

MUS MUSCULUS VE OREOCHROMIS NILOTICUS'TA KARACİĞER DOKUSUNDA ANTIOKSİDAN SİSTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI* Comparison of the antioxidant systems in liver tissues of *Mus musculus* and *Oreochromis niloticus*

Ergül BELGE¹, Elif ORUÇ², Güneş T YÜREGİR³, Nevin ÜNER⁴, Figen DORAN⁵, Seyhan VARİNLİ⁶

Özet

Amaç: Normal metabolizma süresince türeyen serbest oksijen radikalleri hücrede hasar oluştururlar. Bu hasarı önleyecek mekanizma, hücrel antioksidan sistem olup Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz(G6PD) glutatyon redüktaz (GR) süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) gibi maddelerdir. Birçok toksikolojik maddeler serbest oksijen radikalleri oluşturduğundan ileride yapılacak toksikolojik çalışmalara temel teşkil etmek üzere fare (*Mus musculus*) ve balık (*Oreochromis niloticus*) karaciğerinde hücrel antioksidan sistemleri araştırmayı amaçladık. Karaciğer histopatolojisi normal olan denekler değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi (G6PD) Beutler metoduyla, glutatyon redüktaz (GR) Staal metoduyla, süperoksit dismutaz (SOD) Fridovich metoduyla ve redükte glutatyon (GSH) Beutler metoduyla bu iki türde karaciğer dokusunda belirlenmiştir.

Bulgular: G6PD: 2.38±1.09 Ü/g karaciğer (*M.musculus*), 21.88±6.95 Ü/g karaciğer (*T.nilotica*); GR: 2.47±1.31 Ü/g karaciğer (*M.musculus*), 1.01±0.26 Ü/g karaciğer (*T.nilotica*); SOD: 553.71±214.26 Ü/g karaciğer (*M.musculus*), 388.10±459.40 Ü/g karaciğer (*T.nilotica*); GSH: 0.946±0.228 µmol/g karaciğer (*M.musculus*), 0.123±0.035 µmol/g karaciğer (*T.nilotica*) olarak bulunmuştur.

Sonuç: *O Niloticus*'da G6PDH aktivitesi *M. musculus*dan anlamlı derecede yüksek fakat GR, SOD aktivitesi ve GSH düzeyinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Antioksidan sistemlerin tür içi ve türler arasında önemli farklılıklar gösterdiği saptanmıştır ($p<0.01$).

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Fare, Karaciğer, *Mus musculus*

Summary

Purpose: Free oxygen radicals produced during the normal metabolism cause damage. This possible damage is prevented by the cellular antioxidant system which consists of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione reductase(GR), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH). Since many toxicologic substances are being metabolised through the free radical pathway, we aimed to establish antioxidant systems in mice (*Mus musculus*) and fish (*Oreochromis niloticus*) that had normal livers according to the results of histopathological analysis.

Material and Methods: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity was measured by Beutler method, glutathione reductase (GR) by Staal method, superoxide dismutase (SOD) by Fridovich method and reduced glutathione (GSH) by Beutler method in the liver tissues of the above species.

Results: The levels of the enzymes and reduced glutathione were; G6PD: 2.38±1.09 U/g liver (*M.musculus*), 21.88±6.95 U/g liver (*O. niloticus*); GR: 2.47±1.31 U/g liver (*M.musculus*), 1.01±0.26 U/g liver (*O. niloticus*); SOD: 553.71±214.26 U/g liver (*M.musculus*), 388.10±459.40 U/g liver (*O. niloticus*); GSH: 0.946±0.228 µmol/g liver (*M.musculus*), 0.123±0.035 µmol/g liver (*O. niloticus*).

Conclusion: The G6PDH activity in *O. niloticus* was significantly higher than that found in *M. musculus* but GR, SOD activities and GSH level were significantly lower. Antioxidant systems showed significant differences within different strains and species ($p<0.01$).

Key Words: Antioxidants, Liver, Mice, *Mus musculus*

* XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997
Çukurova Üniversitesi 01330 ADANA
Tıp Fakültesi. Biyokimya.Araş.Gör.Dr.¹, Prof.Dr.³.
Patoloji. Doç.Dr.⁵, Prof.Dr.⁶.
Fen Edebiyat Fakültesi.Araş.Gör.Dr.², Prof.Dr.⁴.

Geliş tarihi:19 Temmuz 1997

Serbest oksijen radikalleri (SOR) aeroblar tarafından oksijen kullanımının bir sonucu olarak üretilirler ve hücrede makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonuna, lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına ve sonunda hücrenin ölümüne neden olabilirler. İyonize

radasyon ve ksenobiyotik metabolizması sonucu da oksidatif hasar oluşabilir. Fakat hücre bu hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarla korunur. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon redüktaz (GR), glutasyon peroksidaz (GPX), ve katalaz (CAT) enzimatik antioksidanlar, redükte glutasyon (GSH), vitamin E ve C de non-enzimatik antioksidanlardır (1,2).

Pentoz fosfat yolunun kilit enzimi olan G6PD aynı zamanda biyokimyasal bir tümör tanımlayıcısı (marker)dır. G6PD enzimi tarafından oluşturulan redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat NADPH birçok biyosentetik reaksiyonda ve SOR'nin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (3).

GPX ve GR enzimleri tiyol grubu içeren enzimler olup, glutasyonun oksidasyonunda ve redüksiyonunda, peroksitlerin detoksifikasyonunda ve pentoz fosfat yolunun regülasyonunda rol oynamaktadırlar (4). *Mus musculus'ta* G6PD enzim eksikliğinde GR aktivitesinin %24 oranında arttığı bildirilmektedir (5).

GSH hücrelerde bol miktarda bulunan, tiyol grubu içeren düşük molekül ağırlıklı bir tripeptid olup redükte formda SOR'ye karşı hücreyi korur. Yaşa bağlı olarak GSH fonksiyonu kan, karaciğer ve bağırsakta azalmaktadır (6). Hayvan hücrelerinde GSH sentezindeki bozukluklar hemolize neden olmaktadır (7). SOD SOR'nin yıkımını sağlayan diğer bir enzim olup çeşitli hayvan türlerinde üç formda (CuZn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD) rastlanmıştır. Hayvan dokularında yaygın olarak CuZn-SOD formu bulunmaktadır.

Dokulardaki lipid oranının birçok balık türünde çok yüksek miktarlara ulaşabileceği, bu nedenle balıklarda SOR'nin moleküler mekanizmasının önemli olduğu bildirilmiştir (8).

Bu araştırmada, *Mus musculus* ve *Oreochromis niloticus'da* karaciğerde antioksidant sistemler toksikolojik çalışmalar için temel verileri sağlamak

üzere, karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Araştırma materyali olarak kullanılan 30-40 g ağırlığındaki 4 aylık, 38 erkek *M. musculus* Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezinden alınmıştır. Denekler 22-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlatma periyodunda tutularak standart laboratuvar yemi ile beslenmişlerdir. Diğer araştırma materyali olan 30 erkek *O. niloticus* 13 aylıkken Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri yetiştirme havuzlarından alınarak bir ay süre ile 160x40x40 cm boyutlarındaki stok akvaryumlarda laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Balıklar bu süre içerisinde yaklaşık 10-18 cm boy ve 100-150 g ağırlığa ulaşmışlardır. Akvaryum koşullarında ortalama sıcaklık 20-22°C, pH 7.5, alkalinite 340 ppm CaCO₃, çözülmüş oksijen 7.2±0.5 ppm olarak sağlanmıştır. Oniki saat aydınlatma periyodu uygulanmış ve balıklar günde iki kez ticari balık yemi ile beslenmişlerdir.

Dokuların histopatolojik incelenmesi için doku kesitleri %10'luk formaldehidde (Merck) fikse edilmiş ve rutin işlemlerden sonra 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri Harris hematoksilen-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (9). Bu çalışmada araştırma materyali olarak kullanılan her iki türe ait tüm karaciğer örnekleri histopatolojik olarak normal bulunmuştur.

Karaciğer doku örnekleri alınıp alınmaz soğuk %1.15 KCI (Merck) ile 1:5 oranında (w/v) homojenizatörde (Heidolph 50110 R2R0) 15-20 dakika homojenize edilerek 14000 g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra (Sorvall RC 2B) süpernatanda enzim aktiviteleri ve GSH miktarları belirlenmiştir.

GSH miktarı Beutler yöntemiyle saptanmıştır (10). Reaksiyon karışımı, 10 ml'lik total volümde 2.0 ml filtrat, 8 ml fosfat tampon ve 1.0 ml DTNB (5,5'dithiobis 2-nitrobenzoic acid)'den oluşmaktadır. Kör 1.2 ml presipite edici solusyon, 0.8 ml distile

su, 8 ml fosfat tampon ve 1 ml DTNB'den hazırlanmaktadır. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda DTNB öncesi ve DTNB sonrası absorbanslar okunarak değerler standart eğriden değerlendirilmiştir.

G6PDH aktivitesi Beutler yöntemiyle saptanmıştır (10). Reaksiyon karışımı 3 ml'lik total volümde 0.3 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.3 ml 6mM G6P, 0.3 ml 2mM NADP, 0.3 ml 0.1M MgCl₂, 1.79 ml saf su ve 10µl enzim içeren süpernatandan oluşmaktadır. Tepkime 37 C de enzim tarafından indirgenen 1µmol NADP' nin 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

GR aktivitesi Staal yöntemiyle saptanmıştır (11). Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 900 µL 100 mM fosfat tampon pH 6.8 içinde 1mM NADPH ve 1mM GSSG'den oluşan substrat ve 100µl enzim içeren süpernatandan oluşmuştur. Tepkime 37C'de enzimin NADPH varlığında GSSG'yi redüklerken oluşan NADP'nin 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde 5 dakika süreyle her 2.5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

SOD aktivitesi Fridovich yöntemiyle saptanmıştır (12). SOD aktivite tayini için, süpernatant 1:65 oranında 0.01 M fosfat tampon pH 7.0 ile dilue

edilmiştir. Hazırlanan dilüsyonda SOD aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 1ml' lik total volümde 25µl enzim içeren süpernatant, 850µl ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren mix substrat ve 125µl ksantin oksidazdan oluşur. Kör, örnek gibi hazırlanmış, fakat örnek yerine fosfat tamponu kullanılmıştır. Örneğin 505 nm dalga boyunda 37°C'de ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde havaya karşı sıfır ve üç dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aritmetik ortalama (X) ve standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İstatiksel analiz için Student t testi kullanılmıştır.

BULGULAR

M. musculus ve O. niloticus'da antioksidan sistemlerde türler arasında p<0.01 ve p<0.05 önem derecesinde fark saptanmıştır (Tablo I). G6PDH aktivitesi M. musculus'ta O. niloticus'dan daha az, GR ve SOD aktivitesi ile GSH miktarının ise M. musculus'ta O. niloticus'dan daha az , GR ve SOD aktivitesi ile GSH miktarı ise daha fazla bulunduğu saptanmıştır.

M. musculus'ta en yüksek enzim aktivitesi SOD iken G6PDH ve GR enzim aktiviteleri birbirlerine yakın bulunmuştur. O. niloticus'da en yüksek enzim aktivitesi sırasıyla SOD, G6PDH, GR'dir. Aynı türe ait bireyler arasında en büyük farklılık SOD enzim aktivitesinde görülmüştür.

Tablo I. *M. musculus* ve *T. nilotica* 'da karaciğer dokusunda antioksidant sistemlerin karşılaştırılması

Antioksidant sistem	M. musculus n: 38		T. nilotica n: 30	
	n	X±SD (Sınır)	X±SD (Sınır)	
*G6PDH (U/g karaciğer)	30	2.38±1.09 (0.38-4.54)	21.88±6.95 (10.69-37.04)	
*GR (U/g karaciğer)	30	2.47±1.31 (0.38-4.96)	1.01±0.26 (0.44-1.36)	
**SOD (U/g karaciğer)	30	553.71±214.26 (205-912)	388.10±459.40 (20-2124)	
*GSH (µmol/g karaciğer)	30	0.946±0.228 (0.66-1.21)	0.123±0.035 (0.055-0.178)	

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *M. musculus* ve *T. nilotica*'da karaciğerde G6PDH, SOD, GR enzimleri ve GSH miktarının bir karşılaştırması sunulmuştur. Sonuçlar tür içinde ve türler arasında önemli derecede farklılık ($p<0.01$ ve $p<0.05$) göstermiştir. Tür içindeki en büyük farklılık SOD enziminde görülmektedir. İncelenen 30 *O. niloticus* içinde dokuzunun uç değerlerde olduğu vd standart sapmanın ortalamasının üstünde olduğu saptanmıştır.

Uç değerler çıkarıldığında 333 ± 236 Ü/g karaciğer bulunmuştur. Uç değerler *O. niloticus* bireylerinin aynı koşullardaki yaşam koşullarına farklı cevap verdiklerini işaret etmektedir. Bu nedenle *O. niloticus*'da SOD için normal sınırları saptamak için daha çok örnek çalışması gerekmektedir.

Antioksidan sistemler tür, organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenmektedirler (13). Karasal hayvanların karaciğer dokusundaki SOD aktivitesinin balıklardan ve diğer farklı oksijen konsantrasyonlarında bulunan hayvanlardan daha fazla olduğu ve bu durumun farklı oksijen konsantrasyonlarındaki canlı dokularında farklı miktarda süperoksit radikali üretimi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (14). Farklı balık türlerinde SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, türler arasında görülen farklılıkların fizyolojik veya sudaki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki farklılıklardan ileri gelebileceği rapor edilmiştir (15). Radi ve ark. , GPx ve SOD aktivitelerinin herbivor balıklarda, CAT aktivitesinin omnivor balıklarda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır(8). *Rattus norvegicus*'ta SOD aktivitesinin en fazla karaciğerde, en az ince bağırsakta (14), *M. Musculus*'ta GSH miktarının en fazla karaciğerde, en az kalpte olduğu bildirilmiştir (4). Mavelli ve ark. , GPx/CuZn SOD oranının sıçan beyin hücrelerinde karaciğer hücrelerinin aksine yaşa bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir(16).

Farklı türlere ait antioksidan sistemlerde görülen bu varyasyonların organizmaların farklı yaşam

koşullarına adaptasyonları ile ilgili olabileceği ve bu konudaki bilgilerin insan sağlığı ve biyolojinin diğer dallarında yararlı olabileceği ileri düşünülmektedir (17). Sonuç olarak, bu çalışmada *M. musculus* ve *O. niloticus*'da tür içi ve türler arasında antioksidant sistemlerde belirlenen farklılıkların oksidatif hasarla ilgili olarak yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Manno M, Bertazon A, Burlina A, et al. Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. *Enzyme* 1985; 34: 107-112.
2. Liang HCL, Shertzer HG, Nebert DW. "Oxidative stress" response in liver of an untreated newborn mouse having a 1.2-centimorgan deletion on chromosome 7. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 1160-1164.
3. Rzymowska J. Enzyme activities in human breast tumors. *Acta Biochim Pol* 1992; 39: 289-294.
4. Hazleton GA, Lang CA. Glutathione peroxidase and reductase activities in the aging mouse. *Mech Ageing Develop* 1985; 29: 71-81.
5. Lopez-Barea J, Lee C. Mouse liver glutathione reductase. *Eur J Biochem* 1979; 98: 487-499.
6. Stohs SJ, Lawson T, Al-Turk WA. Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in erythrocytes and lymphocytes of mice as a function of age. *Gen Pharmacol* 1984; 15: 267-270.
7. Ji LL, Katz A, Fu R, et al. Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. *J Appl Physiol* 1993; 74: 788-792.
8. Radi AAR, Hai DQ, Matkovics B, et al. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81: 395-399.
9. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone,

Edinburg, 1977, p. 1-15

10. Beutler E. *Red Cell Metabolism (2nd ed)* Grune and Stratton, New York, 1975, pp 261-265.
11. Staal GE, Visser J, Weeger C. Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1969; 185: 39-48.
12. Fridowich I. *Superoxide dismutase. Advances in Enzymology* 1974; 41:35-97.
13. Prohaska JR, Sunde RA. Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105: 111-116.
14. Etiobhio BOI, Oraedu ACI, Ugochukwu EN. A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp Biochem Physiol* 1990; 95: 521-523
15. Wdzieczak J, Zalesna G, Wujec E, Pérs, Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp Biochem Physiol* 1982; 2: 361-365.
16. Mavelli I, Rigo A, Federico R, et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochem J* 1982; 204: 535-540.
17. Shimizu Y, Kawarada S, Suzuki M, et al. Interstrain differences in red cell enzyme activities in mice and rats. *Comp Biochem Physiol* 1991; 100: 687-690.