

# Kandidozlu Farelerde Hepatik Malondialdehit, Nitrik Oksit Düzeyleri ve Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitelerine Dair Ön Çalışma

A PRE-STUDY ABOUT HEPATIC MALONDIALDEHYDE, NITRIC OXIDE LEVELS AND SUPEROXIDE DISMUTASE, GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME ACTIVITIES IN MICE WITH CANDIDIASIS

Neslihan BUKAN\*, Banu SANCAK\*\*, Ayşe KALKANCI\*\*\*, Semra KUŞTİMUR\*\*\*\*

\* Uz.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

\*\* Yrd.Doç.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

\*\*\* Öğr.Gör.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD,

\*\*\*\*Prof.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD, ANKARA

## Özet

**Amaç:** Reaktif oksijen türleri, klinik enfeksiyonların patofizyolojisinde giderek daha önemli bir rol almaktadır. Bu çalışmada, NO ve antioksidan enzim aktivitelerinin kandidozlu ratlardaki rolünü değerlendirmek için hepatik malondialdehit (MDA), nitrit + nitrat düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini inceledik.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmada 10 adet kontrol grubu ve 10 adet kandidoz grubu olmak üzere toplam 20 adet 6-8 haftalık, dişi, BALB/c cinsi fare kullanılmıştır. Yüksek doz ketamin hidroklorid (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) uygulanarak hayvanlar feda edilmiş, dokular serum fizyolojik ile yıkanarak kurutulmuş ve sıvı nitrojende dondurularak deney gününe kadar -70 °C'de saklanmıştır. Deney günü dokular çözülerek malondialdehit (MDA), nitrit + nitrat düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri incelenmiştir.

**Bulgular:** Hepatik MDA ve nitrit + nitrat düzeyleri kandidozlu ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla, p<0.05 ve p<0.001), GSH-Px aktivitesi düşük bulundu (p<0.01) ve karaciğer SOD aktivitesinde değişiklik izlenmedi.

**Sonuç:** C. albicans enfeksiyonu tarafından karaciğer hasarı oluşturulabilmektedir ve bu işlem sırasında antioksidan savunma mekanizmaları organizmayı savunmakta yetersiz kalabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** C. Albicans enfeksiyonu, Karaciğer, Antioksidan enzimler

T Klin Tıp Bilimleri 2003, 23:285-288

## Summary

**Purpose:** Reactive oxygen species have been increasingly implicated as playing a central role in the pathophysiology of clinical infections. In this study, in order to evaluate the role of NO and antioxidant enzyme activities in mice with candidiasis, we have measured hepatic malondialdehyde (MDA), nitrate+nitrite levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) enzyme activities.

**Materials and Methods:** 6-8 week, female, BALB/c twenty mouse were enrolled in this study. Ten mouse were used as control group and 10 mouse were infected by C. albicans. Animals were sacrificed with high dose ketamine hydrochloride (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye). The tissues were briefly washed in ice-cold 0.9% saline (w/v), then frozen in liquid nitrogen and were stored at -70 °C until the subsequent protein and enzyme assays. Malondialdehyde (MDA), nitrite + nitrate levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) enzyme activities were determined in liver tissues.

**Results:** Hepatic MDA and nitrate+nitrite level in rats with candidiasis were found significantly higher than the controls (p<0.05, p<0.001, respectively). On the other hand, hepatic GSH-Px activity was significantly lower in rats with candidiasis (p<0.01) whereas SOD activity didn't change in liver.

**Conclusion:** Hepatic injury can be generated by C. albicans infection and during this process antioxidant defense mechanism is not enough to protect the organism.

**Key Words:** C. Albicans infection, Liver, Antioxidant enzymes

T Klin J Med Sci 2003, 23:285-288

Reaktif oksijen türleri, klinik enfeksiyonların patofizyolojisinde giderek daha önemli bir rol almaktadır. İnflamasyon platelet aktive edici faktör

(PAF), serbest oksijen radikalleri gibi kimyasal mediatörlerin varlığıyla kontrol edilmektedir. Özellikle süperoksit, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>), hipokloroz asid ve nitrik oksit (NO) bu konuda önemli rol oynayan faktörlerdir (1). NO'nun septik şok patogenezindeki önemli rolü ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aracılı NO salınımındaki rolü daha önceden bildirilmiştir (2).

Makrofajlar sistemik *C. albicans* enfeksiyonlarına dirençte önemli bir rol oynayan ve oksidatif mikrobisidal moleküllerin üretimini sağlayan multifonksiyonel immün hücrelerdir. NO makrofajın kandidasidal aktivitesinde önemli bir moleküldür ve NO üretimi aynı zamanda mikroorganizmalar tarafından konak savunma mekanizmasını yıkmak için bir yol olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, NO ve antioksidan enzim aktivitelerinin kandidozlu farelerdeki rolünü değerlendirmek amacıyla hepatik malondialdehit (MDA), nitrit + nitrat düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini inceledik.

### Materyal ve Metod

20-25 g ağırlığında, 6-8 haftalık, dişi, BALB/c cinsi fareler Hıfzısıhha Serum Çiftliği'nden temin edilmiştir. Kandidoz grubu olarak 10 adet, sağlıklı kontrol grubu olarak 10 adet fare kullanılmıştır. Farelere selenyum bakımından özel bir diyet uygulanmamış, normal yem verilmiştir. *Candida albicans* (American Type Culture Collection) ATCC 26555 referans suşu kullanılmıştır. Maya süspansiyonlarının hazırlanması Sabouraud dekstroz agarda (SDA) inkübe edilen *Candida* kolonilerinin 4-5 tanesi 5ml steril %0.9'luk NaCl solüsyonu (serum fizyolojik) içinde karıştırılmıştır.

Organizmalar düşük devirde (1500g) santrifüj edilmiş ve üç kez steril serum fizyolojik ile yıkanmışlardır. Mayalar  $3 \times 10^8$  hücre/ml olacak şekilde hazırlanan solüsyonlar halinde farelerin kuyruk venlerinden 0.2 ml miktarında ve solüsyondaki hücrelerin %99'u blastokonidya olacak şekilde damar içine verilmiştir (Louie ve Barchiasi). Fareler enfeksiyonun altıncı gününde kloroform anestezi altında incelenmiştir. Böbrek, karaciğer izole edilmiş ve enfeksiyon belirtileri araştırılmıştır. Kandidozun gösterilmesi için böbreklerden hazır-

lanan organ süspansiyonları SDA plaklarında 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen böbreklerin tamamında deneyin başlangıcında hayvanlara verilen *C. albicans* ATCC 26555 referans suşu izole edilmiştir. Daha sonra yüksek doz ketamin hidroklorid (ketalar,® Eczacıbaşı, Türkiye) uygulanarak hayvanlar feda edilmiş, dokular serum fizyolojik ile yıkanarak kurutulmuş ve sıvı nitrojende dondurularak deney gününe kadar -70°C'de saklanmıştır.

Doku homojenatlarında protein analizi Lowry metodu ile yapılmıştır (3).

SOD analizi için 1/10 oranında fosfat tamponu (pH 7.4) ile homojenize edilen doku numuneleri, 3/5 kloroform/etanol karışımı eklenerek +4°C'de 5000 G'de 2 saat santrifüj edilmiştir. SOD aktivite tayin yönteminin esası, ksantin / ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesi ve bunun da SOD tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır. 1 ünite SOD, nitroblue tetrazolium redüksiyonunu %50 inhibe eden protein miktarı olarak tanımlanmıştır (4).

GSH-Px aktivite tayini için, doku numuneleri 1/10 oranında 0.5 mM EDTA içeren pH 7.0 fosfat tamponunda homojenize edilmiştir. 3500 rpm de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra supernatandan protein ve GSH-Px aktivitesi tayin edilmiştir. Paglia ve Valentine tarafından tanımlanan prosedür ile enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar okside olan NADPH / dakika /mg protein olarak verilmiştir (5).

MDA düzeyleri tiobarbitürik asid metodu ile tayin edilmiş ve sonuçlar nmol/ g doku olarak verilmiştir (6).

Serum fizyolojik ile 1/10 homojenize edilen dokular ZnSO<sub>4</sub> ve NaOH ile karıştırılarak protein içerikleri çöktürülmüş ve supernatandan Griess reaksiyonu ile nitrit düzeyleri tayin edilirken (7), nitrat düzeyleri nitrat redüktaz varlığında NADPH'nin redüksiyonuna dayanan metodla ölçülmüştür (8).

İstatistiksel analiz Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

**Tablo 1.** Gruplara ait sonuçlar (değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir)

Gruplar	MDA (nmol/g protein)	Nitrit+Nitrat (nmol/ml)	GSH-Px (okside NADPH/dakika/ mg prt)	SOD (U/ mg protein)
Kontrol	23.75 $\pm$ 2.5	3.29 $\pm$ 1.37	7.93 $\pm$ 1.24	29.25 $\pm$ 4.02
Kandidoz	39.62 $\pm$ 12.95 <sup>a</sup>	9.02 $\pm$ 2.30 <sup>b</sup>	3.09 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	30.18 $\pm$ 4.45 <sup>NS</sup>

a:  $p < 0.05$  kontrol grubuna göre anlamlı yüksek, b:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre anlamlı düşük, c:  $p < 0.01$  kontrol grubuna göre anlamlı yüksek

### Sonuçlar

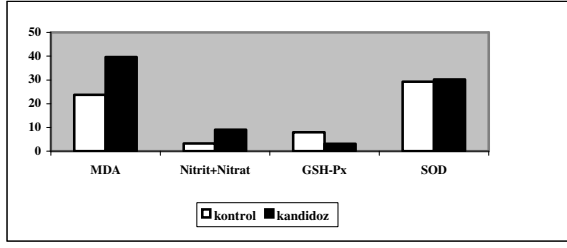
Hepatik MDA ve nitrit + nitrat düzeyleri kandidozlu farelerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla  $p < 0.05$  ve  $p < 0.001$ ) GSH-Px aktivitesi düşük bulundu ( $p < 0.01$ ). Karaciğer SOD aktivitesinde değişiklik izlenmedi. Sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

### Tartışma

Bir fagositik hücre, mikroorganizmayla karşılaştığında mikroorganizmayı membranı ile çevreleyip fagozom oluşturur. Bu olay, fagositin oksijen tüketiminin artmasına ve membrana bağlı NADPH-bağımlı oksidaz enzim kompleksinin aktive olmasıyla kompleks bir sinyal iletiminin başlamasına neden olur (9). Bu enzimle oksijen, süperoksit radikaline ( $O_2^-$ ) redükte olur ve fagozoma salgılanır.  $O_2^-$  de SOD enziminin katalizlediği dismutasyon reaksiyonu ile  $H_2O_2$ ’e dönüşür. Bu toksik maddeler ekstraselüler ortama da salınırlar. Myeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığıyla  $H_2O_2$ ’ten hipokloroz ve daha uzun ömürlü kloraminler oluşturulur. (10). Tüm bu bileşiklerin ( $H_2O_2$ , hipokloroz asit,  $O_2^-$ , kloraminler) in vitro sitotoksik etkilerinin olduğu bilinmekle beraber in vivo mikrobisidal aktiviteleri kesin değildir (11). MPO defekti olan hastalar birçok enfeksiyon ajanına karşı dirençli olmakla beraber fungal ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma güçlerinin azaldığı gösterilmiştir (12). Mikrobisidal aktivitesi olan bir başka fagosit kaynaklı oksidan da NO’tir. Murin fagositik hücrelerinde gösterilen iNOS enzimi birçok sitokin ve lipopolisakkarit tarafından uyarılmaktadır (13). Birçok araştırmacı NO’in C. neoformans, T. gandii, M. bovis gibi birçok pato-

jene karşı mikrobiyostatik ve mikrobisidal olduğunu göstermişlerdir (14,15). Fagositlerin yanı sıra, endotelial hücrelerde de NO,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  inflamasyonda değişik stimuluslarla iletilirler. Feng ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda R. conori enfeksiyonuna karşı endotelial hücrelerin kendilerini korumak amacıyla NO ürettiğini göstermiştir (16). Schroppel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da makrofajların deneysel kandidoza karşı defansta önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bunu, iNOS aracılığıyla NO’i artırarak makrofajın kandidisidal etkisini arttırması yoluyla yaptığı gösterilmiştir. NO üretiminin baskılanması C.Albicans aktivitesi ve virulansının artması ile sonuçlanmaktadır (17). Enfeksiyon tedavisinde kullanılan birçok antimikrobiyal ajan da biyomolekülleri hasara uğratma kapasitesinde olan reaktif oksijen türleri üretirler (18).

Mikroorganizmalar da bunlardan kendilerini korumak amacıyla SOD, katalaz, GSH-Px gibi antioksidan enzimlere sahiptir (19). Bu çalışmada C. albicans sepsisi oluşturulan farelerin karaciğer dokularında serbest radikal hasarının bir göstergesi olan MDA düzeyi çalışılmıştır. C. albicanslı farelerin karaciğerinde MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu bize antioksidan enzimlerle, serbest radikaller arasındaki dengenin bozulduğunu göstermektedir. Doku GSH-Px aktivitesi de bu düşüncüyü destekler şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). SOD enzim aktivitesi ise değişmemiştir. Bu bulgular Şekil 1’de gösterilmiştir. Bunun yanı sıra nitrik oksit metabolizmasının son ürünü olan doku nitrit+nitrat düzeylerinin de kontrol grubuna göre sepsisli farelerde yüksek olduğu izlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu yüksekli-



Şekil 1. Gruplara ait sonuçlar gösterilmiştir.

ğin enfeksiyona cevaben karaciğerde toplanan fagositik hücrelerden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan serbest radikaller *C. albicans* enfeksiyonunda da yer almaktadır. Oksidan-antioksidan dengenin korunmasına yönelik olarak organizma ilgili sistemleri devreye sokmakta ve patojenle mücadele etmektedir. Bu konuyla ilgili çalışmalar genişletilerek *C. albicans* enfeksiyonun oksidatif etkilerinin daha iyi anlaşılabilirliği inancındayız.

#### KAYNAKLAR

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine- nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
2. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7738-42.
3. Lowry OH. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
4. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
5. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte GSH-Px. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-69.
6. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Ann Biochem* 1978; 86: 271-8.
7. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-8.
8. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 41(6): 904-7.
9. Clark RA. The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1990; 161: 1140-7.
10. Miller RA. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1): 1-18.
11. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 9-37.
12. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1981; 95: 293-301.
13. Diez-Orejas R, Molero G, Moro MA, Gil C, Nombela C, Sanchez-Perez M. Two different NO-dependent mechanisms account for the low virulence of a non-mycelial morphological mutant of *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* 2001; 189:153-60.
14. Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 1988; 81: 1129-36.
15. Flesch IE, Kaufmann SH. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 1991; 59:3213-8.
16. Feng HM, Popov VL, Walker DH. Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease. *Infect Immun* 1994; 62: 1952-60.
17. Schroppel K, Kryk M, Herrmann M, Leberer E, Rollinghoff M, Bogdan C. Suppression of type 2NO-synthase activity in macrophages by *Candida Albicans*. *Int J Med Microbiol*. 2001; 290(8): 659-68.
18. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Oxidative damage to DNA and deoxyribose by beta-lactam antibiotics in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Res Commun*. 1988; 5(3):149-58.
19. Haas A, Goebel W. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic Res Commun*. 1992; 16(3):137-57.

Geliş Tarihi: 20.12.2002

Yazışma Adresi: Dr.Neslihan BUKAN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya AD, ANKARA  
nbukan@yahoo.com

Tebliğ yeri ve tarihi: 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, 24-27 Haziran 2002, Ankara.