Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.
2005, 11(1): 1-4

FENİLHİDRAZİN VERİLEN FARELERDE L-KARNİTİNİN KARACİĞER DOKUSUNDAKİ KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine ATAKİŞİ* Mahmut KARAPEHLİVAN* Onur ATAKİŞİ* Ayla ÖZCAN* Mehmet ÇİTİL**

Yayın Kodu: 2005/01-A

Özet: Çalışmada fenilhidrazin ile farelerde oluşturulan karaciğer hasarında L-karnitinin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla Swiss albino cinsi fareler, kontrol, fenilhidrazin (40 mg/kg/fare), fenilhidrazin + L-karnitin (40 mg/kg/fare ve 100 mg/kg/fare/gün) ve L-karnitin (100 mg/kg/fare/gün) olmak üzere dört eşit gruba ayrıldı. Periton içi enjeksiyonlar günlük olarak 7 gün boyunca yapıldı. Yedinci günde fareler ötenazi edildi. Karaciğer dokuları toplandı. AST, ALT aktiviteleri ile üre, total protein, kreatinin, demir, total sialik asit (TSA) ve glukoz konsantrasyonları ölçüldü.

Fenilhidrazin grubunda karaciğer AST ve ALT aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.001$) bulunurken, üre, total protein, keatinin, demir, TSA ve glukoz düzeyleri ise yüksek bulundu. Bununla birlikte, üre değerleri hariç, kontrol grubu ve fenilhidrazin + L-karnitin grubu arasında parametrelerde herhangi bir istatistiksel fark bulunamadı.

Sonuç olarak, farelerde fenilhidrazin verilerek oluşturulan karaciğer doku hasarlarına karşı, L-karnitinin demir ve toksik maddeleri bağlayarak hepatositlerin hücre zarı yapısı üzerinde koruyucu bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Fare, L-karnitin, fenilhidrazin, karaciğer

Investigation of Protective Effect of L-Carnitine in the Liver Tissue of Phenylhydrazine Given Mice

Summary: Aim of this study was to investigate the effects of L-carnitine in phenylhydrazine-induced liver damage in mice.

For that purpose, twenty-eight Swiss albino mice were divided into four equal groups as follows: Control, 0.5 ml/day 0.9% NaCl, phenylhydrazine (40 mg/kg/day per mouse), phenylhydrazine plus L-carnitine (40 mg/kg phenylhydrazine and 1000 mg/kg L-carnitine per day per mouse) and L-carnitine group (1000 mg/kg per day per mouse). Intraperitoneal injections were carried out daily for 7 days. On day 7, mice were euthanasied and sacrificed, liver tissues were collected and activities of AST, ALT, urea, total protein, creatinin, iron, total sialic acid (TSA) and glucose were determined.

Compared to control group, liver AST and ALT activities were significantly lower but urea, total protein, creatinin, iron, TSA and glucose were higher in phenylhydrazine group. However, there was no statistical difference between control group and phenylhydrazine plus L-carnitine group in terms of the status of the parameters measured except urea levels.

In conclusion, the present study suggests that L-carnitine possesses protective roles in phenylhydrazine-induced liver damage in mice, possibly by protecting cell membranes of hepatocytes and by binding iron and toxic substances

Keywords: Mice, L-carnitine, phenylhydrazine, liver

GİRİŞ

Yaşamsal önemi olan L-karnitin, karaciğer ve böbreklerde endojen olarak lizin ve metiyoninden sentezlenen vitamin türevi bir moleküldür[1]. Hücrelerde mitokondriyal β-oksidasyonu aracılığıyla enerji üretiminde önemli bir rolü olan[2,3] L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu[4], ketozisin düzenlenmesi[5] ve immun sistemin desteklenmesi[6] gibi bazı metabolik olaylarda rol almaktadır.

İnsanlarda otoimmun bozukluklara, karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sisteminde değişikliklere, hemolitik anemi ve kansere neden olabilen fenilhidrazinin, hemolizle sonuçlanan ciddi hemolitik anemi ve retikulositosis ile karaciğer ve dalakta aşırı demir birikimine, bunun da yağlı karaciğer ve hepatosit nekrozu gibi fizyopatolojik değişikliklere neden olduğu kaydedilmiştir[7]. Ayrıca endojen lipitlerin ve hücre zarının akışkanlığının değişmesine neden olmaktadır[8].

Bu çalışmada fare karaciğer dokusunda fenilhidrazin ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı L-karnitinin koruyucu etkisinin arıştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yetiştirilen 28 adet Swiss albino cinsi laboratuar faresi kullanıldı.

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE
** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Kontrol (n:7), fenilhidrazin (n:7), fenilhidrazin + L-karnitin (n:7) ve L-karnitin (n:7) olmak üzere fareler 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplara yem ve içme suyu *ad libitum* verildi. Fenilhidrazin grubuna periton içi olarak 40 mg/kg/gün fenilhidrazin, fenilhidrazin + L-karnitin grubuna 40 mg/kg/gün fenilhidrazin ve 1000 mg/kg/gün L-karnitin periton içi verildi. 7. günlük uygulamadan sonra eter anestezisi ile ötenazi edilen farelerin karaciğer dokuları alınarak hemen % 0.9'luk NaCI solüsyonuyla yıkandıktan sonra 0.1 M KCl solüsyonu içinde çözünmüş fosfat tamponunda homojenize edildi[9]. Homojenize edilen doku örnekleri 1000 g'de 15 dakika soğutmalı santrifüje tabi tutulduktan sonra süpernatantları alınarak analiz edilinceye kadar –25°C'de saklandı.

Karaciğer dokusu AST, ALT aktiviteleri ile üre, total protein, kreatinin, demir, glukoz düzeyleri ticari kit (BioMérieux, France) kullanılarak, total sialik asit (TSA) ise Sydow'un[10] metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinin hesaplanmasında SPSS for Windows 6.0 paket programından yararlanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel önemin belirlenmesinde ANOVA testi kullanıldı[11]. Sonuçlar; ortalama±standart hata (x±Sx) olarak verildi.

BULGULAR

Karaciğer dokusunda AST, ALT aktiviteleri ile üre, total protein, kreatinin, demir, glukoz ve TSA düzeyleri Tablo1'de gösterildi.

Karaciğer dokusu AST aktivitesinde, fenilhidrazin ve fenilhidrazin + L-karnitin gruplarında kontrol ve L-karnitin gruplarına göre, ALT aktivitesinde ise fenilhidrazin grubunda, diğer üç gruba göre $p<0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler bulundu. L-karnitin grubunda kontrol grubuna göre AST, ALT aktivitelerinde $P<0.001$ düzeyinde artış bulundu.

TSA düzeyleri fenilhidrazin ve fenilhidrazin + L-karnitin gruplarında L-karnitin ve kontrol gruplarına göre $p<0.001$, fenilhidrazin grubunda total protein ve demir miktarlarının kontrol ve L-karnitin gruplarına göre sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$ düzeyinde yüksek olduğu tespit edildi.

Üre ($p<0.001$) ve glukoz ($p<0.01$) değerleri fenilhidrazin grubunda, diğer üç gruba göre yüksek bulundu.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Fenilhidrazin, demirin serbest redoks aktif formunda salınmasına[12] neden olarak dolaşımdaki eritrositlerin yaşamını kısaltmakta, bu da insan ve deney hayvanlarında hemolitik anemi ve retikulositosise yol açmaktadır[13]. Hücrelerde mitokondriyal β-oksidasyonu aracılığıyla enerji üretiminde önemli bir rolü olan[2,3] L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu[4], ketozisin düzenlenmesi[5] ve immun sistemin desteklenmesi[6] gibi bazı metabolik olaylarda rol almaktadır.

Hücrelerde enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler sağlık durumunu yansıtmaktadır. Doku-

Tablo 1. Karaciğer AST, ALT aktiviteleri ile üre, total protein, kreatinin, demir, glukoz ve TSA düzeyleri.
Table 1. AST, ALT activities, and urea, total protein, creatinin, iron, glucose, TSA levels of the liver.

	KARACİĞER (g/doku)				
	Kontrol	**Fenilhidrazin**	**Fenilhidrazin + L-karnitin**	**L-karnitin**	**P**
AST (U)	64.09±2.50^{b}	51.70±2.80^{c}	59.15±4.84^{bc}	83.23±4.47^{a}	<0.001
ALT (U)	94.17±2.70^{b}	77.85±2.2.13^{c}	94.95±2.68^{ab}	102.84±3.38^{a}	<0.001
TSA (mg)	0.434±0.018^{bc}	0.566±0.033^{a}	0.493±0.005^{b}	0.410±0.017^{c}	<0.001
Üre (mg)	5.40±0.79^{c}	10.51±1.06^{a}	7.86±0.43^{b}	5.48±0.13^{c}	<0.001
Demir (mg)	10.24±0.72^{bc}	14.52±1.17^{a}	12.77±0.91^{ab}	9.71±0.59^{c}	<0.01
Glukoz (mg)	83.67±0.51^{b}	98.08±5.43^{a}	86.40±1.42^{b}	76.83±3.65^{b}	<0.01
Total protein (g)	0.52±0.03^{b}	0.61±0.03^{a}	0.55±0.01^{ab}	0.51±0.02^{b}	<0.05
Kreatinin (mg)	0.12±0.02	0.19±0.02	0.18±0.01	0.16±0.02	-

a,b,c: aynı satırdaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir.

Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.
2005, 11(1): 1-4

lardaki fonksiyonel durum ya da hücresel lezyonların belirlenmesi serumdaki spesifik enzimlerin aktiviteleri ölçülerek yapılmaktadır. Karaciğer dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunan aminotransferazlar sitoplazmik enzimler olup, klinik enzimolojide karaciğer hasarının tespitinde önemli belirteçlerdir. Karaciğeri etkileyen herhangi bir hastalık ya da toksikasyon durumunda hepatositlerin hücre zarları yıkılmakta ve bu enzimlerin plazma düzeyleri hızla artmaktadır[14].

Bolger ve ark.[15], BALB/c farelerine periton içi sıçan sitomegalovirusunu uygulamışlar ve AST, ALT aktivitelerinin serumda 15-24 kat arttığını, bunun yanında ALT aktivitesinin enfekte karaciğer dokusunda % 25 ile 55 arasında azaldığını tespit etmişlerdir. Bu durum AST, ALT aktivitelerinin serumda artarken dokuda azaldığını göstermekte ve yapılan bu çalışma fenilhidrazin grubunda bu enzimlerin karaciğer dokusundaki aktivitelerinin azalmasını desteklemektedir.

Naughton ve ark.[16], 6 hafta boyunca haftada bir kez fenilhidrazin verdikleri ratların serum AST aktivitelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Demirdağ ve ark.[17], CCl_4 ile akut karaciğer hasarı oluşturdukları ratlarda, L-karnitinin steatosis, yangı ve nekrozu önemli derecede azalttığını ve koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedirler. Yapılan çalışmada fenilhidrazin grubunda kontrol grubuna göre doku AST ve ALT aktivitelerindeki düşüşün karaciğer hasarı sonucu olarak bu enzimlerin plazmaya geçmesinden[14] dolayı olabileceği düşünüldü. Fenilhidrazin+L-karnitin grubunda kontrol grubuna göre, AST, ALT aktivitelerinde istatistiksel olarak fark tespit edilmemesinin ise L-karnitinin karaciğer hücre nekrozunu önleyerek veya azaltarak bu enzimlerin hücre dışına çıkmasını,dolayısıyla dokuda azalmasını engellemesi sonucu olabileceği düşünülmektedir.

Ferrali ve ark.[12], 6 gün boyunca fenilhidrazin verilen ve 9. gün öldürülen ratların karaciğer dokularında kontrol grubuna göre demir miktarında $p<0.01$ düzeyinde artış tespit etmişler ve bunun hemolitik bir madde olan fenilhidrazinin hemoliz yapmasıyla serbest kalan demirin karaciğerde birikmesinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada da benzer olarak fenilhidrazin verilen grupta, karaciğer demir miktarında $p<0.01$ düzeyinde artış tespit edildi.

L-karnitinin demir bağlayıcı bir özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir[18]. Fenilhidrazin+L-karnitin grubunda fenilhidrazin grubuna göre düşük miktarda tespit edilen demir, L-karnitinin demir bağlayıcı özelliğini desteklemektedir.

Sialik asit (SA) organizmada glukozdan sentez edilen, glikoprotein ve mukoproteinlerin yapısında bulunan karbonhidrat birimlerinin önemli bir kısmını teşkil etmektedir[19]. Akut faz proteinlerin (AFP) sialoglikoprotein yapısında olması ve bunların bir çoğunda mevcut oligosakkarit zincirinin son halkasında bulunan SA'ların AFP'lerin bir belirleyicisi olduğu birçok araştırıcı tarafından bildirilmektedir[20-22]. Çalışmada fenilhidrazin verilen grupta diğer gruplara göre yüksek bulunan SA'nın, glukoz ve total protein miktarlarındaki artışların doku harabiyeti sonucu hücre zarında yer alan glikoproteinlerin yıkımlanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. L-karnitinin hücre zarı permeabilitesinin korunmasında önemli bir rol alabileceği kaydedilmektedir[23]. Yapılan çalışmada L-karnitin uygulanan gruplarda SA miktarının önemli derecede düştüğü tespit edildi. Bu durumun L-karnitinin hücre zarı permeabilitesi üzerine olan koruyucu etkisinden kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.

Vince ve ark.[24], fenilhidrazinin fare hücre kültüründe protein yıkılımına sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada fenilhidrazin verilen grupta üre miktarında meydana gelen artışın protein yıkılımı nedeniyle üre sentezinin artmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, fenilhidrazinin karaciğer dokusunda oluşturduğu hasara karşı, L-karnitinin demir ve toksik maddeleri bağlamak suretiyle hepatositlerin hücre zarı yapısı üzerine koruyucu bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1 **Rebouche CJ, Engel AG:** Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochim Biophys Acta* 630: 22-29, 1980.

2 **De Vivo DC, Tein I:** Primary and secondary disorders of carnitine metabolism. *Intl Pediatr*, 5: 134-141, 1990.

3 **Ohlenschläeger G, Berger:** L-carnitin, eine körpereigene substanz von interessanter. *vielfältiger therapeutischer Wirkung, Heilpraxis Magazin*, 4: 1-5, 1990.

4 **Oven K, Nelssen QJL, Goodband RD, Weeden TL, Blum SA:** Effect of L-carnitine and soybean oil on growth and performance and body composition of early weaned pigs. *J Anim Sci*, 74: 1612-1619, 1996.

5 **Mc Gary JD, Robles-Valdes C, Fister WD:** Role of carnitine in hepatic ketogenesis. *Proc Nat Acad Sci*, 72: 4385-4388, 1975.

6 **Famularo G, De Simone C:** A new era for carnitine? *Immunol Today*, 16: 211-213, 1995.

7 **Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX:** Melatonin reduces phenylhydrazine-induced oxidative damage to cellular

membranes: Evidence for the involvement of iron Int *J Biochem Cell Biol*, 32:1 045-1054, 2000.

8 **Djurkovic A, Zaric J, Lusic M, Glisin V, Popovic Z:** Differences in rat RBC cytosol induced after in vivo phenylhydrazine treatment. *Cell Biol Int*, 23(10): 677-683, 1999.

9 **Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dorman6-Famularo G, De Simone C:** A new era for carnitine? *Immunol Today*, 16: 211-213, 1995.

10 **Sydow G:** A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Bichim Acta*, 44(11/12): 1721-1723, 1985.

11 SPSS for Windows, release 6.0, june 17 1993. Copy right (c. SPSS inc. 1989-1993).

12 **Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M:** Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid qurcetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*, 416: 123-129, 1997.

13 **Nakai A, Oya A, Kobe H, Asakura H, Yokata A, Koshino T, Araki T:** Changes in maternal lipid peroxidation levels and antioxidant enzymatic activities before and after delivery. *J Nippon Med Sci*, 67(6): 434-439, 2000.

14 **Eteng MU, Ebong PE, Ettarh RR, Umoh IB:** Aminotransferase activity in serum, liver and heart tissue of rats exposed to theobromine. *Indian J Pharm*, 30(5): 339-342, 1998.

15 **Bolger G, Lapeyre N, Rheaume M, Kibler P, Bousquet C, Garneau M, Cordingley M:** Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral Res*, 44(3)0 155-165, 1999.

16 **Naughton BA, Moore E, Bush ME, Lapin DM, Dornfest BS:** Hemostatic alterations associated with phenylhydrazine-induced anemia in the rat. *J Med*, 20(5-6): 305-30, 1989.

17 **Demirdağ K, Bahçecioğlu İH, Özercan İH, Özden M, Yılmaz S, Kalkan A:** Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Gastroent Hepato*, 19(3): 333, 2004.

18 **Neuman SL, Lin TL, Hester PY:** The effect of dietary carnitine on semen traits of white leghorn roosters. *Poultry Sci*, 81: 495-503. 2002.

19 **Kökoğlu E, Sönmez H, Sarıoğlu A:** İnsan beyin tümörlerinde bir tümör markeri olarak sialik asit. *Biyokimya Derg*, XI(1): 29, 1986.

20 **Carter A, Martin NH:** Serum sialic acid levels in health and disease. *J Clin Pathol*, 15: 69-72, 1962.

21 **Taniuchi K, Chifu K, Hayashi N, Nakamachi Y, Yamaguchi N, Miyamoto Y, Doi, K, Baba S, Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T:** A new enzymatic method for the determination of sialic acid in serum and its application for a marker of acute phase reactant. *Kobe J Med Sci*, 27: 91-102, 1981.

22 **Crook M:** The determination of plasma or serum sialic acid. *Clin Biochem*, 26: 31-38, 1993.

23 **Baumgartner M, Blum R:** L-carnitine. Carnitine-chemistry, biological function and deficiencies. LONZA, Folder Basel, 3-8, 1996.

24 **Vince GS, Dean RT:** Is enhanced free radical flux associated with increased intracelluler proteolysis? *FEB*, 216(2): 253-256, 1987.

Yazışma Adresi (Correspondence Address)

Arş. Gör. Dr. Emine ATAKİŞİ
Kafkas Üniv. Vet. Fak. Biyokimya AD.
36100 Kars- TÜRKİYE
Tel: +90 4742426800-1160
Fax: +90 474 2426853
e-mail: et_tasci@hotmail.com