



ISSN:1306-3111

e-Journal of New World Sciences Academy
2011, Volume: 6, Number: 2, Article Number:1B0026

MEDICAL SCIENCES

Received: November 2010

Accepted: February 2011

Series : 1B

ISSN : 1308-7312

© 2010 www.newwsa.com

Serap Yalçın

İnci İlhan

Yıldırım Beyatlı Doğan

Tülin Söylemezoğlu

Ankara University

ankaraserap@yahoo.com

Ankara-Turkey

**KRONİK ALKOLİK HASTALARDA PROTEİN KARBONİL SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ
VE DİĞER PARAMETRELERLE BİRLİKTE DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZET

Çalışmamızın amacı kronik alkol tüketiminin önemli bir göstergesi olan oksidatif stresin, protein ve lipitler üzerindeki etkisini araştırmaktır. Çalışmada oksidatif hasarı değerlendirmek için alkolizm tanısı ile Ankara Üniversitesi psikiyatri kliniğinde yatmakta olan 40 alkolik hasta ile sağlıklı 20 kişinin kan örnekleri spektrofotometrik yöntemle çalışılmıştır. Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) ($p<0.05$) ve protein karbonil (PCO) düzeyi ($p<0.05$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızın ikinci bölümünde glutatyon (GSH) düzeyi hem kontrol grubu, hem de kronik alkolik hastalarda ($p<0.05$) araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışmada kronik alkol kullanımı sonucu artan oksidatif stresin, lipid ve proteinler üzerinde hasara neden olduğu görülmüş ve alkol kullanımının diğer bir biyomolekül olan DNA üzerinde meydana getirdiği hasarında araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Malondialdehit, Protein Karbonil, Glutatyon, Alkol, DNA

**DETERMINATION OF PROTEIN CARBONYL LEVELS IN PATIENTS WITH CHRONIC
ALCOHOLICS AND EVALUATION TOGETHER WITH OTHER PARAMETERS**

ABSTRACT

Investigation of the impact of oxidative stress, of which chronic alcohol consumption is an important indicator, on proteins and lipids. In this study, in order to evaluate oxidative damage, blood samples of 40 alcoholic patients, lying in the psychiatry clinic of Ankara University with the diagnosis of alcoholism, and 20 healthy people have been worked with spectrophotometric method. Malondialdehyde (MDA), lipid peroxidation product, and protein carbonyl (PCO) levels observed as statistically significantly higher, compared with the control group ($p<0.05$). In the second part of the study, glutathione (GSH) levels were investigated both in patients with chronic alcoholics and control group and observed as statistically significant ($p<0.05$). In the study, the damage on lipid and protein caused by oxidative stress, increased as a result of chronic alcohol use, was seen and it was concluded that investigation of the damage on other biomolecule, DNA, due to alcohol use is needed.

Keywords: Malondialdehyde, Protein Carbonyl, Glutathione, Alcohol, DNA

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Alkol tüketimi, karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek protein, lipid ve DNA üzerinde hasara yol açmaktadır [1 ve 2]. Alkol tüketimi sonucu özellikle karaciğerde ve ekstrahepatik dokularda pro-oksidan ve antioksidan sistemlerindeki dengenin pro-oksidan lehine bozulması sonucu oksidatif hasar gelişir [3]. Memeli hücreleri, oksidatif hasardan (toksik kimyasallar ve sellüler metabolizmanın yarattığı oksidatif hasardan) en önemli endojen sistem olan glutatyon redoks döngüsü ile korunur [4]. Proteinler hücredeki oksidatif hareketin en önemli hedefidir. Protein oksidasyonu birçok etanol bağıntılı modifikasyonlardan biri olarak kabul edilmekte ve bu modifikasyonlar, etanolün reaktif oksijen türlerini (ROT) artırmasıyla hepatositlerde ve özellikle mitokondrilerde protein fonksiyonlarını değiştirmektedir [5]. Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), protein oksidasyon ürünü olan protein karbonil (PCO) ile karşılaştırıldığında, protein karbonil gruplarının (PCO) oksidatif stres belirteci olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır. PCO'in bu avantajları arasında erken dönemde oluşması ve oluşan ürünün uzun süre stabil olması gelmektedir [6]. ROT aminoasit kalıntılarını okside ederek peptid bağlarında ayrılmalara, protein fragmentasyonuna (kümelenme) ve proteolizis oranlarında değişmelere neden olmaktadır [7]. Hepatik hastalıkları olan veya olmayan alkol bağımlısı bireylerde oksidatif yıkımın önemli belirtileri olduğunu destekleyen veri sayısı artmaktadır [8, 9 ve 10]. Alkol tüketimine bağlı olarak karaciğer yapı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu sebepten dolayı hepatik yıkımın olup olmadığını anlamak için γ -GT (GGT) aktivitesi, alanin ve aspartat aminotransferaz (ALT ve AST) parametreleri kullanılmaktadır [11]. GGT aktivitesi özellikle spesifik bir parametre olup, kronik alkol alımının bir göstergesi olarak sıklıkla takip edilmektedir [12].

2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Çalışmamızda kronik alkol tüketimi ile serbest radikal oluşumun indüklenmesi sonucu GGT, ALT ve AST aktivitesinde meydana gelen değişiklikler ve protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve glutatyon düzeylerinin kontrol grubu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3. DENEYSSEL YÖNTEM (EXPERIMENTAL METHOD)

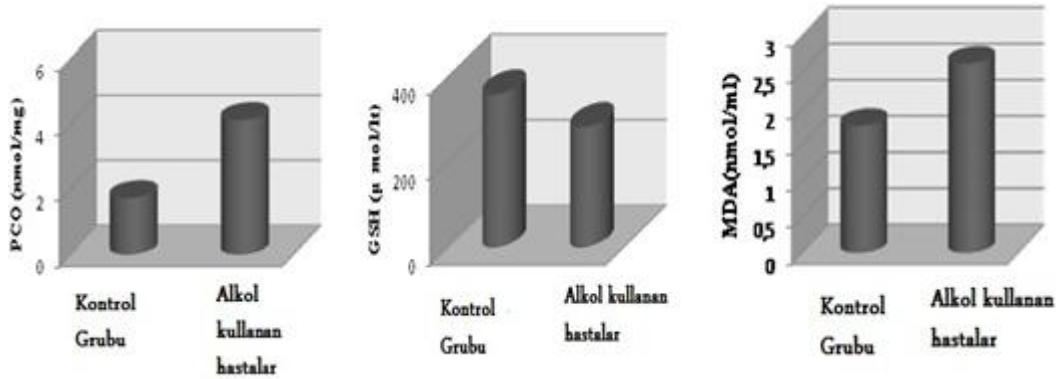
Ankara Üniversitesi, Tıp fakültesi, Psikiyatri bölümünde alkolizm tanısı ile tedavi gören 40 hasta ve 20 sağlıklı kişi çalışma kapsamına alınmıştır. Her hastanın kanı 5 ml'den az olmayacak şekilde steril EDTA'lı tüplere alınarak, çalışma yapılana kadar +4°C'de saklanmıştır. Oksidatif hasarı belirlemek amacıyla ölçümlerde kanın plazma kısmı kullanılmıştır. Plazmada protein karbonil tayini için Reznick ve Packer'in [13] yöntemi kullanılmıştır. Yöntem, plazmadaki proteinlerin 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları rengin spektrofotometrik ölçümüne (Shimadzu UV-1601 Japan) dayanmaktadır. Plazmada LPO tayini için tiobarbitürik asitle reaksiyon veren maddelerin ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla Buege ve Aust'un [14] yöntemi kullanılmıştır. Oluşan MDA, TBA (tiobarbitürik asit) ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansının 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır. Kalibrasyon eğrisi için standart 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılmıştır. Plazmada TSH tayini için Sedlak ve Lindsay'in [15] metodu kullanılmıştır. Yöntem ELLMAN reaktifinin

(DTNB) sülfidril grupları ile redükte olarak nitro merkaptobenzoik asit anyonu açık sarı renktedir ve plazmadaki sülfidril gruplarının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Standart olarak indirgenmiş glutatyon kullanılmıştır. AST, ALT, GGT biyokimyasal parametreleri otomatik tahlil laboratuvarında ölçülmüştür. Grupların birbirinden farklılığı istatistiksel açıdan ANOVA, Mann Whitney U testi ve korelasyon analizi (Pearson korelasyon analizi) yapılmıştır. Tüm hesaplamalarda ve istatistiksel analizlerde SPSS 11.5 versiyonu kullanılmıştır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından 2004-118 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR (FINDINGS)

Alkolizm tanısı ile tedavi gören hastalar ile kontrol grubu karşılaştırılması ve istatistiksel anlamlılıkları Tablo 1, Tablo 2’de verilmektedir. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyleri ve protein karbonil (PCO) düzeyi ve glutatyon (GSH) düzeyi alkolik hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tablo 3’de ise MDA, TSH ve PCO düzeylerinin yaş ve kullanım yılına göre korelasyon tablosu verilmektedir.

Kronik alkol kullanımı sebebiyle oluşan karaciğer hastalıklarının biyokimyasal parametreleri olan AST ($p = 0.035$) ve GGT ($p = 0.001$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir. Ancak ALT düzeyinde istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır ($p = 0.105$) (Tablo 2). Şekil 1’de alkol kullanan hastalar ile PCO ve MDA düzeylerinde bir artış gözlenirken, GSH aktivitesi açısından bir azalma görülmektedir.



Şekil 1. Plazma MDA, TSH ve PCO ortalama düzeylerinin şematik gösterimi
(Figure 1. A schematic representation of mean plasma MDA, TSH and PCO levels)

Tablo 1. MDA, TSH ve PCO ortalama düzeylerinin karşılaştırılması
(Table 1. Comparison of mean MDA, TSH and PCO levels)

	MDA (nmol/ml) Ort±SS	PCO (nmol/mg) ort±SS	TSH (µmol/l) ort±SS
Kontrol Grup (n=20)	1,76±0,44	1,74±0,44	358,20±59,58
Alkolik hasta grubu (n=40)	2,62±1,27	4,14±1,70	281,70±104,58
p	0,005*	0,001*	0,004*

Ort±SS=Ortalama ± Standart sapma

Tablo 2. Karaciğer AST, ALT ve GGT ortalama düzeylerinin karşılaştırılması
(Tablo 2. Comparison of mean AST, ALT and GGT levels in liver)

	AST (U/l) ort±SS	ALT (U/l) ort±SS	GGT (U/l) ort±SS
Kontrol Grup	20.22±1.39	22.78±4.94	17.67±3.32
Alkolik hasta Grubu	49.00±8.65	37.24±5.47	183.35±55.02
p	0,008*	0,105	0,001*

Ort±SS=Ortalama ± Standart sapma

Tablo 3. Yaş ve kullanım yılına göre MDA, TSH ve PCO düzeylerinin korelasyonu
(Tablo 3. The correlation of MDA, TSH and PCO levels according to age and year)

	MDA	TSH	PCO
Yaş	r=0,132 p=0,326	r=-0,202 p=0,131	r=0,381 p=0,003*
Alkol kullanım süresi (yıl)	r=0,253 p=0,058	r=-0,247 p=0,064	r=0,493 p=0,000*

5. TARTIŞMA (DISCUSSION)

Alkol kullanımı sonucu hücre fonksiyonlarında farklılıklar ortaya çıkarken oksidan-antioksidan sistemde de birçok değişiklik meydana gelir. Alkol kullanan hastalarda ciddi karaciğer hasarı oluşmasada oksidatif hasar gözlenebilir. Hepatik sitokrom P-450 monooksijenaz aktivitesinde stimülasyona eşlik eden lipid peroksidasyon (LPO) indeksi olan mikrozomal malondialdehit (MDA) oluşumunda artış görülür [3 ve 11]. Çalışmamızda, alkolik hastalarda kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0.005) görülmüştür. Etanol ve asetaldehitin metabolizması sonucu ortaya çıkan toksik metabolitlerin konjugasyonu ve reaktif oksijen türevlerinin nötralizasyonu, GSH gibi antioksidanların intra ve ekstra hücrel içeriğini düşürür. Yapılan çalışmalarda kronik alkoliklerde plazma ve eritrosit GSH konsantrasyonlarının düştüğü gözlenmiştir. Karaciğerde GSH sentezinin ve salınımının zayıflaması bu düşüşün nedeni olarak düşünülmektedir [16]. Sonuçlarımıza göre, hücre içi non-enzimatik antioksidan ve tiol havuzunun ana bileşeni olan redükte glutatyonun (GSH) alkoliklerde anlamlı derecede (p=0.004) düştüğü görülmüştür. Alkol alımı sonucu, aminoasit bölge zincirlerindeki direk oksidatif atakla veya lipid peroksidasyonu ya da şeker azalması sonucu ortaya çıkan protein modifikasyonu, karbonil gruplarının oluşumunu (aldehit ve keton ürünleri) sağlar. Kronik alkol tüketimi belirgin olarak protein karbonil içeriğini %25-%60 oranında artırmaktadır. Bundan dolayı, kronik alkol tüketimi hücrel mekanizma proteinlerinin önemli bir bölümünde oksidatif hasara sebep olmaktadır [5]. Oksidatif stresin erken aşamasında oluşan ve diğer stres parametrelerine göre, dolaşımda daha uzun süre kalabilen PCO, güvenilir bir marker olarak kullanılmaktadır [17 ve 18]. PCO, bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda kullanılmış ve alkol hastaları ve kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve PCO düzeyinde anlamlı bir artış (p=0.000) görülmüştür. Serbest radikaller proteinlerdeki tiol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur [7, 19 ve 21]. Proteinlerdeki tiol grupları antioksidan fonksiyonunu, peroksidasyonunu başlatan oksidanları tutarak gösterir. Böylelikle lipidler serbest radikallerin oksidatif atağından korunur [21]. Radikallere bağlı protein hasarının en erken gözlenebilen belirtisi

tiol gruplarının disülfidlere ve oksidasyonla dönüşümüdür. Glutasyon ve sistein gibi biyolojik tioller oksidasyonla indüklenen protein inaktivasyonunu, ya direkt olarak radikallerle reaksiyona girerek ya da indirekt olarak proteinlerdeki serbest tiol grupları ile geri dönüşümlü bağlar oluşturarak önlerler [19]. Bu bilgilere bağlı olarak PCO ve TSH düzeyleri arasındaki bu ilişkiyi anlamlandırabilmek amacıyla yaptığımız çalışmada PCO-TSH arasında istatistiksel olarak negatif yönde ($r=-0.330$) korelasyon ve anlamlı bir ilişki ($p=0.010$) bulunmuştur. Türkoğlu ve arkadaşları [22], kronik alkolizm hastaları ile yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu plazma MDA ve protein karbonil düzeylerinde anlamlı artış gözlemişlerdir. Çalışmamızda görülmüştür ki, PCO - MDA arasında istatistiksel olarak pozitif yönde ($r=0.323$) korelasyon ve anlamlı bir ilişki ($p=0.012$) bulunmuştur. Etanolün oksijen radikalleri oluşturduğu, GSH sentezini tutup dokulardaki GSH değerlerini tükettiği, MDA değerlerini artırdığı ve insanlarda ve deney hayvanlarında anti-oksidatif savunma sistemine genellikle zarar verdiği bilinmektedir [23 ve 26]. Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada MDA- TSH arasında istatistiksel olarak negatif yönde ($r=-0.557$) korelasyon ve anlamlı bir ilişki ($p=0.000$) bulunmuştur. Hepatik hastalıkları olan veya olmayan alkol bağımlısı bireylerde oksidatif yıkımın önemli belirtileri olduğunu destekleyen veri sayısı artmaktadır [8 ve 10]. Alkol bağımlılığı ROS oluşumunu destekler ve antioksidan savunma sistemi bu oksijen türevlerini süpürmede kullanılır. Bu sebepten dolayı hepatik yıkımın olup olmadığını anlamak için GGT, AST, ALT ölçülür. Bu süreç özellikle alkol bağımlısı hastalarda uygulanır. Das ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, sağlıklı kontrollerle alkol bağımlısı bireyler karşılaştırılmış ve GGT değerlerinde belirgin bir şekilde yükselme görülmüştür ($p=0.000$). Alkolik hastalarda, AST değerlerinde ise kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yine artış görülmüştür ($p=0.035$). GGT sıklıkla alkol alımının belirleyicisi olarak kullanılır ve GGT' nin artışını yalnızca kronik alkol alımı belirler [11].

Bu bilgilerin bir sonucu olarak kronik alkol belirleyicisi olan AST, ALT ve GGT karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($p=0.000$) bulunmuştur ve AST ($p=0.008$) ve GGT ($p=0.000$) düzeylerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS)

Çalışma sonuçlarımıza göre kronik alkol kullanımı sonucunda yapılan deneylerde alkolik hastalar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında plazma MDA ve PCO düzeylerinde anlamlı bir artış, hücresel GSH düzeylerinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Bu verilere dayanarak kronik alkol kullanımı sonucu meydana gelen oksidatif stresin lipid ve proteinlerde hasara neden olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Ishii, H., Kurose, I., and Kato, S., (1997). Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. J. Gastroenterol. Hepatol., Volume:12, pp:272-282.
2. Nordmann, R., Ribiere, C., and Rouach, H., (1992). Implication of free radical mechanisms in ethanolinduced cellular injury. Free Rad. Biol. Med., Volume:12, pp: 219-240.
3. Dupont, I., Bodenez, P., Berthou, F., Simon, B., Bardou, L.G., and Lucas, D., (2000). Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. Alcoholic&Alcoholism., Volume:35, pp: 98-103.

4. Reed, D.J., (1986). Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, Volume:35, pp:7-13.
5. Sun, A.Y., Ingelman, S.M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S.M., Patel, V.B., Cunningham, C.C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nespov, K., and Sun, G.Y., (2001). Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Volume:25, pp. 237-243.
6. Dalle, D.I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A., (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trend. Mol. Med.*, Volume:9, pp:169-176.
7. Berlett, B.S. and Stadtman, E.R., (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, Volume: 272, pp: 20313- 20316.
8. Preedy, V.R., Adachi, J., Koll, M., Mantle, D., Niemala, O., Parkkila, S., Paice, A.G., Peters, T., Rajendram, R., Seitz, H., Ueno, Y., and Worrall, S., (2002). Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies. *Free radic. Biol. Med.*, Volume:32, pp:683-687.
9. Zima, T., Fialová, L., Mestek, O., Janebová, M., Crkovská, J., Malbohan, I., Stípek, S., Mikulíková, L., and Popov, P., (2001). Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci.*, Volume:8, pp:59-70.
10. Van De Casteele, M., Zaman, Z., Zeegers, M., Sevaes, R., Fevery, J., and Nevens, F., (2002). Blood antioxidant levels in patients with alcoholic liver disease correlate with the degree of liver impairment and are not specific to alcoholic liver injury itself. *Aliment Pharmacol Ther.*, Volume:16, pp: 985-992.
11. Das, K.S., Naya, P., and Vasudevan, D.M., (2003). Biochemical markers for alcohol consumption. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.*, Volume:18, pp: 111-118.
12. Kaplowitz, N. and Tsukamoto, H., (1996). Oxidative stress and liver disease. *Prog Liver Dis.*, Volume: 14, pp: 131-159.
13. Reznick, A.Z. and Packer, L., (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.*, Volume:233, pp: 357-363.
14. Buege, J.A. and Aust, S.D., (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, Volume:52, pp:303-310.
15. Sedlak, J. and Lindsay, R.H., (1968). Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal. Biochem.*, Volume:25, pp:192-205.
16. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Sabba, C., Buonamico, P., and Altomare, E., (1996). Oxidation of circulating proteins in alcoholics role acetaldehyde and xanthine oxidase. *Journal of Hepatology.*, Volume:25, pp: 28-36.
17. Dalle, D.I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R., (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.*, Volume:329, pp: 23-38.
18. Massy, Z.A., Nguyen, K.T., and Beauvais, C.H., (2002). Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J. Nephrol.*, Volume:15, pp: 336-341.
19. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, Volume:324, pp:1-18.
20. Esterbauer, H. and Zollner, H., (1989). Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*, Volume:7, pp:197.

21. Takenada, Y., Miki, M., Yasuda, H., and Mino, M., (1991). The effect of alfa-tocopherolas an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. Arch. Biochem. Biophys., Volume:285, pp: 344.
22. Türkoğlu, Ü.M., Abbasoğlu, S.D., Toker, G.A., Mırsal, H., Beyazyürek, M., and Uysal, M., (2000). Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. J. Lab. Clin. Med., Volume:136, pp:287-91.
23. Speisky, H., Macdonald, A., Giles, G., Orrego, H., and Israel, Y., (1985). Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after ethanol administration. Turnover Studies. Biochemical Journal, Volume: 225,pp: 565-572.
24. Genç, S., Gürdöl, F., Öner, İ.Y., and Onaran, I., (1998). The effect of melatonin administration on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. Pharmacological Research., Volume: 37, pp: 37-40.
25. Guerri, C. and Grisolia, S., (1980). Changes in glutathione in acute and chronic alkohol intoxication. Pharmacology, Biochemistry and Behavior., Volume:13, pp: 53-61.
26. Lieber, C.S., (1994). Mechanisms of ethanol-drug-nutrition interactions. Clin. Toxicol., Volume: 32, pp: 631-681.