

Aflatoksin B₁'in tavşan eritrosit, karaciğer, böbrek arginaz aktiviteleri ile serum ALP, AST, ALT düzeylerine etkisi

Yrd.Doç.Dr.İsmail TEMEL*,
Yrd.Doç.Dr.Ahmet ÇIĞLI†,

Yrd.Doç.Dr.Necip İLHAN**,
Yrd.Doç.Dr.Saim YOLOĞLU****,

Yrd.Doç.Dr.Hanifi EMRE***,
Yrd.Doç.Dr.Sacide KARAKAŞ*****

Otuz tavşan A,B,C ve kontrol olmak üzere dört gruba ayrıldı. A,B,C gruplarına üç ay süreyle farklı dozlarda aflatoksin B₁ (AFB₁) verildi. Diğer taraftan kontrol grubu normal besinlerle beslendi. Serum ALP,AST,ALT düzeyleri AFB₁ uygulamasından önce ve sonra tespit edildi. Eritrosit, karaciğer, ve böbrek arginaz aktiviteleri yalnızca AFB₁ uygulamasından sonra ölçüldü. AST ve ALT nin ilk ve son değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemliydi fakat ALP düzeyleri önemsizdi. AST ve ALT düzeylerindeki artış doğrudan AFB₁ dozları ile ilişkiliydi. A,B ve C gruplarındaki eritrosit, karaciğer ve böbrek arginaz aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandı. Yalnızca karaciğer arginaz düzeyi istatistiksel olarak önemli bulundu. Sonuç olarak AFB₁ in çok küçük dozlarının bile etkisini özellikle karaciğer üzerinde gösterdiğini ve hepatosellüler hasara neden olduğu kanısına vardık. AST ve ALT düzeylerindeki artışlar karaciğer arginaz aktivitesiyle paralellik arz etmekteydi. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1(2):88-92,1994]

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, arginaz aktivitesi, serum ALP, AST ve ALT düzeyleri

Effects of aflatoxin B₁ on the erythrocytes, liver, kidney arginase activities and serum ALP, AST, ALT levels of rabbits

30 rabbits were seperated into four groups as A,B,C and control. Aflatoxin B₁ (AFB₁) had been given orally in different doses to the groups A,B,C for three mounths. On the other hand the control group were feeded with normal nutrients. The serum levels of ALP, AST, ALT were determined before and after application of AFB₁ adminstration. The differnces between first and last levels of AST and ALT were significant but levels of ALP were insignificant. The increasing in AST and ALT values were correlated directly with the AFB₁ doses. The arginase activity levels of the erythrocytes, liver and kidney in the groups A, B, C were compared with the control group. Only the liver arginase levels were statistically significant. As a result, we concluded that even minimum dose of AFB₁ shows its effects particularly on the liver and causes the hepatocellular damage. The increasing in AST and ALT levels were correlated with the liver arginase activity. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1(2):88-92,1994]

Key Words: Aflatoxin B₁, arginase activity, serum ALP, AST and ALT levels.

-
- * : İnönü Ün. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı - Malatya
** : Fırat Ün. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı - Elazığ
*** : İnönü Ün. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı - Malatya
**** : İnönü Ün. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalı - Malatya
***** : İnönü Ün. Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı - Malatya

Temel ve ark.

Aflatoxin B₁'in eritrosit, karaciğer, böbrek arginaz aktiviteleri ile serum ALT, AST, ALT düzeylerine etkisi

Küfler doğada hemen her iklim kuşağında yaşayan, özellikle serin ve nemli yerleri seven mantar türleridir. İhtiyaçları olan organik maddeleri kendileri sentezleyemediklerinden hazır besinleri kullanırlar. Ürettikleri mikotoksinlerden dolayı da insan ve hayvan sağlığını tehdit edici potansiyele sahiptirler¹.

Günümüze kadar 250 dolayında mikotoksin varlığı saptanmıştır. Bunlar arasında altı değişik varyantı ile aflatoxinler, üzerinde en çok çalışılan mikotoksin türleridir². Tamamı birer dehidrofuran türevidir olan aflatoxinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türü küf mantarları tarafından üretilir. Çoğunlukla mutajen, karsinojen, teratojen ve bağışıklığı baskılayıcı etkilere sahip oldukları bilinmektedir³.

Aflatoxinler arasında insan ve hayvanlara karşı en kuvvetli toksisiteye sahip olanı AFB₁'dir. Bu bileşiğin DNA zincirine bağlanarak protein sentezini engellediği bilinmektedir⁴.

Uzun süre aflatoxinlerle bulaşık gıdalar yemek ve aflatoxinlerle bulaşık havayı solumak ağır kronik hastalıklara neden olmaktadır. Bunların başlıcaları: Primer karaciğer kanseri, hepatitis, siroz, kolon ve akciğer kanserleri ile çeşitli hematolojik bozukluklardır⁵.

Çalışmamızda AFB₁'in çeşitli dokularda oluşturduğu hasarı saptamak üzere anahtar enzim olarak arginaz seçilmiştir. Arginaz başta karaciğer olmak üzere eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, beyin, barsak, böbrek, tiroid ve tükürük bezleri, plasenta, deri ve testislerde az yada çok aktif olarak bulunan bir enzimdir⁶.

Arginaz (L-Arginin Amidinohidrolaz EC: 3.5.3.1) oldukça spesifik bir enzim olup doğal substratı L-Arginindir. Arginini üre ve ornitine parçalayarak etki eder. Optimal pH'sı 9.4 ila 9.8 arasındadır⁷.

Enzimin maksimum aktiviteye ulaşabilmesi için kofaktör olarak Mn²⁺ iyonlarına ihtiyaç vardır. Diğer iki değerlikli metal iyonları ile aynı düzeyde aktiviteye erişilmemektedir^{8,9}.

Klinik açıdan arginaz enzim aktivitesindeki eksiklik çok nadir görülen bir hastalık olan hiperargininemiye yol açmaktadır. Tersine kanser ve infarktüs gibi bazı hastalık gruplarında ise serum arginaz aktivitelerinin normalin birkaç misli arttığı bildirilmiştir^{10,11}.

MATERYAL VE METOD

Araştırmada sağlıklı ve bir yaşından küçük 30 tavşan kullanıldı. Sekizer tavşandan ibaret üç çalışma grubu (A,B,C) ve altı tavşandan ibaret bir kontrol grubu (K) oluşturuldu. Kontrol grubundakilere sırasıyla 0.01; 0.0075; 0.005 mg/kg/gün AFB₁ oral olarak, yiyeceklere katılarak verildi. Doz seçiminde Clark ve arkadaşlarının belirlediği subtoksik doz ile bunun 1.5 ve 2 katı dozlar kullanıldı¹².

Üç ay süreyle devam eden bu uygulamanın başında ve sonunda tavşanların kulak venlerinden alınan kan örneklerinde serum ALP, AST, ALT düzeyleri çalışıldı. Bu amaçla Beckman Synchron CX4 otoanalizör sistemi ve rutin test kitleri kullanıldı. Ayrıca uygulama sonunda tüm tavşanlardan EDTA'lı kan örnekleri alınarak bunun küçük bir miktarı Drabkin yöntemiyle Hb tayininde kullanıldı¹³. Geri kalan büyük kısım 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları uzaklaştırıldı.

Toplanan eritrositler üç kez serum fizyolojik (SF) ile yıkandıktan sonra 2.5 mM MnCl₂ ilavesiyle orjinal hacimlerine tamamlandı. Alt üst edilerek iyice karışmaları ve tamamen hemolize olmaları sağlandı. Elde edilen hemolizatlarda aynı gün thiosemicarbazide diasetil monoxime urea (TDMU) yöntemi ile eritrosit arginaz aktiviteleri çalışıldı¹⁴.

Sonraki aşamada tavşanlar "Pentothal, Ether" anestezisi ile uyutularak batin ve göğüs kafesleri açıldı. Karaciğer ve böbrekleri çıkarıldı. SF ile perfüze edilip yıkandıktan sonra uygun kaplara konularak -20°C de korumaya alındı. Sonraki günlerde doku çalışmalarına başlamadan bir gece önce örnekler derin dondurucudan çıkarılarak buzdolabına yerleştirildi ve yavaş yavaş çözünmeleri sağlandı. Tekrar SF ile yıkandıktan sonra küçük parçacıklar şeklinde kesilen doku örneklerinden ikişer gram tartılarak buz içerisinde oturtulmuş beherlere aktarıldı. Beherlere 20 ml 2.5 mM MnCl₂ ilave edilerek dokular tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Homojenatlar 0°C'de 15.000 g'de 20 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantları ayrı ayrı tüplerde toplandı.

En son aşamada süpernatantlardan Lowry yöntemi ile doku protein analizleri ve TDMU yöntemi ile arginaz aktiviteleri tayin edildi¹⁵.

Elde edilen bulgular denek sayısına uygun düşen

Temel ve ark.

Aflatoxin B₁'in eritrosit, karaciğer, böbrek arginaz aktiviteleri ile serum ALP, AST, ALT düzeylerine etkisi

non parametrik istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirildi.

BULGULAR

Serum ALP, AST, ALT düzeylerinin ilk ve son değerleri arasındaki fark "Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi" kullanılarak analiz edildi. ALP düzeylerindeki fark tüm gruplarda önemsiz bulundu. AST ve ALT düzeylerindeki fark sadece C grubunda önemsiz bulunurken A ve B gruplarındaki farkta anlamlı artışlar görüldü (Tablo I). Doku arginaz aktivite düzeylerindeki değişimi ortaya koymak için gruplar arası varyans analizi uygulandı, sonuçlar Tablo II'de gösterildi. Bu maksatla yapılan "Kruskal Wallis Varyans Analizi" sonucu sadece karaciğer arginaz aktivite düzeyindeki değişimler önemli bulundu ($p < 0.05$).

Karaciğer arginaz aktiviteleri arasındaki anlamlı farkın hangi grup yada gruplardan kaynaklandığını saptamak için "Mann Whitney U Testi" uygulandı, sonuçlar Tablo III'de gösterilmiştir. Bu tabloda kontrol grubu ile A grubu; kontrol grubu ile B grubu; ve A grubu ile C grubu arasındaki değişimlerin anlamlı olduğu görülürken ($p < 0.05$) diğer gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı saptandı.

Serum AST, ALT düzeyleri ile karaciğer arginaz aktiviteleri arasındaki ilişkiyi incelemek üzere korelasyon analizi uygulandı, sonuçlar Tablo IV'de gösterildi. Bu sonuçlara göre karaciğer arginazının hem AST hemde ALT artışlarıyla orta derecede pozitif bir korelasyona sahip olduğunu göstermektedir. ALT ile olan korelasyon AST korelasyonundan daha kuvvetli görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada AFB₁ in serum ALP, AST, ALT düzeylerine etkisi, AFB₁ uygulamasından sonra elde edilen değerlerin uygulama öncesi bulunanlarla kıyaslanarak açıklanmaya çalışılmıştır. Doku arginaz aktiviteleri üzerine etkisi ise; AFB₁ verilen ve verilmeyen gruplardan elde edilen sonuçların birbiriyle kıyaslanmasıyla ortaya konulmağa çalışılmıştır.

DeneySEL bulguların istatistiksel analizlerinden ortaya çıkan sonuç: AFB₁ in çok küçük dozlarda bile karaciğer üzerinde hasar oluşturduğu yönündedir. Serum AST, ALT düzeylerindeki anlamlı artışlar ve doku arginaz aktivitelerinden yalnızca karaciğer arginazında anlamlı artış bulunması da bu kanaati

doğrulamaya niteliktedir.

Serum ALP düzeylerindeki artış, beklenenin aksine anlamsız bulunmuştur. Bu konuda tavşanların çoğunun henüz kemik gelişim sürecini tamamlamadığının etkili olduğunu sanmaktayız.

Benzer çalışmalarda Ugarte ve ark¹⁶, ları CCL₁ vererek akut karaciğer hasarı oluşturdukları köpeklerde karaciğer arginaz aktiviteleri ve serum AST düzeylerinde önemli artışlar saptamışlardır. Türkoğlu¹⁷ nun çalışmasında CCL₁ enjekte edilerek siroz oluşturulan sıçanların karaciğer arginaz aktivitelerinde önemli azalmalar bulunmuştur. Aynı çalışmada serum AST ve ALT düzeylerinde anlamlı artışlar olduğu tespit edilmiştir.

Fasciola hepatica enfeksiyonu sonucu siroz oluşan sığır karaciğer dokularında çalışan Ozan¹⁸ arginaz aktivitelerinde önemli azalmalar bulmuştur. Plazma AST düzeylerinde azalma, ALT düzeylerinde ise artış saptamıştır.

Burada vurgulanması gereken önemli bir nokta: gerek Türkoğlu gerekse Ozan araştırmalarını sirozlu doku örneklerinde gerçekleştirmişlerdir. Oysa Ugarte ve bizim çalışmalarımızda hepatosellüler hasar oluşturulan örnekler kullanılmıştır. Ayrıca çalışmamızda kullanılan dozlar ve uygulama şekli de kısa sürede siroz oluşturmaya yetmeyecek durumdadır.

Bulgularımızda kontrol grubu tavşanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da AST ve ALT düzeylerinde bir miktar artış mevcuttur. Bunun kontrol grubu içindeki tavşanlardan bazılarının aşırı yüksek sonuçlarından kaynaklandığını ve ortalamayı yükselttiğini sanmaktayız.

Tavşanların tamamı ayrı kafeslerde beslenmelerine rağmen aynı odayı paylaşmaları nedeniyle kontrol grubu tavşanların da havaya karışan AFB₁ partüküllerinden etkilendiğini sanmaktayız. Hayes ve ark¹⁹, larının aflatoxinli havayı soluyan kişilerde karaciğer ve solunum yolu kanserlerinin görüldüğünü belirten araştırmaları da bu düşüncemizi desteklemektedir.

Grupların eritrosit ve böbrek arginaz aktivitelerinin irdelenmesinden çıkarılan sonuç: kullanılan AFB₁ dozlarının ve süresinin karaciğer dışı dokularda hasar oluşturacak düzeye ulaşmadığı yönündedir (Tablo II). Karaciğer arginaz aktivitelerinde ise; uygulanan doza bağlı olarak kontrol grubu ile A grubu, kontrol grubu ile B grubu ve A grubu ile C grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur (Tablo III). Birbirine

Temel ve ark.

Aflatoxin B₁'in eritrosit,karaciğer,böbrek arginaz aktiviteleri ile serum ALT,AST,ALT düzeylerine etkisi

Tablo I. AFB₁ uygulamasından önce ve sonra serum ALP, AST, ALT düzeyleri

Test	Gruplar	n	Önce (X±SD)	Sonra (X±SD)	Fark (X±SD)	t	p
ALP U/L	A	8	103.5±24.17	119.25±17.51	15.75±18.15	13	> 0.05
	B	8	90.38±14.83	88.38±9.87	2.00±11.47	17	> 0.05
	C	8	133.38±21.79	120.25±16.35	13.13±12.38	12	> 0.05
	Kontrol	6	101.17±14.16	114.83±14.13	13.67±6.72	3	> 0.05
AST U/L	A	8	36.63±4.89	66.63±17.70	30.00±15.69	3	< 0.05
	B	8	31.50±4.20	42.75±5.19	11.25±3.63	1	< 0.05
	C	8	28.38±2.16	43.13±8.62	14.75±7.48	3	< 0.05
	Kontrol	6	60.17±19.38	68.17±25.11	8.00±18.25	7	> 0.05
ALT U/L	A	8	52.38±5.98	88.63±14.45	36.25±12.89	2	< 0.05
	B	8	53.00±9.65	85.38±10.99	32.38±7.02	0	< 0.05
	C	8	48.00±5.40	68.50±7.09	20.50±4.77	1	< 0.05
	Kontrol	6	57.00±8.83	86.33±21.16	29.33±17.24	4	> 0.05

Tablo II. Doku arginaz aktivitelerinin gruplar arası değişimi

Doku	A grubu X±SD n=8	B grubu X±SD n=8	C grubu X±SD n=8	Kontrol X±SD n=6	KW	p
EA	36.65±1.43	36.75±1.53	37.58±1.28	38.02±1.09	0.999	> 0.05
KA	1.91±0.08	1.86±0.13	1.64±0.08	1.46±0.07	9.563	< 0.05
BA	0.17±0.18	0.15±0.13	0.15±0.11	0.14±0.19	0.050	> 0.05

EA : Eritrosit arginaz aktivitesi= Ünite/gr.Hb.dakika

KA : Karaciğer arginaz aktivitesi= Ünite/mg.protein dakika

BA : Böbrek arginaz aktivitesi= Ünite/mg.protein dakika

Tablo III. Karaciğer arginaz aktivitelerinin gruplar arası değişimi

Birinci grup : X±SD	İkinci grup : X±SD	U	p
Kontrol (n=6) : 1.46±0.07	A grubu (n=8) : 1.91±0.08	45.00	< 0.05
Kontrol (n=6) : 1.46±0.07	B grubu (n=8) : 1.86±0.13	42.00	< 0.05
Kontrol (n=6) : 1.46±0.07	C grubu (n=8) : 1.64±0.08	34.00	> 0.05
A grubu (n=8) : 1.91±0.08	B grubu (n=8) : 1.86±0.13	36.00	> 0.05
A grubu (n=8) : 1.91±0.08	C grubu (n=8) : 1.64±0.08	50.50	< 0.05
B grubu (n=8) : 1.86±0.13	C grubu (n=8) : 1.64±0.08	41.00	> 0.05

Tablo IV. Karaciğer arginaz aktivitesi ile AST, ALT ilişkisi

Parametreler	n	r	Sr (α:0.05)	İlişkinin yönü
Arginaz - AST	30	0.545	± 0.306	+
Arginaz - ALT	30	0.699	± 0.306	+

yakın dozda AFB₁ alan gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Karaciğerin arginaz aktivitesi yönünden en zengin doku olması ve AFB₁ in karaciğerde detoksifiye edilmesi özellikle bu dokunun etkilenmesini sağlayan sebeplerin

başlıcalarıdır.

Çalışmamızda serum AST ve ALT düzeylerindeki artış ile karaciğer arginaz aktivitelerindeki artış kıyaslandığında aralarında pozitif bir ilişkinin olduğu görülmektedir (Tablo IV).

Temel ve ark.

Aflatoxin B₁'in eritrosit, karaciğer, böbrek arginaz aktiviteleri ile serum ALT, AST, ALT düzeylerine etkisi

Bu çalışmada parametrik test varsayımları yerine getirildiği halde, uygulanan doza bağlı olarak gruplara düşen denek sayısının az olması nedeniyle "Nonparametrik İstatiksel Analiz Yöntemleri" kullanılmıştır²⁰.

Sonuç olarak diyebiliriz ki: AFB₁ çok küçük dozlarda dahi özellikle karaciğer üzerinde hasar oluşturucu etkiye sahiptir. Kullanılan doz ve kullanma süresine bağlı olarak bu etki artmaktadır. Besinlerimizin bu tür maddelerle kirlenmesinin önlenmesi gerekir.

KAYNAKLAR

1. Alperden İ. Küfler ve mikotoksinlerin insan sağlığına etkileri. In: Alperden İ, editör. Gıdalarda küfler ve mikotoksinler araştırma projesi III. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Yayınları Gebze - Kocaeli 1985; 1 - 17.
2. Ciegler A. Mycotocxins - Occurance, Chemistry and Neurological Activity. Lloydia. 1975; 38:21-35.
3. Eke D. Toksik küfler üretilmeleri ve toksin belirlenmesi. In: Alperden İ, editör. Gıdalarda küfler ve mikotoksinler araştırma projesi III. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Yayınları. Gebze-Kocaeli 1985;88-92.
4. Nyathi CB, Dube N, Hasler JA, Obwolo MJ, Fuhrman H, Sallman HP. The effect of diet on aflatoxin B₁ binding to hepatic macromolecules in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993; 82 (2): 199 - 207.
5. Daniels JM, Matula TI, Massey TE. DNA binding and mutagenicity of aflatoxin B₁ catalyzed by isolated rabbit lung cells. Carcinogenesis 1993; 14 (7): 1429 - 34.
6. Aminlari M, Vaseghi T. Arginase distribution in tissues of domestic animals. Comp Biochem Physiol B 1992;103(2):385 - 9.
7. Aminlari M. A novel colorimetric method for assaying arginase activity. Clin Biochem 1992;25 (6): 431-6.
8. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T. Purification and properties of human erythrocyte arginase. Ann Clin Biochem 1989; 26: 547-53.
9. Kang JH, Cho YD. Purification and properties of arginase from soybean, glycine max axes. Plant Physiol 1990; 93:1230-4.
10. Uchino T, Haraguchi Y, Aparicio JM, Mizutani N, Higashikawa M, Naitoh H, et al. Three novel mutations in liver-type arginase gene in three unrelated Japanese patients with argininemia. Am J Hum Genet 1992;51(6):1406-12.
11. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Regula A. Can arginase be a marker of the larg bowel neoplasia? Acta Biochem Pol 1993;40(1):160-3.
12. Clark JD, Greene EC, Calpin JP, Hatch RC, Jain VA. Induced aflatoxocosis in rabbits: blood coagulation defects. Toxicology and applied farmacology 1986;86:353-61.
13. Henry JB. Clinical Diagnosis Management By Laboratory Methods. 18th ed. W.B. Saunders Comp. Philadelphia 1991;557.
14. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal Biochem 1971;39:412-7.
15. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-
16. Ugarte G, Pino ME, Peirano P, Marusic E. Serum arginase activity in subjects with hepatocellular damage. J Lab Clin Med 1960;55 (4):522-6.
17. Türkoğlu C. Studies on somehepatic urea cycle enzymes and pyrimidine biosynthesis in CCl₄ injected rats. Middle East Thecnical University Ph D thesis. Ankara. 1985.
18. Ozan S, Gülen Ş. Facsiola hepatica enfeksiyonu sonucu oluşan sirotik sığır karaciğer ve plazmalarında bazı aminoasit metabolizması enzim düzeyleri üzerinde çalışmalar. Fırat Ün. Sağlık Bilimleri Dergisi 1987;1(A):113-26.
19. Hayes RB, Van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Tenkate FJW. Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. Fd Chem Toxocol 1984;22:39-43.
20. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik 3. baskı Hatipoğlu Yayınevi. Ankara. 1990.

Yazışma adresi: Yrd.Doç.Dr. İsmail TEMEL
İnönü Ün. Tıp Fakültesi Biyokimya ABD
44300 MALATYA