun da bu antioksidatif etkinliğe katkıda bulunduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Etanol, Karaciğer hasarı, melatonin, SOD, GSH-Px, Selenyum.

GİRİŞ

Organizmadaki biyolojik moleküller, membranlar ve dokuların serbest radikaller ile oksidasyonu bir çok patolojik durumun ortaya çıkışı ile yakın ilişkilidir. Alkol ve diğer etyolojik faktörlere bağlı olarak karaciğerde oksidatif bir stres hali olduğu ve hücre hasarının siroz ile hepatosellüler karsinoma'ya kadar gidebilen ciddi hastalıklara neden olabildiği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur (1,2). Alkol alımına bağlı olarak artan bu hücre hasarının oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerindeki artış veya vücuttaki antioksidan savunma sistemlerinin düzeylerinin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (2,3). Polavarapu ve ark.(4) kronik olarak alınan alkolün karaciğerde oksidatif değişikliklerle birlikte nekroinflamatuvar hücre değişikliklerine ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olduğunu bildirmektedirler.

Kronik ve yoğun alkol tüketimi belli bir süre sonunda karaciğer hücrelerinde hasara yol açmakta ve özellikle hücre membranlarını etkilemektedir. Çünkü artan serbest radikal ürünleri hücre membranları ile kolayca reaksiyona girmektedirler (5). Membranlarda bulunan poliansature yağ asitleri (PUFAs) sıklıkla hedef moleküllerdir ve membran fosfolipidlerinden hidrojen çıkarılması ile bir lipid peroksidasyon reaksiyon zinciri başlayarak hücre harabiyetine yol açmaktadır. Membranlardaki PUFAs' nin peroksidatif yıkım ürünlerinden olan Malondialdehit (MDA), oluşan bu lipid peroksidasyon ürünlerindedir ve tiyobarbitürük asit ile ölçülerek, artmış olan oksidatif hasarın indirekt bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (5,6).

Organizmada artmış olan bu oksidatif ürünlere karşı harekete geçen enzimatik (Superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz vb) ve non enzimatik (vitamin E, karotenoidler, askorbik asit, ürik asit, bazı proteinler vb) ajanlar vardır (7).

Suresh ve ark. (8) alkole bağlı olarak gelişen hücre hasarı sırasında artmış olan MDA düzeylerinin farklı dozlarda uygulanan C vit ile azaldığını aynı zamanda alkolik karaciğer hasarının bir göstergesi olan gamma glutamil transpeptidaz (γ -GT) düzeylerinin de düştüğünü bildirmektedirler. Organizmada başlıca pineal bezden salınan melatonin (N-Asetil 5-metoksitriptamin) antioksidatif özelliklere sahip, diurnal ritim gösteren ve yapılan çeşitli çalışmalarda artmış lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeylerini azaltan ve indirekt olarak vücuttaki antioksidan enzimler üzerine de etkileri olan oldukça potent bir antioksidandır (9,10).Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda melatoninin, yaşlılık, iskemi reperfüzyon hasarı ve benzeri oksidatif stres tablolarında artmış olan MDA düzeylerini azaltarak, antioksidan enzimlerin bazılarını stimüle ettiği bildirilmektedir (11,12). İleri derecede lipofilik bir hormon olan melatonin hem suda, hem de yağda çözünebildiğinden dolayı oldukça etkili bir antioksidandır (9,12).

Bu çalışmada, kronik alkolik ratlarda alkol alımına bağlı olarak ortaya çıkan ve ciddi sonuçlara yol açabilen lipid peroksidasyonu ve antioksidatif sistemler üzerine melatoninin etkileri araştırıldı. Ayrıca etanolün karaciğerde yapmış olduğu hasarlar histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilerek, antioksidan savunma sistemleri incelendi.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada Elazığ Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsünden temin edilen 150-200 gram ağırlığında toplam 36 erkek Swis wistar albino rat kullanıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı: grup 1 (Kontrol, n=12), grup 2 (Etanol verilen grup, n=12) ve grup 3 (Etanol +10 mg/kg/gün melatonin verilen grup, n=12).

Etanol ile oluşturulan karaciğer hasar modeli

Çalışma gruplarındaki her rat, De Carli ve ark. (13) tarafından tarif edilmiş özel bir likid diyet uygulaması ile beslendi. Bütün ratlara öncelikle bir hafta sadece sıvı diyet uygulandı. İkinci haftadan sonra bir grubun sıvı diyetine isokalorik sukroz eklendi, diğer likid diyet alan iki grubun diyetlerine ise günlere bağlı olarak artan şekilde 8 gr/kg olacak şekilde etanol eklendi. Bu iki grubun diyetine eklenen etanol miktarı haftada 1gr/kg artacak şekilde giderek artırıldı ve 8 hafta sonunda 16 gr/kg a ulaşıldı.

Etanol verilen gruplardan birine (grup 3) taze olarak absolute etanol + % 0.9 NaCl de çözünmüş olan melatonin (1:10) (Sigma Chem Co., St Louis, U.S.A.), etanolla birlikte 8 hafta boyunca her gün 10 mg/kg/gün olacak şekilde intraperitoneal olarak 17.00-18.00 saatleri arasında uygulandı. Diğer etanol alan gruba ise (grup 2) aynı periyotta 8 hafta boyunca plasebo olarak isotonik NaCl enjekte edildi. 8 hafta sonunda dekapite edilen ratlardan alınan kan örneklerinden plazma elde edildi ve aspartat aminotransferaz (ALT), alanin aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) gama glutamil transpeptidaz (γ -GT) enzim aktivite düzeyleri (AST, ALT, ALP, γ -GT kitleri, Technicon Corp, New York, U.S.A) kit kullanılarak Technicon RA-XT (Technicon Corp. MO, U.S.A.) otoanalizöründe hemen çalışıldı. Histopatolojik inceleme ve MDA, GSH-Px, SOD ve selenyum düzeylerinin ölçülmesi amacıyla alınan karaciğer dokuları analiz edilinceye kadar -20°C de saklandı.

Karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin ölçülmesi: Karaciğer dokusu MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. (14)'nın metoduna göre ölçüldü. 1 gr karaciğer dokusuna 9 ml %1.15 KCl eklenerek (1:10) teflon uç yardımıyla Ultra-Tunnax T25 Homogenizer ile homojenize edildi. Daha sonra aşağıdaki ölçüm prosedürü ile karaciğer dokusunda MDA düzeyi belirlendi. 0.2 ml % 10 (w/v) doku homojenatı, 0.2 ml % 8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 1.5 ml % 20 asetik asid solusyonundan eklendi. Daha sonra 1.5 ml % 0.8 aköz tiyobarbitürik asit solusyonundan katılarak, son hacim 4 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. 60 dakika 95°C sıcak kaynar su banyosunda inkubasyondan sonra çeşme suyu ile soğutulularak, 1ml distile su ve 5 ml n-butanol-piridine karışımından (15:1 v/v) eklendi ve santrifüj edilerek üstteki organik tabaka alınıp, 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak MDA düzeyleri hesaplandı.

Enzim ölçümleri için doku Homojenizasyonu : Karaciğer doku örnekleri % 0.9 NaCl ile yıkandıktan sonra 0.05 M fosfat tamponu (pH:7) ile 10 kat sulandırılarak teflon uçlu Ultra-Tunnax T25 Homogenizer ile 4 dakika aerobik şartlarda homojenize edildi. Daha sonra 15000 rpm de (Sorwal soğutmalı santrifüj) 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen supernatantlarda GSH-Px ve SOD aktivite tayinleri yapıldı.

GSH-Px : GSH-Px aktivitesi NADPH' ın glutasyon reduktaz enzimi ile oksidasyonu esasına dayalı olarak çalışan Paglia ve ark (15)' nin metoduna göre ölçüldü.

SOD: Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi, homojenatlar hazırlandıktan sonra supernatantlarda, ksantin-ksantin oksidaz enzim sistemi ile üretilen superoksidin nitroblue tetrazolium ile indirgenmesine dayalı olarak çalışan Sun ve ark. (16) tarafından modifiye edilen metoda göre ölçüldü. 1 Unite SOD, nitroblue tetrazoliumun indirgenmesini % 50 oranında azaltan miktar olarak belirtildi ve spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi. Protein düzeyleri ise Lowry (17) metoduna göre ölçüldü ve sonuçlar spesifik aktivite (U/mg protein) olarak ifade edildi.

Karaciğer doku selenyum ölçümleri: Doku örnekleri Breyer ve ark. (18) tarafından modifiye edilen metoda homojenize edildikten sonra florasan spektrofotometre (Perkin Elmer 100,U.S.A.) ile tayin edildi.

Patolojik İnceleme: Karaciğer doku örnekleri %10' luk formalin içinde fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü ve daha sonra bloklardan alınan kesitler Hematoksilen Eozin ile değerlendirildi. Işık mikroskobu ile x40, x100, x200 ve x400 büyütmelemlerde patolojik değişiklikler incelendi (19).

İstatistik: Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde ANOVA testi (Kruskal Wallis) ve post ANOVA testlerinden Tukey B ve Scheffe testleri kullanılırken, karaciğer doku düzeyindeki patolojik değerlendirmelerde Ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

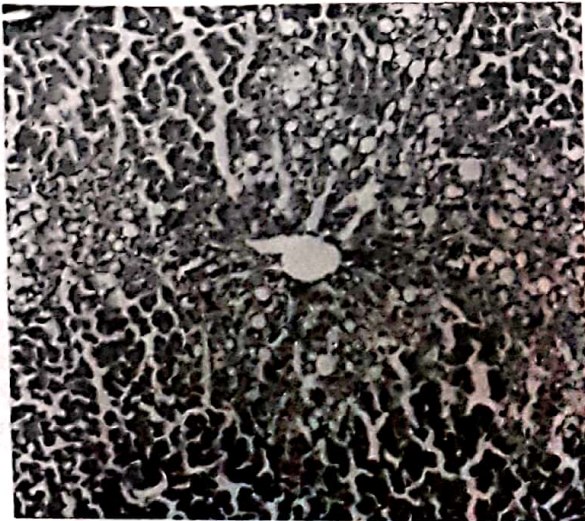
Çalışma sonucunda etanol verilmiş ratlarda, karaciğer dokusunda belirgin bir yağlanma, inflamatuvar hücre artışı ve nekrotik odaklarla birlikte yer yer fibrotik değişiklikler gözlenirken, melatonin verilen grupta yağlanmanın anlamlı ölçüde

azaldığı, nekrotik odakların daha az olduğu ve fibrozisde de azalma olduğu belirlendi (Şekil 1, Şekil 2). Bu histopatolojik bulgular biyokimyasal olarak çalışılan enzim düzeyleri ile bir paralellik göstermekteydi. Özellikle alkole bağlı karaciğer

hasarında artan γ -GT düzeyleri etanol verilmiş grupta 8.12 ± 1.98 U/L iken etanolla birlikte melatonin verilen grupta 4.98 ± 1.06 U/L anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.05$) (Tablo 1).

Tablo I- Kontrol, etanol verilen grup ve etanol +melatonin verilen gruplara ait karaciğer doku LPO, GSH-Px, SOD aktivite düzeyleri ve selenyum değerleri ile bazı biyokimyasal parametreler (ANOVA ; Tek yönlü varyans analizi, post ANOVA Tukey B ve Scheffe testleri) Veriler Ortalama \pm Standart sapma olarak gösterilmiştir (NS:Anlamsız $p > 0.05$).

	Kontrol I	Etanol verilen grup II	Etanol+Melatonin III	P	
Karaciğer doku MDA (nmol MDA/mg protein)	6.74 \pm 1.12	11.04 \pm 2.09	7.97 \pm 1.22	p<0.001	I-II
Karaciğer doku GSH-Px (U/mg protein)	31.60 \pm 3.79	24.95 \pm 2.37	32.92 \pm 3.39	p<0.05	I-II
Karaciğer doku SOD (U/mg protein)	536.84 \pm 26.43	460.61 \pm 15.10	517.55 \pm 14.54	p<0.001	I-II
Karaciğer doku Se (μ g /gr doku)	3.04 \pm 0.33	1.78 \pm 0.35	2.20 \pm 0.36	p<0.001	I-II
ALT (U/L)	82.16 \pm 10.52	261.43 \pm 40.87	147.21 \pm 18.71	p<0.01	I-II
AST (U/L)	184.13 \pm 21.45	316.07 \pm 81.25	361.95 \pm 49.52	p<0.05	II-III
ALP (U/L)				p>0.05	NS
γ -GT (U/L)	3.56 \pm 1.29	8.12 \pm 1.98	4.98 \pm 1.06	p<0.05	I-II
					II-III

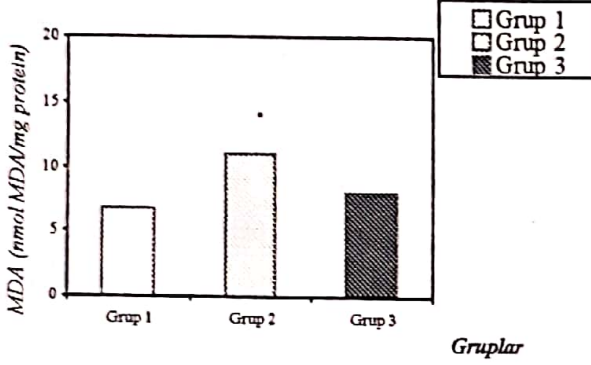


Şekil 1. Etanol ile oluşturulmuş rat karaciğerinde histopatolojik değişikliklerin görünümü (Yağlanma, inflamatuvar hücre artışı ve nekrotik odaklarla birlikte fibrotik değişiklikler) (HEx100).

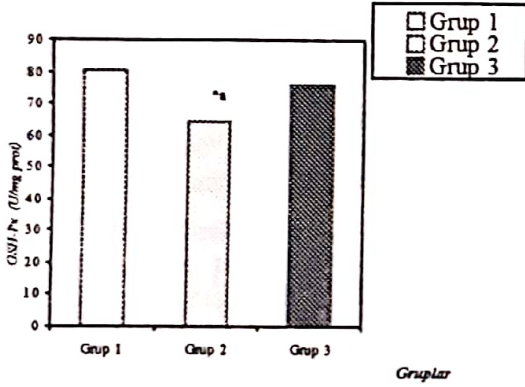


Şekil 2. Etanol ile oluşturulmuş rat karaciğerinde histopatolojik değişikliklerdeki azalmanın görünümü (HEx100).

Çalışmalarda grup 2 de MDA düzeylerinin (11.04 ± 2.09 nmol/mg protein) kontrol grubu (6.74 ± 1.12 nmol/mg protein) ratlara göre anlamlı olarak arttığı gözlenirken ($p < 0.001$), melatonin verilen grupta (7.97 ± 1.22 nmol/mg protein) ise etanol uygulanmış gruba göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p < 0.001$) (Şekil 3).

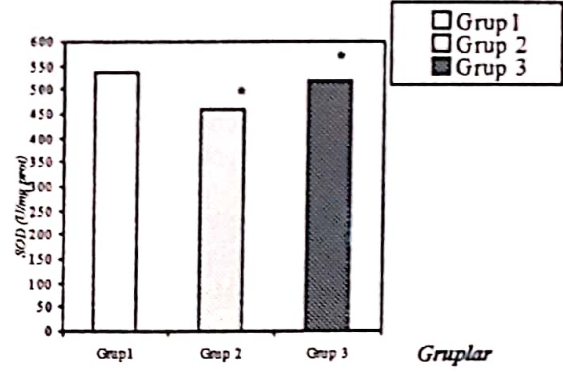


Şekil 3. Melatoninin etanol ile oluşturulmuş karaciğer hasarında, karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri üzerine etkileri. Grup1 (Kontrol), grup 2 (Etanol verilen grup), grup 3 (Etanol+melatonin verilen grup). * $p < 0.001$ (Grup 1-Grup 2) ve (Grup 2-Grup 3). (ANOVA, Kruskal Wallis)



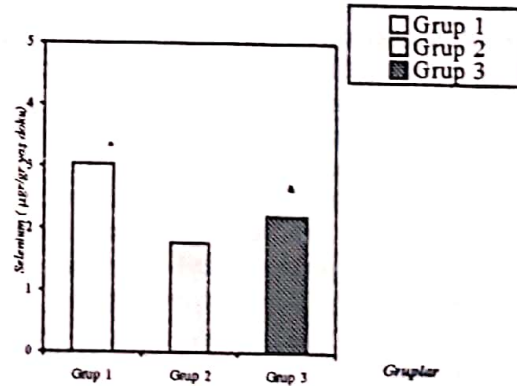
Şekil 4. Melatoninin etanol ile oluşturulmuş karaciğer hasarında karaciğer dokusundaki GSH-Px aktivite düzeyleri üzerine etkileri. Grup1 (Kontrol), grup 2 (Etanol verilen grup), grup 3 (Etanol+melatonin verilen grup) * $p < 0.051$ (Grup 1-Grup 2) ve (Grup 2-Grup 3) (ANOVA, Kruskal Wallis).

Karaciğer dokusunda ölçülen glutatyon peroksidaz aktivite düzeylerinde kontrol grubuna (31.60 ± 3.79 U/mg protein) göre grup 2 de (24.95 ± 2.37 U/mg protein) anlamlı bir azalma ($p < 0.05$) gözlenirken, melatonin uygulanan grupta (32.92 ± 3.39 U/mg protein) grup 2 ye göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 1, Şekil 4).



Şekil 5. Melatoninin ratlarda etanol ile oluşturulmuş alkolik karaciğer hasarında, karaciğer dokusu SOD aktivite düzeyleri üzerine etkileri. Grup1 (Kontrol), grup 2 (Etanol verilen grup), grup 3 (Etanol+melatonin verilen grup) * $p < 0.001$ (Grup 1-Grup 2) ve (Grup 2-Grup 3). (ANOVA, Kruskal Wallis)

Yine karaciğer dokusunda SOD aktivite düzeyleri açısından kontrol grubuna (536.84 ± 26.43 U/mg protein) göre etanol verilen grupta (460.61 ± 15.10 U/mg protein) anlamlı bir azalma olurken ($p < 0.001$) melatonin uygulanmış grupta (517.55 ± 14.54 U/mg protein) kontrol düzeylerine yakın değerler ölçülmüştür ve bu değerler grup 2 ye göre anlamlı düzeyde farklılıklar göstermektedir ($p < 0.001$) (Tablo 1, Şekil 5).



Şekil 6. Melatoninin ratlarda etanol ile oluşturulmuş alkolik karaciğer hasarında karaciğer dokusu selenyum düzeyleri üzerine etkileri. Group1 (Kontrol), group 2 (Etanol verilen grup), grup 3 (Etanol+melatonin verilen grup). * $p < 0.001$ (Grup 1-Grup 2), * $p < 0.05$ (Grup 1-Grup 3) ve (Grup 2-Grup 3) (ANOVA, Kruskal Wallis)

Karaciğer dokusunda ölçülen selenyum değerleri de melatonin verilen grupta (2.20 ± 0.36 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) etanol uygulanmış gruba göre (1.78 ± 0.35 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) anlamlı bir artış göstermiş ($p < 0.05$) ve kontrol grubu (3.04 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku) ratlarda ölçülen değerlere yakın çıkmıştır (Tablo 1, Şekil 6). Selenyum değerleri özellikle melatonin verilen grupta glutasyon peroksidaz düzeyleri ile anlamlı ölçüde korele olan bir artış göstermiştir ($r: 0,651$ $p < 0.01$).

TARTIŞMA

Kronik alkol alımının veya karaciğeri etkileyen çeşitli hastalıkların karaciğerde oksidatif bir stres durumuna yola açarak, doku harabiyeti, siroz ve karaciğer kanserlerine kadar gidebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1,2,20). Hirano ve ark. (21) uzun süreli ve yoğun olarak alınan alkolün selektif olarak hepatik mitokondrial glutasyon içeriğinin azalmasına ve artan oksidatif maddelerin zararsız hale getirilememesi sonucu hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinden hidrojen çıkarmak suretiyle lipid peroksidasyon reaksiyon zincirini başlatarak lipid peroksid ürünleri ortaya çıkarttığını bildirmişlerdir. Gerçekten artan bu lipid peroksid ürünleri membranda giderek artan seri reaksiyonlar sonucunda hücre bütünlüğünü bozmakta ve harabiyete yol açmaktadır. Yine yapılan diğer çalışmalarda alınan alkolün doz ve zaman bağımlı olarak organizmada antioksidan savunma sistemlerini etkileyerek lipid peroksid ürünleri olan ve tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren malondialdehid oluşumunun arttığı, artan bu oksidatif strese bağlı olarak alkolün organizmada hepatik vitamin E düzeylerini de azaltarak lipid peroksidasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (22,23). Ayrıca etanolün direkt olarak pinealden sentezlenen melatonin hormon sentezini inhibe ettiği, hücre membran yapısını ve permeabilityi bozduğu da bildirilmektedir (24). Bu yüzden deneysel olarak etanol alımına bağlı olarak gelişen karaciğer hasarında eksojen olarak verilen melatoninin etkisini araştırdığımız çalışmamızda, uyguladığımız etanole bağlı olarak etanol verilen grupta ölçülen malondialdehid düzeyleri (11.04 ± 2.09 nmol /mg protein) kontrol grubuna (6.74 ± 1.12 nmol /mg protein) göre anlamlı olarak ($p < 0.001$) artarken etanolle beraber melatonin uyguladığımız grupta (7.97 ± 1.22 nmol/mg protein) malondialdehid düzeyleri sadece etanol verilen gruba göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$) ve kontrol grubu değerlerine yakın değerler elde edildi. Artmış bu malondialdehid

düzeyleri ile, histopatolojik incelemelerde elde edilen sonuçlar paralellik göstermekteydi.

Histopatolojik inceleme sonucunda, alkol verilen grup ratların karaciğerlerinde yağlanma, hepatositlerde zedelenme ve nekroz ile inflamatuvar hücre infiltrasyonları gözlenirken, yapılan biyokimyasal çalışmalarda SGOT, SGPT enzimleri kontrol grubuna göre etanol verilen grupta anlamlı artışlar gösterirken en anlamlı artış özellikle alkolik hasarın bir göstergesi olan γ -GT düzeylerinde gözlemlendi. Zira Alkole bağlı olarak gelişen hücre hasarı sonrasında plazmaya geçen γ -GT düzeyleri spesifik olarak artmaktadır.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda akut metanol intoksikasyonu (25) ve etanol uygulamasında (26) karaciğer dokusunda, serum ve eritrositlerde MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı bildirilirken, Coudray ve ark.(27) ise uygulanan etanolün ne lipid peroksid düzeyleri üzerine, ne de antioksidan enzimlere fazla etkili olmadığını bildirmekte dirler. Biz bu durumun, araştırmacıların uygulamış olduğu etanol dozu ve uygulama protokolünden kaynaklandığını düşünmekteyiz, zira etanole bağlı olarak gelişen oksidatif hasarda alkolün dozu ve alınma süresi oldukça önemlidir. Araştırmamızda, daha önce yapılmış bir çok çalışmada uygulanan prosedür uygulanmış ve etanole bağlı olarak lipid peroksid düzeylerinde artış olduğu ve bu artışın melatonin uygulaması ile gerilediği görülmüştür.

Çalışmada elde ettiğimiz bulgular, yaşlı ratlarda artmış olan plazma MDA düzeylerinin melatonin uygulaması ile anlamlı olarak azaldığını bildiren Gonca ve ark. (11) ile, iskemi reperfüzyon hasarında karaciğer dokusunda artan MDA düzeylerinin melatonin uygulaması ile anlamlı olarak azaldığını bildiren Sewerynwek ve ark.(12)'nın bulguları ile uyumludur.

Pinealden salınan güçlü bir antioksidan hormon olan melatonin, antioksidan özelliğini sadece lipid peroksidasyonu üzerinden göstermemektedir. Aynı zamanda, organizmada oluşan superoksid anyonlarını daha az zararlı hidrojen perokside çeviren SOD, hidrojen peroksidi parçalayarak suya dönüştüren GSH-Px, membranlardan kolaylıkla geçebilen ve en potent serbest radikal olan hidroksil (OH) radikaline dönüşebilen hidrojen peroksidi su ve oksijene çeviren katalaz gibi antioksidan enzimler üzerine de etkilidir (28).

Suresh ve ark. (8) tarafından yapılan çalışmada, alkolik hasar üzerine yüksek doz vitamin

C uygulamasının artmış olan MDA düzeylerini azaltırken aktiviteleri azalan SOD ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerini ise arttırdığı tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar vitamin C' nin, yükselmiş olan □□GT düzeylerini azalttığını bildirmektedirler. Yine vitamin E ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda ileri derecede lipofilitesi ve güçlü antioksidan özellikleri ile melatoninin vitamin E' den 2 kat daha etkin bir şekilde alkolik karaciğer hasarı veya oksidatif strese bağlı durumlarda artmış olan MDA düzeylerini düşürdüğü ve antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px düzeylerini de arttırdığı gözlenmiştir (7,29). Bizim çalışmamızda da etanol verilen grupta kontrole göre azalmış olan GSH-Px ve SOD aktivite düzeylerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ancak melatonin uygulaması ile artış gösterdiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmektedir. GSH-Px enzimi hidrojen peroksidi de içeren peroksidlerin yıkılmasını katalize eden önemli bir antioksidan enzimdir. Yıkılamayan hidrojen peroksid fazla toksik olmamasına rağmen membranlardan kolaylıkla geçerek daha toksik olan OH[•] radikale dönüşebilmesi açısından oldukça önemlidir. GSH-Px aynı zamanda selenyum bağımlıdır ve çalışmamızda da görüldüğü gibi GSH-Px ile iyi bir korelasyon gösteren selenyum düzeyleri de etanol verilmiş grupta azalmışken melatonin uygulanan grupta artmış ve kontrol değerlerinin bile üstüne çıkmıştır. Melatoninin GSH-Px enzim düzeyi üzerindeki etkinliği oldukça önemlidir ve bu etki

özellikle beyin dokusunda yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Zira beyinde oluşan oksidatif ürünleri yok etmek için en önemli enzim GSH-Px' dir. Melatonin bu enzimi beyin dokusunda stimule ederek etkili olmakta ve bu şekilde oluşabilecek OH[•] radikallerini indirekt olarak da yok etmektedir. Omodeo ve ark.(30) tarafından yapılan çalışmada kronik alkol alımına bağlı olarak beyin dokusunda oluşan MDA düzeyleri ve OH[•] radikal ilişkisini incelediklerinde, burada oluşan hasarın daha çok OH[•] radikali aracılığı ile olduğunu bildirmektedirler. Bu yüzden melatonin verilmesiyle GSH-Px aktivitesinde görülen artış oldukça önemli olmakta ve muhtemelen oluşan diğer serbest radikallerin giderilmesinde de rol oynamaktadır (31).

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin ışığında, alkole bağlı gelişen, gerek artmış hepatik oksidatif stres ve gerekse nonenzimatik antioksidanların (Vit E vb) azaldığı alınan diyetdeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan kaynaklanan hücre hasarlarının temelinde oksidatif ürünlerin ve antioksidan enzimlerde görülen azalmanın önemli olduğu, eksojen olarak verilen melatonin artmış lipid peroksid ürünlerini azaltarak, antioksidan enzimler üzerine de olumlu etkiler göstererek karaciğerde alkole bağlı olarak gelişen harabiyeti önleyebileceği veya en azından geriletebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Sherlock, S., Dooley, J. Alcohol and the liver. In Diseases of the Liver and Biliary System. Blackwell Science, London.1997; pp385-403
- 2- Teare JP, Greenfield SM, Watson D et al. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. Gut 1994; 35 :1644-1647.
- 3- Rouach H, Fatacccioli 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.
- 4- Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE. et al. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. Hepatology 1998; 27: 1317-1323.
- 5- Köse K, Doğan P. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes . 1.Protective effect of Gingko Biloba extract (Egb761) J Int Med Res 1995; 23: 9-18.
- 6- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1.Baskı, Konya, 1995; 1-84.
- 7- Sies H and Stahl W. Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1315-1321.
- 8- Suresh MV, Sreeranjit Kumar CV. et al. Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in quinea pigs. Toxicol Lett 1999; 104: 221-229.
- 9- Longoni B, Salgo MG, Pryor WA. et al. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. Life Sci 1998; 62: 853-859.
- 10- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B. et al. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of

- bioactive substance. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-357.
- 11- Gonca Akbulut K, Gönü I.B., Akbulut H. Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. *Gerontology* 1999; 45: 67-71.
 - 12- Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D. et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 898-905.
 - 13- Lieber, C.S. and De Carli, L.M. Quantitative relationship between the amount of dietary fat and the severity of alcoholic fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.* 1970; 23: 474-478.
 - 14- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid relations. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
 - 15- Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
 - 16- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34: 497-500.
 - 17- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* 1951; 193: 262-275.
 - 18- Breyer, P.H. and Gilbert, B.P. Determination of selenium (IV) differential pulse voltammetry of the 3,3'-diaminobenzidine piazoselenol. *Anal. Chim. Acta* 1987; 201: pp 23-32.
 - 19- Adler M, and Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med* 1979; 67: 811-816.
 - 20- Kılınç K. Oksijen radikalleri üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya dergisi* 1985; 10: 60-89.
 - 21- Hirano T, Kaplowitz N, Tsuamoto H. et al. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 1992; 16: 1423-1427.
 - 22- Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol* 1999; 17: 97-105.
 - 23- Amin AN, Eun KY, Fogt F. et al. Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established experimental alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Therap.* 1996; 277: 1694-1700.
 - 24- Schmitz MM, Sepandj A, Pichler PM. et al. Disrupted melatonin-secretion during alcohol withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996; 20: 983-995.
 - 25- Skrzydlewska E, Farbis, Zewski R. Lipid peroxidation and antioxidant status in the liver, erythrocytes, and serum of rats after methanol intoxication. *J Toxicol Environ Health* 1999; 53: 637-649.
 - 26- Genç S, Gürdol F, Öner İyidoğan Y. et al. The effect of melatonin administration on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 1998; 37: 37-40.
 - 27- Coudray C, Richard MJ, Faure H. et al. Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin Chim Acta* 1993; 219: 35-45.
 - 28- Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 103-117.
 - 29- Pieri C, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R. Melatonin: peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994 ; 55: 271-276.
 - 30- Omodeo Sale F, Gramigna D, Campaniello R. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Neurochem Res* 1997; 22: 577-582.
 - 31- Russel J Reiter. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 1998; 56: 359-384.