

SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİNLE OLUŞTURULAN HEPATOSELLÜLER HASARIN ÖNLENMESİNDE KUPFFER HÜCRESİ İNAKTİVASYONUNUN ROLÜ

Evin ADEMOĞLU, Cahide GÖKKUŞU, Bilge ÖZ*

ÖZET

Çalışmamızda, galaktozamin (Gal-NH₂) uygulanarak hepatosellüler hasar oluşturulan sıçanlarda spesifik Kupffer hücresi inaktivatörü olan gadalinyum klorür' ün (GdCl₃) hasarın önlenmesindeki etkilerini inceledik. Akut Gal-NH₂ (1g/kg) enjeksiyonunu takiben sıçanların plazma ALT, AST, GGT aktiviteleri ile karaciğer lipit peroksit düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Gal-NH₂ uygulaması sıçanlarda karaciğer GPx ve SOD aktivitelerinde kontrollere göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Gal-NH₂ uygulanarak hepatosellüler hasar oluşturulan sıçanlara GdCl₃ (10 mg/kg) verilmesi 48. saate artmış plazma ALT, AST, GGT aktiviteleri ile karaciğer lipit peroksit düzeylerinde bir düzelmeye sağlamamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar bize, Gal-NH₂'nin hepatotoksik etkisinde Kupffer hücre aktivasyonunun rolü olmadığını düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: Gal-NH₂, GdCl₃, kupffer hücresi, karaciğer hasarı

SUMMARY

The role of kupffer cell inactivation in d-galactosamine induced hepatocellular damage in rats. In the present study we examined the role of Kupffer cells in galactosamine (Gal-NH₂) induced hepatitis and also the capability of gadalinium chloride (GdCl₃) -a specific Kupffer cell inhibitor-to prevent the liver damage in rats.

Following acute Gal-NH₂ (1g/kg) injection to the rats, plasma ALT, AST, GGT activities and liver lipid peroxide levels were increased significantly and the liver GPx, GST ve SOD activities were not changed in comparison to the controls. GdCl₃ (10mg/kg) administration , in addition to Gal-NH₂ did not improve the increased plasma ALT, AST, GGT activities and lipid peroxide levels in 48.hours in the rats .

In conclusion, we thought that Kupffer cell activation does not take role in Gal-NH₂ induced hepatic injury.

Key Words: Gal-NH₂, GdCl₃, Kupffer cells, liver damage

GİRİŞ

Galaktozamin (Gal-NH₂), selektif olarak karaciğerde metabolize olan bir amino şekerdir (10). Akut Gal-NH₂ uygulamasının sıçanlarda, morfolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki viral hepatite benzeyen akut hepatite neden olduğu gösterilmiştir (9,11). Gal-NH₂ karaciğerde üridin trifosfat havuzunun tükenmesine sebep olarak hızlı bir glikojen kaybına, sitoplazmada Ca birikmesine Ca⁺⁺, RNA ve proteinler gibi makromoleküllerin sentezinde inhibisyona, plazmada ise spesifik karaciğer enzimlerinin ve bilirubinin artı-

şına yol açmaktadır (11,15). Deneysel hayvanlarında enjeksiyonu takiben 6 saat içinde karaciğerde özgün morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan Gal-NH₂, birçok maddenin hepatoprotektif etkilerinin araştırılmasına uygun bir ajandır (4,5).

Karaciğerin yerleşik makrofajları olan Kupffer hücreleri mikroorganizmalar, yabancı partiküller ve immun reaktif materyalleri fagosite ederek dolaşımdan uzaklaştırılır (7). Kupffer hücrelerinin biyolojik aktiviteleri sadece fagositozla sınırlı olmayıp interferon-β, TNF-α, interleukin-1 ve 6 gibi peptid medya-

Mecmuaya Geldiği Tarih: 05.04.1999

* İstanbul Üniversitesi , İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

törler, prostanooidler ve lökotrienler gibi eikosnoid türevleriyle, süperoksit (O₂) ve nitrik oksit (NO) salgılamasında da rol alırlar. (1,3,7,16,17). Aktive olmuş Kupffer hücrelerinden salgılanan bu biyolojik ürünlerin karaciğer hasarından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (7,15,16,17).

Öte yandan, spesifik olarak Kupffer hücrelerini inaktive eden gadalinyum klorür (GdCl₃) immun sistemin diğer elemanlarını etkilemeyen tek ajandır (3,13,20,24). GdCl₃'ün sıçanlarda, karaciğeri iskemi reperfüzyon hasarından, endotoksinler, alkol ve karbon tetraklorürün neden olduğu hepatitten koruduğu bildirilmiştir (2,6,10,13,15,25). Bu çalışmalarda, GdCl₃'ün neden olduğu sistemik yan etkilere rastlanmamasına rağmen, henüz insanlarda tedavi amacıyla kullanılmamaktadır ve etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır (2,13).

Çalışmamızda, galaktozamin uygulanarak hepatosellüler hasar oluşturan sıçanlarda, Kupffer hücrelerinin rolünü ve spesifik bir Kupffer inaktivatörü olan GdCl₃'ün, oluşan hasarın önlenmesindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 180-220 g olan 20 adet Wistar dişi sıçan kullanıldı. Bu sıçanlardan 5 tanesi kontrol grubu 15 tanesi ise deney grupları olarak ayrıldı.

1. Grup (n=5): Sıçanlar, kuyruk veninden tek doz 10 mg/kg GdCl₃ enjeksiyonunu takiben 48. saatte sakrifiye edildi.

2. Grup (n=5): Bu gruptaki sıçanlar intraperitoneal olarak tek doz 1g/kg D-Galaktozamin. HCl enjeksiyonunu takiben 48. saatte sakrifiye edildi.

3. Grup (n=5): Sıçanlarda kuyruk veninden tek doz 10 mg/kg GdCl₃ enjeksiyonundan 60 dakika sonra 1g/kg D-Galaktozamin. HCl

intraperitoneal olarak uygulandı ve 48. saatte sakrifiye edildi.

Kontrol grubundaki sıçanlara ise aynı hacimlerde %0.9 NaCl enjekte edildi.

GdCl₃ ve D-Galaktozamin HCl enjeksiyonlarından 48 saat sonra bir gece aç bırakılan sıçanlar, eter anestezisi ile uyutulduktan sonra heparinli enjektörlerle kalplerinden kan örnekleri alındı, karaciğerleri hızla çıkarılarak soğuk %0.9 NaCl ile yıkandı ve porsiyonlara ayrılarak -800C'de saklandı. Bir kısım karaciğer ise histopatolojik incelemeler için kullanıldı.

Plazmada Yapılan İncelemeler

Sıçanların plazma ALT, AST ve Gamma-GT aktiviteleri Biocon (Almanya) kit ile ölçüldü.

Plazma interleukin-1 α düzeyleri enzim immünassay kit'le (Immunotech, Fransa) tayin edildi.

Karaciğer Dokusunda Yapılan İncelemeler

Karaciğer postmitokondrial fonksiyonunun eldesi: Karaciğer 0.15 M KCl içinde Potter-Elvehjem homojenizatörü ile buz içinde homojenize edildi (% 5'lik homojenat w/v) Daha sonra bu homojenatlar +4°C'de, 10000xg'de 20 dakika sentrifüj edilerek mitokondrial fraksiyon çöktürüldü, postmitokondrial fraksiyonu oluşturun süpernatant, çalışmamızda kullanıldı.

Postmitokondrial fraksiyonda, lipid peroksidasyonun son ürünü olan malon dialdehitin (MDA) sıcak ve asit ortamda tiobarbitürik asit ile oluşturduğu fluorasans spektrofotometrede (ekstinksiyon 252 nm emisyon 547 nm) okundu (26). Standart olarak 1,1,3,3 tetraetoksipropan kullanıldı ve sonuçlar nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Postmitokondrial faz glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi Paglia ve Valentine'in meto-

duna göre ölçüldü (18). Substrat olarak kümen hidroperoksit kullanılarak 340 nm'de 1.2 ve 3. dakikalardaki absorbans değişimi izlendi.

Glutasyon-S-transferaz (GST) aktivitesi, substrat olarak 1-kloro-2,4, dinitro benzen kullanılarak Habig ve ark.'ların metoduyla ölçüldü (8). Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazolimin süper oksit radikalleriyle indirgenmesinin SOD tarafından inhibe edilmesi prensibine dayanan Sun ve ark.'larının metodu ile ölçüldü (23).

Karaciğer postmitokondrial raksiyonunda protein tayini Lowry metodu ile yapıldı (14).

İstatistiki değerlendirmeler Student's -t test ile yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi.

BULGULAR

GdCl₃ (10 mg/kg, i.v), Gal-NH₂ (1g/kg, i.p.) ve GdCl₃+Gal NH₂ uygulamasından 48 saat sonra kesilen sıçanların plazma ve karaciğer-

lerinde yapılan incelemelerden elde edilen sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir. Tek doz GdCl₃, plazma interlökin düzeylerinde kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı bir azalmaya neden olurken, ölçülen diğer parametrelerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Akut Gal-NH₂ uygulaması ise sıçanlarda plazma ALT, AST, GGT ve interlökin düzeyleri ile karaciğer GST aktivitesini ve lipit peroksit düzeylerini anlamlı olarak arttırmıştır.

Gal-NH₂'le birlikte GdCl₃ verilen sıçanlardan elde edilen sonuçlar Gal-NH₂ uygulananlarla karşılaştırıldığında, plazma ALT, AST, GGT ve interlökin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Karaciğerde ise GPx aktivitesi ile lipit peroksit düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Histopatolojik incelemeden elde edilen sonuçlar: GdCl₃ (10 mg/kg) uygulanan sıçanlardan 48. saatte elde edilen histopatolojik bulgular kontrollerden farklı değildi, kesitlerde iltihabi infiltrasyon, nekroz ve safra kanalı proliferasyonuna rastlanmamıştır (Resim 1). GdNH₂(1g/kg)

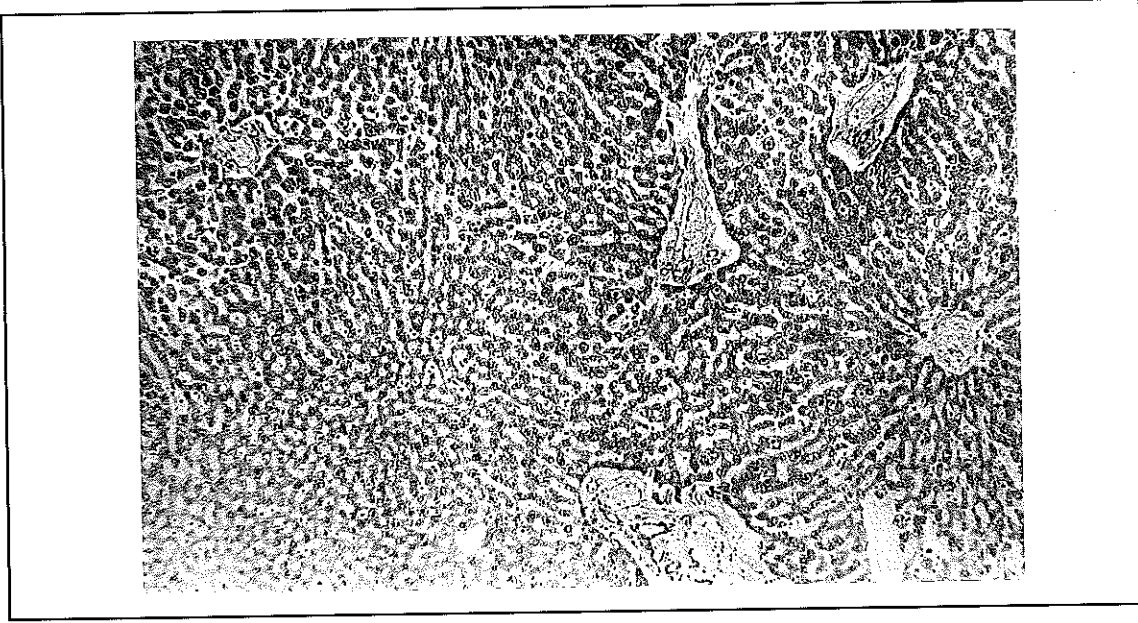
Tablo 1. GdCl₃ (10mg/kg,i.v), Gal-NH₂ (1g/kg, i.p) ve GdCl₃ +Gal-NH₂ uygulamasından 48 saat kesilen sıçanların plazma ve karaciğerlerinden elde edilen sonuçlar (Ortalama \pm SD).

PLAZMA	Kontrol	GdCl ₃ (n=5)	Gal-NH ₂ (n=5)	GdCl ₃ +Gal NH ₂ (n=5)
ALT (U/L)	58.30 \pm 6.71	56.70 \pm 5.75	434.00 \pm 120.84*	455.00 \pm 178.26*
AST(U/L)	101.50 \pm 8.11	93.65 \pm 11.11	627.20 \pm 163.31*	782.60 \pm 322.05*
GGT (U/L)	4.10 \pm 2.96	3.01 \pm 1.32	12.04 \pm 2.54**	13.90 \pm 6.55***
İnterlökin (ng/ml)	12.77 \pm 4.99	5.17 \pm 1.36**	32.57 \pm 7.28*	26.72 \pm 6.73**
KARACİĞER POSTMİTOKONRİ FRAKSİYONU				
GPX (U/mgprotein)	1.08 \pm 0.28	1.15 \pm 0.18	1.01 \pm 0.11	0.76 \pm 0.08 ^a
GST (mU/mgprotein)	544.18 \pm 121.12	403.69 \pm 54.23	288.78 \pm 58.65**	266.92 \pm 131.49**
SOD (U/mg protein)	26.55 \pm 1.79	24.60 \pm 2.46	22.89 \pm 2.97	22.06 \pm 1.00
MDA (nmol/mg protein)	0.59 \pm 0.34	0.39 \pm 0.06	1.33 \pm 0.31	0.95 \pm 0.10 ^b

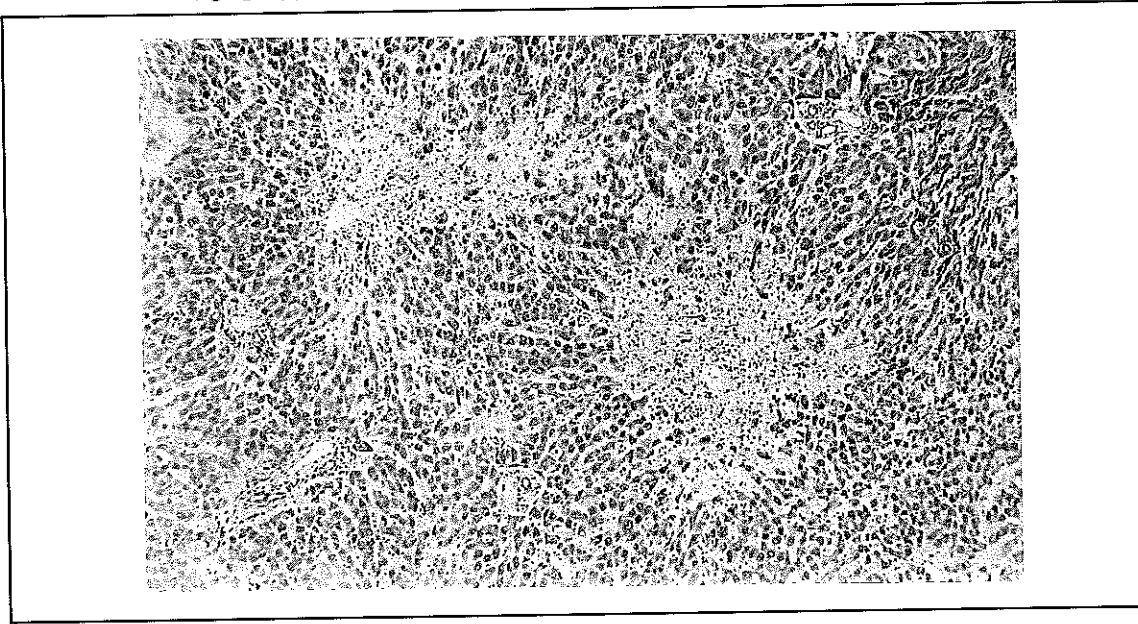
*p<0.001, **p<0.01, ***p<0.05, GdCl₃, Gal-NH₂ ve GdCl₃+Gal-NH₂ uygulanan sıçanlar kontrollerle karşılaştırıldığında.

^ap<0.001, ^bp<0.05, Gal,NH₂ ve GdCl₃+Gal-NH₂ uygulanan sıçanlar birbirileri ile karşılaştırıldığında.

Resim 1. GdCl₃ (10mg/kg) uygulanan sıçanlarda 48. saatte elde edilen histopatolojik değişiklikler



Resim 2. Gal-NH₂ (1g/kg) uygulanan sıçanlarda 48. saatte elde edilen histopatolojik değişiklikler

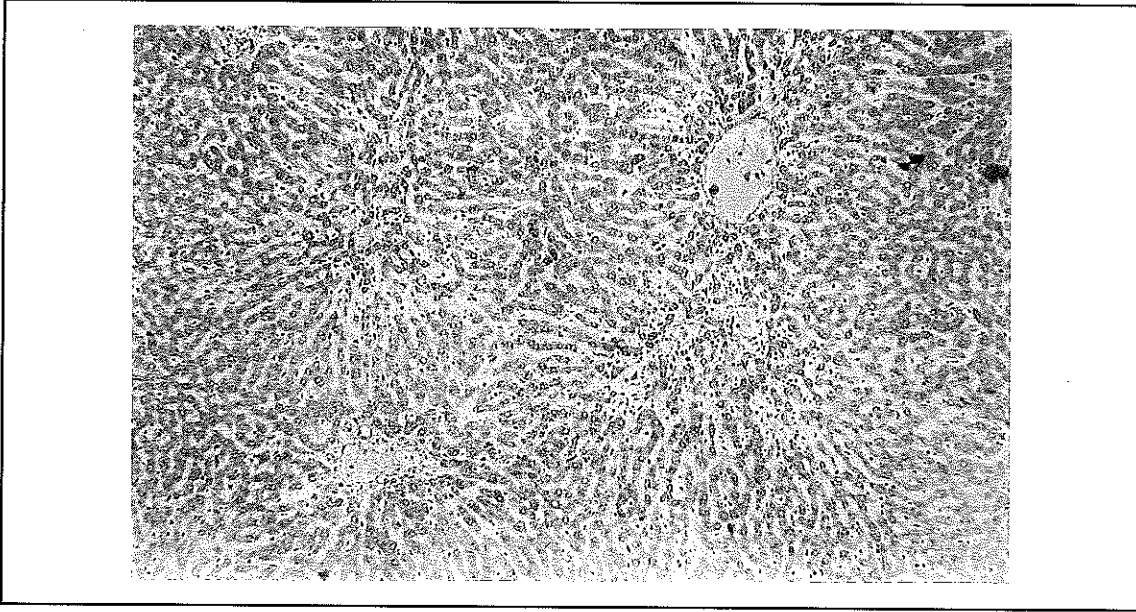


uygulaması, başlıca periportal alanda olmak üzere belirgin iltihabi infiltrasyona ve nekroza neden olmuştur (Resim 2). Gal-NH₂'le birlikte GdCl₃ uygulaması, periportal ve sinüzoidal alanlarda orta şiddette iltihabi infiltrasyona ve küçük nekrotik alanlara yol açmıştır. Ayrıca hafif fibrozis ve safra kanalı proliferasyonu da tesbit edilmiştir (Resim 3).

TARTIŞMA

Karaciğerin yerleşik makrofajları olan Kupffer hücreleri immun sistemin önemli bir elementidir. Aktive Kupffer hücrelerinin, sitokinler, reaktif oksijen radikalleri ve bazı proteolitik enzimler gibi karaciğerin parankimal hücrelerinde hasara yol açan sitotoksik maddeler salgıladığı bildirilmiştir (7,12,20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Kupffer

Resim 3. Gal-NH₂'le birlikte GdCl₃ uygulanan sıçanlarda 48. saatte elde edilen histopatolojik değişiklikler



hücrelerini spesifik olarak inaktive eden GdCl₃'ün, alkol, karbon tetraklorür ve lipopolisakkaritlerin neden olduğu doku hasarını önlediği ileri sürülmektedir (2,6,10,13,15,25).

Karaciğerde özgün morfolojik ve biokimyasal değişikliklere yol açan GdNH₂'le oluşturulan hepatosellüler hasarda, lipid peroksidasyonun rolünü inceleyen çalışmaların sonuçları çekişlidir. Bazı araştırmacılar GdNH₂'le oluşturulan hepatosellüler hasarda lipid peroksidasyonunun rolü olmadığını ileri sürerken (19), Seçkin ve ark'ları Gal-NH₂ metabolizmasının karaciğer zar yapısında oluşturduğu değişikliklere bağlı olarak gelişen kalsiyum birikiminin lipid peroksidasyonunu uyardığı ve GdNH₂'nin karaciğerde oluşturduğu hasarda bu iki uyarının birlikte rol aldığını ileri sürmüşlerdir (21,22). Yaptığımız literatür araştırmalarında, karaciğerde Gal-NH₂'le uyarılmış lipid peroksidasyonunda Kupffer hücrelerinin rolünü inceleyen bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Çalışmamızda, akut Gal-NH₂ (1g/kg) uygulamasını takiben sıçanlarda hepatosellüler hasar olduğu ve plazma ALT, AST, GGT aktiviteleri ile karaciğer lipid peroksidasyonunun

ise anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Oluşan bu hasar histopatolojik bulgularla da desteklenmiştir. Öte yandan, Gal-NH₂ (1g/kg) uygulaması sıçanlarda karaciğer GPx ve SOD aktivitelerinde kontrollere göre anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, GST aktivitesinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Elde edilen bu sonuçlar bize, Gal-NH₂'nin protein sentezini inhibe ederek enzimlerin baskılanmasında etkili olabileceğini düşündürdü.

Gal-NH₂ uygulanarak hepatosellüler hasar oluşturulan sıçanlara (GdCl₃ (10mg/kg) verilmesi 48.saatte artmış plazma ALT, AST, GGT aktivitelerinde bir düzelme sağlanmıştır. Karaciğerde ise GPx aktivitesi ile lipid peroksidasyon düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlar bize, Gal-NH₂'le oluşturulan hepatosellüler hasarda Kupffer hücre aktivasyonunun rolü olmadığını düşündürdü.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 933/090597

KAYNAKLAR

1. Adachi B., Bradford U.E., et al.: Inactivation of kupffer cells prevents early alcohol induced liver injury. *Hepatology* 20:453 (1994).
2. Adachi Y., Bradford B.U., Gao W., Bojes H.K., Thurman R.G.: Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20:453 (1994).
3. Arai M., Mochida S., et al.: Sinusoidal endothelial cell damage by activated macrophages in rat liver necrosis. *Gastroenterology* 104:1466 (1993).
4. Bauer C.H., Lukaschek R., Reutter W.: Studies on the golgi apparatus. Cumulative inhibition of protein and glycoprotein secretion by D-galactosamine. *Biochem J* 142:221 (1974).
5. Decker K.: Biologically active products of stimulated liver macrophages. *Eur J Biochem* 192:245 (1990).
6. Edwards M.J., Keller B.J., Kauffman F.C., Thurman R.G.: The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 119:X275 (1993).
7. Fawaz C.J., Hamaodi N.E., Neaud V., Balabaud C.: Preservation of human liver grafts in UVV solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activity during cold ischemia-reperfusion. *Liver* 14:50 (1994).
8. Habig W.H., Jakoby W.B.: Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth Enzymol* 77:398 (1981).
9. Jonker A.M., Dijkhuis F.W.J., Boes A., Hardonk M.J., Grond J.: Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* 15:423 (1992).
10. Jonker A.M., Dijkhuis F.W.J., Hardonk M.J., Moerkerk P., Kate J.T., Grond J.: Immunohistochemical study of hepatic fibrosis induced in rats by multiple galactosamine injections. *Hepatology* 19 (3): 775 (1994).
11. Keppler D., Lesch R., Reutter W., Decker K.: Experimental hepatitis induced by D-galactosamin. *Exp Mol Pathol* 9:279 (1968).
12. Laskin D.L.: Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin Liver Disease* 10: 293 (1990).
13. Lois H., Le Moine O., Peny M.O., Gulbis B., Nisoi F., Goldman M., Deviere J.: Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 112:935 (1997).
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265 (1951).
15. Mourelle M. and Meza A.: Colchicine prevents D-galactosamine-induced hepatitis. *J Hepatol* 8:165 (1989).
16. Nukina S., Fusaoka T., Thurman R.G.: Glycogenolytic effect of adenosine involves ATP from hepatocytes and eicosanoids from Kupffer cells. *Am J Physiol* 266:99 (1994).
17. Obi-Tabot E.T., Hanrahan L.M., Cacheco r., Beer E.R.: Changes in hepatocyte NADH fluorescence during prolonged hypoxia. *J Surg Res* 55:575 (1993).
18. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:157 (1967).
19. Scherer N.M., Deamer D.W.: Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 246:589 (1986).
20. Scot-Conner C.E., Drogan J.B.: The pathophysiology of biliary obstruction and its effects on phagocytic immune function. *J Surg Res* 57:316 (1994).
21. Seçkin Ş., Koçak-Toker N., Uysal M., Öz B.: The role of lipid peroxidation and calcium in galactosamine induced toxicity in the rat liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 80:117 (1993).
22. Seçkin Ş.: Galaktozamin uygulamasıyla gelişen karaciğer hasarında lipid peroksidlerin ve kalsiyumun rolü. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul 1992.
23. Sun Y., Oberley L.W.: Suitability of copper chloride as a reaction terminator for superoxide dismutase activity assay. *Clin Chim Acta* 226:101 (1994).
24. Suzuki S., Toledo-Pereyra L.H.: Role of kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circulatory Shock* 42:204 (1994).
25. Vollmar B., Rüttinger D., Wanner A., Leiderer R., Menger M.D.: Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock* 6:434 (1996).
26. Wasowicz W., Neve J., Peretz A.: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 39: 2522 (1993).