

Köpeklerde Karbontetraklorür İntoksikasyonunda Serum ve Karaciğer Dokusu Mineral Madde Düzeylerinin Araştırılması

Nazmi YÜKSEK¹✉ Nuri ALTUĞ¹ Zahid Tevfik AĞAOĞLU¹ Abdullah KARASU²

¹YYÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-VAN / TÜRKİYE

²YYÜ Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı-VAN / TÜRKİYE

Makale geliş ve kabul tarihleri: 12/12/2005 - 19/01/2006, ✉ Sorumlu araştırmacı, 4322251703/2505, nyukse@yyu.edu.tr

ÖZET

Bu araştırmada akut CCl₄ intoksikasyonunda serum, kronik CCl₄ intoksikasyonunda ise serum ve doku mineral madde düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini 24 sağlıklı melez sokak köpeği oluşturdu. Köpekler akut toksikasyon (n=10), kronik toksikasyon (n=10) ve kronik toksikasyon doku kontrol (n=4) grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Akut CCl₄ intoksikasyonu 12 saatlik açlığı takiben bir kez 1,5 ml/kg dozunda ve kronik CCl₄ intoksikasyonu ise haftada iki kez 12 hafta süreyle 0,5 ml/kg dozunda CCl₄'ün zeytinyağındaki 1/1 oranındaki süspansiyonunun oro-gastrik sonda ile mideye verilmesi ile oluşturuldu. Akut toksikasyon grubunda serum Cu, Fe ve Zn değerlerinde artış, kronik toksikasyon grubunda ise serum Cu ve Fe ile doku Fe ve Zn düzeylerinde artış, serum Mg ve doku Cu seviyelerinde ise azalma belirlendi.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, Karbontetraklorür, İz element, Köpek

Determination of Mineral Elements in Liver and Serum of Dogs with Carbontetrachlorur Intoxication.

SUMMARY

This study was designed to investigate serum mineral elements in acute toxication and tissue concentration of mineral elements in chronic toxication of CCl₄. Twenty-four cross-breed, stray dogs were used. Dogs were assigned into three group; acute toxication (n=10), chronic toxication (n=10), and control groups(n=4). Acute toxication was induced by giving a single dose of 1.5 mg/kg of CCl₄ orally following 12 hours starvation, chronic toxication was induced by giving 0.5 mg/kg in olive oil (1w/1w) twice a week for 12 weeks. Serum Fe, Cu, and Zn concentration increased in acute toxication while serum Cu and Fe and tissue Fe and Zn concentration decreased in chronic toxications.

Keywords: Liver, Carbontetrachlorur, Trace element, Dog.

GİRİŞ

Mineral maddeler organizmada kan ve depo organlarda yüksek oranda bulunurlar. Karaciğer özellikle çinko (Zn), demir (Fe), bakır (Cu), mangan (Mn) gibi iz elementlerin depolandığı önemli bir organdır (13, 17). Mineral maddelerin fonksiyonel özgülüğü vücuttaki spesifik taşıyıcı ve depolayıcı proteinler tarafından sağlanır. Bu taşıyıcı proteinler mineral maddelere özgüdür ve onları taşıyarak bağlanırlar, nakledeleler ve/veya organizma içerisindeki spesifik yerlerde onları depo ederler. Bu durum demir için transferrin ve ferritin, çinko için α₂ makroglobulin, bakır için serüloplazmin ve mangan için ise transmanganin tarafından gerçekleştirilir (12, 13, 17).

Mineral maddelerin doku, organ ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonları ve fonksiyonel formları eğer dokuların fonksiyonel ve yapısal bütünlüğü korunursa belirli limitler içinde değişmez tutulur. Ancak birçok faktörün mineral maddelerin vücut sıvı ve dokularındaki fonksiyonel formlarının aktivitelerinin ve konsantrasyonlarının değişimine yol açtığı bildirilmiştir (13, 17). Karbontetraklorür (CCL₄) selektif bir hepatotoksik faaliyete sahip olduğu bildirilen ve birçok araştırmacı tarafından akut ve kronik toksisite oluşturmasında kullanılan toksik bir ajandır (6, 15). Karbontetraklorür intoksikasyonu ve mineral madde

düzeyleri ile ilgili deney hayvanlarında daha önce yapılan çalışmalarda serum ve doku mineral madde düzeylerinde aynı mineral madde üzerinde bazı araştırmacılar artış (10, 16) bazıları ise azalma (6) olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle mevcut araştırmada akut karbontetraklorür toksikasyonu oluşturulan köpeklerde serum mineral madde düzeyleri, kronik toksikasyon oluşturulan köpeklerde ise serum ve doku mineral madde düzeylerinin belirlenmesi ve konunun aydınlatılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini 1-6 yaş arası ve 15-28 kg canlı ağırlığında her iki cinsiyetten toplam 24 sağlıklı melez sokak köpeği oluşturdu. Köpekler akut toksikasyon grubu (n=10), kronik toksikasyon grubu (n=10) ve kronik toksikasyon doku kontrol grubu (n=4) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Köpekler deneme müddetince türlerine özgü gıdalarla beslendi ve önlerinde daima içme suyu bulunduruldu.

Karbontetraklorür intoksikasyonu akut toksikasyon grubuna 12 saatlik açlığı takiben bir kez 1,5 ml/kg dozunda ve kronik toksikasyon grubuna ise haftada iki kez 12 hafta süreyle 0,5 ml/kg dozunda CCL₄'ün (Merck) zeytinyağındaki 1/1 oranındaki süspansiyonunun oro-gastrik sonda ile mideye verilmesiyle oluşturuldu. Akut

toksikasyon grubu köpeklerden toksikasyon öncesi 1. ve 2. günlerde ve toksikasyonun 1., 3., 5., 7. ve 9. günlerinde, kronik toksikasyon grubu köpeklerden ise toksikasyon öncesi 1. ve 2. günlerde ve toksikasyon süresince 21 gün arayla 4 kez V. cephalica antebraçhiden 10 ml'lik antikoagülsüz tüplere kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı ve serumlar analizleri yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Her iki grup köpeklerden deneme öncesi 1. ve 2. günlerde alınan serum mineral madde değerlerinin ortalaması kontrol değeri olarak kullanıldı. Mineral madde düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (UNICAM-929) ile ölçüldü.

Karaciğer dokusu mineral madde düzeyleri ölçümü için kronik toksikasyon grubu köpeklerden toksikasyonun 12. haftasında, bu grubun doku kontrol grubu ile eş zamanlı olarak ultrasonografi rehberliğinde karaciğer biyopsisi alındı. Alınan doku örneklerinin mineral madde düzeyleri; yaş doku ağırlığı belirlendikten sonra 100

°C'de 3 gün bekletilerek kuru ağırlığı da kaydedildi. Daha sonra kurutulmuş doku örnekleri 550 °C'de kül fırınında 24 saat süreyle yakıldı. Yakılan örneklerin üzerine 4 ml 3N HCl eklenerek 25 ml'lik balon jöjeye aktarıldı ve 25 ml distile deiyonize su eklenerek filtre kağıdından süzülürdü (4). Elde edilen çözeltinin mineral madde ölçümleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (UNICAM-929) ile yapıldı.

Bu araştırmada toksik maddenin deneme hayvanlarındaki serum ve doku mineral madde düzeyleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla SPSS paket programıyla Student's t – testi uygulandı.

BULGULAR

Akut ve kronik toksikasyon grubu köpeklerin serum mineral madde düzeyleri tablo 1 ve 2'de, kronik toksikasyon grubu köpeklerin karaciğer dokusu mineral madde düzeyleri ise tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 1. Akut toksikasyon grubu köpeklerin serum mineral madde düzeyleri.

Parametreler	Uygulama öncesi (n=10)	Uygulama sonrası (n=10)				
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	1. gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün
Cu (mg/L)	0.453±0.13	0.660±0.10**	0.801±0.32*	0.739±0.29	0.492±0.99	0.550±0.15
Mg (mg/L)	8.329±1.03	7.836±0.69	8.351±1.44	8.309±1.42	7.133±1.11	7.847±1.34
Fe (mg/L)	1.401±0.29	1.350±0.26	2.585±0.52***	2.008±0.53*	1.934±0.35**	1.995±0.20**
Mn (mg/L)	4.61±2.29	4.26±0.34	4.13±0.77	6.17±0.80	4.87±0.41	5.00±2.03
Zn (mg/L)	0.175±0.12	0.274±0.35**	0.363±0.11	0.432±0.23***	0.327±0.12**	0.314±0.12*

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Tablo 2. Kronik toksikasyon grubu köpeklerin serum mineral madde düzeyleri.

Parametreler	Uygulama öncesi (n=10)	Uygulama sonrası (n=10)			
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	3. Hafta	6. Hafta	9. Hafta	12. Hafta
Cu (mg/L)	0.453±0.13	0.499±0.33	1.016±0.50*	0.947±0.45*	0.517±0.17
Mg (mg/L)	9.329±1.03	5.948±1.21*	6.118±2.75*	7.197±1.59*	6.300±3.53*
Fe (mg/L)	1.401±0.29	1.935±1.12	2.010±0.50*	3.590±1.29**	1.833±1.38
Mn (mg/L)	4.61±2.29	5.22±3.61	4.60±0.18	4.18±1.8	3.62±0.46
Zn (mg/L)	0.175±0.12	0.238±0.03	0.228±0.06	0.208±0.10	0.177±0.18

*p<0.05, **p<0.01

Tablo 3. Kronik toksikasyon grubu köpeklerin karaciğer dokusu mineral madde düzeyleri.

Parametreler	Doku Kontrol grubu (n=4)	Kronik grup (n=4)
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Cu (mg/L)	70.96±4.20	26.63±16.43***
Mg (mg/L)	68.67±4.57	104.94±1.21
Fe (mg/L)	194.18±17.99	295.73±93.74*
Mn (mg/L)	7.63±2.26	35.03±34.08
Zn (mg/L)	34.95±1.69	44.99±10.09*

*p<0.05, ***p<0.001

TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer mineral maddelerin depolandığı önemli bir organdır. Bir çok faktör mineral maddelerin vücut doku ve sıvılarındaki fonksiyonel formlarının, aktivitelerinin ve konsantrasyonlarının değişimine yol açarak mineral maddelerin belirli limitlerin üzerine çıkmasına veya altına düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (13, 17). Bu faktörlerden biri olan CCl_4 'ün karaciğerdeki hepatoksin etkisinden dolayı mineral maddelerin seviyelerinde değişimlere yol açtığı ifade edilmiştir (6, 10, 11, 15).

Bu çalışmada akut toksikasyon grubunda Cu, Fe ve Zn seviyelerinde önemli artış belirlenirken, Mg ve Mn düzeylerinde farklılık gözlenmedi. Bu sonuçların bir çok araştırıcının (8, 15) bulgularıyla uyumlu olduğu görüldü. Bu durum Mikhail ve ark. (15) bildirdikleri gibi akut hepatoselüler hasara bağlı olarak mineral madde metabolizmasındaki değişikliklerin CCl_4 toksikasyonundaki en erken bulgulardan biri olabileceği veya kanaatimize göre Cu, Fe ve Zn'nun taşınması ve yer değişiminden sorumlu mekanizmalardaki hızlı değişimlerle ilgili olabileceğine işaret edebilir.

Kronik toksikasyon grubunda serum Cu ve Fe seviyelerinde 6. ve 9. haftalarda önemli artışlar belirlenirken, serum Mg düzeylerinde tüm örnekleme zamanlarında istatistiki önem arz eden azalma saptandı. Örneklemenin 12. haftasında serum Mg değerleri hariç, diğer mineral madde düzeylerinin kontrol değerleriyle farklı olmamasının köpeklerin belirli bir süre sonrasında toksikasyona adaptasyon göstermesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer mukozal hücrelerindeki Cu seviyelerindeki artışın metallothionein sentezini stümüle ederek Cu'nun metallohioninle bağlanmasını, portal kana geçmesini ve hücre döngüsü içerisinde Cu'nun kaybedilmesini sağladığı bildirilmektedir (13). Bu bağlamda kronik toksikasyon grubunda serum Cu konsantrasyonlarında gözlenen artış, doku Cu seviyelerinde meydana gelen azalma ile ilişkilendirilebilir. Doku Cu konsantrasyonlarındaki azalma toksikasyona bağlı olarak hücrelerdeki dejenerasyon ve Cu kana verilmesinden kaynaklanabileceği ve böylece serum Cu konsantrasyonlarında artışa neden olabileceği düşünülmektedir.

CCl_4 ile oluşturulan kronik toksikasyonda serum Zn düzeylerinin; Frezza ve ark.(10) arttığını, Dashti ve ark (6, 7) ise azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular bazı araştırıcılar (10) ile uyum içinde iken, diğer araştırmaların (6, 7) bulgularıyla farklılık arz etmektedir. Cabre ve ark (5) kronik CCl_4 toksikasyonunda rasyona Zn ilavesinin hepatik hasarı ve lipit peroksidasyonunu azalttığını bildirmiştir. Bu durum mevcut çalışmamızdaki serum Zn düzeylerindeki artışın toksikasyondaki hepatik hasar ve lipit peroksidasyonunu azaltmak için Zn'nun sindirim sisteminden emiliminin artmasına bağlı olabileceği ile izah edilebilir.

Hanna ve ark (11) CCL_4 ile oluşturulan toksikasyonda oluşan lipit peroksidasyonunun inhibisyonunun Zn'nun karaciğer hücrelerinde membran yüzeylerinde bağlandığı yerlerden salınımı ve böylece Fe ile yer değişimini sağlayarak gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, kronik toksikasyonda karaciğer dokusu Zn düzeylerinde önemli artışlar tespit edildi. (Tablo. 3) Çinko düzeylerinde gözlenen artış Zn'nun toksikasyonda artan lipit peroksidasyonunu önlemeye çalışması nedeniyle karaciğer dokusunda depolanmasındaki artışla ve karaciğer hasarında proliferen olan hepatositlerde artan Zn düzeylerine bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir (10, 11).

Araştırmamızda serum ve karaciğer dokusu Fe konsantrasyonunun arttığı belirlendi. Karbon tetraklorür toksikasyonunda hepatik demir alımının arttığı (3) ve toksikasyonda gözlenen lipit peroksidasyon oluşumunun artan Fe'e bağlı olduğu (2) bildirildi. Ayrıca Cu yetmezliğinin CCL_4 'ün neden olduğu lipit peroksidasyonunda ve hepatik Fe konsantrasyonunda artışa neden olduğu (14) ifade edildi. Bu literatür bilgileri ışığında çalışmamızda serum ve karaciğer dokusu Fe konsantrasyonundaki artış; CCL_4 toksikasyonunda artan Fe'e bağlı olarak gerçekleşen lipit peroksidasyon artışının karaciğer dokusundan kana geçen Cu ile dengelenmeye çalışıldığı, bu nedenle doku Cu seviyesi azalırken serum Cu düzeylerinin arttığı, ancak artan serum Cu düzeylerinin Fe'in neden olduğu lipit peroksidasyonunu engelleyemediği, böylece serum ve karaciğer dokusu Fe düzeylerinin artışı ile sonuçlandığını göstermektedir.

Ayrıca doku Cu seviyesindeki azalmaya karşın Zn seviyesindeki artış, Jacob ve ark.(12) bildirdiği gibi sindirim sisteminden artan Zn absorpsiyonunun Cu absorpsiyonunu antagonize etmesi ile izah edilebilir.

Hücre membran bütünlüğü üzerinde Mn yetmezliğinin etkisinin membranlarda lipit peroksidasyonunun artan hızına bağlı olabileceği ve bu hayvanlarda lipit peroksidasyonunun artabileceği, MnSOD aktivitesindeki azalmanın lipit peroksidasyon hızında artışa neden olabileceği bildirildi (13). Ayrıca karaciğer hastalıklarında MnSOD aktivitelerinde artış olduğu ifade edildi (1, 13). Bu nedenle mevcut çalışmada doku Mn aktivitelerindeki artış lipit peroksidasyonunu engellemek için karaciğere artan MnSOD transferine veya CCL_4 'ün faaliyetinin bir sonucu olarak hasarlı mitokondriyal membranlardaki permeabilite artışına bağlanabilir.

Kronik toksikasyon grubunda serum Mg düzeyleri azaldı. Bu durum Kaneko ve ark. (13) bildirdikleri Mn'in yapısına girdiği birçok aktivatörler (Hydrolase, Kinase) için nonspesifik olması ve metal iyonlarının özellikle Mg'un Mn yerini alması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak; Akut toksikasyonda Cu, Fe ve Zn değerlerinde artış, Mn değişmezken Mg değerlerinde azalma, Kronik toksikasyonda serum Mg'de azalma, doku Mg'de artışlar. Diğer parametrelerde (Cu, Fe, Zn, Mn) ilk uygulamalarda artış ve 4 haftada normal seviyelere yakın olarak belirlendi. Ayrıca doku seviyelerinde Cu azalma

($P < 0,001$), Mg, Fe, Mn ve Zn ise artışlar belirlendi. Bu sonuçlara göre; akut karaciğer toksikasyonlarında serum Cu, Fe ve Zn seviyelerinde gözlenen artışlar, kronik karaciğer toksikasyonlarında ise serum Cu ve Fe ile doku Fe ve Zn seviyelerindeki artışlarla birlikte serum Mg ve doku Cu düzeylerindeki azalmaların değerlendirilmesinin yararlı olacağı kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Adachi T., Nagae T., Ito Y., Hirano K., Sugiura M (1983): Superoxide dismutase levels following liver and kidney intoxication. J. Pharmacobiodyn., 6(6): 433-437.
2. Alam, K., Nagi, M.N., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Rikabi, A.C., Al-Bekairi, A.M (1999): The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. Pharmacol. Res., 40 (2): 159-163.
3. Batey RG., Johnston R (1993): Effects of alcohol, carbon tetrachloride, and choline deficiency on iron metabolism in the rat. Alcohol Clin. Exp. Res. 17 (5): 931-934.
4. Bentley PJ, Grubb BR (1991): Effects of a Zinc-deficient diet on tissue Zinc concentration in rabbits. J. Anim Sci., 69, 4876-4882,
5. Cabre M., Camps J., Paternain J.L., Ferre N., Joven J.J (2000): Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 27 (9), 694-699.
6. Dashti H., Jeppsson B., Hägerstrand I., Hultberg B., Srinivas U., Abdulla M., Bengmark S (1989): Thioacetamide- and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. Eur. Surg. Res. 21: 83-91.
7. Dashti H.M., al-Sayer H., Behbehani A., Madda J., Christenson J.T (1992): Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment. J. R. Coll. Surg. Edinb. 37 (1): 23-28.
8. Dashti H., Behbehani A., Abul H., Hussain T., Madda P (1995): Alterations of trace elements in kidney, spleen and lungs in treated and untreated experimental liver cirrhosis. J. R. Coll. Surg. Edinb. 40 (3): 173-179.
9. El-Dessoukey, E.A., Awadallah, R, El-Attar, S. (1977): Biochemical changes under the effect of carbon tetrachloride intoxication. Z Ernährungswiss, 16(4): 217-222.
10. Frezza E.E., Gerunda G.E., Farinati F., DeMaria N., Galligioni A., Plebani F., Giacomini A., Van Thiel D.H. (1994): CCL₄- Induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats: relationship to plasma zinc, copper and estradiol levels. Hepato-Gastroenterol. 41: 367-369.
11. Hanna, P.M., Kadiiska, M.B., Jardon, S.J., Mason, R.P. (1993): Role of metallothionein in zinc (II) and chromium (III) mediated tolerance to carbon tetrachloride hepatotoxicity: evidence against a trichloromethyl radical scavenging mechanism. Chem. Res. Toxicol. 6 (5): 711-717.
12. Jacob, R.A. (1986): Textbook of Clinical Chemistry. (Editör: Tietz, N.W) W.B. Saunders Company. Volume: I 965-969. Philadelphia, London.
13. Kaneko, J.J. (1989): Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 14th. edition Academic press. inc. California.
14. Lawrence, R.A., Jenkinson, S.G. (1987): Effects of copper deficiency on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation. J. Lab. Clin. Med., 109(2): 134-140.
15. Mikhail, T.H., Awadallah, R, El-Dessoukey, E.A. (1978): Effect of AMP on serum minerals in carbon-tetrachloride hepatotoxicity. Z Ernährungswiss, 17 (1): 47-51.
16. Ono H (1981): Experimental studies on metabolism of iron overload in dogs with carbon tetrachloride induced chronic hepatic injury. Hokkaido Igaku Zasshi. 56(5): 469-482.
17. Underwood E.J. (1977): Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press. 56-247 pp. London