

SOY İZOFLAVONLARIN KARBON TETRAKLORÜRE (CCL₄) BAĞLI KARACİĞER HASARI VE PLAZMA PARAOKSONAZ İLE ARİLESTERAZ AKTİVİTE DÜZEYLERİNE OLAN ETKİLERİ

Bilal ÜSTÜNDAĞ¹ İbrahim H.BAĞÇECİOĞLU² Kazım ŞAHİN³ Funda GÜLCÜ¹
Sevda DÜZGÜN¹ İbrahim H.ÖZERCAN¹ M.Ferit GÜRSU¹

¹Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ –TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ –TÜRKİYE

Geliş Tarihi:21.10.2005 Kabul Tarihi: 26.12.2005

ÖZET

Flavonoidler yaygın olarak tanınan ve biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonu inhibe edici doğal antioksidan yapılarıdır. Bu çalışmada soy izoflavonların ratlarda CCL₄ ile deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı.

Deneylerde 28 adet erkek rat kullanıldı: Grup1 (n=7) (kontrol, 5 hafta bazal diyet alan grup), Grup2 (n=7) (5 hafta bazal diyet+oral soy izoflavon (Diyette 100mg/kg) alan grup, Grup3 (n=7) (5 hafta i.p. haftada 3 gün 0,15 ml/100g ³/₄ oranında zeytin yağı içinde CCL₄ uygulanan ve bazal diyet alan grup), Grup4 (n=7) (5 hafta i.p.olarak haftada 3 gün 0,15 ml/100g ³/₄ oranında zeytin yağı içinde CCL₄ uygulanan ve oral soy izoflavon (Diyette 100mg/kg) alan grup). Plazma malondialdehit (MDA), paraoksonaz, arilesteraz ve diğer biyokimyasal parametreler uygun metodlarla ölçüldü.

Plazma MDA düzeyleri grup3 de; grup1,2 ve grup 4'den anlamlı olarak yüksek olup (sırasıyla p<0.01, p<0.01, p<0.05). Karaciğer doku MDA düzeyleri ise grup3 de; grup 1,2 ve grup4 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.01). Grup4 ile grup3 karşılaştırıldığında plazma ve karaciğer doku MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (P<0.05). Plazma paraoksonaz ve arilesteraz düzeyleri grup3 de, grup1 ve grup 4 ten anlamlı olarak daha düşüktü (P<0.05). Grup3 ve grup4 arasında MDA düzeyleri ve plazma paraoksonaz düzeyleri arasında negatif bir korelasyon vardı (r:-0.5378, p<0.01, r: -487 p<0.01).

Bulgularımız soy izoflavonların antioksidatif etkinliğe sahip olduğu ve soy izoflavon uygulamasının oksidatif hasarı önlemede paraoksonaz gibi bazı antioksidan özelliğe sahip enzimleri de stimule ederek etkili olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Soy izoflavon, Karaciğer hasarı, Lipid peroksidasyonu, Paraoksonaz.

ABSTRACT

Effects of Soy Isoflavones on Carbon Tetrachloride (CCL₄)-Induced Liver Damage and on the Level of Plasma Paraoxonase with Arylesterase Activities

Flavonoidler are widely recognized as a naturally occurring antioxidant that can inhibit lipid peroxidation in biological membrane. In this study, the effects of soy isoflavones on the liver damage and the level of plasma paraoxonase with arylesterase activities were investigated on the CCL₄-induced liver damage in rats.

Total of twenty eight male rats were used in the experiments:Group1 (n=7) (control,basal diet for five weeks), group2 (n=7) (basal diet plus oral soyisoflavones (100mg/kg of diet) for five weeks), group3 (n=7) (treated with three times/week i.p.CCL₄ (0.15 ml/100gr of body weight) and basal diet for five weeks,group4 (n=7) (treated with three times/week i.p.CCL₄ (0.15 ml/100gr of body weight) and basal diet plus oral soy isoflavones (100mg/kg of diet)for five weeks.

Plasma Malondialdehyde (MDA) and paraxonase, arylesterase and biochemical parameters were measured with appropriate methods.

The level of MDA was higher in plasma of group3 than group1,2 and group4(respectively P<0.01, P<0.01, P<0.05). The level of liver tissue MDA was significantly increased in group2 compared to group1,2 and group4 (P<0.01). There was a significant reduction in plasma and liver MDA in group4 compared to group3 (P<0.05). The level of plasma paraoxonase and arylesterase activities were lower in group3 than group1 and group4 (p<0.05).There was a inverse correlation between level of plasma MDA and paroxonase in group3 and group4 (r:-0.537, P<0.01, r: -487 P<0.01).

Our findings suggest that soy isoflavones, have an antioxidative effect, soy isoflavones treatment helped to prevent oxidative injury by stimulating some antioxidant enzymes, paraoxonase.

Key Words: Soy Isoflavanes, Liver damage, Lipid peroxidation, Paraoxonase.

GİRİŞ

Karbon tetra klorür (CCl₄) deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan bir ksenobiyotiktir ve mitokondriyal monooksijenaz (P450 2E1) sistemince metabolize edilir. Metabolizma esnasında öncelikle stabil olmayan başlangıç metaboliti triklorometil (CCl₃) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklorometil peroksit (Cl₃ COO⁻) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür. Daha sonra sekonder olarak oluşan konjuge dien, lipit hidroperoksit ve malondialdehit gibi yapılar ile kısa zincirli karbonhidratlar oluşur (1,2). Oluşan bu serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asidlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine yol açarlar.

CCl₄' e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipit peroksidasyonu oldukça önemlidir (3, 4). Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreç sonunda karaciğer fibrozu ve siroz oluşabilir. Karaciğer fibrozu, ekstrasellüler matriks komponentlerinin artması ile karakterize, dinamik bir süreçtir. Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak, potent profibrojenik mediatörlerin de aktive olması ile sürekli matriks yapımı yönünde bozulmaktadır (5). Yapılmış olan bir çok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (6, 7). Yapısında major olarak flavonoid ve terpenoidleri içeren Gingko biloba ekstraktı (EgB761) uygulamasının, CCl₄ ile deneysel karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (8). Yine ratlarda CCl₄ ile oluşturulan hepatoksisiteye karşı Ginseng bileşiklerinin de koruyucu antioksidan özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (9).

Fitoöstrojenler ailesinden; soy izoflavonların konjuge halka yapıları ve hidroksil grupları sayesinde potansiyel antioksidan olarak, superoksit anyonları ve lipit peroksid radikallerini temizledikleri ve serbest radikaller ile ilişkili olaylarda hidrojenasyon veya kompleks yapılar oluşturarak okside edici ajanları stabilize edebildikleri gösterilmiştir (8, 10, 11, 12). Soy izoflavonlar kanser ve çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıları yok ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimule ederek (13), intrasellüler oksidatif stresi azaltarak,

nitrik oksit ve peroksit radikalleri de direkt olarak temizleyerek etkili olabilmektedirler (14). Ayrıca flavonoidlerin hiperkolesterolemik ratlarda antioksidan etkiler gösterdiği ve koruyucu olduğu rapor edilmiştir (15). Soy izoflavonların bu özellikleri yanı sıra düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunun önlenmesinde etkili oldukları ve bu etkilerini direkt veya indirekt gösterebildikleri ileri sürülmüştür. LDL oksidasyonunun önlenmesinde yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) aracılığıyla gerçekleşen olaylarda antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzimi önemli bir rol oynamaktadır (16, 17).

Bu çalışmada taşımış oldukları fonksiyonel hidroksil grupları açısından önemli olan genistein, daidzein ve glyciteinden oluşan major soy izoflovanların, ratlarda CCl₄ ile deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarı üzerindeki etkileri ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz enzim düzeyleri arasındaki ilişkileri araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları

Deneylerde 28 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar 12 saat gün ışığı alan bir özel odada hazırlanmış kafeslerde muhafaza edildi. Çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Ratların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından sağlanan özel rat yemi kullanıldı. Kafeslerde özel bölümlere yerleştirilen uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişeler ile su verildi.

Ratlar eşit sayıda 4 gruba bölündü: Grup1 (n=7) (kontrol, 5 hafta sadece bazal diyet alan grup), Grup2 (n=7) (5 hafta bazal diyet+oral soy izoflavon (Diyette 100mg/kg) alan grup, Grup3 (n=7) (5 hafta i.p. olarak haftada 3 gün 0,15 ml/100g ³/₄ oranında zeytin yağı içinde CCl₄ uygulanan ve sadece bazal diyet alan grup), Grup4 (n=7) (5 hafta i.p. olarak haftada 3 gün 0,15 ml/100g ³/₄ oranında zeytin yağı içinde CCl₄ uygulanan ve oral soy izoflavon (Diyette 100mg/kg) alan grup).

Çalışma gruplarına içerisine major soy isoflovanlar olan genistein (5,7,4-trihidroksi izoflavon), daidzein (7,4-dihidroksi izoflavon) ve glycitein (7,4-dihidroksi6-metoksi izoflavon) katılmış özel olarak hazırlanmış yem verilmiştir (Tablo I).

Tablo 1. Çalışma gruplarına verilen yem içeriği ve soy izoflavon içerikleri

	Grup 1 Kontrol+ Bazal diyet (n= 7)	Grup 2 Kontrol+ Soyizoflovan diyet (n= 7)	Grup 3 CCL₄+ Bazal diyet (n= 7)	Grup 4 CCL₄+ Soyizoflovan diyet (n= 7)
Normal Rat yemi	+	+	+	+
Soy izoflavon (100mg/kg Rat yemi)				
<i>Genistein</i>	-	21,05 mg/100mg	-	21,05 mg/100 mg
<i>Daidzein</i>	-	47,36 mg/100 mg	-	47,36 mg/100 mg
<i>Glycitein</i>	-	34,21 mg/100 mg	-	34,21 mg/100 mg

Plazma MDA ölçümleri

Plazma MDA düzeyleri Satoh (18) ve Yagi (19) tarafından modifiye edilmiş olan tiyobarbitürik (TBA) asit metodu ile ölçüldü. Metod lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ve TBA arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Doku homojenizasyonu ve karaciğer doku MDA ölçümleri

Alınan doku örnekleri soğuk % 0.9 NaCl ile yıkandıktan sonra ıslaklığı alınarak tartımı yapıldı ve çalışma yapılıncaya kadar -70 C⁰ de derin dondurucuda saklandı. Çalışma esnasında 1 gram doku başına 9 ml % 1.15 'lik KCl (1/10 oranında) olacak şekilde homojenat hazırlandı. Hazırlanan homojenattan lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA düzeyleri, Ohkawa ve ark. (20) tarafından belirlenen metodla spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm prosedüründe; 0.2 ml % 10 (w/v) doku homojenatına, 0.2 ml % 8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 1.5 ml % 20 asetik asit solusyonundan eklendi. Ardından 1.5 ml %0.8 aköz TBA solusyonundan eklenerek son hacim 4 ml olacak şekilde distile su eklendi. 95 C sıcaklıkta kaynar su banyosunda inkubasyondan sonra çeşme suyu ile soğutularak 1 ml distile su ve 5 ml n-butanol-piridin karışımından (15:1 v/v) konuldu. Santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki organik tabaka alınarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak verildi.

Plazma Paraoksonaz ve Arilesteraz ölçümü

Plazma paraoksonaz aktivitesi ölçümü substrat olarak kullanılan paraoksonun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün ölçümü esasına dayanan Ruiz ve ark (21) metodu ile ölçüldü. Plazma paraoksonaz düzeyleri; 2 mmol/L CaCl₂, 1 mol/L NaCl ve 2 mmol/L paraokson (O-O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat) içeren 0.1 mol/L pH:8 Tris-HCl

buffer çözeltisi kullanılarak; 1400 µl bu reaktif karışımına 40 µl serum örneğinin ilave edilmesiyle oluşan 4-nitrofenolün 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi.

Plazma arilesteraz aktivitesi ise substrat olarak kullanılan fenilasetatın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenolün ölçümü esasın dayanan Juretic ve ark (22) metodu ile ölçüldü. 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L fenilasetat içeren 0.1 mol/L pH:8 Tris-HCl buffer çözeltisi kullanılarak; 1500 µl bu reaktif karışımına 10 µl 1/50 dilüe serum örneğinin ilave edilmesiyle oluşan fenolün 270 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi.

İstatistiksel değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Parametrelerin gruplar arasındaki değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analiz testi, Kruskal Wallis, ikili karşılaştırmalarda ise Mann Whitney-U testi ile değerlendirme yapıldı. Ayrıca bazı parametreler için Pearson Spearman korelasyon testleri kullanıldı. İstatistik değerlendirmeler SPSS 11.0 paket program kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışma sonucunda elde edilen rutin biyokimyasal parametreler tablo II de gösterildi. Aspartat transaminaz (AST) ve Alanin transaminaz (ALT) değerlerinin kontrol gruplarına göre CCL₄ uygulanmış grupta oldukça anlamlı artış gösterdiği saptandı (b p<0.001 (grup 3-1 ve grup3-2)). CCL₄ ile birlikte soy izoflavon verilen grupta da kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış olmakla beraber (a P<0.05 (grup 4-1 ve grup 4-2)), sadece CCL₄ verilmiş grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (b P<0.001 (grup 4-3)). Plazma gama-glutamil transferaz (GGT) düzeylerinde de özellikle CCL₄ uygulanmış grupta; kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış olduğu (c P<0.001 (grup 3-1 ve grup3-2)), CCL₄ ile birlikte soy izoflavon uygulanan grupta ise kontrol gruplarına göre anlamlı olarak

yüksek olmakla beraber (b P<0.01 (grup 4-1 ve grup 4-2)), CCL₄ verilen gruba göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (a P<0.05 (grup 4-3)), (Tablo II).Gruplarda total protein ve albumin düzeylerinin ise özellikle CCL₄ uygulanmış grupta , kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (a P<0.05 (grup 3-1 ve grup3-2)). Alkalen fosfat düzeyleri ise CCL₄ uygulanmış ratlarda kontrol gruplarına ve CCL₄ ile birlikte soyisoflavon uygulanmış gruplara göre anlamlı olarak artış gösterdi (sırasıyla b P<0.001 (grup 3-1), a p<0.05 (grup3-2) ve (grup 3-4)). Kontrol grubu ile sadece soy izoflavon verilen grup arasında rutin parametreler arasında alkalene fosfataz dışında (b P<0.01 (grup1-2)) anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

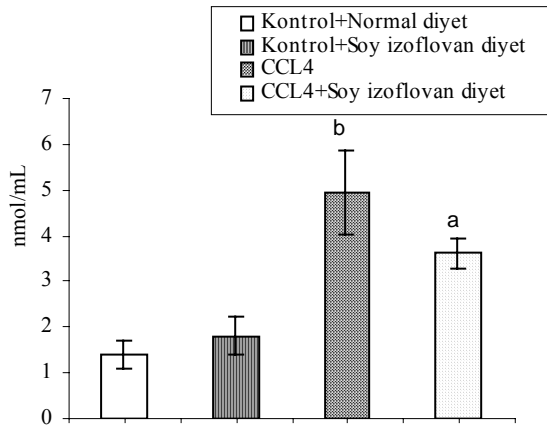
CCL₄ uygulanmış ratlarda plazma MDA düzeylerinin, kontrol grupları ve CCL₄ ile birlikte soy izoflavon verilen grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla b P<0.01 (grup 3-1 ve grup3-2) ve a P<0.05 (grup3-4)). (Tablo III). Karaciğer doku MDA düzeyleri de CCL₄ uygulanan grupta, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (b P<0.01, (grup 3-1 ve grup3-2)). CCL₄ ile birlikte soy izoflavon uygulanan grupta karaciğer doku MDA düzeylerinin ise soy izoflavon verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek iken (a P<0.05, (grup 4-2)), CCL₄ uygulanan grupla kıyaslandığında ise karaciğer doku MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (a P<0.05 (grup 4-3)) (Tablo III, Şekil 1, Şekil 2).

Tablo 2. Çalışma gruplarında elde edilen bazı biyokimyasal parametreler

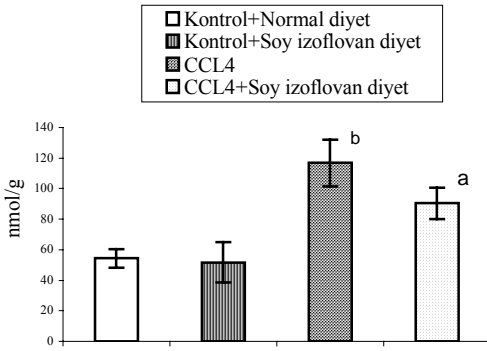
	Grup 1 Kontrol+ Normal diyet (n= 7)	Grup 2 Kontrol+ Soyizoflovan diyet (n= 7)	Grup 3 CCL₄+ Normal diyet (n= 7)	Grup 4 CCL₄+ Soyizoflovan diyet (n= 7)	P
<i>AST</i> (U/L)	160±18,64	144±11,78	708,81±108,8 ^b	245,01±23,65 ^a	<i>a P<0.05 Grup 4 - 1,2</i> <i>b P<0.001 Grup 3 - 1,2</i> <i>Grup 3 - 4</i>
<i>ALT</i> (U/L)	74,8±23,02	52,4±9,36	278,66±33,67 ^b	68,81±13,38 ^a	<i>a P<0.05 Grup 4 - 1,2</i> <i>b P<0.001 Grup 3 - 1,2</i> <i>Grup 3 - 4</i>
<i>TBil.</i> (mg/dL)	0,34±0,09 ^b	0,57±0,21	0,69±0,13 ^a	0,51±0,09 ^b	<i>a P<0.01 Grup 3 - 2</i> <i>b P<0.001Grup 3 - 1,4</i> <i>NS</i>
<i>D.Bil.</i> (mg/dL)	0,03±0,01	0,02±0,005	0,06±0,02	0,04±0,005	
<i>T.Prot.</i> (g/dL)	7,6±0,51	7,9±0,63	6,53±0,51 ^a	7,58±0,42	<i>a P<0.05 Grup 3 - 1,2</i>
<i>Albumin</i> (g/dL)	3,3±0,25	3,5±0,37	2,91±0,11 ^a	3,38±0,47	<i>a P<0.05 Grup 3- 1,2</i>
<i>ALP</i> (U/L)	227,1±33,7 ^b	441,6±96,5	574,1±91,42 ^a	419,2±101,25	<i>a P<0.05 Grup 3-2,4</i> <i>b P<0.01Grup 1- 2, 3,4</i>
<i>GGT</i> (U/L)	1,33±0,81	0,87±0,49	4,12±1,34 ^c	2,87±0,54 ^{a,b}	<i>a P<0.05 Grup 3-4</i> <i>b P<0.01 Grup 4-1,2</i> <i>c P<0.01 Grup 3-1,2</i>

Tablo 3. Çalışma gruplarında elde edilen plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri ile plazma paraoksonaz ve arilesteraz düzeyleri

	Grup 1 Kontrol+ Normal diyet (n= 7)	Grup 2 Kontrol+ Soyizoflovan diyet (n= 7)	Grup 3 CCL₄+ Normal diyet (n= 7)	Grup 4 CCL₄+ Soyizoflovan diyet (n= 7)	P
<i>Plazma MDA</i> (nmol/mL)	1,42±0,31	1,81±0,43	4,81±0,64 ^b	2,77±0,81 ^a	<i>a P<0.05 Grup 4-1,3</i> <i>bP<0.01 Grup 3 - 1,2</i>
<i>KC Doku MDA</i> (nmol/g doku)	54,45±6,05	51,62±13,21	101,82±21,35 ^b	74,19±12,45 ^a	<i>a P<0.05 Grup 4 - 2,3</i> <i>b P<0.01 Grup 3 - 1,2</i>
<i>Plazma Paraoksonaz</i> (U/L)	144,56±12,3 ^a	179,81±26,32 ^b	131,21±10,52 ^c	181,53±12,42	<i>a P<0.05 Grup 1-3</i> <i>b P<0.05 Grup 2-1</i> <i>c P<0.001 Grup 3 -2</i> <i>,4</i>
<i>Plazma Arilesteraz</i> (U/L)	30,24±2,81 ^a	35,64±2,31	25,26±3,59 ^b	35,97±6,08	<i>a P<0.05 Grup 3 - 1</i> <i>b P<0.01 Grup 3- 2,4</i>



Şekil 1. Çalışma gruplarında plazma MDA düzeyleri (a $P<0.05$ Grup 4 vs 1, 3, b $P<0.01$ Grup 3 vs 1, 2)

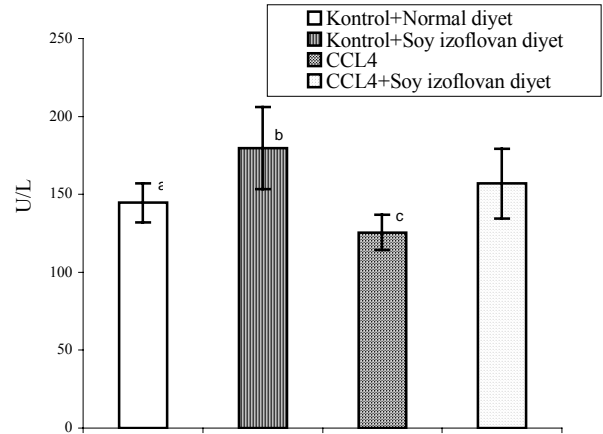


Şekil 2. Çalışma gruplarında karaciğer doku MDA düzeyleri (a $P<0.05$ Grup 4 vs 2, b $P<0.01$ Grup 3 vs 1,2)

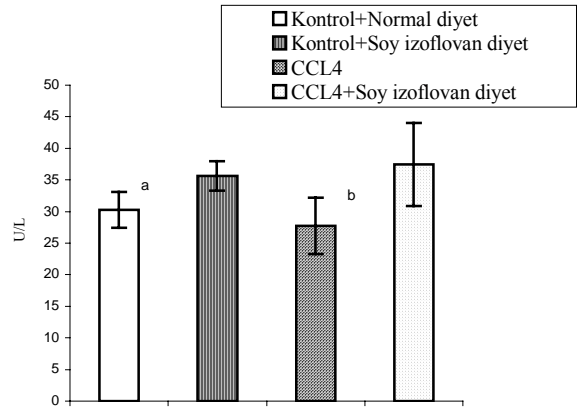
Plazma paraoksonaz aktivite düzeylerinin kontrol grubunda, sadece CCL₄ verilen gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (a $P<0.05$, (grup 1-3)). Plazma paraoksonaz düzeyleri, soy izoflavon verilen kontrol grubunda; kontrol grubu ve sadece CCL₄ verilen gruba göre anlamlı olarak yüksekti (b $P<0.05$, (grup 2-1), c $P<0.001$ (grup 2-3)). Sadece CCL₄ uygulanan gruptaki plazma paraoksonaz düzeyleri ise CCL₄ ile birlikte soy izoflavon verilen grup ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşüktü (c $P<0.001$ (grup 3-4)) (Tablo III, Şekil 3, Şekil 4).

Plazma arilesteraz düzeylerinin ise sadece CCL₄ uygulanan grupta; diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi (sırasıyla, a $P<0.05$ (grup3-1), b $P<0.01$ (grup 3-2 ve grup3-4)).

CCL₄ uygulanmış grupta plazma MDA düzeyleri ve paraoksonaz düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyonun olduğu gözlemlendi. (r:-0.537, $p<0.01$).



Şekil 3. Çalışma gruplarında plazma paraoksonaz düzeyleri (a $P<0.05$ Grup 1-3, b $P<0.05$ Grup 2 vs 1, c $P<0.001$ Grup 3 vs 2, 4)

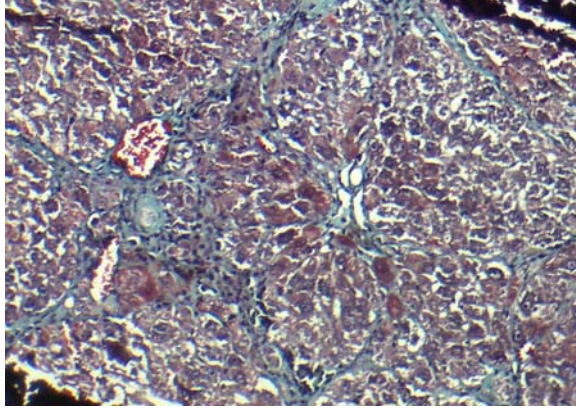


Şekil 4. Çalışma gruplarında plazma arilesteraz düzeyleri (a $P<0.05$ Grup 2 vs 1, b $P<0.01$ Grup 3 vs 2, 4)

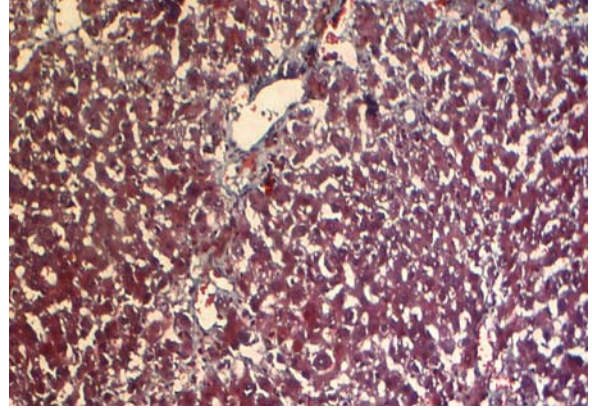
CCL₄ ile birlikte soy izoflavon uygulanmış grupta özellikle plazma MDA düzeyleri ve paraoksonaz düzeyleri karşılaştırıldığında da negatif yönde anlamlı bir korelasyonun olduğu gözlemlendi (r:-487 $p<0.01$)

Histopatolojik bulgular

Tablo IV de görüldüğü gibi CCL₄ uygulanmış grupta yağlanma (steatozis) derecelerine bakıldığında sadece CCL₄ verilmiş gruptaki steatozisin, soy izoflavon uygulamasıyla anlamlı olarak gerilediği görülmüştür (a $P<0.05$, (grup 3-4)). Ayrıca CCL₄ uygulanmış grup inflamasyon ve nekroz açısından değerlendirildiğinde artmış olan inflamasyon ve nekrozun, CCL₄ ile birlikte soy izoflavon verilen grupta anlamlı olarak azaldığı (a $P<0.05$ (grup3-4), b $P<0.01$ (grup3-4)), yine CCL₄ uygulanmış gruptaki fibrozisinde soy izoflavon uygulaması ile anlamlı olarak gerilediği gözlemlendi (b $P<0.01$ (grup3-4)) (Tablo IV, Şekil 5, Şekil 6).



Şekil 5. CCL₄ uygulanmış ratlarda karaciğer dokusunda fibrozis ve inflamasyon hidropik dejenerasyon ve yağlanma (Massaon Trichrom X200)



Şekil 6. CCL₄ uygulanmış ve soyizoflavan verilmiş ratlarda karaciğer dokusu görünümü, fibrozisde azalma (Massaon Trichrom X200).

Tablo 4. Çalışma gruplarında elde edilen histopatolojik bulgular

	Grup 1 Kontrol+ Normal Yem (n= 7)	Grup 2 Kontrol+ Soyizoflavan (n= 7)	Grup 3 CCL ₄ + Normal diyet (n= 7)	Grup 4 CCL ₄ + Soyisoflavan yem (n= 7)	P
Steatozis* (Grade)	-	-	1,97±0,53	1,35±0,39	a P<0.05 Grup 3-4
İnflamasyon (Hücre/mm ²)	-	-	37,68±5,71	24,57±4,18 ^a	a P<0.05 Grup 3-4
Nekroz (fokus/mm ²)	-	-	2,48±0,87	1,48±0,59 ^a	b P<0.01 Grup 3-4
Fibrozis* (%)	-	-	27,55±5,37	15,77±3,22 ^a	b P<0.01 Grup 3-4

* Steatozis: Steatotik hücreler belirlendi. Değerlendirmede % 33 e kadar olan steatosiz Grade I (1), %33-66 arası Grade II (2), % 66 üzeri Grade III (3) olarak hesaplandı.

Fibrozis: 400 kat büyütme ile sentral ven odaklanarak inceleme yapıldı. İmajlar 10 kat artırılarak *Image Analysis* yöntemi ile spesifik olarak dizayn edilmiş bilgisayar programı yardımı ile ölçüldü

TARTIŞMA

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında patogeneze sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar da CCL₄ uygulanmış ratlarda oksidatif stres ve karaciğer kupfer hücrelerinin inaktivasyonunun karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir (23,24). Wang ve ark. (25) melatonin uygulaması ile CCL₄ uygulanmış ratlarda, karaciğerde fibrozisin gerilediğini ve antioksidan enzimler olan superoksid dismutaz (SOD) ile Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinde artış olduğunu rapor etmektedirler. Bir başka çalışmada akut CCL₄ uygulamasında bakteri hücre duvarlarında ve bitki duvarlarındaki kitin yapısındaki katyonik polisakkarit yapılı Chitosanın lipid peroksidasyonu azalttığı antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz (CAT) aktivitelerini ise arttırdığı bildirilmektedir (26). Mi Kyung Lee ve ark (27) yüksek kolesterol diyeti uygulanan ratlarda bir

soy izoflavon olan Naringenin uygulaması ile plazma ve karaciğer dokusunda artmış MDA düzeylerinin düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca antioksidan olarak flavonoidlerin özellikle karaciğer homojenatlarında mikrozom, mitokondri ve lipozomlarda öncü oksidant yapıların neden olduğu lipid peroksidasyonunu da inhibe ettiği rapor edilmektedir (28).

Çalışmamızda CCL₄ uygulanmış ratlarda artmış olan lipid peroksidasyonuna bağlı karaciğer hasarı sonucunda karaciğer enzimlerinden AST ve ALT düzeyleri anlamlı olarak artarken bu artışların soy izoflavon uygulaması ile düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca CCL₄ uygulanmış ratlarda karaciğer dokusunda artmış olan inflamasyon ve nekrozun da soy izoflavonla gerilediği görülmektedir. İnflamasyon, toksik maddeler ve ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkan süreç karaciğer hasarında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreçte özellikle serbest oksijen radikalleri ve artmış hidrojen peroksit gibi prooksidan yapılar ile birlikte profibrogenik yapı bazı mediatörlerde hasarı artırmaktadır. Bu

açından bakıldığında hücresele oksijenazları, NADPH oksidaz veya hücresele antioksidantları aktive etmek yoluyla veya antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile oksidatif hasarın engellenmesinde antioksidan özelliklere sahip soy izoflavonlar gibi bileşiklerin kullanılması oldukça önemlidir (29).

Aneja ve ark (30) tarafından yapılan bir çalışmada, fitoöstrojenlerden Genistein ve daidzein uygulaması sonucunda CCL₄'e bağlı karaciğer hasarından hepatik glutatyon-S transferaz ve antioksidan hepatik glutatyon aracılığı ile korunduğu ve lipid peroksidasyonunu önlediği rapor edilmektedir. Belinky ve ark (31) bir soy izoflavon olan Glabridinin, bakır iyonları ve 2,2 %-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) gibi bileşikler indirileyerek lipid peroksidasyonunu ve oksisterol oluşumunu inhibe ettiğini, bu şekilde LDL oksidasyonunu önlediğini bildirmektedirler.

De Whalley ve ark (32) ise diyetle bulunan flavon ve flavonol türevlerinin makrofajlar aracılığıyla meydana gelen LDL oksidasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmektedir. Mangiapane ve ark.(33) da doğal olarak oluşan ve bir flavonol türevi olan kateşinin arterial hücre duvarında bakır iyonları ile oluşan LDL oksidasyonunu inhibe ettiğini rapor etmektedir. Bütün bu çalışmalara bakıldığında; soy izoflavonların oksidatif hasarı geriletmesi yanında LDL oksidasyonunu da önlediği, ancak bunun tam olarak hangi mekanizmalar ile olduğu konusunun net olmadığı görülmektedir. Bu açıdan ele alındığında; kalsiyum bağımlı, HDL kolesterol içeren bir enzim olan ve başta LDL kolesterol olmak üzere plazma lipoproteinlerini serbest oksijen radikallerine bağlı oksidasyondan koruyan antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzimi üzerinde durmak gerekir. Paraoksonaz, lipid peroksitleri ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi potent oksidant yapıları enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanılabilir. H₂O₂ özellikle aterogenezis sırasında arter duvarı endotelde oluşan major bir reaktif oksijen bileşikler (ROS) türüdür ve LDL oksidasyonuna yol açarak daha potent oksidatif ürünler oluşumuna yol açabilmektedir. Bu yüzden paraoksonaz enziminin H₂O₂ hidrolize edebilme yeteneği özellikle potent

antioksidan yapıların ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (27).

Çalışmamızda da yoğun olarak HDL kolesterole bağlı olarak bulunan ve özellikle lipid peroksidleri hidrolize eden bir antioksidan enzim olarak tanınan paraoksonaz düzeyleri ve plazma arilesteraz düzeylerinin CCL₄ uygulanan grupta azaldığı, soy izoflavon uygulaması sonucunda ise bu enzimlerin plazma düzeylerinde anlamlı artışlar olduğu ve stimule olduğu gözlemlendi.

Bazı çalışmalarda doğal antioksidan yapılar olan Vitamin C ve folik asit eklenmesinin paraoksonaz aktivitesini ve arilesteraz aktivitesini arttırdığı rapor edilmektedir (34). Bir başka çalışmada Jesup ve ark (35) LDL oksidasyonunun endojen lipofilik antioksidan yapıları bileşiklerin (vitE, beta- karoten ve likopen vb) azalmasından sonra başladığını bildirmektedirler. Ayrıca yüksek kolesterol içeren diyetle beslenme ve buna bağlı olarak artan lipid peroksid düzeylerinin paraoksonaz enzim aktivitesinde inaktivasyona neden olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (36). Karaciğer hasarı oluşumu sırasında ROS üretiminde meydana gelen aşırı artış ve buna bağlı olarak antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px düzeylerinde anlamlı azalmalar olmaktadır. Dolayısı ile antioksidan enzimler ile karaciğer hasarı, fibrosiz ve lipid peroksidasyon düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğu gözlenmektedir (37, 38). Çalışmamızda da CCL₄ uygulanmış grupta artmış olan MDA düzeylerinin plazma paraoksonaz düzeyleri ile ters bir korelasyon gösterdiği ve soy izoflavon uygulanmış grupta stimule edilmiş olan paraoksonaz enziminin artmış MDA düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğü gözlenmiştir.

Bu sonuçlarla soy izoflavonların deneysel olarak oluşturulmuş CCL₄ hasarına bağlı olarak gelişen karaciğer harabiyetini önlemede etkili olduğu, artmış olan lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı ve soy izoflavonların antioksidan özelliğe sahip paraoksonaz enzimini stimule edici bir etkisi olduğu da görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Recknagel R, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharma Ther* 1989; 43: 139-154.
2. Slater TF. Free radicals as reactive intermediates in injury. In: R Snyder, DV Parke, JJ Kocsis, DJ Jollow, GG Gebson, CM Witmer (Eds). *Biological Reactive Intermediates II: Chemical Mechanisms and Biological Effects*. New York, Plenum Press, 1982: 575-589.
3. Nadkarni GD, Souza NB. Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Biochem Med and Met Biol* 1988; 40: 42-5.
4. Parola M, Rubio M, Varela G, et al. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver

- fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25: 2000- 2005.
5. Lee RG. Fibrosis and cirrhosis. *Diagnostic Liver Pathology*. First Ed. Mosby-ear Book Inc 1994; 280-304.
 6. Shimiziu I. Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection. *Current Drug Targets Infectious Disorders*. 2001; 1 (2): 227-240.
 7. Shimiziu I. Impact of estrogens on the progression of liver disease. *Liver International* 2003; 23 (1):63-69.
 8. Bahcecioglu IH, Ustundag B, Ozercan IH et al. Protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl₄-induced liver damage. *Hepatology Research* 1999; 15: 215-224.
 9. Jeong TC, Kim HJ, Park J, Ha CS, et al. Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in sprague dawley rats. *Planta Med* 1996; 63:136-140.
 10. Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T &Watanabe K. Antioxidative action of flavonoids quercetin and catechin mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Expe Clin Med*. 1999; 24 (1),1-11.
 11. Kelly E, Heim, Anthony R, Tagliaferro, Dennis J, Bobilya. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships *J of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572–584.
 12. Kulling SE, Lehmann L, Metzler M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J of Chromotography* 2002; 777: 211-218.
 13. Cai Q and Wei H. et al. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice . *Nutrition Cancer* 1996; 25: 1-7.
 14. Chunyeon Choi, Hyeyeon Cho. et al. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NF-κB activation in RAW 264.7 Macrophages. *Biosci Biotech Biochem* 2003; 67 (9): 1916-1922.
 15. L.Anila, N.R. Vijayalakshmi. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats, *Food and Chemistry* , 2003; 83: 569-574.
 16. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:69–76.
 17. Watson A, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882–2891.
 18. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1978; 90:37-43.
 19. Yagi K. Assay of lipid peroxidation in blood plasma and serum. *Methods Enzymology* 1984; 105: 328-363.
 20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.
 21. Ruiz J, Blanche H, James RW, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in y-type 2 diabetes. *Lancet* 1995, 346;869-872.
 22. Juretic D, Tadjanovic M, Rekić B, et al. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients. Cohort study *Croat Med J* 2001; 42: 146-150.
 23. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology* 2003; 23 (2): 103-108.
 24. Luckey SW, Peterson DR. Activation of kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats. *Experimental and Molecular Pathology* 2001; 71 (3): 226-240.
 25. Wang H, Wei W, Wang NP, et al. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005; 77:1902-1915.
 26. Jeon Tae IL, Hwang SG, Park NG, et al. Antioxidative effect of Chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology* 2003; 187: 67-73.
 27. Me Kyung Lee, Hae Bok S, Jeong TS, et al. Supplementation of Naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high Cholesterol fed rats. *Biorganic and Medicinal Chemistry* 2002; 10: 2239-2244.
 28. Rodriguez RJ, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. Influence of prenylated and non prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39: 437-445.
 29. Fuhrman B and Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2001; 12 (1); 41-48.
 30. Aneja R and Upadhyaya G. Ameliorating effect of Phytoestrogens on CCl₄-induced oxidative stress in the livers of male wistar rats. *Artificial Cells, Blood substitutes and Biotechnology* 2005; 201-213.
 31. Belinky PA, Aviram M, Fuhrman B, Rosenblat M, Vaya J. The antioxidative effects of the isoflavonoid genistein on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis* 1998; 137: 49-61.
 32. De Whalley C, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake D. Flavonoids inhibit the oxidative

- modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1743.
33. Mangiapane H, Thomson J, Salter A, et al. The inhibition of the oxidation of low density lipoproteins by catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 445.
34. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1329–1333.
35. Jessup W, Rankin SM, De Whalley CV, et al. Alpha-tocopherol consumption during low density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1990;265: 399.
36. Aviram M, Rosenblat M, Scott B, et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892–904.
37. Castilla Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, et al. Hepatoprotective effects of insuline like growth factor I in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997; 113 (5): 1682-1691.
38. Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, et al. Increased lipide peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathologicall liver injury in experimental alchocolic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27 (5): 1317-1323.

Yazışma Adresi: Bilal ÜSTÜNDAĞ, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 23200, Elazığ-TÜRKİYE
Tel: 0424 2333555-2254 e-posta: drbustundag@yahoo.com
