

# DENEYSEL OLARAK SİROZ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KARACİĞER ARGİNAZ ENZİM DÜZEYİ\*

İhsan HALİFEOĞLU Nevin İLHAN Necip İLHAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.11.1997

## Liver Arginase Activity In Rats With Experimental Cirrhosis

### SUMMARY

Arginase (L-arginine ureohydrolase, EC. 3.5.3.1) is the final enzyme of the urea cycle and is present in most tissues. Arginase converts arginine to ornithine and urea. The main source of this enzyme is liver and it is affected by experimentally induced liver injury. For this purpose cirrhosis was induced in rat with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and the level of liver tissue arginase was determined. Tiosemicarbazide-Diacetylmonoxime-Urea (TDMU) method for arginase and Lowry method for tissue protein were used. Activity of arginase was defined as U/mg protein.hour and results were compared with control group. The mean value of control group was found 312.50 ± 42.79 U/mg protein.hour (mean ± S.D.) and the mean value of experimental group was found 201.42 ± 38.48 U/mg protein/hour. The difference between the two groups were statistically significant (p < 0.001). These results revealed that arginase activity of liver tissue is decreased in cirrhosis due to cell damage.

*Key words: Arginase, liver, cirrhosis, CCl<sub>4</sub>*

### ÖZET

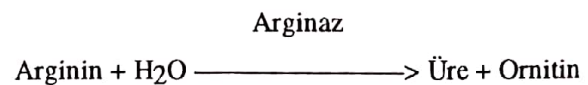
Arginaz (L-arginin üreohidrolaz, EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son enzimidir ve birçok dokuda bulunur. Arginaz, arginini üre ve ornitine çevirir. Bu enzimin ana kaynağı karaciğerdir ve karaciğerde oluşturulan hasardan etkilenir. Bu amaçla karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile sıçanlarda siroz oluşturuldu ve karaciğer doku arginaz düzeyi saptandı. Arginaz aktivitesi için tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksime-Üre (TDMU) ve doku proteini için Lowry metodu kullanıldı. Arginaz aktivitesi U/mg- protein.saate olarak tarif edildi ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubunun ortalama değeri 312.50 ± 42.79 (ortalama ± S.D.) U/mg-protein.saate ve deney grubunun ortalama değeri 201.42 ± 38.48 (ortalama ± S.D.) U/mg-protein.saate olarak bulundu. İki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p < 0.001). Bu sonuçlar göstermektedir ki sirozda hücre hasarına bağlı olarak arginaz enzim düzeyi karaciğer dokusunda azalmaktadır.

*Anahtar kelimeler: Arginaz, karaciğer, siroz, CCl<sub>4</sub>*

### GİRİŞ

Üreolitik organizmalarda arginaz enziminin (L-arginin üreohidrolaz; E.C.3.5.3.1) ana fonksiyonu; amonyağın detoksifikasyonu için üre oluşturmaktır. Argininin hidrolizi ile ikinci ürün olarak oluşan ornitin ise, hem üre döngüsünün devamında hem de hücrenin bölünmesi ve farklılığı için poliamin sentezinde öncü

molekül olarak görev almaktadır (1,2). Üre döngüsünün son enzimi olan arginaz aşağıdaki denklemde görüldüğü gibi arginini hidroliz etmektedir (3)



\*Bu çalışma 28-31 Ekim 1997 tarihleri arasında İzmir'de yapılan XIV.Ulusal Biyokimya Kongresinde Poster olarak sunulmuştur.

Ana kaynağı karaciğer olmakla birlikte arginaz enzimi böbrek, beyin, bağırsak ve eritrosit (4), tiroid dokusu(5), uterus(6) gibi bir çok dokuda bulunmaktadır. İnsanlarda arginaz enziminin beş tipinin olduğu (7),  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi metal iyonlarının enzimin aktivitesini artırıcı ve  $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$ , sitrat, borat, L-ornitin ve L-lösinin aktiviteyi engelleyici yönde etki gösterdikleri anlaşılmıştır (8,9).

Arginaz enzimi eksikliğinde hiperargininemi tablosu oluşur ki bunun sonucunda plazma amonyak düzeyinin artmasına bağlı olarak mental gerileme, gelişme bozukluğu gibi istenmeyen sonuçlar meydana çıkar(10,11). Serum arginaz düzeyi miyokard infarktüsünde (12), meme kanserinde (13), kolorektal kanserde (4), siroz, viral veya toksik hepatit, hepatik nekroz, megaloblastik anemi gibi hepatosellüler hasarlarda (2,8) artış göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı; karbon tetraklorür muamelesi sonucu deneysel olarak siroz oluşturulan sıçan karaciğerinde doku arginaz enzim düzeyindeki değişiklikleri tespit etmektir.

## MATERYAL VE METOT

**Kimyasal maddeler:** Bu çalışmada analitik saflikta kimyasal maddeler kullanıldı.

**Deney hayvanları:** Ağırlıkları ortalama olarak 150-200 gram olan Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 12 saat gün ışığı alan ve havalandırması olan bir odada özel olarak hazırlanmış kafeslerde bakıma alındı. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasından sağlanan özel sıçan yemi ile beslendi. Kullanılan yemin içeriği aşağıdaki gibidir: Buğday %10, mısır %22, arpa %15, kepek %8, soya fasulyesi %26, balık unu %8, kemik unu %5, melas %5, tuz %5, mineral karması (basitrasin, mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum, kalsiyum, antioksidan) %1.25 ve vitamin karması (A, D<sub>3</sub>, E, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folik asit, nikotinamid, biotin ve kolin klorür) %1.25. Deney hayvanlarına bu yem ile birlikte kafeslerdeki özel bölüme yerleştirilen ve uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişelerle su verildi. Deney hayvanlarının kafesleri hergün düzenli olarak temizlendi (14).

Bu çalışmada 10' kontrol ve 20'si deney olmak üzere toplam 30 adet sıçan kullanıldı. Deney grubundaki sıçanlarda siroz oluşturmak için selektif hepatotoksin

olarak Merck marka karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>) kullanıldı (15,16). CCl<sub>4</sub> zeytinyağı (Sigma) ile 3/4 (v/v) oranında karıştırıldı ve haftada iki kez olmak üzere altı hafta boyunca 0.150 ml/100 gram deri altına enjekte edildi. Altı hafta sonunda bir sıçan dekapite edilerek karaciğerinde histopatolojik inceleme sonucu siroz olduğu görüldü. Böylece bütün sıçanlar teker teker dekapite edilerek karaciğerleri alındı ve deney grubunu oluşturan sıçanların hepsinin karaciğerlerinde bu süre sonunda siroz olduğu histopatolojik olarak tespit edildi.

Kontrol grubu hayvanlarına da aynı süre ve dozda sadece zeytinyağı (mineral oil) verildi ve dekapite edilerek karaciğerleri alındıktan sonra arginaz enzim aktivitesi ölçüldü.

**Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi:** Karaciğer dokusunun net ağırlığı 100 mg olarak tartıldıktan sonra üzerine 1/10 oranında pH'sı 7.4 olan 0.01 M Tris-HCl tamponu eklenip ve iyice parçalanarak buzlu su içindeki homojenizatör (Potter-Elvehjem, cam-cam) vasıtasıyla homojenize edildi(17). Elde edilen homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 20.000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant enzim kaynağı olarak, daha sonra kullanılmak üzere, -20 derecede saklandı. Bu çalışmada karaciğer doku arginaz düzeyi Tiyosemikarbazid - Diasetilmonoksim - Üre (TDMU) metodu(18), doku protein miktarı Lowry (19) yöntemi ile tespit edildi.

Bir ünite enzim aktivitesi, bir saatte 37 °C'de L-arginin substratından 1 mikromol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg-protein cinsinden ifadesi olup U/mg-protein.saat olarak tanımlandı

İstatistiksel çalışmalarda Student t testi kullanılarak iki ortalama arasındaki farkın önemliliği incelendi (20).

## BULGULAR

Karaciğer dokusuna ait arginaz enzim aktivitesinin siroz oluşturulmuş grup ile kontrol grubuna ait değerleri tablo 1'de verilmektedir. Tablodan anlaşıldığı gibi U/mg-protein.saat olarak verilen arginaz aktivitesi sirozlu grupta kontrol grubuna göre sayısal olarak daha düşük olup istatistiksel karşılaştırılmada ise iki grup arasındaki fark anlamlıdır (p<0.001).

**Tablo 1.**Karaciğer sirozu oluşturulmuş deneysel grup ile kontrol grubu oluşturan sıçanlarda karaciğer homojenatı arginaz enzim aktivitesinin karşılaştırılması (ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $\bar{x} \pm S.D.$ )

Parametre	Kontrol grubu	Sirozlu grup
Arginaz (U/mg-protein.saat)	312.50 $\pm$ 42.79 n=10	201.42 $\pm$ 38.48* n=20

\* p < 0.001 Sirozlu grup kontrol ile karşılaştırıldığında.

## TARTIŞMA

Karaciğerde aşırı miktarda fibröz doku gelişmesi, parankimal hücrelerin çoğunu tahrip ederek kan damarlarının etrafını kuşatmak suretiyle karaciğere portal kanın akışına karşı bir direnç oluşturur ki bu hastalık karaciğer sirozu olarak bilinir. Siroz, sıklıkla alkolden kaynaklanır; ancak karbon tetraklorür zehirlenmesi, enfeksiyöz hepatit gibi virüs hastalıkları ve safra kanallarının enfeksiyonu gibi durumları takiben de siroz görülebilir. Bu çalışmada karbon tetraklorür kullanılarak sıçanlarda deneysel siroz oluşturuldu ve karaciğer doku arginaz düzeyleri ölçüldü. Tablo 1'de görüldüğü gibi siroz oluşturulmuş sıçanlarda karaciğer doku arginazı düzeyi oldukça düşmektedir. Hepatosellüler hasarda serum arginaz düzeyinin arttığı belirtilmektedir (2,8,21). Aminleri ve arkadaşları (22) deneysel karaciğer nekrozu sonucunda serum arginaz düzeyinde artış bulmuşlardır. Maier ve arkadaşları (23) alkolik hepatitte karaciğer doku arginaz düzeyinin karaciğer hücre nekrozunun bir göstergesi olarak azaldığını, Gebhardt ve Reichen (24) ise karbon tetraklorür ve fenobarbital

buharına maruz bırakılan ratlarda oluşturulan sirozda karaciğer arginaz düzeyinin etkilenmediğini vurgulamaktadırlar. Bu sonuç ile bizim çalışmamız arasında paralellik görülmezken, alkolik hepatit ile ilgili çalışma arasında bir paralellik söz konusudur. Karaciğer harabiyetine bağlı olarak bir çok enzim gibi ana kaynağı karaciğer olan arginaz enziminin serum düzeyinde de artış meydana geldiği yukarıda verilen literatür bilgilerinden de anlaşıldığı gibi kesinlik kazanmıştır. Bu çalışmamızda biz de, siroz oluşturulmuş sıçanların karaciğer doku arginaz enzim düzeyinin azaldığını saptadık.

Sonuç olarak; karaciğer hücre harabiyetine bağlı olarak protein sentezinin etkilenmesi neticesinde karaciğer doku arginaz enzim düzeyinin azaldığı ve karaciğer biopsisi yapılarak doku arginaz enzim düzeyindeki azalmanın diğer laboratuvar bulguları ile birlikte sirozun teşhisinde yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Bresdeilins M., Kühner R., Schumacher K. Purification,affinity to anti-human arginase immunoglobulin-Sepharose 4B and subunit molecular weights of mammalian arginases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 840: 79-90.
- Multhaupt H., Fritz P., Schumacher K. Immunohistochemical localisation of arginase in human liver using monoclonal antibodies against human liver arginase.*Histochemistry* 1987; 87: 465-470.
- Powers SG., Meister A. Urea synthesis and ammonia metabolism.In: Aries I,Popper H., Schachter D. and Shafritz D.A. (eds), *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York 1982, pp 251-263.
- Leu SY., Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70: 733-736.
- İlhan N. İnsan tiroid doku arginazının kinetik özellikleri. F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ 1992.
- Halifeoğlu İ.İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazının kinetik özellikleri. F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ 1993.
- Zamecka E., Poremska Z. Five forms of arginase in human tissues.*Biochem Med and Metab Biol* 1988; 39: 258-266.
- Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests* (first ed.). W.B.Saunders Company, Philadelphia 1983: 70-71.
- Maggini S., Stoecklin-Tschan F.B.,Mörkofer-Zwey S.,Walter P. New kinetic parameters for rat liver arginase measured at near-physiological steady-state concentrations of arginine and Mn<sup>2+</sup>. *Biochem J* 1992; 283: 653-660.

10. Grody WW., Klein D., Dodson AE. et al. Molecular genetic study of human arginase deficiency. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1281-1290.
11. Cederbaum S.D., Moedjono SJ. Treatment of hyperargininaemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. *J Inher Metab Dis* 1982; 5: 95-99.
12. Poremska Z., Kedra M. Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin Chem Acta* 1975; 60: 355-361.
13. Straus B., Cepalak I., Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chem Acta* 1992; 210:5-12.
14. Ekşioğlu FE. Hepatik ensefalopati oluşturulan ratların kan-beyin bariyer geçirgenliğindeki değişimler. F.Ü. Tıp Fak. Fizyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Elazığ 1997.
15. Poli G., Albano E., Dianzani M.U. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 117-142.
16. Yamagishi F., Komoda T., Ohnishi K., Itoh S. Protective effect of dantrolene sodium on carbon tetrachloride induced liver injury in rat. *Research Commun Chem Pathol Pharma* 1993; 82: 237-240.
17. Spector EB., Rice SCH., Moedjone S., Bernard B., Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem Med* 1982; 28: 165-175.
18. Gayer JW., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analy Biochem* 1971; 39: 412-417.
19. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
20. Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V. *Bioistatistik* (6.baskı). Özdemir Yayıncılık, Ankara 1995.
21. Lange F., Roth E., Steininger R., Winkler S., Muhlbacher F. Arginase release following liver reperfusion. Evidence of hemodynamic action of arginase infusions. *Transplantation* 1995; 59: 1542-1549.
22. Aminlari M., Veseghi T., Sajedianfard MJ., Samsami M. Changes in arginase, aminotransferases and rhodanese in sera of domestic animals with experimentally induced liver necrosis. *J Comp pathol* 1994; 110: 1-9.
23. Maier KP., Volk B., Hoppe-Soyler G., Gerok W. Urea-cycle enzymes in normal liver and patients with alcoholic hepatitis. *Europ J Clin Invest* 1974; 4: 193-195.
24. Gebhard R., Reichen J. Changes in distribution and activity of glutamine synthetase in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat: Potential in hyperammonemia. *Hepatology* 1994; 20: 684-691.