

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI
GASTROENTEROLOĞİ BİLİM DALI

129799

EKSTRAHEPATİK KOLESTAZDA OKSİDATİF STRES

T.C. KÜLTÜR VE TURİZM BAKANLIĞI
DOKÜMAN İZLENİM VE DEĞERLENDİRME BÜROSU

YANDAL UZMANLIK TEZİ

129799

Cemal Nuri ERÇİN
J.Tbp.Bnb.

ANKARA-2003

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanlığının Ekim 2002 tarihli sözlü emriyle verilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır.

Safra kesesi taşları ve buna bağlı komplikasyonlardan biri olan ekstrahepatik kolestaz günümüzde sık karşılaşılan sorunlardandır. Ekstrahepatik kolestazda oluşan karaciğer hasarından sorumlu mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada; safra kesesi taşlarına bağlı oluşan ekstrahepatik kolestaz ile gelen hastalarda oluşan karaciğer hasarında oksidatif stresin rolünü malondialdehid ve antioksidan enzim düzeylerini tespit ederek ortaya koymayı amaçladık.

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Tbp. Tuğg. Kemal DAĞALP olmak üzere, Prof. Tbp. Kd. Alb. Necmettin KARAEREN, Doç. Tbp. Kd. Alb. Mustafa GÜLŞEN, Doç. Tbp. Alb. Ahmet ERDİL, Doç. Tbp. Yb. Ahmet UYGUN, Yrd. Doç. Tbp. Yb. Ahmet TÜZÜN, Yrd. Doç. Hv. Tbp. Yb. Yüksel ATEŞ, Yrd. Doç. J. Tbp. Bnb. Zeki YEŞİLOVA, Uzm. Tbp. Kd. Bnb. Murat CİĞERİM, Uzm. Tbp. Bnb. Hakkı ERGÜN, Uzm. Tbp. Bnb. Murat ASLAN, Uzm. Tbp. Bnb. Zülfikar POLAT ve tüm klinik personeline,

Çalışmamın her safhasında yardım ve desteğini gördüğüm tez hocam Doç. Tbp. Kd. Alb. Sait BAĞCI ve bana iyi bir çalışma ortamı hazırlayan Prof. Dr. Ecz. Alb. Ahmet SAYAL, Doç. Dr. Ecz. Yb. Ahmet AYDIN, Uzm. Biyolog Ayşe EKEN ve Uzm. Hv. Tbp. Kd. Yzb. İlker YILMAZ'a,

Her zaman yanımda olan ve bana güç veren eşim Uzm. Dr. Okşan ERÇİN ve kızım Cansu Eda ERÇİN'e teşekkür ederim.

Dr. Cemal Nuri ERÇİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I- GİRİŞ	1
II- GENEL BİLGİLER	3
A. Malondialdehid	6
B. Antioksidan Enzimler	7
a. Glutasyon Peroksidaz	8
b. Süperoksid Dismutaz	10
III- GEREÇ VE YÖNTEM	13
IV- BULGULAR	17
V- TARTIŞMA VE SONUÇ	22
VI- ÖZET	26
VII- İNGİLİZCE ÖZET	27
VIII- KAYNAKLAR	28

GİRİŞ

Kolestaz sonucu histolojik düzeyde karaciğerde bazı değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişikliklerden sorumlu mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir.

Kolestaz oluşuktan sonra; safra kanaliküllerinde dilatasyon, mikrovillus kaybı, hücrelerarası bileşkede değişiklikler olur. Bunun sonucu olarak kanaliküler geçirgenlik artar ve hepatositlerde plazma membran polaritesinin değişir ve safra içeriğinin hepatic lenflere ve kana regürjitasyonu oluşur (37). Bu yapısal değişiklikler yanında, biliyer epitel bölgesini infiltre eden lenfosit ve makrofajların etkisi ile sitokin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınımı olur. Kolanjiositler de bu durumdan bağımsız olarak tümör nekroz faktör-alfa (TNF-alfa) ve interlökin 6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinleri salabilirler (1, 42).

Deneysel çalışmalarda dolaşımdaki bu sitokinlerin reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) yapımını arttırdığı ortaya konulmuştur. TNF-alfa'nın süperoksid, hidrojen peroksid ve hidroksil radikallerinin yapımını arttırmak suretiyle oksidatif stres oluşturduğu bildirilmektedir (13, 34, 53). Bunların yanında nitrik oksit proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile normalden fazla oluşur ve beraberinde peroksinitrit gibi reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna neden olur. Oksidatif stres ile mitokondriyal respirasyon bozulur, lipid peroksidasyonu hücre membranları hasarlanır, DNA sentezi ve onarıcı enzimler inhibe olur (51). Tüm bu değişiklikler hepatosellüler hasarın oluşumuna neden olmaktadır (10, 398, 41). Kolestazda, serbest radikallerin oluşumu ile tetiklenen membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu ve hücre antioksidan sisteminin temel faktörü olan glutatyon sisteminin fonksiyonunun bozulması ile bir dengesizlik oluşmaktadır (10, 26, 39). Diğer yandan, oksidatif stres antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirerek, süperoksid ve hidrojen peroksid yapımını da artırarak doku hasarının fazlalaşmasına neden olmaktadır (47).

Kolestaza bağlı hasarın temel mekanizmasının lipid peroksidasyonu olduğu bildirilmiştir (45, 49). Kolestaz esnasında polimorfonükleer lökositlerin portal alanda birikmesi, A ve E vitamini gibi yağda eriyen vitaminlerin eksikliği ve artan oksidatif stresin sekonder doku hasarını arttırdığı bildirilmiştir (4, 31, 46, 48). Lipid

peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyleri koledokları bağlanmış ratlarda yapılan çalışmalarda karaciğer dokusu, plazma ve eritrositte yüksek olarak tespit edilmiştir (24, 29, 32, 39).

Bu durumda, endojen antioksidan sistemin kolestaz altındaki karaciğerin daha fazla hasar görmemesi için etkili olması gereklidir (27).

Yapılan çalışmalarda biliyer obstrüksiyonu olan ratlarda antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve bunun temel nedeninin oksijen radikallerinin reaksiyon ürünlerinin, enzim sistemini inhibe etmesi olduğu ve E vitamini ve selenyum düzeylerinin düşüklüğünün de oksidatif strese katkıda bulunabilecekleri bildirilmektedir (5, 14, 16, 39).

Yapılan hayvan çalışmalarında glutatyon peroksidaz (GSH-Px) açısından değişik sonuçlar tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar hepatik enzim düzeylerini düşük olarak tespit ederken (2, 29, 33, 39), eritrosit düzeyleri açısından koledoku bağlanmış ratlarla, kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır (2, 29).

Süperoksid dismutaz (SOD) düzeylerini değerlendiren hayvan çalışmalarında karaciğer SOD düzeyi bir çalışmada düşük olarak bulunurken (33), başka bir çalışmada kontrol grubu ile anlamlı bir fark bulunamamıştır (2). Eritrosit SOD değerleri açısından ise bir çalışmada koledokları bağlanmış ratlar ile kontrol grubu arasında fark bulunamamıştır (29).

Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi ekstrahepatik kolestaz durumunda oluşan karaciğer hasarından sorumlu mekanizmalardan biri de oksidatif strestir. Biz de çalışmamızda oksidatif stres varlığını MDA, buna vücudun cevabını da antioksidan enzim düzeylerini tespit ederek incelemeye çalıştık.

GENEL BİLGİLER

Kolestaz, duodenuma safra akımının azalması veya yokluğu olarak tanımlanabilmektedir. Normal kanaliküler safra akımı; kanaliküllere plazma veya hepatositlerden aktif olarak salınan solütlere cevap olarak su ve elektrolitlerin ozmotik akımıdır. Sonuçta oluşan konsantrasyon gradienti, safra asitlerine bağlı (salınan safra asitlerine bağlı) ve safra asitlerinden bağımsız (diğer solütlerin özellikle glutatyon ve glutatyon konjugelerinin salımına bağlı) komponentleri içerir (37).

Safra asitlerinin hepatositlerden salınımı; safra asitlerinin alımı, hücre içi transport ve kanaliküler sekresyon safhalarını içerir. Bilirubinler taşıyıcılarla hepatosit içine alınıp, UDP-glukronil transferaz enzimi yardımı ile glukronik asit ile endoplazmik retikulumda konjuge edildikten sonra kanaliküler lümene salınır. Bunun yanında safra yolları epitel hücreleri (kolanjiosit) de sekretinin stimülasyonu ile bikarbonattan zengin sıvı sekrete ederler (37).

Kolestaz 2 şekilde ortaya çıkabilmektedir:

1. İntrahepatik kolestaz
 - a. İntrahepatik safra yollarının obstrüksiyonu
 - b. Hepatositlerin safra sekrete edememesi
2. Ekstrahepatik kolestaz

Ekstrahepatik kolestaz nedenleri arasında; safra yolunun taş, kan veya striktür ile tıkanması veya dıştan bası ile akımın engellenmesi sayılabilir. Porta hepatisi tutan lenfatik tümörler, pankreas tümörleri ve pankreatit olguları dıştan bası yaparak kolestaza neden olabilirler (52).

Ekstrahepatik kolestazda safra kanaliküllerinde dilatasyon ve sonuçta mikrovillus kaybı, hücrelerarası bileşkede değişiklikler oluşur. Sonuçta kanaliküler geçirgenlik artar ve safra içeriğinin hepatik lenflere ve kana regürjitasyonu oluşur. Kanaliküllerin yanında hepatositlerde de bazı değişiklikler olur. Plazma membran polaritesi, değişik enzim ve taşıyıcıların kanaliküler kutuptan sinüzoidal kutuba geçmesiyle modifiye olur ve normalde kanaliküllere salınan maddelerin tekrar kana verilmesine neden olur. Ayrıca safra asitlerinin hepatositler tarafından alımını sağlayan taşıyıcıların down regülasyonu sonucu, hem kolestazın bir sonucu olan

safranın içeriğinin kanda birikimi sağlanmış olur, hem de potansiyel olarak toksik olan safranın asitlerinin hepatositlerde birikimi önlenmiş olur. Aynı zamanda hepatositlerden alkalen fosfataz ve kolesterol yapımı artar. Kolestazın biyokimyasal tablosundaki kolesterol ve alkalen fosfataz artışı bu nedenle olur. Kolestaz uzun sürerse safranın yollarında duktular proliferasyon, fibrozis ve sonuçta sekonder biliyer siroz oluşabilir (37).

Biliyer obstrüksiyon akut hepatosellüler hasara neden olur ve uzun sürerse progresif fibrozeze yol açabilir. Hasarın mekanizması tam olarak ortaya konamasa da, yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin rol aldığı düşünülmektedir (10, 39, 41). Bu durumda endojen antioksidan sistemin kolestaz altındaki karaciğerin daha fazla hasar görmemesi için etkili olması gereklidir (27). Yapılan hayvan çalışmalarında safranın yollarının bağlanmasıyla 7 gün sonra hepatik mikrozomal oksidatif ilaç metabolizmasının azaldığı ortaya konmuştur (12).

Karaciğer reaktif oksijen metabolitlerine (ROM), kolestaz veya hepatit gibi değişik karaciğer hastalıkları süresince maruz kalır. ROM karaciğerde mitokondrial elektron transport sistemi, mikrozomal sitokrom P450 sistemi, hepatositlerin sitozolik ksantin-ksantin oksidaz sistemi yoluyla ve stimüle edilmiş polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, endotel hücreleri ve Kupffer hücrelerinden oluşmaktadır (6, 17, 23, 40). Oksidatif strese karşı karaciğerde iyi bir antioksidan sistem mevcuttur. Bu mekanizmalar içinde; mikronutrientler (vitamin E ve C), tiolden zengin proteinler, ferritin gibi metal sekestre eden proteinler, enzimler (reaktif metabolitleri metabolize eden epoksit hidrolaz, ROM'ları metabolize eden katalaz ve süperoksid dismutaz (SOD), lipid peroksidlerini metabolize eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sayılabilir. İnsan karaciğerindeki en önemli antioksidan ise glutatyon sistemidir (40). Glutatyon seviyelerinin yüksek olmasının oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir (25).

Safranın yollarında hasara yol açan toksik, immun, enfeksiyöz, neoplastik hastalıklar yanında, kolestazda karaciğerde hedef hücrelerden biri de kolanjiositlerdir. Kolanjiositlerin etkilenmesi sonucu; biliyer epitel bölgesini infiltrate eden lenfosit ve makrofajların etkisi ile sitokin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınımı olur. Kolanjiositler de bu durumdan bağımsız olarak TNF-alfa ve IL-6 gibi

proinflamatuvar sitokinleri salabilirler. Bu sitokinler safra ve bikarbonat sekresyonunu inhibe ederler (1, 42). Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanan ratlarda serum TNF-alfa, IL-1beta ve interferon-gama (IFN-gama) değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (18). Deneysel çalışmalarda, dolaşımdaki bu sitokinlerin ROM yapımını arttırdığı bildirilmektedir. Örneğin, TNF-alfa'nın süperoksid, hidrojen peroksid ve hidrosil radikallerinin yapımını arttırmak suretiyle oksidatif stres oluşturduğu bildirilmiştir (13, 34, 47, 53). Bunların yanında L-argininden Nitrik Oksit sentetaz enzimi ile oluşan nitrik oksit proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile normalden fazla oluşur ve beraberinde peroksinitrit gibi ROM oluşumuna neden olur. Sonuçta oksidatif stres ile mitokondriyal respirasyon bozulur, lipid peroksidasyonu hücre membranları hasarlanır, DNA sentezi ve onarıcı enzimler inhibe olur (51).

Değişik karaciğer hastalıklarında olduğu gibi kolestazda da hücrel oksidatif durumda bir dengesizlik söz konusudur. Bu dengesizlik iki şekilde ortaya çıkar. Birincisi, serbest radikallerin oluşumu ile tetiklenen membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, ikincisi ise hücrel antioksidan sistemin temel faktörü olan glutatyon sisteminin fonksiyonunun bozulmasıdır (10, 26, 39).

Primer sklerozan kolanjitli fare modellerinde yapılan çalışmalarda, nitrik oksit sentaz inhibitörleri, ROM skavengerleri ve antioksidanlarla yapılan tedavilerin yararlı olabileceği ortaya konmuştur (7).

Tıkanma sarılığı olan hastalarda yapılan çalışmalarda, doku hasarından oluşan lipid peroksidasyonunun sorumlu olduğu bildirilmiştir (45, 49). Kolestaz esnasında polimorfonükleer lökositlerin portal alanda birikmesi ve hepatik bakır miktarının artmasının lipid peroksidasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (4, 31). Ayrıca koledoku bağlanarak ekstrahepatik kolestaz oluşturulan hayvanlarda yapılan çalışmalarda, A ve E vitamini gibi yağda eriyen vitaminlerin eksikliğini de lipid peroksidasyonuna bağlı sekonder doku hasarının engellenmesini önlediği ve artan oksidatif stresin sekonder doku hasarını arttırdığı bildirilmiştir (45, 46).

A. MALONDİALDEHİD

Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi son ürün olan malondialdehid (MDA) seviyeleridir. MDA hepatik stellat hücrelerini aktive ederek kollajen yapımını ve fibrojenizi artırır. Ayrıca TNF-alfa ve interlökin-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını regüle eden nükleer faktör kapa beta'yı (NF- κ) aktive ederek inflamasyona katkıda bulunur (15).

Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratlarda, eritrosit ve karaciğer MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu bildirilmiştir (24). Yapılan başka bir çalışmada koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların karaciğer MDA seviyeleri, bağlanmadan 7 gün sonra, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (29). Ratlarla yapılan başka çalışmalarda koledok bağlanmasından 14-21 gün sonra plazma ve karaciğer MDA seviyelerinin (2), 28 gün sonra plazma MDA seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (39). Vendemiale ve ark, 12 kolestazlı hastada yaptıkları çalışmada karaciğer MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve kolestaz tablosunun düzelmesinden sonra tamamen normale döndüğünü bildirmişlerdir (50).

Ljubuncic ve ark, koledoğu bağlanmış ratlara ursodeoksikolik asit (UDCA) vererek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir (19).

Lubrano ve ark, kolestazlı 10 çocuk üzerinde yaptıkları bir çalışmada hastalara E vitamini verilerek, eritrosit ve plazma MDA seviyelerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir (21).

Parola ve ark, ratlarda yaptıkları bir çalışmada lipid peroksidasyonunun koledok bağlanmasından sonraki 1-2 haftalık dönemde başladığını ve bunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ile nötrofil ve monosit/makrofaj infiltrasyonu arasında pozitif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir (32).

B. ANTİOKSİDAN ENZİMLER

Enzimler organik katalizörlerdir. Enzimler substratlarına bağlanır ve oluşturdukları bu kompleks enzim ve bir ürüne parçalanır. Bazı enzimler kimyasal reaksiyonları katalize etmek için kofaktör denen ikinci bir bileşiğe ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktör inorganik veya organik olabilir. İnorganik kofaktörler arasında Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , K^+ , Na^+ sayılabilir. Organik kofaktörlere koenzim denir. Bazı enzimlerin katalitik fonksiyonları için koenzimle beraber metal iyonu da gerekebilir. Metal iyonlarına gereksinim duyan enzimlere metalloenzimler denir. Metal iyonlarına kofaktör olarak gereksinim duyan veya onları içeren enzimler arasında alkol dehidrogenaz (Zn^{+2}), karboksipeptidaz (Zn^{+2}), fosfotransferaz (Mn^{+2}), sitokrom oksidaz (Fe^{+2} ve Fe^{+3}), süperoksit dismutaz (Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3}) ve glutatyon peroksidaz (Se^{+6}) sayılabilir (36).

En dış halkasında çiftlenmemiş elektron bulunan ve bu nedenle çok reaktif olan serbest radikaller anyon, katyon veya nötral durumda bulunabilirler. Diğer moleküllerle hızla kimyasal reaksiyona girme ve onların yapısını değiştirme yeteneğine sahiptirler (8, 36).

Oksijen bir elektron alarak indirgenir ve ilk radikal olan süperoksit oluşur. Süperoksit anyon radikalleri hücre zarına ve DNA'ya zarar verebilir veya değişik enzimleri inaktive edebilirler. Bir elektron daha alarak hidrojen peroksid oluşur. Hidrojen peroksid aslında serbest radikal değildir, fakat bir elektron alarak hidroksil radikal ve hidroksil anyonuna dönüşebilir. Hidroksil radikali güçlü bir kimyasal aktiviteye sahiptir (54).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkisine maruz kalan organizmalarda oldukça kompleks bir savunma sistemi geliştirilmiştir. Bu savunma sistemi; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, indirgenmiş glutatyon, glutatyon redüktaz ve vitaminleri kapsar.

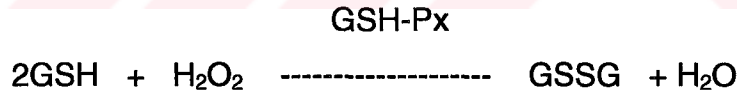
Yapılan çalışmalarda biliyer obstrüksiyonu olan ratlarda, karaciğerde antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu konuda suçlanan temel faktör, oksijen radikallerinin reaksiyon ürünlerinin enzim sistemini inhibe etmesidir. Örneğin; SOD hidrojen peroksid ile, katalaz ve GSH-Px süperoksit ile inhibe edilir. Ayrıca bu ratlarda E vitamini ve selenyum düzeylerinin düşük olduğu,

E vitamini eksikliğinin lipid peroksidasyonunu arttırarak, selenyum eksikliğinin ise GSH-Px aktivitesini azaltarak oksidatif strese katkıda bulunabilecekleri bildirilmektedir (5, 14, 16, 39).

a- GLUTATYON PEROKSİDAZ

Serbest oksijen radikallerine karşı savunma görevi yapan bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tetramer yapısındadır ve dört tane selenyum taşıır. Bu enzim temel olarak hidrojen peroksidi suya indirger, hemoglobinin, membran proteinlerinin ve enzimlerinin sülfidril gruplarını redükleyerek eritrosit bütünlüğünü sağlar ve ayrıca prostaglandin ve lökotrien sentez ve katabolizmasında rol alır. Organik hidroperoksitlere etkisi yoktur (9, 36).

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksidi suya indirgerken indirgeyici güç olarak indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanır. Glutatyon antioksidan savunma için çok önemlidir. Glutatyon, antioksidan glutatyonla bağlı enzimlere substrat olması yanında, serbest radikallerin temizlenmesinde, α -tokoferol oluşumunda ve protein sülfidril gruplarının devamında etkilidir. Yapılan çalışmalarda glutatyon konsantrasyonlarının azalmasının lipid peroksidasyonunda artmaya neden olduğu gösterilmiştir (35, 36).

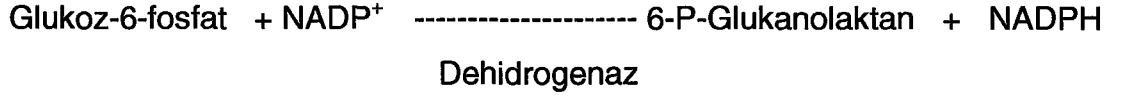


Reaksiyona giren glutatyonlar okside olurlar (GSSG). Reaksiyonun devamı için okside glutatyonlar tekrar indirgenmiş hale getirilmelidir. Burada glutatyon redüktazın (GSSG-R) katalizlediği ve nikotinamid adenzin dinükleotid fosfatın (NADPH) kullanıldığı bir reaksiyon oluşur. Bu reaksiyonda kullanılan NADPH' ın tekrar sentezi için ise glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-P Dehidrogenaz) enzimine gerek vardır.

GSSG-R



G - 6 - P



Selenyuma bağlı glutasyon peroksidaz karaciğerde yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta ve kasta düşük aktivitede bulunur. Enzim serum, plazma, eritrosit, trombosit, plasenta ve diğer dokularda bulunur. Selenyum alımı enzimin dağılımını ve aktivitesini değiştirmektedir. Selenyum eksikliğinde GSH-Px aktivitesi karaciğer ve plazmada fazla, böbrekler ve eritrositlerde orta derecede azalma gösterir (9, 36).

Eritrosit GSH-Px ile selenyum arasında önemli bir ilişki mevcuttur. Selenyum GSH-Px içine sadece eritropoezis ve hücre maturasyonu sırasında girdiğinden önemli değişiklikler ancak uzun bir zaman sürecinden sonra saptanır. Bu gecikme dolaşımdaki eritrositlerin yaşam süresi ile yakından ilişkilidir. Selenyuma bağlı olan ve olmayan GSH-Px aktivitesi dokular arasında farklılık gösterir. İnsan karaciğerinde total GSH-Px aktivitesinin % 42' sini selenyuma bağlı olmayan GSH-Px enzimi oluşturur. Bu durum vitamin E düzeyi yeterli, selenyum ve GSH-Px düzeyi düşük olan hastalarda belirgin semptomların olmamasını ağıklayabilir (36, 43).

Yapılan ęalıřmalar eritrosit GSH-Px aktivitesinin kadınlarda erkeklere göre hafif ama anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir. Plazma ve eritrosit GSH-Px aktivitesinin yaşla azaldığı da bilinmektedir (11).

Togashi ve ark, insanlarda yaptığı bir ęalıřmada, akut ve kronik hepatitli hastalarda karaciğer SOD ve GSH-Px düzeylerini incelemişlerdir. Akut hepatit grubunda CuZn SOD seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. GSH-Px ağısında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (44).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların karaciğer GSH-Px seviyeleri bağlanmadan 7 gün sonra, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada eritrosit GSH-Px seviyeleri açısından iki grup arasında farklılık bulunmamıştır (29). Alptekin ve ark, ratlarda yaptığı benzer bir çalışmada koledok bağlanmasından 14-21 gün sonra eritrosit glutasyon seviyeleri açısından kontrol grubu ile hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulamamıştır. Aynı çalışmada hepatic GSH-Px aktivitesi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (2).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, S-adenosyl-L-metionin ile glutasyon düzeylerinin artmasının hepatositlerde GSH-Px düzeyini artırarak oksidatif strese karşı koymada yararlı olabileceği öne sürülmüştür (10).

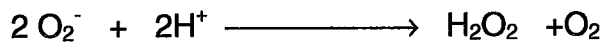
Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların 28 gün sonra karaciğerlerinde Se-GSH-Px ve selenyuma bağlı olmayan GSH-Px düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu ve N-asetil sistein verilerek enzim düzeyinin artırıldığı bildirilmiştir (33).

Singh ve ark, yaptıkları çalışmada koledoku bağlanmış ratlarda plazma ve karaciğerde E vitamini düzeylerinin düşüklüğü yanında, karaciğerde GSH-Px, glutasyon redüktaz ve katalaz aktivitesinin de azalmış olduğunu bildirmişlerdir (39).

b- SÜPEROKSİD DİSMUTAZ

Süperoksid dismutaz enzimi, süperoksid anyon radikallerinin hidrojen peroksid ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek hücreler için oksijen toksisitesine karşı önemli bir korunma sağlar. SOD enzimi değişik organ ve dokularda farklı konsantrasyonlarda bulunur. Karaciğer dokusu enzimin en çok bulunduğu organ olarak bilinmektedir (3, 54). Dört alt grubu vardır.

a. *Bakır Çinko içeren Süperoksid Dismutaz (CuZn SOD)*: Bu enzim süperoksid detoksifikasyonu için anahtar bir enzimdir. $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ dönüşümünü sağlar. Bu reaksiyonda O_2^- yıkılır, ama güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oluşur. Oluşan bu H_2O_2 daha sonra katalaz enzimi ile detoksifiye edilir (3).



CuZn SOD enzimi içinde katalitik olarak aktif olan metal bakırdır. Çinkonun ise sadece enzimi stabilize ettiği bilinmektedir. Enzimin iki tipi tanımlanmaktadır. Genelde bulunan SOD-1 enzimidir (3).

CuZn SOD enziminin çoğunluğu hücre sitozolündedir, ama aynı zamanda lizozomlarda, mitokondrinin iç ve dış membranları arasında ve nükleusta da bulunmaktadır (3).

CuZn SOD karaciğerde daha çok sentrilobüler alandaki hepatositlerde yoğunlaşmaktadır. Enzimin karaciğer lobüllerinde diffüz ve lokal olarak iki farklı dağılımı söz konusudur. Fokal dağılımın şiddetli parenkimal lezyonu ile beraber olan karaciğer hastalıklarında olduğu tespit edilmiştir (54).

b. *Mangan içeren Süperoksid Dismutaz (Mn SOD)*: İlk kez E. coli' den izole edilen bu enzim bazı bakterilerde ve bitki ve hayvan dokusu ekstraktlarında da bulunmaktadır. Bakır alımı kısıtlanan durumlarda Mn SOD sentezi artmakta, tam tersi mangan alımı kısıtlanan durumlarda da CuZn SOD aktivitesi artmaktadır (30). Enzimin dört alt protein ünitesi vardır ve her ünite 0.5 veya 1 mangan içerir. Enzimden mangan çıkarılırsa aktivite kaybolur.

Mn SOD enzimi başlıca mitokondri matriksinde yerleşmiştir, bununla birlikte mitokondri dışında da bulunmaktadır (3).

Mn SOD enziminin aktivitesi alkolik karaciğer hastalarında alkole bağlı oksidan strese cevap olarak artar. Bunun yanında alkolik karaciğer hastalarında oksidan stres esnasında salınan bir sitokin olan TNF-alfa'da enzim aktivitesinde artışa neden olur. TNF-alfa oksidatif stresi; süperoksid, hidrojen peroksid ve hidrosil radikallerini arttırarak yapar.

c. *Demir içeren Süperoksid Dismutaz (Fe SOD)*: E. coli bakterisinden elde edilmiştir. Enzim hücre matriksinde bulunmaktadır. İki protein alt ünitesi içerir ve her alt ünite bir veya iki demir iyonu vardır. Enzim normal halde iken Fe iyonu +3 değerliklidir (3).

d. *Ekstrasellüler Süperoksid Dismutaz (EC SOD)*: Ekstrasellüler sıvının temel SOD enzimidir. Dokular arasında enzimin miktarı farklılıklar gösterir. Fizyolojik rolü henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, ekstrasellüler alanda koruyuculuk yaptığı düşünülmektedir. EC SOD glukoprotein yapısındadır ve karaciğer plazma

proteinlerinin önemli bir kaynağı olmasına rağmen bu enzim karaciğerde azdır (22).

Seto ve ark, yaptığı bir çalışmada kültür ortamında hepatosit içinde safra asitlerinin yüksek konsantrasyonda olduğu ve lipid peroksidlerinin aktive edildiği bir durumda alfa-tokoferol veya SOD'nin kültür ortamına ilavesinin aktivasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (38).

Togashi ve ark, insanlarda yaptığı bir çalışmada, kolestaz durumunda serbest oksijen radikallerinin katılımı ile oksidatif stresin etkili olduğunu ve karaciğerde ZnSOD, CuSOD ve katalaz aktivitelerinin düşük olduğunu bildirmiştir (44).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların eritrosit SOD seviyeleri bağlanmadan 7 gün sonra ve kontrol grubunda tespit edilmiş ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (29).

Alptekin ve ark, ratlarda yaptığı bir çalışmada koledokun bağlanmasından 14-21 gün sonra karaciğer SOD değerleri kontrol grubundan farklı bulunmamıştır (2).

Yapılan bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların 28 gün sonra karaciğerlerinde SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir (33).

31 primer biliyer sirozlu hastayı da içeren değişik karaciğer hastalarında yapılan bir çalışmada, serum Mn-SOD düzeyleri düşük olarak bulunmuş ve bu durum oksidatif stres lehine yorumlanmıştır (28).

GEREÇ VE YÖNTEM

HASTALAR

Ekim 2002 ile Haziran 2003 tarihleri arasında GATA Gastroenteroloji kliniğine safra taşına bağlı ekstrahepatik kolestaz tanısı ile başvuran ve değişen derecelerde aminotransferaz yüksekliği olan 20 hasta ile sağlıklı kontrol grubu olarak 15 birey çalışmaya alındı.

Hasta grubunda (Grup A) 17 kadın, 3 erkek vardı. Yaş ortalaması 51.65 (19-78) idi. Hastaların geliş tablolarında biyokimyasal ve radyolojik olarak kolestaz bulguları mevcuttu. Ateş ve lökositozu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi (Tablo-I). Kolestaz esnasında tüm hastalardan kan örnekleri alındı.

Hastaların tümüne ERCP işlemi yapıldı ve biyokimyasal olarak kolestaz tablosu tamamen düzeldikten sonra tekrar kan örnekleri alındı (Grup B).

Kolestaz tablosunun tamamen düzelme süresi ortalama 15.95 gündü.

Başka bir hastalığı olmayan 15 bireyden kontrol grubu olarak kan örnekleri alındı (Grup C). Bireylerin 12'si kadın, 3'ü erkekti. Yaş ortalaması 51.06 (22-84) idi.

Tablo-I: Çalışmaya alınan hastaların özellikleri

No	Yaş	Cins	ALT	AST	ALP	GGT	T.Bil	Yapılan işlem	Kolestaz düzelme süresi
1	59	K	169	111	263	126	3.8	ST	8 gün
2	47	K	229	95	225	164	1.82	ST	22 gün
3	78	K	74	81	122 1	443	4.4	ST+ taş ekstraksiyonu	10 gün
4	61	K	86	69	192	300	0.7	ST	7 gün
5	62	K	134	29	693	323	0.4	ST	30 gün
6	53	E	183	312	193	374	1.52	ST+ taş ekstraksiyonu	30 gün
7	61	K	830	656	195	302	3.21	ST	15 gün
8	76	K	137	286	659	348	2.9	ST+ taş ekstraksiyonu	16 gün
9	63	K	67	52	387	230	6.8	ST+ taş ekstraksiyonu	22 gün
10	28	K	74	31	201	123	1.71	ERCP normal	6 gün
11	48	E	601	219	140 3	914	1.8	ST+ taş ekstraksiyonu	32 gün
12	19	K	216	153	164	101	3.9	ST+ taş ekstraksiyonu	6 gün
13	22	K	64	112	141 2	356	1.2	ST	15 gün
14	64	K	61	78	751	454	18.7 6	ST	25 gün
15	27	K	112	73	443	419	4.4	ST+ taş ekstraksiyonu	14 gün
16	70	K	184	670	826	345	6.0	ST+ taş ekstraksiyonu	9 gün
17	43	E	60	46	311	45	7.8	ST	16 gün
18	25	K	267	67	337	451	0.7	ST+ taş ekstraksiyonu	7 gün
19	55	K	316	135	344	383	1.6	ST	15 gün
20	72	E	311	446	512	503	2.17	ST+ taş ekstraksiyonu	14 gün

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz,
GGT: Gama glutamil transferaz, ALP: Alkalin fosfataz,
T.Bil: Total bilirubin, ST: Sfinkterotomi

HASTALARDAN KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Çalışmamıza dahil olan hastalardan ve kontrol grubundan tripotasyum EDTA'lı (Etilendiamintetraasetik asit) tüplere 10 ml kan alındı. Alınan kan örnekleri derhal 4 °C'de 4000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı ayrıldı ve polipropilen tüplerde -25 °C'de analiz yapılincaya kadar saklandı. Geride kalan şekilli elemanlar üzerine hacminin üç katı kadar %0.9'luk NaCl solüsyonu ilave edilerek hafifçe ters yüz edildi ve 4 °C'de 6 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant atıldı. Bu işlem iki defa daha tekrar edilerek sonunda 1 ml eritrosit alınarak üzerine 4 ml soğuk distile su ilave edilip vortekslenerek (Nüve, Türkiye) lize edildi ve 4 °C'de 10 dakika tutuldu. Daha sonra 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilerek eritrosit kabuklarının ayrılması sağlandı ve polipropilen tüplerde -25 °C'de analiz yapılincaya kadar saklandı.

MALONDİALDEHİD VE ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN ÇALIŞILMASI

Malondialdehid (MDA) tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır.

Eritrosit lizat örnekleri ve plazma distile su, glasiyal asetik asit ve % 0.33'lük aköz TBA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra kaynayan su banyosu üzerinde 60 dakika süre ile ısıtıldı. Numuneler soğuduktan sonra, TBA ile reaksiyon veren maddelerin oluşturmuş olduğu kompleks n-butanol fazından geçirildikten sonra, organik fazdaki kompleksin oluşturduğu renk 532 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Standart kalibrasyon eğrisi, tetrametoksiopropan solüsyonu kullanılarak elde edildi. Eritrosit MDA değerleri nmol/ml olarak belirtildi.

Eritrosit ve plazmada GSH-Px ölçümü:

GSH-Px ölçümleri spektrofotometrik (Philips, PU 8360, İngiltere) olarak yapıldı. Başlangıçta hazırlanan eritrosit ve plazma örnekleri içinde glutatyon,

glutasyon redüktaz, NADPH, EDTA bulunan ortamla inkübe edildikten sonra tersiyer butil hidroperoksit kullanılarak reaksiyon başlatıldı ve absorbans azalması spektrofotometrede 340 nm'de takip edildi. Aynı şartlarda hazırlanan standart kalibrasyon grafiğine göre örneklerin eritrosit ve plazma GSH-Px aktiviteleri U/ml olarak hesaplandı.

Eritrositlerde CuZn SOD ölçümü:

Eritrositlerde CuZn SOD ölçümü spektrofotometrik olarak yapıldı. Substrat olarak 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorür (I.N.T.) kullanıldı. Süperoksit anyonu radikali üreticisi olarak ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanıldı. Başlangıçta hazırlanan eritrosit lizatlarından uygun miktar alındı ve hazırlanan reaksiyon karışımı ile inkübe edildi. Absorbans değişimi spektrofotometrede 505 nm'de takip edilerek ölçümler yapıldı. Standart kalibrasyon grafiğine göre örneklerdeki CuZn SOD aktiviteleri U/ml olarak verildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İlk önce çalışmaya alınan parametrelerin ortalamaları, standart sapmaları ve dağılımları belirlendi. Daha sonra gruptan sağlanan verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları test edildi. Verilerin büyük bölümünün normal dağılıma uymadıkları gözlemlendi. Bu nedenle non-parametrik testlerin uygulanması kararlaştırıldı.

Hasta grubu ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, hasta grubunun ERCP öncesi ve sonrası değerlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. Sonuçlarda $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol grubunun eritrosit MDA, plazma GSH-Px, eritrosit GSH-Px ve eritrosit CuZn SOD değerleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Ortalama eritrosit MDA değerleri ERCP ncesi hasta grubunda (A grubu) 6.07, ERCP sonrası hasta grubunda (B grubu) 3.46, kontrol grubunda (C grubu) 1.32 nmol/ml idi (Tablo III).

Ortalama plazma GSH-Px değerleri A grubunda 0.61, B grubunda 0.57, C grubunda 0.72 U/ml idi (Tablo III).

Ortalama eritrosit GSH-Px değerleri A grubunda 12.74, B grubunda 11.37, C grubunda 11.07 U/ml idi (Tablo III).

Ortalama eritrosit CuZn SOD değerleri A grubunda 333.95, B grubunda 316.70, C grubunda 233.46 U/ml idi (Tablo III).

Eritrosit MDA

Eritrosit MDA değerleri;

- A grubunda B grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.000).
- A grubunda C grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.000).
- B grubunda C grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.000). (Tablo IV)

Plazma GSH-Px

Plazma GSH-Px değerleri;

- A grubunda B grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu (p= 0.401).
- C grubunda A grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.001).
- C grubunda B grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.000). (Tablo IV)

Eritrosit GSH-Px

Eritrosit GSH-Px değerleri;

- A grubunda B grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.000).
- A grubunda C grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.023).
- B grubunda C grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu (p= 0.521). (Tablo IV)

Eritrosit CuZn SOD

Eritrosit CuZn SOD değerleri;

- A grubunda B grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu (p= 0.709).
- A grubunda C grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.002).
- B grubunda C grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksekti (p= 0.001). (Tablo IV)

Tablo-II: Hasta grubunun MDA ve antioksidan enzim düzeyleri

Grup	Eritrosit MDA (nmol/ml)	Plazma GSH-Px (U/ml)	Eritrosit GSH-Px (U/ml)	Eritrosit CuZn SOD (U/ml)
A1	11.22	0.46	11.41	444
A2	11.69	0.44	10.60	367
A3	3.33	0.48	12.16	550
A4	5.75	0.71	14.13	334
A5	9.02	0.57	13.29	359
A6	11.75	0.50	13.38	266
A7	4.85	0.62	14.15	362
A8	9.43	0.67	13.79	402
A9	3.76	0.72	14.04	309
A10	4.66	0.66	21.09	491
A11	3.90	0.59	5.01	305
A12	5.30	0.54	13.83	263
A13	4.87	0.77	14.18	231
A14	4.72	0.52	13.26	288
A15	4.89	0.61	12.75	599
A16	4.13	0.72	12.86	193
A17	3.82	0.73	9.58	155
A18	5.15	0.64	7.66	245
A19	5.73	0.67	14.15	287
A20	3.45	0.65	13.67	229
B1	6.44	0.56	11.15	381
B2	4.50	0.52	11.59	516
B3	3.29	0.51	9.82	381
B4	4.93	0.32	13.69	421
B5	3.62	0.55	8.44	244
B6	3.23	0.62	11.19	229
B7	3.60	0.67	12.47	379
B8	2.80	0.74	13.35	310
B9	3.31	0.67	12.83	286
B10	3.17	0.52	13.95	217
B11	2.27	0.57	12.56	273
B12	2.67	0.63	8.48	306
B13	3.11	0.62	8.85	197
B14	2.96	0.48	9.06	533
B15	3.11	0.67	11.70	266
B16	2.72	0.64	12.36	299
B17	3.58	0.49	11.62	267
B18	3.04	0.48	10.58	242
B19	4.83	0.72	11.57	316
B20	2.06	0.54	12.19	271

A Grubu: ERCP öncesi hasta grubu B Grubu: ERCP sonrası hasta grubu
C Grubu: Kontrol grubu MDA: Malondialdehid, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz,
CuZn SOD: Bakır Çinko Süperoksit dismutaz

Tablo-II (devamı): Kontrol grubunun MDA ve antioksidan enzim düzeyleri

Grup	Eritrosit MDA (nmol/ml)	Plazma GSH-Px (U/ml)	Eritrosit GSH-Px (U/ml)	Eritrosit CuZn SOD (U/ml)
C1	1.51	0.77	8.36	249
C2	1.53	0.81	8.98	265
C3	1.49	0.67	11.69	223
C4	1.84	0.69	13.86	314
C5	1.20	0.54	9.41	279
C6	1.73	0.64	13.65	242
C7	0.93	0.66	12.61	252
C8	0.75	0.76	9.41	192
C9	1.10	0.78	11.73	154
C10	1.45	0.69	16.95	216
C11	1.08	0.67	11.19	205
C12	1.54	0.83	9.00	267
C13	1.50	0.80	8.97	260
C14	1.09	0.77	10.6	190
C15	1.20	0.76	9.65	194

A Grubu: ERCP öncesi hasta grubu B Grubu: ERCP sonrası hasta grubu
C Grubu: Kontrol grubu MDA: Malondialdehid, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz,
CuZn SOD: Bakır Çinko Süperoksid dismutaz

Tablo-III: Hasta ve kontrol grubunda parametrelerin ortalama değerleri

Gruplar	Eritrosit MDA (nmol/ml)	Plazma GSH-Px (U/ml)	Eritrosit GSH-Px (U/ml)	Eritrosit CuZn SOD (U/ml)
Hasta grubu (ERCP öncesi)	6.07	0.61	12.74	333.95
Hasta grubu (ERCP sonrası)	3.46	0.57	11.37	316.70
Kontrol grubu	1.32	0.72	11.07	233.46

Tablo-IV: Test sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

Gruplar	Eritrosit MDA	Plazma GSH-Px	Eritrosit GSH-Px	Eritrosit CuZn SOD
ERCP öncesi hasta grubu- ERCP sonrası hasta grubu	p= 0.000	p= 0.401	p= 0.037	p= 0.709
ERCP öncesi hasta grubu- Kontrol grubu	p= 0.000	p= 0.001	p= 0.023	p= 0.002
ERCP sonrası hasta grubu- Kontrol grubu	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.521	p= 0.001

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolestaz sonrası karaciğerde oluşan değişikliklerin patogeneğinde özellikle sitokinler yolu ile oluşan oksidatif stresin önemli yer tuttuğu yapılan bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur (1, 10, 13, 34, 41, 42, 51, 53).

Kolestazda hem biliyer epitel bölgesini infiltre eden lenfosit ve makrofajlar, hem de kolanjiositler TNF-alfa ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri salabilirler (1, 42). Bu sitokinler reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) yapımını arttırabilirler. Örneğin, TNF-alfa'nın süperoksid, hidrojen peroksid ve hidrosil radikallerinin yapımını arttırmak suretiyle oksidatif stres oluşturduğu bildirilmiştir (13, 34, 47, 53). Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanan ratlarda serum TNF-alfa, IL-1beta ve IFN-gama değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (18).

Bunların yanında nitrik oksit, proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile normalden fazla oluşur ve beraberinde peroksinitrit gibi reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna neden olur. Bu sayede mitokondriyal respirasyon bozulur, lipid peroksidasyonu hücre membranları hasarlanır, DNA sentezi ve onarıcı enzimler inhibe olur (51).

Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi, son ürün olan malondialdehid (MDA) seviyeleridir. MDA hepatik stellat hücrelerini aktive ederek kollajen yapımını ve fibrojenizi arttırır. Ayrıca TNF-alfa ve interlökin-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını regüle eden nükleer faktör kappa beta'yı (NF- κ B) aktive ederek inflamasyona katkıda bulunur (15).

Tüm bu değişiklikler hepatosellüler hasarın oluşumuna neden olmaktadır (10, 398, 41). Bu tabloya vücudun cevabı antioksidan sistemin aktive olmasıdır. Ancak gerek antioksidan sistemdeki dengesizlik, gerekse oksidatif stresin enzimlerin aktivitesini değiştirerek ROM'ların yapımını arttırması, hasarın fazlalaşmasına neden olmaktadır (10, 26, 39, 47).

Biz de çalışmamızda oksidatif stres varlığını, MDA ve buna vücudun cevabını antioksidan enzim düzeylerini tespit ederek incelemeye çalıştık. Bu konuda yaptığımız literatür taramasında, karaciğer biyopsisi yolu ile kolestaz esnasında ve sonrasında MDA değerlerini karşılaştıran bir çalışma dışında, insanlarda MDA,

CuZn SOD ve GSH-Px değerlerini eritrosit ve plazmada değerlendiren bir çalışmaya rastlamadık. Bu anlamda bu çalışma orijinal bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

Bizim alışmamızda; eritrosit MDA değerleri, ERCP ncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubuna göre, ERCP ncesi ve sonrası hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratlarda eritrosit ve karaciğer MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu bildirilmiştir (24). Ratlarla yapılan başka çalışmalarda, koledok bağlanmasından 14-21 gün sonra plazma ve karaciğer MDA seviyelerinin (2), 28 gün sonra plazma MDA seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (39). Vendemiale ve ark, 12 kolestazlı hastada yaptıkları çalışmada karaciğer MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve kolestaz tablosunun düzelmesinden sonra tamamen normale döndüğünü bildirmişlerdir (50).

Malondialdehid seviyelerindeki bu anlamlı yükseklik kolestaz tablosunda lipid peroksidasyonunun rol aldığını göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca biyokimyasal olarak kolestazın normale dönmesine rağmen, MDA seviyelerinin halen yüksek kalmasının histolojik açıdan olayın devam ettiğini düşündürmektedir. Yapılan bir hayvan çalışmasında, lipid peroksidasyonunun koledok bağlanmasından sonraki 1-2 haftalık dönemde başladığı ve bunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ile nötrofil ve monosit/makrofaj infiltrasyonu arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir (32). Bizim hastalarımızda kolestazın biyokimyasal olarak normale dönme sresinin ortalama 15.95 gün olduğu düşünülürse, lipid peroksidasyonunun devamı ve onun göstergesi olan MDA düzeylerinin yüksek kalması doğaldır.

Çalışmamızda plazma GSH-Px değerleri ERCP ncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Kontrol grubunda ise ERCP ncesi ve sonrası hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Eritrosit GSH-Px değerleri ise ERCP ncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubu ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ERCP sonrası hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

Togashi ve ark, insanlarda yaptığı bir çalışmada, akut ve kronik hepatitli hastalarda karaciğer GSH-Px düzeylerini incelemişlerdir. GSH-Px açısından akut hepatit grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (44).

Singh ve ark, ratlarda yaptıkları çalışmada koledoku bağlanmış ratlarda karaciğer GSH-Px, glutatyon redüktaz ve katalaz aktivitesinin azalmış olduğunu bildirmişlerdir ve bu sonucun prooksidan/antioksidan dengesinin lipid peroksidasyonu lehine kaymasının bir göstergesi olarak yorumlamışlardır (39).

Yapılan bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların 28 gün sonraki karaciğerlerinde, GSH-Px düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir (33).

Ratlarda yapılan başka bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların karaciğer GSH-Px seviyeleri bağlanmadan 7 gün sonra, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada, eritrosit GSH-Px değerleri açısından koledoku bağlanmış ratlarla kontrol grubu arasında fark bulunamamıştır (29). Alptekin ve ark, ratlarda yaptığı benzer bir çalışmada koledok bağlanmasından 14-21 gün sonra hepatik GSH-Px aktivitesi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (2). Her iki çalışmada da oluşan karaciğer hasarının oksidan-antioksidan dengesindeki bozukluğa bağlı olabileceği öne sürülmüştür

Enzim düzeylerinin hasta gruplarında kontrol grubuna göre düşük olması oksidatif strese yatkınlığın bir göstergesi olabilir. Aynı şekilde oksidatif stres durumunda enzim sentezinin sitokinler ile inhibe edilmesi de bu duruma yol açmış olabilir (5, 14, 16, 39).

Çalışmamızda eritrosit CuZn SOD değerleri, ERCP öncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bunun yanında ERCP öncesi ve sonrası hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Togashi ve ark insanlarda yaptığı bir çalışmada, kolestaz durumunda serbest oksijen radikallerinin katılımı ile oksidatif stresin etkili olduğunu ve karaciğerde ZnSOD, CuSOD ve katalaz aktivitelerinin düşük olduğunu bildirmiştir (44).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların eritrosit SOD seviyeleri bağlanmadan 7 gün sonra ve kontrol grubunda tespit edilmiş ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (29). Alptekin ve

ark, ratlarda yaptığı bir çalışmada, koledoğun bağlanması 14-21 gün sonra karaciğer SOD değerleri kontrol grubundan farklı bulunmamıştır (2). Her iki çalışmada bu durum oksidan-antioksidan dengesindeki bozukluğa bağlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada koledokları bağlanarak kolestaz oluşturulmuş ratların, 28 gün sonra karaciğerlerinde SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu ve N-asetilsistein verilmesi ile sitozolik SOD değerlerinde bir değişiklik olmazken, mitokondriyal SOD değerlerinde parsiyel düzelme olduğu bildirilmiştir (33).

31 primer biliyer sirozlu hastayı da içeren değişik karaciğer hastalarında yapılan bir çalışmada, serum Mn-SOD düzeyleri düşük olarak bulunmuş ve bu durum oksidatif stres lehine yorumlanmıştır (28).

Sonuç olarak; kolestaz durumunda oluşan oksidatif strese vücudun cevabı olarak antioksidan sistemde bazı değişiklikler olmaktadır. Yapılan çalışmalarda GSH-Px ve CuZn SOD değerleri değişkenlik göstermektedir. Bu durum çoğu çalışmada oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengesizliğe bağlanmıştır. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular da, ekstrahepatik kolestazda oksidatif stresin arttığını, antioksidan sistemin farklı komponentlerinde anlamlı değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur. Bütün bu değişimlerin, ekstrahepatik kolestazda ortaya çıkan karaciğer hasarının patogenezinde rol oynadığını düşünmekteyiz.

ÖZET

Biliyer obstrüksiyon akut hepatosellüler hasara neden olabilmekte ve ilerleyici fibrogeneze yol açabilmektedir. Sorumlu mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğu öne sürülmektedir. Kolestatik karaciğer hastalığında endojen antioksidan sistem hasarın daha da büyümesini önlemede temel rol oynamaktadır. Biz bu çalışmamızda ekstrahepatik kolestazda oksidatif stresin rolünü malondialdehid ve antioksidan enzimlerin tayini ile incelemeyi amaçladık.

Koledokolitiyazise bağlı ekstrahepatik kolestazi olan, ateşi ve lokösitozu olmayan 20 hasta (17 kadın, 3 erkek, yaş ortalaması 51.65) ile sağlıklı 15 kişi (12 kadın, 3 erkek, yaş ortalaması 51.06) çalışmaya alındı. Hastaların hepsine ERCP yapılarak, sfinkterotomi ve taş ekstraksiyonu ile kolestaz tedavi edildi. Bütün hastalardan ERCP öncesi ve sonrası olmak üzere ve kontrol grubundan alınan kanlarda eritrosit malondialdehid (MDA), plazma ve eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve eritrosit süperoksid dismutaz (CuZn SOD) enzimlerinin düzeyleri tayin edildi.

Malondialdehid seviyeleri; ERCP öncesi hasta grubunda, ERCP sonrası hasta grubu ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Plazma GSH-Px değerleri ERCP öncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Kontrol grubunda ise ERCP öncesi ve sonrası hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Eritrosit GSH-Px değerleri, ERCP öncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubu ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ERCP sonrası hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Eritrosit CuZn SOD değerleri, ERCP öncesi hasta grubunda ERCP sonrası hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bunun yanında ERCP öncesi ve sonrası hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç olarak; çalışmamızda elde edilen bulgular, ekstrahepatik kolestazda oksidatif stresin arttığını, antioksidan sistemin farklı komponentlerinde anlamlı değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur. Bütün bu değişimlerin, ekstrahepatik kolestazda ortaya çıkan karaciğer hasarının patogenezinde rol oynadığını düşünmekteyiz.

SUMMARY

Biliary obstruction may cause acute hepatocellular injury and lead to progressive fibrogenesis. Oxidative stress has proposed as one process which might be involved in this problem. The endogenous antioxidant system could have a central role in preventing more extensive injury in the cholestatic liver. In this study, our aim was to evaluate the role of oxidative stress in cholestatic liver disease via malonyldialdehyde and antioxidant enzymes.

Twenty patients with extrahepatic cholestasis because of the choledocholithiasis (17 women and 3 men, mean age 51,65) and fifteen healthy subjects (12 women and 3 men, mean age 51,06) were enrolled in the study. We performed ERCP for all patients and cholestasis was treated by sphincterotomy and stone extraction. In the patients before and after ERCP and in the healthy subjects, the levels of erythrocyte malonyldialdehyde (MDA), plasma and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) were measured.

The levels of erythrocyte malonyldialdehyde in the patients with cholestasis before ERCP were found to be high comparing to the other groups. The levels of plasma GSH-Px in control group were higher than those of the patient groups before and after ERCP. There was no difference between the patient groups before and after ERCP. The levels of erythrocyte GSH-Px in patient group before ERCP were found to be high, comparing to the patient group after ERCP and control group. There was no difference between the patient group after ERCP and control group. The levels of erythrocyte CuZn SOD in patient group before and after ERCP were higher than those of the control group. There was no difference between the patient groups before and after ERCP.

In conclusion, the results found in our study showed the increase in the oxidative stress and the significant alterations in the different part of the antioxidant system in extrahepatic cholestasis. We consider that all of these alterations take part in the pathogenesis of liver injury in extrahepatic cholestasis.

KAYNAKLAR

1. Alpini, G., McGill, J.M., La Russo, N.F.: The Pathobiology of Biliary Epithelia, *Hepatology*, 35: 1256-1268, 2002.
2. Alptekin, N., Mehmetçik, G., Uysal, M., Aykaç-Toker, G.: Evidence for Oxidative Stress in the Hepatic Mithocondria of Bile Duct Ligated Rats, *Pharm. Res.*, 36: 243-247, 1997.
3. Aydın, A. : Nitrik Oksid ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ankara, 1997.
4. Aykaç, G., Özdemirler, G., Alptekin, N., Arıcan, N., Öz, B., Uysal, M., Öz, H.: The Hepatic Lipid Peroxidation, Copper and Fibrosis in Cholestatic Rats, *Pharmacol. Res.*, 21: 701-706, 1989.
5. Blum, J., Fridovich, I.: The Inactivation of Glutathione Peroxidase by Superoxide Radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, 240: 500-508, 1985.
6. Dahm, L.J., Hewett, J.A., Roth, R.A.: Bile and Bile Salts Potentiate Superoxide Anion Release from Activated Rat Peritoneal Neutrophils, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 95: 82-92, 1988.
7. Fickert, P., Zollner, G., Fuschsbichler, A., Stumptner, C., Weiglein, A.H., Lammert, F., Marschall, H.U., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner M.: Ursodeoxycholic Acid Aggravates Bile Infarcts in Bile Duct-ligated and Mdr2 Knockout Mice via Disruption of Cholangioles, *Gastroenterology*, 123: 1238-1251, 2002.
8. Friberg, L.: Specific Metals. Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd edition Vol. II., (Eds.) Gunnar F., Nordberg V., Amsterdam, Elsevier, 1986, 233-255, 276-298, 354-387, 482-521, 664-681.
9. Fujii, S.: The Role of Glutathione Peroxidase in the Antioxidant System of Erythrocytes, *British Journal of Haematology*, 68: 263-271, 1988.
10. Gonzalez-Correa, J.A., De La Cruz, J.P., Martin-Aurioles, E., Lopez-Egea, M.A., Ortiz, P., De La Cuesta, F.S.: Effects of S-Adenosyl-L-Methionine on Hepatic and Renal Oxidative Stress in an Experimental Model of Acute Biliary Obstruction in Rats, *Hepatology*, 26 (1): 121-127, 1997.

11. Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G.: Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood, *Clin. Chem.*, 37: 1932-1937, 1991.
12. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.: Free Radicals, Antioxidant and Human Disease: Where Are We Now?, *J. Lab. Clin. Med.*, 119: 598-620, 1992.
13. Hennet, B., Richter, C., Peterhans, E.: Tumour Necrosis Factor- α Induces Superoxide Anion Generation in Mitochondria of L929 Cells, *Biochem. J.*, 289: 587-592, 1993.
14. Hodgson, E.K., Fridovich, I.: The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase with Hydrogen Peroxide: Inactivation of the Enzyme, *Biochemistry*, 14: 5294-5299, 1975.
15. Jaeschke, H., Wang, Y., Essani, N.A.: Reactive Oxygen Species Activate the Transcription factor NF- κ B in the Liver by Induction of Lipid Peroxidation [Abstract], *Hepatology*, 24: 238A, 1996.
16. Ji, L.L., Stratman, W., Lardy, H.A.: Antioxidant Enzyme Systems in Rat Liver and Skeletal Muscle. Influences of Selenium Deficiency, Chronic Training and Acute Exercise, *Arch. Biochem. Biophys.*, 263: 150-160, 1988.
17. Kountouras, J., Billing, B.H., Scheuer, P.J.: Prolonged Bile Duct Obstruction: A New Experimental Model for Cirrhosis in the Liver, *Br. J. Exp. Pathol.*, 65: 305-311, 1984.
18. Liu, T.Z., Lee, K.T., Chern, C.L., Cheng, J.T., Stern, A., Tsai, L.Y.: Free Radical-Triggered Hepatic Injury of Experimental Obstructive Jaundice of Rats Involves Overproduction of Proinflammatory Cytokines and Enhanced Activation of Nuclear Factor κ B, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 31: 383-390, 2001.
19. Ljubuncic, P., Tanne, Z., Bomzon, A.: Ursodeoxycholic Acid Suppresses Extent of Lipid Peroxidation Diseased Liver in Experimental Cholestatic Liver Disease, *Dig. Dis. Sci.*, 45: 1921-1928, 2000.
20. Lopez, P.M., Finana, I.T., De Agueda, M.C., Sanchez, E.C., Munoz, M.C., Alvarez, J.P., De La Torre Lozano, E.J.: Protective Effect of Melatonin Against Oxidative Stress Induced by Ligature of Extra-hepatic Biliary Duct

in Rats: Comparison with the Effect of S-adenosyl-L-methionine, *J. Pineal Res.*, 28: 143-149, 2000.

21. Lubrano, R., Frediani, T., Citti, G., Cardi, E., Mannarino, O., Elli, M., Cozzi, F., Giardini O.: Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation Before and After Vitamin E Supplementation in Children with Cholestasis, *J. Pediatr.*, 115: 380-384, 1989.
22. Marklund, S.L.: Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines, *J. Clin. Invest.*, 74: 1398-1403, 1984.
23. Mitsuyoshi, H., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Inaba, K., Skamoto, Y., Okanoue, T., Kashima, K.: Ursodeoxycholic Acid Protects Hepatocytes Against Oxidative Injury via Induction of Antioxidants, *Bio. Bio Res. Comm.*, 263: 537-542, 1999.
24. Montilla, P., Cruz, A., Padillo, F.J., Tunez, I., Gascon, F., Munoz, M.C., Gomez, M., Pera, C.: Melatonin versus Vitamin E as Protective Treatment against Oxidative Stress after Extra-hepatic Bile Duct Ligation in Rats, *J. Pineal Res.*, 31: 138-144, 2001.
25. Mosialou, E., Ekstrom, G., Adang, A.E.P., Morgenstern, R.: Evidence that Rat Liver Microsomal Glutathione Transferase is Responsible for Glutathione Dependent Protection against Lipid Peroxidation, *Biochem. Pharmacol.*, 45: 1645-1651, 1993.
26. Muriel, P., Suarez, O.R., Gonzalez, P., Zuniga, L.: Protective Effect of S-adenosyl-L-methionine on Liver Damage Induced by Biliary Obstruction in Rats: A Histological, Ultrastructural and Biochemical Approach, *J. Hepatol.*, 21: 95-102, 1994.
27. Neuschwander-Tetri, B.A., Nicholson, C., Wells, L.D., Tracy, T.F.Jr: Cholestatic Liver Injury Down-regulates Hepatic Glutathione Synthesis, *J. Surg. Res.*, 63: 447-451, 1996.
28. Ono, M., Sekiya, C., Ohhira, M., Namiki, M., Endo, Y., Suzuki, K., Matsuda, Y., Taniguchi, N.: Elevated Level of Serum Mn-Superoxide Dismutase in Patients with Primary Biliary Cirrhosis: Possible Involvement of Free Radicals in the Pathogenesis in Primary Biliary Cirrhosis, *J. Lab. Clin. Med.*, 118: 476-483, 1991.

29. Orellana, M., Rodrigo, R., Thielemann, L., Guajardo, V.: Bile Duct Ligation and Oxidative Stress in the Rat: Effects in Liver and Kidney, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 126: 105-111, 2000.
30. Öner, G., Şentürk, Ü.K., İzgüt, N.: The Effect of Manganese on Erythrocyte Superoxide Dismutase, *J. of Medical Sciences*, 19: 283-286, 1993.
31. Panozzo, M.P., Basso, D., Balint, L., Biasin M.R., Bonvicini, P., Metus, P., Infantolino, D., Plebani, M.: Altered Lipid Peroxidation/Glutathione Ratio in Experimental Extrahepatic Cholestasis, *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22: 266-271, 1995.
32. Parola, M., Leonarduzzi, G., Robino, G., Albano, E., Poli, G., Dianzani, M.U.: On the Role of Lipid Peroxidation in the Pathogenesis of Liver Damage Induced by Long-standing Cholestasis, *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 351-359, 1996.
33. Pastor, A., Collado, P.S., Almar, M., Gonzalez-Gallego, J.: Antioxidant Enzyme Status in Biliary Obstructed Rats: Effects of N-acetylcysteine, *J.Hepatol.*, 27: 363-370, 1997.
34. Radeke, H.H., Meier, B., Topley, N., Floege, J., Habermehl, G.G., Resch, K.: Interleukin 1-alpha and Tumor Necrosis Factor-alpha Induce Oxygen Radical Production in Mesangial Cells, *Kidney Int.*, 37: 767-775, 1990.
35. Rouach, H., Fataccioli, V., Gentil, M., French, S.W., Morimoto, M., Nordmann, R.: Effect of Chronic Ethanol Feeding on Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in Relation to Liver Pathology, *Hepatology*, 25: 351-355, 1997.
36. Sayal, A.: Değişik Kanser Türlerinde Plazma ve Eritrositlerde Glutatyon Peroksidaz ve Eser Element Düzeyleri, *Doktora Tezi, Ankara*, 1992.
37. Schiff, E.R., Sorrell, M.F., Maddrey, W.C.: The Cholestasis Disorders. *Disease of the Liver*, 8th edition on CD-ROM, (Eds.) Erlinger S., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
38. Seto, Y., Nakashima, T., Shima, T., Sakamoto, Y., Okuno, T., Takino, T.: Involvement of Oxygen Radicals in Bile Acid-induced Hepatocytes Injury, *Hepatology*, 8: 1452, 1998 (abstract).

39. Singh, S., Shackleton, G., Ah-Sing, E., Chakraborty, J., Bailey, M.E.: Antioxidant Defenses in the Bile Duct-ligated Rat, *Gastroenterology*, 103: 1625-1629, 1992.
40. Sleisenger, M.H., Friedman L.S., Feldman, M.: Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics and Toxins. *Gastrointestinal and Liver Disease*, 7th Edition, Vol II, (Eds.) Farrell, G.C., Philadelphia, Saunders, 2002, 1408-1409.
41. Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R.A.: Effects of Dietary Lipid and Vitamin E on Mitochondrial Lipid Peroxidation and Hepatic Injury in the Bile Duct-ligated Rat, *J. Lipid Res.*, 32: 1349-1357, 1991.
42. Spirli, C., Nathanson M.H., Fiorotto, R. Duner, E., Denson, L.A., Sanz, J.M., Di Virgilio, F., Okolicsanyi, L., Casagrande, F., Strazzabosco, M.: Proinflammatory Cytokins Inhibit Secretion in Rat Bile Duct Epithelium, *Gastroenterology*, 121: 156-169, 2001.
43. Tanner, A.R., Bantock, I., Hinks, L., Lloyd, B., Turner, N.R., Wright, R.: Depressed Selenium and Vitamin E Levels in an Alcoholic Population. Possible Relationship to Hepatic Injury through Increased Lipid Peroxidation, *Dig. Dis. Sci.*, 31: 1307-1312, 1986.
44. Togashi, T., Shinzawa, H., Wakabayoshi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T., Ishikawa, M.: Activities of Free Oxygen Radical Scavenger Enzymes in Human Liver, *J. Hepatol.*, 11: 200-205, 1990.
45. Tsai, L.Y., Lee, K.T., Tsai, S.M.: Changes of Lipid Peroxide Levels in Blood and Liver Tissue of Patients with Obstructive Jaundice, *Clin. Chim. Acta.*, 215: 41-50, 1993.
46. Tsai, L.Y., Lee, K.T., Tsai, S.M.: Vitamin A Status in Patients With Cholelithiasis, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 10: 301-307, 1994.
47. Tsai, L.Y., Lee, K.T., Tsai, S.M., Lu, F.J.: The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Animals with Obstructive Jaundice, *J. Biomed. Lab. Sci.*, 7: 1-8, 1995.
48. Tsai, L.Y., Tsai, S.M.: Vitamin E Levels in Plasma and Liver Tissue of Patients with Cholelithiasis, *J. Biomed. Lab. Sci.*, 5: 27-33, 1993.

