

YÜKSEK DOZDA GENTAMİSİN VERİLEN RATLARDA KARACİĞER VE BÖBREK ARGİNAZİ ÜZERİNE MANGANEZ KLORÜRÜN ETKİLERİ

Fulya BENZER¹ Ahmet ATEŞŞAHİN² İzzet KARAHAN²

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ - TÜRKİYE

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 23. 01. 2006 Kabul Tarihi: 26. 05. 2006

ÖZET

Bu çalışma, yüksek dozda gentamisin verilen ratlarda manganez klorür ($MnCl_2$)'ün karaciğer ve böbrek arginazı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Erişkin 36 adet Wistar Albino rat 6 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol, ikinci gruba tek başına gentamisin (gentamisin sülfat 100 mg/kg, i.p.), üçüncü ve dördüncü gruplara tek başına $MnCl_2$ (sırasıyla, 2 ve 20 mg/kg, i.p.), beşinci ve altıncı gruplara ise gentamisin ile birlikte $MnCl_2$ 'in iki farklı dozu 6 gün süreyle verildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra ratlardan alınan karaciğer ve böbrek örneklerinde arginaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

Karaciğer ve böbrek dokusu arginaz aktiviteleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin verilen gruplarda arttığı görüldü. $MnCl_2$ 'in düşük dozu karaciğerde arginaz aktivitesini kontrole göre artırırken ($p<0.001$), yüksek dozda aktiviteyi değiştirmede ($p>0.05$). Buna karşılık böbrekte $MnCl_2$ 'in hem düşük, hem de yüksek dozunun arginaz aktivitesini artırdığı belirlendi ($p<0.001$). Gentamisin ile birlikte verilen $MnCl_2$ ise hem karaciğerde, hem de böbrekte arginaz aktivitesini artırdı. Karaciğerde gentamisin ile birlikte uygulanan düşük doz $MnCl_2$ 'ün arginaz aktivitesini ($p<0.001$), yüksek doz $MnCl_2$ 'e göre daha fazla artırdığı görüldü ($p<0.001$).

Sonuç olarak, yüksek dozda gentamisin uygulamaları sırasında oluşan hasarın azaltılması bakımından düşük miktarlarda manganez uygulamasının arginaz aktivitelerini arttırmak suretiyle iyileşmeye yardımcı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, Gentamisin, Manganez klorür, Karaciğer, Böbrek.

ABSTRACT

The Effect of Manganese Chloride on Liver and Kidney Arginase Activity in Rats Given High Dose Gentamicin

The aim of this study was to investigate the effect of manganese chloride ($MnCl_2$) on liver and kidney arginase activities in rats given a high dose of gentamicin. Thirty six Wistar Albino rats were divided into 6 groups as follows: Group 1 was control group; Group 2: received gentamicin alone (gentamicin sulphate 100 mg/kg i.p.); Group 3 and 4: received $MnCl_2$ alone (2 mg/kg i.p. and 20 mg/kg i.p.); Group 5: received gentamicin (100 mg/kg i.p.) and $MnCl_2$ (2 mg/kg i.p.), Group 6: received gentamicin (100 mg/kg i.p.) and $MnCl_2$ (20 mg/kg i.p.). Injections were repeated daily for 6 days. Twenty four hours after the last injections samples were kidney and liver collected in rats and arginase activities were spectrophotometrically detected.

Arginase activities of liver and kidney tissues of groups receiving gentamicin ($p<0.001$) were higher than control group. The lower dose of $MnCl_2$ significantly increased liver arginase activity ($p<0.001$) compared to control rats, but the higher dose did not effect ($p>0.05$). On the other hand, both low and high doses of $MnCl_2$ increased kidney arginase activity ($p<0.001$) compared to control group. Administration of together with gentamicin and $MnCl_2$ increased arginase activities in both tissues. The low dose of $MnCl_2$ administered together with gentamicin caused more elevation ($p<0.001$) than high dose ($p<0.001$).

In conclusion, it was suggested that tissue damage in administrations of high dose gentamisin could be reduced through increased arginase activity by administration of low dose manganese.

Key Words: Arginase, Gentamicin, Manganese chloride, Liver, Kidney

GİRİŞ

Klinikte yaygın olarak kullanılan bazı ilaçlar böbrekler üzerinde toksik etkilere sahiptirler. Bunların başlıcaları aminoglikozid antibiyotikler, nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve birçok antineoplastik ajanlardır (1). Gentamisin önemli bir aminoglikozid antibiyotik olup, insan ve hayvanlarda başta Gram (-) bakteriler olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı kullanılır. Terapötik dozlarda da böbrek hasarına neden olabilen bu ilaçları kullanan hastaların yaklaşık %20'sinde akut böbrek yetmezliği görülebilmektedir (2-4).

L-arginin nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi tarafından nitrik oksid (NO)'e, arginaz tarafından ise üre ve ornitine metabolize edilir ve yangısal olaylarda bu iki yol yarışma halindedir. Yangısal olaylarda sitotoksik ve vazodilatatör etkili NO ile matriks sentezi ve hücre proliferasyonunu teşvik eden ornitin arasında bir denge vardır (5). Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininin ornitin ve üreye hidrolizini katalizleyen bir enzimdir (6). Üre döngüsünün tüm enzimlerini içeren karaciğer hem üre sentezinin, hem de arginaz aktivitesinin en yoğun olduğu organdır (7). Karaciğer dışında arginaz enzimine böbrek, bağırsak, beyin, akciğer, kalp, dalak, iskelet kası, eritrosit, fibroblast, makrofaj ve tükrük bezleri gibi nonüreotelik dokularda düşük düzeylerde rastlanılmaktadır (8-11).

Bir metalloenzim olan arginazın, tam aktivite gösterebilmesi, alt birimlerine ayrılmaması ve kuvaterner yapısının şekillenmesi için her alt birimin bir mol manganey (Mn^{+2}) içermesi gerekmektedir (6,12).

Bu çalışma, yüksek dozda gentamisin verilen ratlarda düşük ve yüksek dozlarda $MnCl_2$ uygulamasının karaciğer ve böbrek dokusunda arginaz aktiviteleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan Wistar Albino cinsi ratlar Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı. Plastik kafeslerde standart şartlar altında beslenen ratlara yem ve su ad libitum olarak verildi. Ratlar her grupta 6 rat olacak şekilde altı eşit gruba ayrıldı.

Kontrol grubu : 6 gün boyunca periton içi 0.5 ml serum fizyolojik verildi.

Gentamisin grubu: Bu gruptaki ratlara 0.5 ml serum fizyolojik içinde 100 mg/kg dozunda gentamisin sülfat periton içi olarak 6 gün boyunca enjekte edildi.

Manganez grubu (düşük doz): Bu gruptaki ratlara 0.5 ml serum fizyolojik içinde 2 mg/kg $MnCl_2$ periton içi olarak 6 gün boyunca enjekte edildi.

Manganez grubu (yüksek doz): Bu gruptaki ratlara 0.5 ml serum fizyolojik içinde 20 mg/kg $MnCl_2$ periton içi olarak 6 gün boyunca enjekte edildi.

Gentamisin + Manganez grubu (düşük doz): Bu gruptaki ratlara 0.5 ml serum fizyolojik içinde 100 mg/kg gentamisin sülfat ve 2 mg/kg $MnCl_2$ periton içi olarak 6 gün boyunca enjekte edildi.

Gentamisin + Manganez grubu (yüksek doz): Bu gruptaki ratlara 0.5 ml serum fizyolojik içinde 100 mg/kg gentamisin sülfat ve 20 mg/kg $MnCl_2$ periton içi olarak 6 gün boyunca enjekte edildi.

Son enjeksiyondan 24 saat sonra bütün gruplardaki hayvanlar dekapite edilerek böbrek ve karaciğer dokuları alındı ve analizler yapılana kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. Doku örnekleri soğuk serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile yıkanarak iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra 1 g olarak tartılıp, 4 mM $MnCl_2$ (1/10, w/v) ilavesinden sonra kırılmış buz içerisinde (Potter-Elvehjem, cam-cam) homojenizatörle homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 21 000 g'de $+4^{\circ}C$ 'de 15 dakika santrifüje tabii tutuldu (13) ve işlemde sonra pelletler atılarak süpernatantlar alınıp, enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Dokulardaki arginaz aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim-Üre (TDMU) metodu (14) ile ölçülmesi sonucu saptandı. Protein miktarının ölçümünde ise Lowry (15) metodu kullanıldı.

Çalışmada spesifik aktivite, 1 saatte, $37^{\circ}C$ 'de, L-argininden 1 μ mol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesi olup, μ mol üre/mg protein/saat olarak tanımlanmaktadır. Elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları sunulmuştur. Gruplar arasında karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında ise Duncan testi uygulandı ($p < 0.001$).

BULGULAR

Karaciğer ve böbrek dokusu arginaz aktiviteyi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (sırasıyla 135.73±7.11, 15.25±1.54, p<0.001) gentamisin verilen gruplarda (sırasıyla 320.47±20.12, 36.10±1.37, p<0.001) arttığı belirlendi. Kontrolle karşılaştırıldığında karaciğerde MnCl₂'in düşük dozu arginaz aktivitesini (465.40±77.77, p<0.001) artırırken, yüksek dozu aktiviteyi (181.07± 15.45, p>0.05) değiştirmedir.

Buna karşılık böbrekte MnCl₂'in hem düşük, hem de yüksek dozu arginaz aktivitesini (sırasıyla 37.87±4.86, 41.25±2.86, p<0.001) arttırdı. Karaciğerde gentamisin ile birlikte uygulanan düşük dozu MnCl₂'ün arginaz aktivitesini (893.67±66.65, p<0.001), yüksek dozu göre (505.47±38.05, p<0.001) daha fazla artırdığı belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Kontrol ve deneme grubu ratlarda karaciğer ve böbrek arginaz aktivitesi (U/mg protein).

| Gruplar | Karaciğer | Böbrek |
|--|-----------------------------|---------------------------|
| Kontrol | 135.73 ± 7.11 ^a | 15.25 ± 1.54 ^a |
| Gentamisin | 320.47 ± 20.12 ^b | 36.10 ± 1.37 ^b |
| Mn ⁺² (2 mg/kg) | 465.40 ± 77.77 ^c | 37.87 ± 4.86 ^b |
| Mn ⁺² (20 mg/kg) | 181.07 ± 15.45 ^a | 41.25 ± 2.86 ^c |
| Gentamisin + Mn ⁺² (2 mg/kg) | 893.67 ± 66.65 ^d | 45.15 ± 2.44 ^c |
| Gentamisin + Mn ⁺² (20 mg/kg) | 505.47 ± 38.05 ^c | 50.30 ± 6.65 ^c |

^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.001).

TARTIŞMA

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan ve genellikle metal iyonlarından meydana gelen yan gruplarına kofaktör denir. Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn⁺² kationlarının gerekli olduğu Muszynska (16) tarafından bildirilmiştir. Mn⁺² kationlarının enzime bağlanması, ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimin inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır.

Arginaz enzimi üzerine Mn⁺² kationlarının etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda dokular için Mn⁺² konsantrasyonlarının farklı olduğu ve genellikle 1-5 mM arasında değiştiği tespit edilmiştir (17-20).

Yapmış olduğumuz çalışmada Mn⁺² ilavesinin arginaz aktivitesini hem karaciğer, hem de böbrek dokusunda artırması ve karaciğerde bu artışın düşük konsantrasyonlarda daha fazla olması yukarıdaki çalışmalarla uyum göstermektedir.

Biyolojik sistemlerde arginaz enziminin önem taşıdığı başlıca metabolik yollar, üre döngüsü, prolin ve poliaminlerin biyosentez yolu ve sitotoksik NO radikalini sentezleyen NOS enzimiyle paylaştığı substrat için girdiği yarışma yoludur (21).

Yangısal olaylarda sitotoksik ve vazodilatör etkiye sahip olan NO ile hücre proliferasyonunda ve matriks sentezinde rol oynayan L-ornitin arasında bir denge vardır. Deneysel glomerulo-

nefritis olgularında NOS'un aktive edildiği gösterilmiştir. Cook ve ark. (5) tarafından yapılan çalışmada deneysel glomerulonefritis oluşturularak argininin metabolizması ve NOS ile arginaz arasındaki etkileşim incelenmiştir. NOS ve arginaz enzim aktiviteyi arasında geçici değişimler görülmüş ve bu geçici değişimlerin ya L-arginin substratı için yarıştan, ya da hücreler farklılıktan olabileceği görüşüne varılmıştır.

Arginaz L-arginini NOS ile ortak substrat olarak kullanır ve yangı bölgesinde her iki enzim de aktiftir. Arginazın regülasyonunu ve NO üretimiyle ilişkisini anlamak için Waddington ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada, ratlarda immuno glomerulonefritis sırasında glomerullar tarafından sentezlenen üre ve nitrit üzerine hidroksi L-arginin (HOArg) ve İnterlökin-4 (IL-4)'ün etkileri araştırılarak makrofaj ve glomerular mezenşyal hücrelerle karşılaştırılmıştır. Üre üretimi HOArg tarafından inhibe edilirken, IL-4 tarafından aktive edilmiştir. NO inhibisyonu nefrotik glomerullarda ve makrofajlarda arginaz aktivitesini artırmış, fakat mezenşyal hücrelerde artırmamıştır. Nitrit sentezi IL-4 tarafından inhibe edilmiştir. Yangı sırasında bu iki endojen bileşiğin farklı cevaplar verdiği yani NOS baskılandığı zaman arginazın uyarıldığı veya arginaz baskılandığı zaman NOS'ın uyarıldığı görülmüş ve bu durumun yangı ve onarım mekanizmasındaki dengenin kontrolü için gerekli olabileceği kanaatine varılmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada (23) arginazın iki izoformunun bulunduğu, bunlardan Arginaz I (AI)'in karaciğere özgü olduğu, Arginaz II (AII)'nin ise her yerde olduğu ve fonksiyonunun tam olarak bilinmediği bildirilmiştir. Arginazlar üre üretimi dışında yangı bölgesinde de bulunurlar. Yangı bölgesinde arginazın rolü tam olarak bilinmemektedir, fakat apoptosisin düzenlenmesinde, NO üretiminde, yapısal ve hücrel proteinlerin üretiminde öncül madde olarak görev yaptıkları düşünülmektedir. Glomerulonefritis olgularında nefritik glomerullarda yara iyileşmesini takiben arginaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

Jansen ve ark. (24) tarafından nefritik glomerulolarda arginin metabolizmasının araştırıldığı çalışmada nitrit üretimini en önemli kaynağının makrofajlar olduğu, arginazın glomerullarda mevcut olduğu ve glomerulonefritis olaylarında NOS ile substrat için yarıştığı öne sürülmüştür. Bu amaçla nefritik glomerullarda ve peritoneal makrofajlarda iki yolun varlığı kontrol edilmiş, glomerulitis olgularındaki nefritik glomerullarda kontrollerle karşılaştırıldığı zaman arginazın % 500 oranında arttığı ve bu artışın NOS artışının çok üstünde olduğu gösterilmiştir. NOS ve arginaz arasındaki bu yarışın glomerulonefritis olgularındaki iyileşme ve hasarın patogenezesinde düzenleyici bir rol oynadığı söylenebilir.

Gentamisin ve $MnCl_2$ 'in karaciğer ve böbrek arginaz aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada $MnCl_2$ 'in arginaz aktivitesini düşük dozlarda artırıp, yüksek dozlarda inhibe etmesi mevcut çalışmalarla uyumludur. Ancak böbrek

dokusunda yüksek dozunun da aktiviteyi arttırması, bu çalışmalarla tezat teşkil etmiş olsa da sonuç olarak bu durum Mn^{+2} 'in arginazın bir aktivatörü olduğu tekrar göstermektedir.

Ayyıldız ve ark. (25) tarafından yapılan çalışmada saflaştırılmış sığır karaciğer arginaz enzimi üzerine 1-8 mM konsantrasyonlarında gentamisin uygulanmış ve gentamisinin arginaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda gentamisinin arginaz aktivitesi üzerine direkt etkisine değil, yüksek dozda gentamisin uygulanmasının hasarlı dokudaki arginaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldı. Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı gibi arginaz, yangı bölgesinde NOS yolunu baskılaması hücre proliferasyonu ve matriks üretimi için gerekli olan poliaminler ve prolin sentezini uyarması açısından gereklidir.

Gentamisinin uygulamasının özellikle böbreklerde hasara sebep olduğu (2-4), böbrekteki yangının iyileşme aşamasında arginaz aktivitesinin arttığı (24) ve enzimdeki aktivite artışının $MnCl_2$ tarafından uyarıldığı (17-20) deneysel çalışmalarla ispatlanmıştır. Gentamisin uygulamasının böbreklerde oluşturduğu hasar histopatolojik olarak Ateşşahin ve ark. (2) tarafından da doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada, antibiyotik tedavisi sırasında oluşan karaciğer ve böbrek hasarının azaltılması için özellikle düşük dozda $MnCl_2$ uygulanmasının arginaz enzim aktivitesini arttırmak suretiyle iyileşmeye yardımcı olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Garella S. Drug-induced renal disease. Hosp Pract 1993; 28 (4): 129-140.
2. Ateşşahin A, Karahan I, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Pirincci I. The effect of manganese chloride on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Pharmacol Res 2003; 48 (6): 637-642.
3. Ali BH, AL-Qarawi AA, Mousa HM. The effect of calcium load and the calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. Food Chem Toxicol 2002; 40 (12): 1843-1847.
4. Walker Pd, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. J Clin Invest 1988; 81: 334-341.
5. Cook HT, Jansen A, Lewis S, Lagen P, O'Donnell M, Reaveley D, Cattell V. Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: Interaction between nitric oxide synthase and arginase. Am J Physiol 1994; 267 (4 Pt 2): F646-653.
6. Powears SG, Meister T. Urea synthesis and ammonia metabolism. In: Arias I, Popper H, Schachter D and Shafrits DA. (Editors). The Liver: Biology and Pathobiology. Newyork: Raven Press, 1982: 251-263.
7. Herzfeld A, Raper SM. The heterogeneity of arginases rat tissues. Biochem J 1976; 153 (2): 469-478.

8. Aminlari M, Vaseghi T . Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp Biochem Physiol* 1992; 103 (2): 385-389.
9. Chen PC, Broome JD . Mouse macrophage arginase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980; 163 (3): 354-359.
10. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T, Totani M. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 547-553.
11. Nikumb SK, Santhanam K, Rao MV. Hepatic and serum arginase and ornithine transcarbamylase activities of rats maintained on diets of different protein quality. *Ann Nutr Metab* 1987; 31 (6): 387-394.
12. Muszynska G, Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979; 10 (8): 665-668.
13. Ozan S, Gülen Ş. Farklı türlerin organlarında bulunan arginazların metilen mavisi ile fotoinaktivasyonları. *Doğa Tr J Biology* 1991; 15: 222-229.
14. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39 (2): 412-417.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 (1): 265-275.
16. Muszynska G. Immobilization of rat liver arginase. *C.I Biospecific Chromatography. Protides of the Biological Fluids 23 RD. Colloquim. Oxford and New York. Pergamon Press, 1976: 633-637.*
17. Hus-Citharel A, Levillain O. Identification of two arginase isoenzyme activities along the nephron of *Meriones shawi*. *Pflugers Arch* 1999; 437 (3): 423-431.
18. Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri, Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
19. Erişir M, Ozan S. Sığır Rumen doku arginazının saflaştırılmasından önce ve saflaştırılmasından sonra bazı özellikleri. *Tr J Vet Anim Sci* 1999; 23 (3): 597-608.
20. Benzer F, Ozan S. Fasciolosisli koyunların arginaz enzim aktivite düzeyleri ile karaciğer doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. *Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2002; 16 (2): 217-222.
21. Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect Biol Med* 1979; 22 (3): 421-453.
22. Waddington SN, Tam FW, Cook HT, Cattell V. Arginase activity is modulated by IL-4 and HOArg in nephritic glomeruli and mesangial cells. *Am J Physiol* 1998; 274 (3 Pt 2): F473-480.
23. Waddington SN, Cattell V. Arginase in glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 2002; 8 (3): 128-134.
24. Jansen A, Lewis S, Cattell V, Cook HT. Arginase is major pathway of L-arginine metabolism in nephritic glomeruli. *Kidney Int* 1992; 42 (5): 1107-1112.
25. Ayyıldız A, Gökhan İH. Kısmen saflaştırılan sığır karaciğer arginazının kinetik özellikleri ve bazı kimyasal bileşiklerin enzim aktivitesine etkilerinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 1999; 52 (2): 71-76.