

## BAZI İKİ DEĞERLİKLİ KATYONLARIN KOBAY AKCİĞER VE BÖBREK MİKROZOMAL NADPH-SİTOKROM C REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE İN VİTRO ETKİLERİ

Mümtaz İşcan (\*)

### ÖZET :

Mikrozomal ilaç metabolize eden enzimlerin, veya diğer ismiyle karışık fonksiyonlu oksidazların, bileşenlerinden biri olan NADPH-sitokrom c redüktaz, bu enzim sisteminde NADPH'dan sitokrom P-450'ye elektron taşımada rol oynar. Bu çalışmada, çevrede yaygın olarak bulunan kadmiyum ve nikelin, ve organizma için gerekli bir eser element olan ve mikrozomal ilaç metabolize eden enzimlerin aktivite tayinlerinde inkübasyon ortamına invitro olarak ilave edilen magnezyumun kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitelerine etkileri incelenmiştir. Reaksiyon ortamına, in vitro olarak  $1.0 \times 10^{-5}$  ile  $1.0 \times 10^{-3}$  M aras değişen konsantrasyonlarda kadmiyum klorür ve nikel klorür, ve  $5.0 \times 10^{-4}$  ile  $1.0 \times 10^{-2}$  M arasında değişen konsantrasyonlarda magnezyum klorür ilave edildiğinde her iki organın enzim aktivitelerinde bir değişim gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar, in vitro olarak, bu iki değerlikli katyonların kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzimlerinin elektron taşıma kapasitelerini değiştirmedğini ve akciğer ve böbrek enzim aktivitelerinin bu katyonlara yanıtında gerek nitel ve gerekse nicel farklılık bulunmadığını göstermiştir.

THE INFLUENCE OF SOME DIVALENT CATIONS ON GUINEA-PIG  
LUNG AND KIDNEY MICROSOMAL NADPH-CYTOCHROME C  
REDUCTASE ACTIVITIES IN VITRO

(\*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,  
Tandoğan-Ankara

## SUMMARY :

NADPH-cytochrome c reductase, which is one of the components of microsomal drug-metabolizing enzymes, or mixed-function oxidases, plays a role in the electron transport from NADPH to cytochrome P-450 in the enzyme system. In this study, in vitro, direct effects of three divalent cations, cadmium and nickel, the metals which are widely distributed throughout the environment, and magnesium, which is nutritionally required trace element and usually added in vitro to incubation mediums used in assays of microsomal drug-metabolizing enzyme activity, on lung and kidney microsomal NADPH-cytochrome c reductase of male guinea-pig were examined. In vitro addition of cadmium chloride and nickel chloride in the concentrations ranging from  $1.0 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-3}$  M and magnesium chloride in the concentrations ranging from  $5.0 \times 10^{-4}$  to  $1.0 \times 10^{-2}$  M to reaction medium caused no alterations in the enzyme activities of lung and kidney. This indicated that these divalent cations did not change the electron capacity of microsomal NADPH-cytochrome c reductase of guinea-pig lung and kidney and that there was no either qualitative or quantitative difference in the enzyme activities of guinea-pig lung and kidney in response to these divalent cations in vitro.

## GİRİŞ

İlaç, pestisit ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi birçok kimyasal madde yanısıra steroid, kolesterol ve yağ asitleri gibi endojen maddeler memeli karaciğeri endoplazmik retikulumunda bulunan ilaç metabolize eden enzimler, veya diğer adıyla karışık fonksiyonlu oksidazlar, tarafından metabolize edilirler (1-3). Bu enzimler tarafından metabolize edilen kimyasal maddelerin metabolizma hızları farklı olup hayvan türüne, soyuna ve beslenme durumuna bağlıdır (2, 4-6). Farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarda, birçok kimyasal maddenin bu enzim sistemini stimüle veya inhibe ettiği gösterilmiştir (2, 7, 8).

Son zamanlarda bağırsak, akciğer ve böbrek gibi karaciğer dışındaki organlarda da metabolizma çalışmaları yoğunluk kazanmıştır (8-10). Bu organların bazıları çevre kirleticileri için giriş yolu olurken bazıları da birikim yeri olabilmektedir. Dolayısıyla bu organlarda detoksikasyon-toksikasyon mekanizma çalışmalarının yapılması ve bu organlarda çeşitli kimyasal maddelerin yazığı ve etkilerinin araştırılması önemlidir. Bilin-

diği gibi endüstri ve kirli şehir havasında, sigara dumanında, suda ve besinlerde bulunan kadmiyum ve nikelin çevre kirleticileri arasında önemli yerleri vardır (11-13). Karaciğer yanısıra akciğer ve böbrek bu çevre kirleticilerinin başlıca hedef organlarıdır. Magnezyum ise mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz enzim aktivitesi tayinlerinde genellikle inkübasyon ortamına ilave edilen ve organizma için gerekli olan eser elementlerden biridir. Dolayısıyla bu kationların bu enzim sistemine ve bu enzim sisteminin üç bileşeninden biri olan (diğer ikisi sitokrom P-450 ve lipitir) ve NADPH ile sitokrom P-450 arasında elektron transferini gerçekleştiren mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması önemlidir.

Bu kationların mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi sıçan karaciğerinde in vivo ve in vitro (14-17) ve kadmiyumun bu enzim aktivitesine etkisi tavşan akciğerinde in vitro (18) çalışılmış olmasına karşın bu kationların kobay organları mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkileriyle ilgili bilgiye rastlanmamak-

tadır. Aslında bu çeşit bilgi, katyonların aynı hayvanın değişik organlarının enzim aktiviteleri üzerine etkileri arasında veya değişik hayvan türlerinin aynı organlarının enzim aktiviteleri üzerine etkileri arasında karşılaştırma yapmak için gerekli ve önemlidir çünkü çeşitli katyonların mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz enzim sistemi üzerine etkilerinin mikrozomların elde edildiği organ veya türe bağlı olarak değişebildiği bildirilmektedir (19).

Bu nedenle bu çalışma, *in vitro* olarak, bu iki değerlikli katyonların kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH—sitokrom c redüktaz enzimlerinin elektron transport kapasitelerinin değiştirip değiştirmediğini ve bu katyonlara yanıtta kobay akciğer ve böbrek mikrozomal enzim aktivitelerinin nitel ve nicel farklılık gösterip göstermediğini saptamak amacıyla yapılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada kullanılan NADPH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat), sitokrom c (Tip III) Sigma (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, A.B.D.) firmasından ve kristalize sığır serum albümini BDH (BDH Chemicals, Ltd., Poole, İngiltere) firmasından satın alındı. Kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik saflıktaydı.

Deneylede ağırlıkları 500 ile 600 g. arasında değişen beyaz erkek kobaylar kullanıldı. Kobaylar Yem Sanayii Türk A.Ş. Ankara Yem Fabrikası tarafından imal edilen pellet kobay yemi ile beslendiler. Tüm hayvanlar öldürülmeden önce 24 saat aç bırakıldılar.

Kobaylar, başları hızla sert bir cisme vurularak, bayıltıldılar ve başları kesilerek öldürüldüler. Organlar hemen çıkarılarak, soğuk saf su ile yıkanarak kanlarından olduğunca arındılar. Sonra suları süzülerek, emici bir kağıt üzerinde kurulandılar. Ağırlıkları 0.1 grama kadar ölçülerek kaydedildi. Mikrozomlar daha önce İşcan ve ark'larının (8) tarif ettiği şekilde hazırlandı.

Akciğer ve böbrek mikrozomlarının NADPH—sitokrom c redüktaz aktivitesi 28°C'de pH'sı 7.6 olan 0.1 M potasyum fosfat tamponunda, Masters ve ark'larının (20) tarif ettiği yöntemle, reaksiyon ortamında katyonların varlığında ve yokluğunda, sitokrom c'nin 550 nm dalga boyundaki indirgenme hızının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi. Redüktaz aktivitesinin saptanmasında reaksiyon ortamındaki mikrozomal protein miktarı ml'de akciğer için 0.06 mg ve böbrek için 0.13 mg'dır. 1 ünite redüktaz 25°C'de 1 dakikada 1 nmol sitokrom c'yi indirgeyen enzim miktarı olarak tarif edildi.

Hazırlanan mikrozom süspansiyonlarının protein miktarları standart olarak kristalize sığır serum albümini kullanılarak Lowry ve ark'larının (21) yöntemlerine göre tayin edildi.

## BULGULAR

Tablo 1'de kadmiyum klorürün kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH—sitokrom c redüktaz aktivitesine etkisi gösterilmiştir. Görüldüğü gibi  $1.0 \times 10^{-5}$  ile  $1.0 \times 10^{-3}$  M arasında değişen konsantrasyonlarda kadmiyum klorür (*in vitro* reaksiyon ortamına ilave edildiğinde enzim aktivitelerinde bir değişim gözlenmemektedir.

Nikel klorürün kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH—sitokrom c redüktaz enzim aktivitesine etkisi Tablo 2'de gösterilmektedir. Tablodan da görüleceği gibi nikel klorür  $5.0 \times 10^{-4}$  ve  $1.0 \times 10^{-3}$  M konsantrasyonlarında reaksiyon ortamına ilave edildiğinde akciğer enzim aktivitesinde % 7'lik bir azalma gözlenmektedir. Ancak bu önemli bir düşüş değildir. Nikel klorürün böbrek enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığı da saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 1 — Kadmiyum klorürün kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH sitokrom c redüktaz aktivitelerine etkisi.

CdCl <sub>2</sub> Konsantrasyonu (M)	% Kontrol aktivite <sup>a</sup>	
	AKCİĞER	BÖBREK
Kontrol	100	100
1.0 x 10 <sup>-5</sup>	97	95
5.0 x 10 <sup>-5</sup>	93	100
1.0 x 10 <sup>-4</sup>	95	95
5.0 x 10 <sup>-4</sup>	94	99
1.0 x 10 <sup>-3</sup>	94	99

<sup>a</sup> Kadmiyum klorür bulunmayan reaksiyon ortamında saptanan mikrozomal NADPH — sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi kontrol aktivite olarak alınmıştır. Kontrol enzim aktivitesi, nmol indirgenmiş sitokrom c/dk./mg. protein olarak ifade edilmekte olup 4 ayrı saptamanın ortalaması ( $\pm$  SH ile) akciğer için 46.73  $\pm$  0.76 ve böbrek için 15.49  $\pm$  1.34'tür. Her değer, aksi belirtilmedikçe, üç ayrı deney sonucunun ortalamasını göstermektedir.

Tablo 2 — Nikel klorürün kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH — sitokrom c redüktaz aktivitelere etkisi.

NiCl <sub>2</sub> Konsantrasyon (M)	% Kontrol Aktivite <sup>a</sup>	
	AKCİĞER	BÖBREK
Kontrol	100	100
1.0 x 10 <sup>-5</sup>	95	100
5.0 x 10 <sup>-5</sup>	97	96
1.0 x 10 <sup>-4</sup>	95	99
5.0 x 10 <sup>-4</sup>	93	94
1.0 x 10 <sup>-3</sup>	93	98

<sup>a</sup> Nikel klorür bulunmayan reaksiyon ortamında saptanan mikrozomal NADPH — sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi kontrol aktivite olarak alınmıştır. Kontrol enzim aktivitesi, nmol indirgenmiş sitokrom c/dk./mg protein olarak ifade edilmekte olup 4 ayrı saptamanın ortalaması ( $\pm$  SH ile) akciğer için 46.73  $\pm$  0.76 ve böbrek için 15.49  $\pm$  1.34'tür. Her değer, aksi belirtilmedikçe,

üç ayrı deney sonucunun ortalamasını göstermektedir.

Tablo 3 Magnezyum Klorürün kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH — sitokrom c redüktaz aktivitelere etkisi.

MgCl <sub>2</sub> Konsantrasyonu (M)	% Kontrol Aktivite <sup>a</sup>	
	AKCİĞER	BÖBREK
Kontrol	100	100
5.0 x 10 <sup>-4</sup>	100	92
1.0 x 10 <sup>-3</sup>	96	95
2.5 x 10 <sup>-3</sup>	100	94
5.0 x 10 <sup>-3</sup>	98	97
1.0 x 10 <sup>-2</sup>	97	99

<sup>a</sup> Magnezyum klorür bulunmayan reaksiyon ortamında saptanan mikrozomal NADPH — sitokrom c redüktaz enzim aktivitesi kontrol aktivite olarak alınmıştır. Kontrol enzim aktivitesi, nmol indirgenmiş sitokrom c/dk./mg protein olarak ifade edilmekte olup 4 ayrı saptamanın ortalaması ( $\pm$  SH ile) akciğer için 46.73  $\pm$  0.76 ve böbrek için 15.49  $\pm$  1.34'tür. Her değer, aksi belirtilmedikçe, üç ayrı deney sonucunun ortalamasını göstermektedir.

5.0 x 10<sup>-4</sup> ile 2.5 x 10<sup>-3</sup> M arasında değişen konsantrasyonlarda magnezyum klorür reaksiyon ortamına ilave edildiğinde kobay akciğer ve böbrek mikrozomal enzim aktivitelerinde artma veya azalma saptanmıştır (Tablo 3).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışılan konsantrasyonlarda kadmiyum klorür kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH—sitokrom c redüktaz aktivitelere üzerine etkili olmuştur. Bu bulgu Aitio ve ark'ları (17) ile Fukuhara ve Takabatake'nin (18) in vitro bulgularına uyum göstermektedir. Aitio ve ark'ları (17) in vitro olarak 2.0x10<sup>-5</sup> ile 5.0x10<sup>-4</sup> M arası değişen konsantrasyonlarda kadmiyum iyodürü

reaksiyon ortamına ilave ettiklerinde sıçan karaciğeri mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitesinde bir değişim gözlemlemişlerdir. Fukuhara ve Takabatake (18) de  $4.0 \times 10^{-7}$  ile  $4.0 \times 10^{-4}$  M arası değişen konsantrasyonlarda kadmiyum asetat reaksiyon ortamına ilave ettiklerinde tavşan akciğeri enzim aktivitesinde artma veya azalma saptamamışlardır. Tüm bu veriler, kadmiyumun organ ve tür farkı gözetmek-sizin bu enzim aktivitesine direk etkili olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan kadmiyumun bu enzim aktivitesi üzerine *in vivo* etkisiyle ilgili bilgiler çelişiktir. Means ve ark'ları (15) sıçanlara i.p. olarak kadmiyum enjekte ettiklerinde enzim aktivitesinde değişim görmediklerini bildirirken Maines ve Kappas (14) sıçanlara deri altına kadmiyum uygulamasıyla enzim aktivitesinde anlamlı düşü-yü kaydettiklerini bildirmişlerdir. *In vivo* sonuçlarda görelen bu farklılık kadmiyumu-nun hayvanlara uygulanış yollarının ve/veya kadmiyumun uygulanışı ile hayvan-ların öldürülmesi arasında geçen sürenin farklı oluşlarına bağli olabilir.

Nikel klorürün de çalışılan konsan-trasyonlarda akciğer ve böbrek enzim aktivitelere etkisi gözlenmemiştir. Li-teratürde diğer türlerde nikelin akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enzim aktivitelere etkisiyle ilgili bilgi mevcut olmadığından bulgulari karşılaştırma olanağı da yoktur. Ancak bu sonuç Maines ve Kappas'ın (14) sıçan karaciğeriindeki *in vivo* sonucuna uymamaktadır. Maines ve Kappas (14) nikel klorürü sıçanlara deri altına enjekte ettiklerinde sıçan karaciğeri mikrozomal NADPH - (sitokrom c redüktaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığını saptamışlardır. Bu farklı bulguların nedeni direk etki ile indirek etkinin farklılığı ya-nırsıra organ veya hayvan türü farklılığı olabilir.

Gerek akciğer ve gerekse böbrek mik-rozomal enzim aktivitesi üzerinde mag-nezyum klorürün etkili olmadığı gözlen-miştir. Literatürde diğer türlerde mağ-

nezyumun akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH - sitokrom c redüktaz enzim aktivitelere etkisiyle ilgili bilgi me-y-cut olmadığından saptanan bulgulari karşılaştırma olanağı yoktur. Ancak, Peters ve Fouts (16) magnezyumun, *in vitro*, sıçan karaciğeri mikrozomal NADPH - sitokrom c redüktaz enzim aktivitesini arttırdığını saptamışlardır Bu farklı bul-guların nedeni organ veya tür farklılığı olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, kadmi-yum, nikel ve magnezyumun, *in vitro*, kobay akciğer ve böbrek mikrozomal NADPH - sitokrom c redüktaz enzimi elektron transport kapasitesini değiştiremediği ve bu katyonlara yanıtta kobay akciğer ve böbrek mikrozomal enzim ak-tivitelerinin gerek nitel ve gerekse nicel farklılık göstermediği saptanmıştır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Brodie, B.B., Axelrod, J., Cooper, J.R., Gaudette, L., La Du, B.N., Mi-toma, C., Udenfriend, S.: Detoxi-cation of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 121, 603-604, 1955.
- 2- Conney, A.H.: Pharmacological im-plications of microsomal enzyme in-duction. *Pharmac. Rev.*, 19, 317-366, 1967.
- 3- Lu, A.Y.H.: Liver microsomal drug metabolizing enzyme system: func-tional components and their proper-ties. *Fedn. Proc.*, 35, 2460-2463, 1976.
- 4- Oppelt, W.W., Zange, M., Ross, W.E., Remmer, H.: Comparison of micro-somal drug hydroxylation in lung and liver of various species. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.*, 1, 43-56, 1970.
- 5- Flynn, E.J., Lynch, M., Zannoni, V.G.: Species differences and drug metabolism. *Biochem. Pharmac.*, 21, 2577-2590, 1972.
- 6- Vesell, E.S., Lang, C.M., White, W.J., Passananti, G.T., Hill, R.N., Clemens, T.L., Liu D.K., Johnson, W.D.:

- Environmental and genetic factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Fedn. Proc.*, 35, 1125-1132, 1976.
- 7- Alvares, A.P., Schilling, G.R., Levin, W.: Species differences in the induction of microsomal hemoproteins and 3, 4-benzopyrene hydroxylase by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 175, 4-11, 1970.
  - 8- İşcan, M., Arınc, E., Vural, N., İşcan, M.Y.: In vivo effects of 3-methylcholanthrene, phenobarbital, pyrethrum and (2,4,5-T isooctylester on liver, lung and kidney microsomal mixed-function oxidase system of guinea-pig: A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C, 177-190, 1984.
  - 9- Wattenberg, L.W., Leong, J.L., Strand P.L.: Benzopyrene hydroxylase activity in the gastrointestinal tract. *Cancer Res.*, 22, 1120-1125, 1962.
  - 10- Arınc, E., İşcan, M.Y.: Comparative studies of sheep liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase. *Comp Biochem. Physiol.* 74C, 151-158, 1983.
  - 11- Hammond, P.B., Beliles, R.P.: *Metals. Toxicology'de* (Ed. Doull, J., Klaassen, C.D. ve Amdur, M.O.), sayfa 409-467, Mac Millan, New York, 1980.
  - 12- L onard, A., Gerber, G.B. Jacquet P.: Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of nickel. *Mutation Res.* 87, 1-15, 1981.
  - 13- İşcan, M.: Sigara iiminin ila metabolizmasına etkisi. *A.E.O.B.*, 5(4), 49-59, 1983.
  - 14- Maines, M.D., Kappas, A.: Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem. J.*, 154, 125-131, 1976.
  - 15- Means, J.R., Carlson, G.P., Schnell, R.C.: Studies on the mechanism of cadmium-induced inhibition of the hepatic microsomal monooxygenase of the male rat. *Toxic. Appl. Pharmac.*, 48, 293-304, 1979.
  - 16- Peters, M.A., Fouts, J.R.: A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism *in vitro*. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 173, 233-241, 1970.
  - 17- Aitio, A., Ahotupa, M., Parkki, M.G.: Inhibition of drug metabolizing enzymes by heavy metals *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 850-856, 1978.
  - 18- Fukuhara, M., Takabatake, M.: *In vitro* inhibitory action of cadmium on microsomal monooxygenases of rabbit lung. *Biochem. Pharmac.*, 31, 3425-3429, 1982.
  - 19- Peters, M.A., Fouts, J.R.: The influence of magnesium and some other divalent cations on hepatic microsomal drug metabolism *in vitro*. *Biochem. Pharmac.*, 19, 533-544, 1970.
  - 20- Masters, B.S.S., Williams Jr., C.H., Kamin, H.: The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase of pig liver. *Methods in Enzymology'de* (Ed. Colowick, S.P. ve Kaplan, N.O.), sayfa 565-573, Academic Press, New York, 1967.
  - 21- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.