

ARAŞTIRMA

İn vitro şartlarda asetonun eritrosit membranı üzerine hemolitik etkileri**Ferah Armutcu¹, Ahmet Gürel¹, Sadık Söğüt²*¹ Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Zonguldak² Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay**Özet**

Amaç: Aseton endüstriyel bir çözücü ve kimyasal ara ürün olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aseton içeren pek çok ürün endüstride kullanılmakta, ayrıca tırnak cilası, boya temizleyicisi, tutkal ve temizlik ajanları gibi bazı ürünler de tüketiciler tarafından kullanılmaktadır. Ayrıca yer altı ve içme sularında da asetona rastlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu azalmış membran akışkanlığı ve fonksiyonu, bozulmuş mitokondri ve golgi fonksiyonu ve enzim inhibisyonlarını içeren toksikolojik etkilerin bir çoğu ile ilişkilidir. Bu in vitro çalışmada yaygın kullanılması nedeniyle temas riski yüksek olan asetonun eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna yol açıp açmadığı ve hemolitik etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve yöntem: İki haftalık banka kanından elde edilen kan örnekleri antikoagülanlı tüplere alındı ve farklı konsantrasyonlarda aseton bu tüplere ilave edildi. 48 Saat sonra plazma ve eritrosit örnekleri ayrıldı, aspartat aminotransferaz (AST), laktat

dehidrogenaz (LDH) ve demir düzeyleri plazmada çalışıldı. Eritrositlerin oksidatif durumu da, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri çalışılarak değerlendirildi.

Bulgular: AST, LDH ve demir düzeyleri aseton ilave edilen örneklerde kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek idi, yükselmiş düzeyleri artmış aseton konsantrasyonları ile korele idi. Lipid peroksidasyon belirteci MDA düzeyleri bakımından çalışma ve kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu.

Sonuç: Asetonun in vitro şartlarda toksik etkileriyle eritrositlerin hemolizine neden olabileceği ve bunun akut dönemde lipid peroksidasyonu ile ilişkili olmadığı, ancak eritrosit membranına lipofilik ve çözücü etkileri ile ilgisi olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Aseton, hemoliz, lipid peroksidasyonu

The hemolytic effect of acetone on the erythrocyte membrane in vitro conditions

Abstract

Purpose: Acetone is widely used as an industrial solvent and chemical intermediate. Most products containing acetone are used by industry, also some acetone products, such as nail polish remover, paint remover, glue, and cleaning agents, are used by consumers. It has been detected in groundwater and drinking water. Lipid peroxidation is associated with a wide variety of toxicological effect, including decreased membrane fluidity and function, impaired mitochondrial and golgi apparatus functions, and inhibition of enzymes. In this in vitro

* Bu çalışma 30 Ekim - 2 Kasım 2003 tarihleri arasında Antlarya'da yapılan Türk Toksikoloji Derneğinin 5. Uluslararası kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi:

Dr. Ferah Armutcu
Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Kozlu Zonguldak
Tel: 0 372 2610243 / 4333
Fax: 0372 2610155
E-posta: drferah@yahoo.com

study, we aimed to investigate if acetone, a widely used agent and so having a high risk of contact, causes lipid peroxidation at erythrocyte membrane or not, and if it has any hemolytic effect.

Methods: Blood samples that were obtained from two weeks old stored blood were put into tubes with anticoagulant and at different concentrations acetone was added these tubes. After 48 hours, plasma and erythrocyte samples were seperated and studied aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and iron levels in the plasma. It was evaluated the oxidative state of erythrocytes by studied MDA levels which is the indicator of lipid peroxidation.

Result: AST, LDH and iron levels in acetone added tubes were significantly higher than the controls, their elevated levels was correlated with increased concentrations of acetone. No significant difference was observed between the study and control samples about MDA levels, a lipid peroxidation marker.

Conclusion: It was concluded that acetone may cause hemolysis of erythrocytes with its toxic effect in vitro conditions and this is not related with lipid peroxidation in acute period (48 hours) but may relate with lipophilic and solvent effect of acetone on erythrocyte membrane.

Key words: Acetone, hemolysis, lipid peroxidation

Aseton endüstriyel bir çözücü ve kimyasal ara ürün olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hava, su, toprak ve biyolojik örneklerde yaygın olarak bulunan asetona solunan hava, çeşme suyu, alınan gıdalar ve aseton içeren ürünler veya toprakla temas yoluyla maruz kalınmaktadır. Endojen olarak insan vücudunda da üretilmektedir (1,2). Cilt yoluyla temas tırnak cilası ve boya çıkarıcılar, ev temizliği ve cila ürünleri gibi ürünlerle temas sonucu meydana gelebilmektedir. Sigara aseton içerdiğinden içenler içmeyenlerden daha fazla asetona maruz kaldığı, günlük alkol tüketiminin de yükselmiş aseton düzeyleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (3,4). Amerika'da zehir kontrol merkezleri ulusal veri toplama sistemi kurumu 1991 yıllık raporunda 1137 asetonla temas vakası yayınlamıştır (5). Literatürde kaza sonucu veya intihar amacıyla bilerek aseton alınması vakalarına rastlanmaktadır (6,7).

Asetonun oksidatif stresi artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8,9). Biyomembranlarda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sıklıkla reaktif oksijen türlerine maruz kalma ile oluşur ve hücresel fonksiyon değişimi veya hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır (10). Hemoliz genel olarak aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) gibi plazma enzim-

lerindeki artış ile değerlendirilmektedir. Bu enzimler tamamen spesifik olmasa da aktivitelerindeki artışa ilave olarak plazma demir ve potasyum düzeylerindeki artışlar eritrositlerin hemolizindeki artışı yansıtmaktadır (11).

Daha önce yaptığımız deneysel bir çalışmada içme sularında bir hafta aseton verilen rat eritrositlerinde MDA düzeylerinin arttığını gözledik (12). Bu çalışmadan yola çıkarak asetonun toksik ve hemolitik etkilerinin in vitro ortamda da olup olmadığını ve bu etkilerin lipid peroksidasyonu ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bunun için farklı konsantrasyonlarda aseton ile inkübe edilen kan örneklerinde plazma AST, LDH ve demir düzeyleri ile eritrosit MDA düzeylerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem

ZKÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'nden sağlanan iki haftalık banka kanından toplam 8 grup (her birinde 5 örnek bulunan) olmak üzere, 5'er ml kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Aseton ilave edilmeyen ilk grup kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra, diğer gruplara 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500'er 1 aseton (Fluka) ilave edildi. 48 saat 4 °C'de inkübe edildikten sonra tüm örnekler 1500 devirde 10 dk santrifüj edilerek plazma örnekleri elde edildi. Kalan eritrosit örnekleri serum fizyolojik ile 3 defa yıkandıktan sonra -20 °C'de saklandı ve çalışma gününde deiyonize soğuk su ile çözülen eritrosit paketlerinden hemolizat örnekleri elde edildi. Plazma örneklerinde AST, LDH ve demir düzeyleri manuel ticari kitleri (Sigma) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Hemolizat örneklerinde MDA ölçümü Draper ve Hadley'in çift ısıtma metodu ile yapıldı (13). Metodun prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu sonucu oluşan pembe renk absorbansının spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. MDA konsantrasyonları, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 Japan) absorbans değerleri okunduktan sonra, MDA-TBA kompleksinin absorbans sabiti ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Hemogloblin ölçümleri de Drabkin çözeltisi ve standart kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü ve sonuçlar mol / gr hemogloblin olarak verildi.

İstatistiksel analizler: Gruplar arasındaki karşılaştırma SPSS ®11.0 paket istatistik programında tek yönlü ANOVA ve Post-hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. Bulgular arasındaki korelasyon analizleri ise pearson korelasyon testi kullanılarak saptandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir. Tek yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında AST, LDH ve demir düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 1. Aseton ilave edilmeyen (kontrol) ve farklı konsantrasyonlarda aseton ilave edilen gruplara ait plazma AST, LDH, demir ve eritrosit MDA düzeyleri. Her grup için n = 5, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Her gruba ait AST, LDH ve demir düzeyi bir önceki grup ile karşılaştırıldığında; $p < 0.001$, MDA; anlamsız. Her üç parametre arasındaki ilişki pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldığında; $r: 0.9$, $p < 0.001$

Gruplar	AST (U/L)	LDH (U/L)	Demir ($\mu\text{g/dl}$)	MDA ($\mu\text{mol/g Hb}$)
Kontrol	18.4 $\pm$ 0.54	225.0 $\pm$ 5.2	32.4 $\pm$ 1.52	0.050 $\pm$ 0.007
10 μl	24.2 $\pm$ 3.7	247.4 $\pm$ 7.9	38.2 $\pm$ 2.59	0.051 $\pm$ 0.008
25 μl	33.1 $\pm$ 3.16	287.0 $\pm$ 11.5	52.0 $\pm$ 2.24	0.057 $\pm$ 0.006
50 μl	44.6 $\pm$ 4.5	392.8 $\pm$ 41.1	59.2 $\pm$ 3.42	0.053 $\pm$ 0.007
100 μl	59.0 $\pm$ 4.7	612.6 $\pm$ 35.7	80.1 $\pm$ 7.13	0.060 $\pm$ 0.008
250 μl	89.2 $\pm$ 5.0	1055.4 $\pm$ 60.8	134.6 $\pm$ 8.61	0.054 $\pm$ 0.006
500 μl	126.0 $\pm$ 6.5	2164.8 $\pm$ 90.1	305.2 $\pm$ 15.3	0.057 $\pm$ 0.006

fark varken ($P < 0.001$), MDA düzeyleri arasında fark bulunamadı. Farklı konsantrasyonlar arasında Tukey testi kullanılarak yapılan istatistiksel karşılaştırmada da aseton ilave edilmeyen grup ile karşılaştırıldığında 10, 25, 50, 100, 250, 500 μl aseton ilave edilen gruplarda her üç parametre bakımından da anlamlı istatistiksel fark olduğu ($p < 0.001$) bulundu. Her üç parametre arasındaki ilişki pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, konsantrasyon arttıkça AST, LDH ve demir düzeylerinin de arttığı ve aralarında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi. AST-LDH arasında ($r: 0.96$, $p < 0.001$), AST-demir düzeyleri ($r: 0.944$, $p < 0.001$) ve LDH-demir düzeyleri arasında ($r: 0.992$, $p < 0.001$) anlamlı pozitif korelasyon bulundu. MDA ile AST arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi, ancak MDA düzeyleri ile LDH ($r: 0.391$, $P < 0.05$) ve MDA ile demir düzeyleri arasında da anlamlı ($r: 0.437$, $P < 0.01$) korelasyon olduğu bulundu.

Tartışma

Aseton metabolizması laboratuvar hayvanlarında özellikle sıçanlarda yoğun olarak çalışılmıştır. Aseton; akciğerler, sindirim sistemi ve deri yolu ile emilmekte, hızla tüm vücuda dağılmakta ve doku tercih etmeksizin tüm vücutta depolanmaktadır. Karaciğer metabolize olduğu esas organ olup, başlıca akciğerler ve idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır. Aseton kanın hücrel ve hücrel olmayan fraksiyonlarında oldukça iyi dağılmaktadır (1,14,15). Dietz ve ark. iki hafta içme sularında %5 aseton verilen sıçanlarda makrositik anemi ve hematolojik değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (16). Eritrosit membranı serbest radikal ilişkili peroksidasyona oldukça duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir (17). Ksenobiyotikler eritrosit içinde serbest radikallere oksidize olarak eritrosit membranında hemolize yol açmaktadır. Hemoliz sonucu bir prooksidan rolü oynayan demir salınmakta ve diğer toksik

etkiler indüklenmektedir (18). Oksidatif olarak modifiye olan hemoglobinden demir salınımı H_2O_2 veya lipid peroksitler gibi şiddetli oksitleyicilerin varlığında artmaktadır. Çünkü demir iyonları redoks katalisti olarak (Fenton ve Haber-Weiss tepkimesi) önemli rol oynar (19). Eritrositlerden demir salınımı aseton toksitesinin total prooksidan etkisini artıracaktır. Membran peroksidasyonu, membran akışkanlığı ve permeabilitesinde değişikliklere ve artmış protein yıkım hızına, ve bunlar da en sonunda hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit, oksidatif stresin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmakta olup, eritrositin membran içerikleri ile çapraz bağlar da yapabilmektedir (20). Puntarulo ve Cederbaum içme sularında %1 aseton verilen sıçan mikrozoamlarında H_2O_2 üretimi ve demir bağımlı lipid peroksidasyonunda artış gözlemlenmiş, mikrozoamlara in vitro aseton ilave ettiklerinde ise oksijen radikal üretimine etkisi olmadığını rapor etmişlerdir (21). Dey ve ark. önceden asetona maruz kalan sıçan lenfositlerinde NADPH bağımlı lipid peroksidasyonunun arttığını bildirmişlerdir (22). Daha önce yaptığımız deneysel çalışmada asetonun eritrosit MDA düzeylerini artırdığı ve hemolize yol açtığı, buna karşın önemli bir antioksidan ve membran stabilazörü olarak E vitamini'nin asetonun bu etkilerini önemli ölçüde azalttığı bulundu (12). Bu in vitro çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda aseton ilave edilen gruplar ile kontrol grubu arasında MDA düzeyleri bakımından fark bulunamadı. Ancak bu durum lipid peroksidasyonu oluşmadığı anlamına gelmez. Zira 4-OH nonenal gibi diğer lipid peroksidasyonu son ürünlerinde artış olması da olasıdır. Plazma LDH düzeyleri sitoplazma kaybı ile sonuçlanan herhangi bir hücrel hasar durumunda artarken, eritrositlerde de yüksek aktiviteye sahip olan AST'nin plazma konsantrasyonu hemolizde yükselmektedir.

Plazma demir konsantrasyonu hemoglobin demirine bağlı olarak hemoliz durumunda yükselmektedir (11). Aseton non-iyonik ve su ile karışabilir olduğundan, hücre membranlarına pasif olarak geçebilmektedir. Bu çalışmada üç parametrede her grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu hemolitik etki muhtemelen onun lipid çözücü özelliklerine bağlıdır. Bazı farmasötik formüllerde kullanılan aköz olmayan çözücülerin değerlendirildiği çalışmada asetonun oldukça hemolitik etki yaparak eritrosit morfolojisinde önemli değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (23). Ivanov'a göre aseton gibi organik solventlerin membran proteinlerinin yapısını, toksik etkilerine paralel olarak bozduğu ve bu nedenle biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda dikkatli kullanılmaları gerektiği ileri sürülmektedir (24).

Sonuç olarak asetonun in vitro şartlarda toksik etkileriyle eritrositlerin hemolizine neden olabileceği ve bunun akut dönemde lipid peroksidasyonu ile ilişkili olmadığı, ancak eritrosit membranına lipofilik ve çözücü etkileri ile ilgisi olabileceği sonucuna varıldı. Asetonun in vivo olarak görülen oksidatif etkisi in vitro şartlarda yapılan bu çalışmada gözlenmemiş olsa da bu konuda eritrositlerde antioksidan enzim düzeylerini de kapsayan daha ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

Kaynaklar

1. Morgott DA. Acetone. In: Clayton GD and Clayton FE ed. Patty's Industrial hygiene and toxicology, 4th ed. New York, John Wiley Sons, vol II part A chapter 5, 1993: 149-281.
2. EPA, Integrated Risk Information System (IRIS) Acetone. Online file, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati OH, 1995.
3. Manning DL, Maskarinec MP, Jenkins PA, Marshall AH. High performance liquid chromatographic determination of selected gas-phase carbonyls in tobacco smoke. J Asset Off Anal Chem. 1983; 66: 5-12.
4. Churchill JE, Ashley DL, Kaye WE. Recent chemical exposures and blood volatile organic compound levels in a large population-based sample. Arch Environ Health. 2001; 56: 157-166.
5. Litovitz TL, Holm KC, Bailey KM, Schmitz BF. 1991 Annual report of the American Association of Poison Control Centers National Data Collection System. Am J Emerg Med. 1992; 10: 452-505.
6. Gamis AS, Wasserman GS. Acute acetone intoxication in a pediatric patient. Pediatr Emerg Care. 1988; 4: 24-26.
7. Kostusiak V, Bekkal R, Mateu P. Survival after drinking lethal dose of acetone. Intensive Care Med 2003; 29: 339.
8. Orellana MB, Guajardo V, Araya J, Thieleman L, Rodrigo R. Oxidative stress microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in the liver of rats treated with acetone. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001; 128: 503-509.
9. Deng Y, Boomsma F, Yu PH. Deamination of methyamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. Life Sci. 1998; 63: 2049-2058.
10. Sevanian A, McLeod L. Formation of Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. Taylor and Francis, Washington: DC, 1997: 47-70.
11. Tietz NW, Finley PR, Pruden EL. Clinical Guide to laboratory tests. 2nd edition WB Saunders Company 1990.
12. Armutcu F, Gürel A, Alper C, Numanoglu KV. Aseton verilen ratlarda eritrosit lipid peroksidasyonu üzerine vitamin E'nin etkileri. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi Özet Kitabı 175-176.
13. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990; 186: 421-431.
14. Casazza JP, Felver ME, Veech RL. The metabolism of acetone in rat. J Biol Chem. 1984; 259: 231-236.
15. Mizunuma K, Yasugi T, Kawai T, Horiguchi S, Ikeda M. Exposure-excretion relationship of styrene and acetone in factory workers: a comparison of a lipophilic solvent and a hydrophilic solvent. Arch Environ Contam Toxicol. 1993; 25: 129-33.
16. Dietz DD, Leininger JR, Rauckman EJ et al. Toxicity studies of acetone administered in the drinking water of rodents. Fundam Appl Toxicol. 1991; 17: 347-360.
17. Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. J Biol Chem. 1988; 263: 19809-19814.
18. Everse J, Hsia, N. The toxicities of native and modified hemoglobins. Free Radic Biol Med. 1997; 22: 1075-1099.
19. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett. 1986; 201: 291-295.
20. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes in diabetic rats. Diabetes 1991; 40: 1241-4.
21. Puntarulo S, Cederbaum AI. Increased microsomal interaction with iron and oxygen radical generation after chronic acetone treatment. Biochim Biophys Acta. 1988; 964: 46-52.
22. Dey A, Parmar D, Dhawan A, Dash D, Seth PK. Cytochrome P450 2E1 dependent catalytic activity and lipid peroxidation in rat blood lymphocytes. Life Sci. 2002; 71: 2509-2519.
23. Mottu F, Stelling MJ, Rufenacht DA, Doelker E. Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection. PDA J Pharm Sci Technol. 2001; 55: 16-23.
24. Ivanov IT. Rapid method for comparing the cytotoxicity of organic solvents and their ability to destabilize proteins of the RBC membrane. Pharmazie. 2001; 56: 808-809.