

Karbon Tetraklorür Toksikasyonunun Lipid Peroksidasyonu, Glutasyon ve Vitamin C Üzerine Etkileri

Ayşegül BİLDİK¹ Ali ERTEKİN¹ Fatmagül YUR¹ Semiha DEDE¹

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van.

Özet :Bu araştırma, akut ve kronik dozda CCl₄ (Karbon tetraklorür) ün lipid peroksidasyonu ile vitamin C ve glutasyon düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapıldı. Materyal olarak Lepus europous ırkı tavşanlar kullanıldı. Tavşanlar biri kontrol diğerleri akut ve kronik deneme grubu olmak üzere üçe ayrıldı. Akut deneme grubuna 2.0 cc/kg dozunda intraperitoneal olarak, kronik deneme grubuna ise subkutan 0.5 cc/kg dozunda haftada iki kez CCl₄'ün zeytinyağındaki (1:1) süspansiyonu uygulandı. Malondialdehid (MDA) miktarları, vitamin C ve glutasyon düzeyleri spektrofotometrik olarak tayin edildi. Kontrol grubunun MDA, vitamin C ve glutasyon miktarları sırası ile 3.29 ± 0.39 nmol/ml, 0.252 ± 0.051 mg/dl ve 32.17 ± 4.9 mg/dl, akut grupta, bu değerler sırasıyla 5.68 ± 0.52 nmol/ml, 0.114 ± 0.018 mg/dl ve 15.27 ± 1.1 mg/dl, kronik grupta ise 3.65 ± 0.35 nmol/ml, 0.192 ± 0.027 mg/dl, 35.72 ± 2.3 mg/dl olarak bulundu. Akut gruptaki tavşanların kan plazmasındaki MDA miktarlarında kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde artış, vitamin C ve glutasyon miktarlarında ise p<0.05 düzeyinde düşüş tesbit edildi. Kronik grupta, kontrol grubuna göre önemli bir fark bulunamadı (p>0.05).

Anahtar Kelimeler: CCl₄, Lipid peroksidasyonu, Vit C, Glutasyon.

Effects of Carbon tetrachloride on Lipid Peroxidation, Glutathione and Vitamin C

Summary :The purpose of this study was to investigate the effects of acute and chronic CCl₄ intoxication on lipid peroxidation, vitamin C and glutathione. Lepus europous rabbits were used as material. Rabbits divided into three as control, acute and chronic groups. Two cc/b.w. CCl₄ was given (intraperitoneal) in an oliveoil suspension (1:1 v/v) in acute experimental group. In chronic experimental group, 0.5 cc/b.w. CCl₄ was given (subcutaneous) in an oliveoil suspension (1:1 v/v) for 45 days. Nothing was given in control group. Malondialdehyde, vitamin C and glutathione were analysed by using spectrophotometric technique. In control group, MDA, vitamin C and glutathione levels were 3.29 ± 0.39 nmol/ml, 0.252 ± 0.051 mg/dl and 32.17 ± 4.9 mg/dl, in acute group, these values were 5.68 ± 0.52 nmol/ml, 0.114 ± 0.018 mg/dl and 15.27 ± 1.1 mg/dl respectively, in chronic group were also 3.65 ± 0.35 nmol/ml, 0.192 ± 0.027 mg/dl, 35.72 ± 2.3 mg/dl, respectively. The MDA, vitamin C and glutathione levels in acute groups were significantly (p<0.05) higher than the levels in control group. There was no difference between chronic group and control group (p>0.05).

Key Words: CCl₄, Lipid peroxidation, Vit C, Glutathione.

Giriş

Karbondiklorür (CCl₄), doku hasarına sebep olan serbest radikalleri üreten bir hepatotoksindir (1,2). Karaciğerde, sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür (3).



Bu radikalin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksi-

dasyon başlatıcısıdır (2,4).



Böylece, üretilen serbest radikaller, karaciğerde antioksidan savunmaları aşarak hücre membranlarının oksidatif yıkımına ve ciddi doku hasarına sebep olur (2, 3,5). Karbon tetraklorürün metabolizması boyunca dokularda ve in vitro mikrozomal sistemlerde triklorometil radikali dışında, lipid dienil, lipid dioksi, lipid

peroksi radikallerine de rastlanmıştır (6). Triklorometil (CCl_3O_2) radikalının diğer radikallerin üre-timinde ilk adım olduğu ve bu radikallerin oluşumu ile fosfolipidlere bağlanma oranının oksijen konsan-trasyonuna bağlı olduğu iddia edilmektedir (7). Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşikler üzerine etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipidler, glikolipidler, gliseritler, doymamış yağ asitleri ve transmembran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir. Radikaller yoğun olarak üretil-diklerinde, aerobik solunumu ve kapillar permea-biliteyi bozar, hücresel potasyum kaybını ve kapillar trombosit agregasyonunu hızlandırırlar (8,9). Ser-best radikallere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği, serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden ve antioksidanlar denilen bazı bileşikler önemli rol oynamaktadır (10). C vitamini organizmada bir çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir anti-oksidadır. Süperoksid ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler (3,11,12). Aynı zamanda çok önemli bir antioksidan olan glutatyon da, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (3). Bu çalışmada akut ve kronik dozda karbon tetraklorürün lipid peroksidasyonu ile güçlü birer antioksidan olan Vitamin C ve Glutasyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Lepus europous ırkı aynı yaş ve yaşam koşullarına sahip, sağlıklı yirmi bir adet tavşan materyal olarak kullanıldı. Tavşanlar yöredeki tavşan üretme çiftliklerinden temin edildi. Bir hafta yeme ve çevreye adaptasyon döneminden sonra denemeye başlandı. Deneme süresince tavşanların beslenmesinde ham protein oranı %18 olan rasyon kullanıldı. Araştırma her biri 7 tavşandan oluşan 3 grup halinde yürütüldü. Akut intoksikasyon grubunu oluşturan tavşanlara tek doz halinde 2ml/kg dozunda karbon tetraklorürün 1:1 oranında zeytinyağındaki süspansiyonu intra peritoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 3 saat sonra EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kronik intoksikasyonu oluşturmak amacıyla diğer gruba ise pazartesi ve perşembe günleri olmak üzere haftada iki defa 0.5 ml/kg dozundaki karbon tetraklorürün zeytinyağındaki süspansiyonu (1:1) derialtı enjekte edildi. Enjeksiyona 45 gün devam edildi. Deneme sonunda

EDTA'lı tüplere kanlar alınarak glutatyon, vitamin C ve MDA miktarları aynı gün tayin edildi. Kontrol grubuna herhangi bir toksik madde verilmedi.

Tüm kandaki glutatyon analizleri Beutler metodu ile (13), Plazma vitamin C tayini 2,4-Dinitrofenilhidrazin ayıracağı kullanılarak (14), MDA konsantrasyonları ise Tiobarbutirik asit reaktivitesi metodu kullanılarak (3) Perkin-Elmer Lambda 1A spektrofotometresinde kolorimetrik olarak ölçüldü. MDA tayininde standart olarak 1,1,3,3 Tetra ethoxypropane çözeltisi kullanıldı. Bulguların istatistiki değerlendirilmesinde t-testi kullanılmıştır (15).

Bulgular

Gruplara ait bulgular ve akut ile kronik toksikasyon oluşturulan grupların kontrol grubu ile istatistiki değerlendirmesi tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1.Elde edilen bulguların istatistiki değerlendirilmesi

	n	Akut Toksikasyon	Kronik Toksikasyon	Kontrol
MDA nmol/ml	7	5.68 ± 0.52*	3.65 ± 0.35	3.29 ± 0.39*
GSH mg/dl	7	15.27 ± 1.1*	35.72 ± 2.3	32.17 ± 4.9*
VitaminC mg/dl	7	0.114 ± 0.018*	0.192 ± 0.027	0.252 ± 0.051*

*p<0.05

Tartışma ve Sonuç

Ratlarda karbon tetraklorür toksikasyonu, özellikle son 25 yıl boyunca, karaciğer yağ dejenerasyonu ve nekrosise sebep olan serbest radikal metabolitleri için bir model sistem olarak gösterilmiştir (2). Doi ve ark. (16), ratlara 2ml/kg CCl_4 'ün 2 ml zeytin yağı içerisindeki süspansiyonunu haftada iki kez peros olarak vermişler ve karbonhidrat metabolizmasında oluşan radikallerin lipid peroksidasyonunu bozarak sirozun oluşumunda önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Harvey ve Klaassen (17) de CCl_4 'ün lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda karaciğer harabiyetine yol açtığını göstermişlerdir. Karaciğer hasarında esas etkili faktörün karbon tetraklorürün organik bir radikali olan karbon trimetil (CCl_3) olduğunu iddia etmişlerdir. Tablo 1 incelendiği takdirde akut dozda karbon-tetraklorür verilen tavşanların kan plazmalarındaki MDA miktarları 5.688nmol/ml iken kontrol grubunda 3.226 nmol/ml ($p<0.05$) olarak bulunmuştur. Kronik CCl_4 intoksikasyonu oluşturulan grubun MDA miktarları ise ort. 3.664 nmol/ml ($p>0.05$)dir. Yüksek

ve tek dozda CCl_4 verilen grupta ise lipid peroksidasyonunun oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşın kronik toksikasyon oluşturulan tavşanların MDA miktarları kontrol grubuna yakın olarak bulunmuştur. Aynı şekilde akut toksikasyon oluşturulan grupta vitamin C ve glutatyon düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede ($p < 0.05$) düşerken kronik toksikasyon oluşturulan grupta önemli bir değişimin ($p > 0.05$) olmadığı görülmektedir.

Akut CCl_4 intoksikasyonunda lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA konsantrasyonlarındaki bu yükseliş, toksitenin birkaç saatlik periyotta geliştiği (18) dikkate alınırsa beklenen sonuçtur. Güçlü bir antioksidan olan vitamin C ve glutatyon miktarlarındaki azalış da bu sonucu destekler mahiyettedir. Akut toksikasyonda yüksek miktarda oluşan serbest radikalleri inhibe edecek yeterli antioksidan temin edilemediğinden, lipid peroksidasyonunun arttığı, kronik toksikasyonda ise artan serbest radikal miktarına paralel olarak bunları etkisiz hale getirmek amacıyla organizma tarafından antioksidan sentezinin de arttığı düşünülebilir.

Kaynaklar

1. Recknagel R.O., Glende E.A. Jr., Hruszkewycz A.M. (1977): In: Pryor W.A. ed. Free radicals in biology, vol. 3, New York: Academic press, 97-132.
2. Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993): Free Radicals in Medicine. Br. Med. Bull. 49 (3) 605-620.
3. Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Konya.
4. Albano E., Lott KAK, Slater T.F., Stier A., Symons M.C.R., Tomasi A. (1982): Spin-trapping studies on the free-radical products formed by metabolic activation of carbontetrachloride in rat liver microsomal fractions isolated hepatocytes and in vivo in the rat. Biochem J. (204)593-603.
5. Packer J.E., Slater T.F., Willson R.L. (1978): Relation of the carbontetrachloride-related peroxy free radical (CCl_3O_2) with aminoacids: pulse radiolysis evidence. Life Sci. 23:2617-2620.
6. Phol L.R., Mico B.A. (1984): Electrophilic halogens as potentially toxic metabolites of halogenated compounds. Trends in Pharm. Sci., (5) 61-64.
7. Frank H., Link B. (1984): Anaerobic metabolism of carbon tetrachloride and formation of catabolically resistant phospholipids. Bio. Pharmacol., (33) 1127-30
8. Aslan R., Şeker R., Bayıroğlu F. (1995): Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. Y.Y.Ü. Sađ. Bil. Derg. (2)137-142.
9. Kavas G. (1989): Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. Türkiye Klinikleri 9(1)1-7.
10. Thomas M.J. (1995): The Role of Free Radicals and Antioxidants. How do we know that they are working? Critical Reviews in Food Sci. and Nutr. 35,21-29.
11. Erenel G., Erbaş D., Arıcıoğlu A. (1992): Radikal-ler ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Derg., 3, 243-250.
12. Bant A., Haenen G.R.M., Doelman C.J.A. (1991): oxidants and antioxidants: state of art, Am. J. Med., 91(3)2-13.
13. Beutler E., Duran O., Kelly B.M. (1963): Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. & Clin. Med. 61(5) 882-888.
14. Natelson S. (1961): Microtechniques of Clinical Chemistry. Springfield, Illinois, USA.
15. Minitab Inc. (1991): 3081 Enterprise Drive, State College.
16. Doi K., Kurabe S., Shimazu N. and Inagaki M. (1991): Systemic Histopathology of Rats with-induced Hepatic Cirrhosis, Laboratory animals 25:21-25.
17. Harvey M.J. and Klaasen C.D. (1983): Interaction of Metals and carbontetrachloride on Lipid Peroxidation and Hepatotoxicity. Toxicol. and App. Pharm., 71,316-322.
18. Frank H., Link B. (1984): Anaerobic metabolism of carbon tetrachloride and formation of catabolically resistant phospholipids. Biochem. Pharmacol., (33), 1127-30.