

Alkol Alışkanlığı Olanlarda Eritrosit Oksidan ve Antioksidan Parametre Düzeyleri*

Ferah ARMUTCU^{a,1}, Ahmet GÜREL¹, Sadık SÖĞÜT², Neriman AKSU¹, Murat ÜNALACAK³

¹ Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ZONGULDAK

² Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı HATAY

³ Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı ZONGULDAK

ÖZET

Amaç: Alkol alışkanlığı; bir çok ülkede karaciğer hastalıklarının önde gelen nedenleri arasındadır. Aşırı alkol tüketimi veya alkol alışkanlığı sonucunda meydana gelen karaciğer patolojileri arasında hepatik steatozis, alkolik hepatit, hepatik fibrozis ve siroz yer almaktadır. Son yıllarda alkolün yol açtığı patolojik değişikliklerin ve bu hastalıkların oluşum sürecinde oksidan stresin etkisi üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada alkol alışkanlığı olan 25 erkek deney grubu ile alkol almayan 25 sağlıklı erkek kontrol grubu eritrositlerinin oksidan ve antioksidan durumu değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyleri, oksidan stres nedenlerinden olan nitrik oksit (NO) düzeyi ve ksantin oksidaz (XO) aktivitesi, hücre içi antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri değerlendirildi.

Bulgular: Alkol alışkanlığı olanlarda eritrosit MDA ($p<0.01$), NO ve XO düzeyleri ($p>0.05$) düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulundu. Alkol kullananlarda eritrosit SOD ($p<0.05$) ve CAT ($p<0.01$) düzeyleri de kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç: Bu sonuçlara göre alkol alışkanlığının eritrosit oksidan ve antioksidan dengesini etkilediği, lipid peroksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen bu değişikliklerin alkolle ilişkili hastalıklar ve komplikasyonlarda rolü olabileceği sonucuna varıldı.

©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Alkol, eritrosit, lipid peroksidasyonu, nitrik oksit, ksantin oksidaz, antioksidan enzimler

ABSTRACT

Levels of Erythrocyte Oxidant and Antioxidant Parameters in People with Alcohol Addiction

Aim: Alcohol addiction is one of the leading reasons of liver diseases in many countries. Hepatic steatosis, alcoholic hepatitis, hepatic fibrosis and cirrhosis can be mentioned among the diseases resulting due to alcohol addiction. In recent years, studies have been focused on effect of oxidant stress, in the process of pathological changes and mentioned diseases caused by alcohol. In this study, 25 alcohol addict males were taken as the study group and 25 healthy, non-alcoholic males were taken as control, and oxidant-anti-oxidant status of erythrocytes was evaluated.

Materials and Methods: It was measured erythrocyte levels of malondialdehyde, (MDA), which is an indicator of lipid peroxidation, nitric oxide (NO) levels, and activity of xanthine oxidase (XO), which are some of the reasons of oxidant stress, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, which are intracellular antioxidant enzymes, were evaluated.

Results: While MDA ($p<0.01$) were found to be higher in the study group than the control, there was no statistically significant difference of NO levels and XO activity ($p<0.05$) between the groups. Erythrocytes SOD ($p<0.05$) and CAT ($p<0.01$) activities were found to be higher in the alcohol group than the control.

Conclusion: According to these results, it was concluded that alcohol addiction influenced oxidant and antioxidant balance of erythrocytes, and changes related with lipid peroxidation might have a role in diseases and complications related with alcohol. ©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Key words: Alcohol, erythrocyte, lipid peroxidation, nitric oxide, xanthine oxidase, antioxidant enzymes

Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna (LP) yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (1,2). Genellikle karaciğerde meydana gelen etanol metabolizmasının erken fazında tam oksidasyon ile açığa çıkan oksijen ve NO radikalleri, asetaldehit artışı hücre içi redoks durumunu belirgin olarak değiştirmektedir (3). Ayrıca etanol ve başlıca metaboliti asetaldehitin metabolize olamadığı diğer dokularda serbest radikal türlerinin oluşumuna yol açabildiği ve bu dokularda prooksidan etki sonucu alkolle ilişkili toksisite ve hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (4,5). Etanol metabolizması sırasında karaciğerde aktivitesi oldukça artan ksantin oksidaz kendisi

serbest radikal oluşumuna yol açtığı gibi, asetaldehit metabolizmasının da ksantin oksidaz veya aldehit oksidaz aracılığı ile serbest radikaller üretebilme potansiyeli vardır. Kronik alkol tüketiminde daha aktif hale geçen hepatik mikrozomal P450 2E1 enzim sistemi ve katalaz yolunun da, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 1-OH etil radikali gibi serbest radikallerin üretimi ile ilişkili olduğu ve serbest radikal üretimini artırdıkları bilinmektedir (6,7). Kronik alkol kullanımı basit bir intoksikasyondan hayatı tehdit eden şiddetli metabolik bozukluklara kadar bir çok patolojik durumla ilişkilidir. Alkol alışkanlığı olanlarda demir fazlalığı kadar olmamakla birlikte anemi de sık gözlenmektedir (8-9). Biyomembranlarda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sıklıkla reaktif oksijen türevlerine (ROT)

^a Yazışma Adresi: Dr. Ferah Armutçu, Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 67600 ZONGULDAK

* Bu çalışma 15-19 Mayıs 2004 tarihleri arasında Trabzon'da yapılan 18. ulusal Biyokimya Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuş ve özeti Türk Biyokimya Dergisi kongre özetleri sayısında yayımlanmıştır.

Tel: 0 372 261 02 43 / 4333 Fax: 0 372 261 01 55

e-mail: drferah@yahoo.com

maruz kalma ile oluşur ve hücre fonksiyon değişimi veya hücre ölümüne yol açabilir. Lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır (10). Alkolün hem kimyasal hem de fiziksel olarak hücre membran hasarına yol açtığı bilinmekte olup alkol araştırmaları etanol ile uyarılan biyokimyasal mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (11). Biz de bu çalışmada sürekli alkol kullananlarda eritrosit lipid peroksidasyonu, nitrik oxide (NO) düzeyleri ve ksantine oksidaz (XO) aktivitesi ile antioksidan enzimlerden superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivite düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri, alkol kullanmayan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırarak araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Zonguldak ve Devrek ilçesinde oturan ve olgu grubu olarak sürekli alkol kullanan 25 kişi ile kontrol grubu olarak alkol kullanmayan 25 sağlıklı kişiden oluşan toplam 50 gönüllü erkek katılımcı çalışma kapsamına alındı. Olgu grubu son 5 (en az) yıldır düzenli olarak (haftada en az 3 akşam, günde 80 gr'dan fazla ve daha çok; bira %80, rakı % 20) alkol almaktaydı. Yaş ortalaması 40±5.47 olan olgu grubu ve yaş ortalaması 39±6.18 olan kontrol grubu arasında yaş, vücut kitle indeksleri, beslenme durumları ve sigara alışkanlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Çalışma ve kontrol gruplarından 12 saat açlık sonrası EDTA'lı tüplere sabah kan örnekleri alındıktan sonra bir saat içinde santrifüj edildi, plazma örnekleri ayırdıktan sonra eritrositler serum fizyolojik ile 3 defa yıkandı ve çalışma gününe kadar -40 °C'de saklandı. Çalışma zamanında soğuk deiyonize su ile çözölen eritrosit hemolizati 10 kat sulandırıldı.

Tablo 1. Sürekli alkol kullananlar ile alkol kullanmayan kontrol grubuna ait MDA ve NO düzeyleri ile XO, SOD ve CAT aktivite düzeyleri (ortalama ± standart sapma).

	Kontrol grubu (n=25)	Sürekli alkol kullananlar (n=25)	P değeri
MDA (µmol / g Hb)	0.086±0.04	0.144±0.06	< 0.01
NO (µmol / g Hb)	0.57±0.22	0.68±0.33	A. D.
XO (U / g Hb)	38.6±16.7	43.1±14.5	A. D.
SOD (U / g Hb)	1480±553	1879±688	< 0.05
CAT (k / g Hb)	1073±308	1394±414	< 0.05

TARTIŞMA

Alkol metabolizmasının çeşitli basamaklarında serbest radikal üretimine bağlı olarak etanol ile indüklenen pro-oksidan stres meydana gelmektedir. Gastrointestinal yoldan hızla emilen etanol %90 karaciğer hücrelerinde metabolize edilmekte; alkol dehidrogenaz, mikrozomal etanol okside edici sistem ve katalaz tarafından asetaldehite oksitlenmektedir (1,5). Alkol dehidrogenaz tarafından NAD'nin NADH'a indirgenmesi ve tekrar kullanılmak üzere aldehit oksidaz tarafından NAD'ye yükseltildiği basamakta reaktif oksijen türleri de üretilmektedir (17). Organizmada etanol metabolizması esnasında meydana gelen artmış lipid peroksidasyonu, ya karaciğerde oluşan peroksidatif sürece bağlı olarak indirek, ya da etanolün dolaşan lipidler ve hücre membranları üzerine direk etkisinden ileri gelebilir (18). Dahası, eritrositler çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olup, moleküler oksijen ve Fe⁺² iyonları nedeniyle lipoperoksidatif hasara özellikle yatkındırlar. Bununla birlikte literatürde bu konuda yapılmış

Hemolizat örneklerinde MDA ölçümü Draper ve Hadley'in çift ısıtma metodu ile yapıldı (12). Metoden prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu sonucu oluşan pembe renk absorbansının spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Plazma MDA konsantrasyonları, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 Japan) absorbans değerleri okunduktan sonra, MDA-TBA kompleksinin absorbans sabiti ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Nitrik oksit düzeyleri Griess reaksiyonu (13), XO aktivitesi Prajda ve Weber'in (14), SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının (15) ve CAT aktivite düzeyleri de Aebi'nin (16) yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Hemoglobin ölçümleri Drabkin çözeltisi ve hemoglobin standardı kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü ve sonuçlar µmol gr / hemoglobin veya U / gr hemoglobin olarak verildi.

Çalışma ve kontrol grupları arasındaki anlamlılık SPSS 10.0 paket istatistik programında Student-t testi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi ve anlamlılık düzeyi p<0.05 kabul edildi.

BULGULAR

Sürekli alkol kullananlar ile kontrol grubuna ait bulguların karşılaştırılması ve istatistiksel anlamlılık dereceleri tablo 1'de verilmiştir. Lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan MDA düzeyleri sürekli alkol kullananların eritrosit örneklerinde kontrol grubundan yüksek (p<0.01) bulundu. Aynı şekilde oksidan faktörlerden olan NO düzeyleri ve XO aktivite düzeyleri de yüksek bulundu ancak iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Antioksidan enzimler SOD ve CAT aktivite düzeylerinin de alkol kullananlarda kontrol grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulundu (p<0.05).

çalışmalarda bulunan sonuçlar arasında farklılıklar olduğu görülmektedir. Bir in vitro çalışmada etanolün eritrositlerde metabolize olmadığı ve etanol varlığında eritrosit reaktif oksijen türlerinde azalma ve spontan hemoliz olduğu gözlenirken (20), Akkuş ve ark. alkol kullanan 72 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada eritrosit MDA düzeylerinin kontrol grubundan daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir (21). Yapılan bir diğer çalışmada alkolik hastaların eritrositlerinin kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonuna daha dirençli oldukları rapor edilmiştir (22). Tek doz etanol (0.6 g/kg) alındıktan 30 dakika sonra eritrosit MDA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, SOD aktivitesinin ise tedavi öncesine göre anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (23). Bizim çalışmamızda alkol kullananlarda eritrosit MDA düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu. Nitrik oksit eşlenmemiş bir elektron içerdiği için oksijen, süperoksit radikalleri, Fe ve Cu gibi geçiş metalleriyle hızla reaksiyona girmektedir. Bu nedenle oksidatif ve nitroztatif serbest radikal oluşumundan

söz edilmekte ve nitrik oksit varlığında lipid peroksidasyonunun arttığı ileri sürülmektedir (24). Çalışmamızda oksidan stres nedenlerinden olan NO düzeyleri yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Özellikle etanol metabolizması esnasında karaciğerde aktivitesi oldukça artan ksantin oksidaz da serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır (25). Bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı olmasa da eritrosit ksantin oksidaz düzeyleri, lipid peroksidasyonuna paralel olarak kontrol grubundan yüksek bulundu. Artan lipid peroksidasyonuna organizmanın antioksidan yanıtı oksidan strese maruz kalma miktar ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte akut dönemde antioksidan enzim aktivitelerinde artış olurken uzun dönemde bu yanıtta azalma gözlemlenmektedir. Sözmen ve arkadaşları etanol toksisitesine maruz kalan rat eritrositlerinde SOD ve Na-K ATPase aktivitesinin anlamlı derecede azaldığını rapor etmişlerdir (26). Orta derecede alkol alanların eritrosit SOD ve glutatyon peroksidaz enzimlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamazken (21), bir diğer klinik çalışmada 80 alkolik hastanın eritrositlerinde antioksidan enzim düzeylerinin yanı sıra plazma vitamin C ve E düzeylerinin de azalmış olduğu bulunmuştur (27). Bu çalışmaların aksine bizim çalışmamızda eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. Bu durum bu hastalarda olasılıkla alkolik karaciğer hasarının tam olarak oluşmadığı veya oluşmakta ise de karaciğer dışı dokularda antioksidan sistemin lipid peroksidasyonuna karşı indüklendiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Ishii H, Kurose I, Kato S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S272-282.
- Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Rad Biol Med* 1992; 12: 219-240.
- Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001; 8: 59-70.
- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 231-237.
- Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 1994; 29: 513-22.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 49-98.
- Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS. Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 203-210.
- Armutcu F, Gürel A, Kurtman S, Mungan AG, Ünalacak M. Alkol alışkanlığı olanlarda lipid peroksidasyonu ve serum demir parametreleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2003; 2: 61-67.
- Potter BJ. Alcohol and hepatic iron homeostasis. In: Watson RR. Editor. *Drug and alcohol abuse reviews: vol. 2. Liver Pathology and Alcohol*, Humana Press, Totowa: NJ, 1991: 1-60.
- Sevanian A, McLeod L. Formation of Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. Taylor and Francis, Washington: DC, 1997: 47-70.
- Tyulina OV, Huentelman MJ, Prokopieva VD, Boldyrev AA, Johnson P. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1535: 69-77.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.
- Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
- Prajda N, Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975; 59: 245-249.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1974: 673-677.
- Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF. Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 53-58.
- Clara Lindi, Gigliola Montorfano, Paola Marciani. Rat Erythrocyte Susceptibility to Lipid Peroxidation After Chronic Ethanol Intake. *Alcohol* 1998; 16: 311-316.
- Clot P, Tabone M, Arico S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994; 35: 1637-1643.
- Tyulina OV, Prokopieva VD, Dodd RD, Hawkins JR, Clay SW, Wilson DO, Boldyrev AA, Johnson P. In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 179-186.
- Akkuş I, Gultekin F, Aköz M, Caglayan O, Bahçacı S, Can UG, Ay M, Gürel A. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma, erythrocyte and leukocyte and on some antioxidant enzymes. *Clin Chim Acta* 1997; 266: 141-147.
- Punchard NA, Senturk H, Teare JP, Thompson RP. Resistance of erythrocytes to lipid peroxidation in alcoholic patients. *Gut* 1994; 35: 1753-1756.

23. Dudek IM, Kedziora J, Zagorski T. Effect of ethanol on human erythrocyte superoxide dismutase activity and malonyl dialdehyde concentration. *Int J Occup Med Environ Health*. 1995; 8: 239-43.
24. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 1898-1902.
25. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatori N, Lieber CS. Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation. *Gastroenterology* 1993;98: 203-10.
26. Sozmen EY, Tanyalcin T, Onat T, Kutay F, Erlacin S. Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 741-744.
27. Zhou JF, Chen P. Studies on the oxidative stress in alcohol abusers in China. *Biomed Environ Sci* 2001;14: 180-188.
28. Marotta F, Safran P, Tajiri H, Princess G, Anzulovic H, Ideo GM, Rouge A, Seal MG, Ideo G. Improvement of hemorheological abnormalities in alcoholics by an oral antioxidant. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 511-517.
29. Fiorelli G, De Feo TM, Duca L, Tavazzi D, Nova I, Fargion S, Cappellini MD. Red blood cell antioxidant and iron status in alcoholic and nonalcoholic cirrhosis. *J Clin Invest* 2002; 32 (Suppl 1); 21-27.
30. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 263-355.
31. Aberkane H, Stoltz JF, Galteau MM, Wellman M. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated prooxidant reaction. *Eur J Haematol* 2002; 68: 262-271.

Kabul Tarihi: 28.05.2004