

Alkolün indüklediği oksidatif stresin bazı antioksidanlar üzerine etkileri

Fatih Gültekin¹, Mehmet Gürbilek², Hüsamettin Vatansev², İdris Akkuş², Zihni Karaeren², Sadınaz Kalak²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

Amaç: Çalışma, alkolün indüklediği oksidatif stresin antioksidan sistem üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. **Yöntem:** Kontrol grubu olarak hayatı boyunca alkol kullanmamış 30, vaka grubu olarak ise en az beş yıldır (ortalama 15.0 ± 6.9 yıl) düzenli olarak haftada en az bir kez (138.3 ± 110.5 g/gün) alkol alan 72 sağlıklı erkek seçildi. Bu şahıslarda eritrosit katalaz aktivitesi ile serum çinko, bakır, seruloplazmin, ürik asit, AST, ALT, GGT, total protein, albümin ve total bilirübin düzeyleri çalışıldı. **Bulgular:** Çalışma grubunda bakır, ürik asit ve protein ile karaciğer fonksiyon testlerinden AST ve GGT anlamlı olarak yüksek bulunurken diğer parametrelerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. **Sonuç:** Alkolün oluşturduğu oksidatif strese kronik olarak maruz kalmanın katalaz aktivitesi üzerinde etkili olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Alkol, katalaz, bakır, çinko, seruloplazmin, ürik asit

The effects of alcohol-induced oxidative stress on some antioxidants

Objective: The aim of the study was to investigate the effects of alcohol-induced oxidative stress on some antioxidants. **Method:** The study group consisted of 72 healthy male subjects who regularly consumed alcohol at least once a week (138.3 ± 110.5 g/ day) for minimum five years (15.0 ± 6.9 yrs). The control group consisted of 30 healthy male subjects who had any alcohol in their life. The erythrocyte catalase activity, serum zinc, copper, ceruloplasmin, uric acid, AST, ALT, GGT, total protein, albumin, and total bilirubin levels were determined in all subjects. **Results:** Significant elevations were found at the levels of copper, uric acid, protein, AST and GGT, but the other parameters were not significantly different in the study group when compared to the controls. **Conclusion:** It is concluded that undergoing alcohol-induced oxidative stress chronically does not affect catalase activity.

Key words: Alcohol, catalase, copper, zinc, ceruloplasmin, uric acid

Genel Tıp Derg 1998;8(3):105-9.

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların

Yazışma adresi: Yrd.Doç.Dr.Fatih Gültekin, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, 32040 Isparta

meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid

peroksidasyonunu inhibe ederler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilen antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılabilir (1,2).

Bir antioksidan enzim olan katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Peroksizomlarda lokalizedir (3,4).

Seruloplazmin, albümin, bilirübin ve ürik asit enzim olmayan antioksidanlardan bazılarıdır. Serum bakırının % 80'den fazlasını bağlayan bir glikoprotein olan seruloplazmin çok çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlediği halde önde gelen in vivo oksidan aktivitesi ferooksidaz tarzındadır. Böyle bir oksidasyon $O_2^{\cdot -}$ ya da OH meydana getirmez. Ferooksidaz olarak Fe^{+2} 'nin artırdığı radikal reaksiyonunu inhibe eder ve önemli bir ekstraselüler antioksidan olduğu kabul edilir (5-7).

Seruloplazminin, süperoksid radikallerinin H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ 'e dismutasyonunu katalizleyen süperoksid dismutaz enzimine benzer fonksiyonu da vardır (7).

Albümin bakırı bağlayarak, bilirübin ve ürik asit ise bazı serbest radikalleri tutarak antioksidan etki gösterirler (8).

Bazı elementlerin oksidan veya antioksidan sistemde önemli fonksiyonları vardır. Çinko bir antioksidan olan CuZn SOD'nin de dahil olduğu 70'den fazla metalloenzimin iç yapısında bulunur veya koenzim olarak görev yapar (9). Bu özelliğiyle Zn düzeyi antioksidan kapasitede etkili olabilmektedir.

Alkolün metabolizma ve doku üzerine zararlı birçok etkisi vardır. Bu etkileri direkt kendisi veya metabolizması sonucu açığa çıkan toksik maddeler aracılığı ile gösterir. Etkilerinin bir kısmını serbest radikalleri artırarak veya endojen antioksidanları azaltarak yaptığı ileri sürülmektedir (10-12). Çeşitli dokulardaki lipid peroksidasyonlarına ve antioksidan enzimler üzerine etkisi halen tartışmalıdır.

Bu çalışma, alkolün indüklediği oksidatif stresin bir antioksidan enzim olan katalaz ile enzim olmayan

bazı antioksidanlara ne yönde etki ettiğini araştırmak için yapıldı.

Yöntem

Çalışma grubu haftada en az bir defa alkol alan ve halen düzenli olarak almaya devam eden 72 erkek şahıstan oluşturuldu. Kontrol grubu olarak hayatı boyunca hiç alkol kullanmamış 30 erkek alındı.

Çalışma grubunun ortalama yaşı 35.3 ± 6.1 (20-48) yıl, kontrol grubunun ortalama yaşı 38.7 ± 9.6 (8-55) yıl idi. Çalışma grubu ortalama 15.0 ± 6.9 (5-30) yıldır 138.3 ± 110.5 (20-550) g/gün alkol almakta idi. Her iki gruptaki kişilerin herhangi bir klinik şikayeti ve bulgusu yoktu.

Hesaplamalar, alkol alan kişilerin verdikleri bilgilere ve aldıkları içki türüne göre yaklaşık olarak yapıldı. Alkol grubunun kanları vakaların alkol aldıkları lokanta, bar, birahane gibi yerlerde alındı. Vakalar en az 8 saattir alkol almayan şahıslardan seçildi. Kan alınırken şahısların aç veya tok olmalarına dikkat edilmedi.

Tek kullanımlık enjektör ile 10 ml venöz kan alındı, 5 ml si düz tüplere aktarılarak serumları ayrıldı. Ayrılan serumdan aynı gün rutin tetkikler yapıldı. Geriye kalan serum örnekleri birkaç kısma bölünerek bakır, çinko ve seruloplazmin çalışılınca kadar $-20^{\circ}C$ 'de derin dondurucuda saklandı. Bakır ve çinko çalışma basamaklarında deiyonize malzeme kullanıldı. Lökositleri uzaklaştırmak için enjektörde kalan kanın üzerine yaklaşık yarısı kadar (2 ml) Dextran 70 solüsyonu eklenip alt üst edildi. Enjektör dik pozisyonda oda ısısında 60 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda iğnenin ucu eğilerek lökositleri içeren üst faz plastik bir tüpe aktarıldı.

Eritrositlerin olduğu alt faz ise bir cam tüpe alındı. Eritrositler üç defa soğuk serum fizyolojikle yıkanarak eritrosit paketi elde edildi. Yıkamış eritrosit paketinden Contraves Autolyzer 80 marka kan sayım cihazında hematokrit, hemoglobin, eritrosit ve lökosit sayımları yapıldı. Eritrosit paketi çalışma yapılana kadar derin dondurucuda $-20^{\circ}C$ 'de bekletildi.

Katalaz aktivitesi tayini: Goth'un (13) metodu modifiye edilerek çalışıldı. Önce eritrosit paketi 2000 kat soğuk distile suyla dilüe edilerek eritrosit hemolizati hazırlandı. Daha sonra bu hemolizattan

prosedüre uygun olarak katalaz tayini yapıldı. Metodun prensibi H₂O₂'nin amonyum molibdatla sarı renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Ayrıca literatürdeki formül [Katalaz aktivitesi (kU/L) = A (K₁) - A (N) / A (K₂) - A (K₃) x 271] şeklinde değiştirildi (N: Numune, K₁: Kör 1, K₂: Kör 2, K₃: Kör 3).

Bakır ve Çinko tayini: Sentinel (Italy) marka ticari kit kullanılarak yapıldı.

Seruloplazmin tayini: Sunderman ve Nomoto'nun (14) metoduna göre çalışıldı. Bu metoda göre seruloplazmin pH 5.4'de p-fenilen diammin (PPD) oksidasyonu katalizler. Reaksiyon sonucu mavimeneke renkli bir ürün oluşur. Renkli oksidasyon ürününün oluşum miktarı serum seruloplazmin aktivitesiyle orantılıdır.

Serum AST, ALT, GGT, protein, albümin ve ürik asit düzeyleri Biotrol (Fransa) marka kit kullanılarak Technicon RA XT otoanalizörde rutin biyokimyasal metodlarla ölçüldü.

İstatistikler "SPSS for Windows 6.0" paket programında Student'in t testi ve Pearson korelasyon testi kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Tablo'da görüldüğü gibi, çalışma grubunda kontrol grubuna göre bakır, ürik asit ve protein düzeyleri ve AST, GGT aktiviteleri anlamlı şekilde yüksek bulunurken diğer parametrelerde anlamlı bir farka rastlanmadı. Ayrıca GGT aktivitesi ile içilen alkol miktarı arasında anlamlı (r=0.484, P=0.006) korelasyon bulundu.

Tablo. Çalışma ve kontrol grubuna ait bulguların karşılaştırılması (ortalama ± standart sapma)

	Çalışma grubu (n=72)	Kontrol grubu (n=30)	P
Katalaz (kU/gHb)	358.5 ± 84.4	322.4 ± 100.3	>0.05
Çinko (µg/dL.)	86.3 ± 24.6	80.3 ± 19.7	>0.05
Bakır (µg/dL.)	110.3 ± 24.6	96.2 ± 19.8	<0.05
Seruloplazmin (mg/dL.)	27.2 ± 5.4	25.1 ± 5.8	>0.05
Ürik Asit (mg/dL.)	5.8 ± 1.6	4.9 ± 1.5	<0.01
AST (U/L.)	32.5 ± 18.0	23.8 ± 7.8	<0.001
ALT (U/L.)	28.8 ± 20.1	26.9 ± 18.0	>0.05
GGT (U/L.)	65.5 ± 75.2	32.3 ± 17.4	<0.001
Protein (g/dL.)	7.1 ± 0.5	6.8 ± 0.3	<0.005
Albumin (g/dL.)	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.4	>0.05
T. Bilirubin (g/dL.)	0.61 ± 0.27	0.65 ± 0.27	>0.05

Tartışma ve sonuç

Alkolik karaciğer hastalığına spesifik olan AST ve GGT aktivitelerinin yüksekliği ve GGT ile alkol miktarı arasında pozitif korelasyon olması karaciğerin alkolden etkilendiğini göstermektedir. Alkolün antioksidan enzim aktivitelerine ve enzim olmayan antioksidanlar üzerine etkileri çelişkilidir.

Tablo'da görüldüğü gibi katalaz aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Aynı şekilde Guemouri ve ark (15) ile, Bjorneboe ve ark (16) insanlarda, DeMaster ve ark (17) ise ratlarda eritrosit katalaz aktivitesinde anlamlı bir değişiklik bulunmamışlardır. Wisniewska-Knypl ve Wnoska-Nofer (18) alkol vererek oksidatif stres oluşturulan ratların kanlarında, Genç ve ark (19) ile Fields ve ark (20) ise karaciğer homojenizatında katalaz aktivitesinin değişmediğini göstermişlerdir. Bizim bulgularımız bu çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Bununla beraber alkolik sirozda eritrositlerde (21), kronik olarak alkol tüketen ratların kanında ve beyin korteksinde katalaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir (22,23). Ayrıca alkolle beslenen ratların kan, karaciğer ve beyinde (24-27), alkol inhalasyonunda kanda (28) katalaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

Çinko düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Karkkainen ve ark (29) ve Zidenberg-Cherr ve ark (30) da alkolün Zn düzeyini değiştirmediklerini göstermişlerdir. Bunun yanında Frimponf ve Lovis-Charles (31) orta derecede alkol alanlarda serum çinko düzeyini yüksek bulmuş, alkolün çinkonun diyetle alınmasına veya idrarla atılmasına etkili olmadığını göstermişlerdir. Dinsmore ve ark (32) sağlıklı şahıslarda tek doz alkolle birlikte çinko verilmesiyle serum çinko düzeyinin yükseldiğini ve alkolün çinko emilimini artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca alkol içenlerde serum çinko düzeyinin düştüğünü gösteren birçok çalışma (9,16,33,34) da mevcuttur.

Çeşitli çalışmalarda (5,16,24,31,32,35,36) bakır ve seruloplazmin düzeyi yüksek bulunmuştur. Bunun yanında bakır düzeyinin değişmediğini (9) ve azaldığını (34) bildiren çalışmalar da vardır. Bulgularımız bakır düzeyinin arttığı, seruloplazmin düzeyinin değişmediği şeklindedir. Bakırın artması, serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonunu artıracığından istenmeyen bir durumdur.

28. Burmistrov SO, Mashek ON, Stepanova II. The effect of the inhalation of ethanol and acetone on the indices of the antioxidant protection system and on lipid peroxidation in the brain tissue and blood serum of rats. *Exp Clin Pharmacol* 1992;55:56-8.
29. Karkkainen P, Mussalo-Rauhamaa H, Poikolainen K, Lehto J. Alcohol intake correlated with serum trace elements. *Alcohol Alcohol* 1988;23:279-82.
30. Zidenberg - Cherr S, Olin KL, Villanueva J, Tang A, Phinney SD, Halsted CH, et al. Ethanol - induced changes in hepatic free radical defence mechanism and fatty - acid composition in the miniature pig. *Hepato* 1991;13:1185-92.
31. Frimponf NA, Louis-Charles J. Cupper and zinc status in moderate alcohol intake. *Adv Exp Med Biol* 1989;258:145-54.
32. Dinsmore WW, McMaster D, Callender ME, Buchanan KD, Love AHG. Trace elements and alcohol. *Sci Total Environ* 1985;42:109-19.
33. Ward RJ, Peters TJ. The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or myopathy. *Alcohol Alcohol* 1992;27:359-65.
34. Schuhmacher M, Domingo JL, Corbella J. Zinc and copper levels in serum and urine: Relationship to biological, habitual and environmental factors. *Sci Total Environ* 1994;148:67-72.
35. Cook CC, Walden RJ, Graham BR, Gillham C, Davies S, Pricherd BN. Trace element and vitamin deficiency in alcoholic and control subjects. *Alcohol Alcohol* 1992;26:541-8.
36. Miniuk K, Moniuszko-Jakoniuk J, Kulikowska E, Omieljaniuk N. The interactions of copper, lead and ethanol in rats: effects on some biochemical parameters of blood. *Pol J Pharmacol Pharm* 1989;41:273-80.
37. Gandhi BM, Raina N. Alcohol induced changes in lipids and lipoproteins. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:29-32.
38. Gordon T, Kannel WB. Drinking and its relation to smoking, BP, blood lipids, and uric acid: The Framingham Study. *Arch Intern Med* 1983;143:1366-74.
39. Loenen HM, Eshvis H, Lowik MR, Schouten EG, Hulshoj KF, Odink J, et al. Serum uric acid correlates in elderly men and women with special reference to body composition and dietary intake. *J Clin Epidemiol* 1990;43:1297-303.
40. Faller J, Fox IH. Ethanol induced alterations of uric acid metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1984;165:457-62.
41. Gibson T, Rodgers AV, Simmonds HA, Toseland P. Beer drinking and its effect on uric acid. *Br J Rheumatol* 1984;23:203-9.
42. Faller J, Fox IH. Ethanol induced hyperuricemia: Evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N Engl J Med* 1982;307:1598-602.