

**DIETİLSTİLBESTROL UYGULANAN SIÇANLARIN
BÖBREK, DALAK, KALP VE BEYİNLERİNDE BAZI ENZİM
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

THE INVESTIGATION OF SOME ENZYME LEVELS IN THE
KIDNEY, SPLEEN, HEART AND BRAIN OF RATS TO WHICH
DIETHYLSTILBESTROL IS ADMINISTERED

İsmihan GÖZE*, İzzet YELKOVAN, Sevtap BAKIR*** Ziynet ÇINAR******

* Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu .SİVAS

**Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, SİVAS

***Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, SİVAS

**** Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, SİVAS

58140-SİVAS

ÖZET

Dietilstilbestrol'un (DES) total protein ve dokulardaki enzim parametreleri üzerindeki olası değişimlerini izlemeyi amaçladığımız çalışmamızda, gebe sıçanlara gebeliğin 2. gününden itibaren 19 gün süreyle 0,4 µg/ g / gün (yaklaşık 60 µg/ rat) dozunda DES oral gavaj yoluyla verildi. Denekler gebeliğin son günü servikal dislokasyonla öldürüldü. Böbrek, dalak , beyin ve kalplerinden hazırlanan homojenatlarda total Protein (TP) ile alanin amino transferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), Gama glutamik transpeptidaz (GGT), alkalin fosfat az (ALP), aspartat amino transaminaz (AST) ve glutatyon -s- transferaz (GST) enzim aktivite ölçüldü.. GST aktivitesi spektrofotometrik yöntemle çalışıldı diğer tüm enzim aktivite ölçümleri ise Ciba Corning Express Plus otoanalizörde ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubu sıçanların enzim aktivite sonuçları ile karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel analizde denek enzim aktivite ölçümleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında dalakta ALP hariç tüm enzim gruplarında, gruplar arası farklılık anlamsız olarak bulundu ($p>0,05$). Böbreklerde TP, ALT, LDH ve GST, kalpte ALT ve AST ($u= 4; p<0,05$) Beyinde ise ALT, ALP ve GGT enzim aktivite yönünden gruplar arası fark istatistiksel yönden anlamlı ($p<0,05$) bulunurken diğer gruplarda anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Dalak hariç incelenen diğer dokularda, bazı sitoplazmik enzim aktivitelerinin değişikliğe uğramış olması, DES'in pek çok metabolik yolu etkileyerek biyomoleküllerle etkileştiğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: DES, ALT, LDH, ALP, GGT, TP, AST, GST, enzim, sıçan

ABSTRACT

In this study, we aimed to observe possible changes in enzyme activities and total protein levels in tissues of diethylstilbestrol (DES) at the dose of 0.4 µg/g/day (60 µg/rat) had orally been given to the pregnant rats since two day of the pregnancy for 19. days by oral gavage. Rats were killed by cervical dislocation on the last day of pregnancy. In prepared homogenates from spleen, kidney, heart and brain tissues total protein (TP), alanin amino transferase (ALT), laktate dehidrogenase (LDH), alkaline fosfatase (ALP), gamma glutamik transpeptidaz (GGT), aspartat amino transaminaz (AST) enzymes were measured by Ciba Corning Express Plus autoanalyzer. GST enzyme was studied by spektrofotometric assay. The data of experimental group was compared with those of control rats. In the statistical analysis, there were found insignificant differences between experimental group and control group in terms of enzymes except for ALP in spleen ($p>0,05$). There were found statistically significant differences in experimental group compared to control rats in kidney TP, ALT, LDH, GST in heart ALT, AST and brain ALT, ALP and GGT enzymes ($p<0,05$), but the other enzyme activities were not showed significant differences between two group ($p>0,05$). We think that DES can be affect many metabolic ways because of changed some stoplazmic enzyme activities in the tissues.

Key words: DES, ALT, LDH, ALP, GGT, TP, AST, GST, enzyme.rat

GİRİŞ

Stilbenlerin alt ünitesini oluşturan dietistilbestrol (DES), çok stabil yapılıdır ve toksik etkisi uzun süre devam eder (1,2). İlk sentezlendiğinden beri hayvancılık ve klinik alanda geniş kullanım sahası bulmuştur. Sadece A.B.D. de 1971den bu güne kadar yaklaşık 2.000.000. kadının abortusu engellemek için DES kullandığı belirtilmiştir (3). DES ile fetal dönemde etkilenen kız çocuklarda vagina ve serviks' te adenozis, berrak hücreli adenokarsinoma riskinin normal popülasyona göre yüksek olduğu, erkek çocuklarda ise azospermi ve jinekomasti etkileri bildirilmiştir (4-9).

Anabolizan etkisi nedeni ile hayvancılık alanında kullanılmış ancak karsinojenik etkilerinin tesbitinden sonra bu amaçla kullanımı bir çok ülkede yasaklanmıştır (2,9). Yurdumuza ithal edilen etlerde anabolizan denetimi zorunludur, ancak aynı kontrolün yerli üretimde yapılması için yasal tedbirler yoktur ve etler, et ürünleri ve yemler bu yönde denetlenmemektedir (4,10). Dolayısı ile karsinojenik etkili DES ve metabolitleri besin zinciri yolu ile her gün binlerce insana ulaşmaktadır.

DES' in enzimlere etkileri üzerinde de bazı araştırmalar mevcuttur, adenzin deaminaz (ADA), peptidil arjinin deaminaz, peroksidaz gibi enzim tepkimeleri izlenmiştir (11-15). Organizmaya alınan DES' in kan lipid miktarında değişime neden olup bazı organ ve dokularda yağlanmayı artırdığı, damarlarda yağlanma ve dejenerasyon oluşturduğu bildirilmiştir (16,17). Araştırmamızda karsinojenik etkilerinin yanısıra hormon ve enzim salınımında değişime yol ačan DES' in dalak, böbrekler, beyin ve kalpde total protein değeri ve bazı sitoplazmik enzimlerin aktivitelere etkisi ve olası değişimleri izlemek ayrıca, ksenobiyotik etkisinden dolayı DES' in biyotransformasyonunun glutatyon-s- transferaz (GST) aktivitesini değiştirip değiştirmedini belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL-METOD

Deneylerde 4 haftalık yaklaşık 150 gr ağırlığında 6 adet sıçan kullanıldı. (*Rattus Norvegicus* var.albino). Bunların hepsine gebeliğin ikinci gününden itibaren 19 gün 0,4 µg/g/gün (60 µg/rat) dozunda mısır yağında çözünen DES oral gavaj yolu ile verildi. Kontrol grubu da denek grubuna paralel sürelerde çalışıldı. Denek ve kontrol grubu sıçanların tümü gebeliğin 20. gününde servikal dislokasyonla öldürölüp böbrek, dalak, beyin ve kalpleri alındı. Organlar 0,15 M KCI ile iyice yıkandı. Kaba terazide tartıldı ve 1 gramlık parçalar özütleme için kullanıldı. 1:3 (ağırlık/hacim) oranında 0,15 M KCI ilave edilip 1400 devir/dakika hızla dönen teflon cam özütleyicide (*B.Braun*) üç vuruş yapılarak parçalandı. Elde edilen homojenat soğutmali ve vakumlu olan *Beckman Model J 2 Santrifüj* de 4800 g' de 15 dakika santrifüje edildi. Elde edilen supernatanda GST dışındaki enzim aktiviteyi *Ciba Corning Express Plus* otoanalizöründe ölçüldü. Bioklinikadan temin edilen standard otoanalizör kitleri kullanıldı (18). GST enzim aktivitesi ise glutatyonun substratı ile arasındaki tıyoeter bağı oluşumunun 340 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi ile saptandı (19). İstatistiksel değerlendirme, denek sayısının (n<30) az olması nedeni ile bağımsız iki gruptan ölçümle elde edilen veriler karşılaştırılırken tercih edilen parametrik olmayan Mann-Whitney "u" testi ile yapıldı (20).

SONUÇ VE TARTIşMA

19 gün DES verilen sıçanların dalak, böbrek, kalp ve beyin homojenatlarında saptanan TP ve enzim aktivite değerlerinin (U/ mg protein) istatistiksel analizlerine ait veriler Tablo 1 , Tablo 2, Tablo 3 ve 4' de gösterilmiştir.

Denek gebe sıçanların *dalak* homojenatında ölçülen TP ve enzim aktivite değerleri, kontrol grubu değerleri Mann Whitney "u" testi ile karşılaştırıldığında ALP hariç tüm parametrelerde gruplar arası farklılık istatistiksel yönden anlamsız bulundu ($p>0,05$) (Tablo 1)

TABLO 1. Denek ve kontrol grubu sıçanların dalakları arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

T.P ve Enzimler	X + Sx DENEK n:6	X+Sx KONTROL n:6	SONUÇ
total protein - T.P U/mg protein	1,32+0,11	1,03+0,09	U=20; $p>0,05$
alkalen fosfataz- ALP U/mg protein	243,33+61,14	60+13,17	U=30; $p<0,05^*$
alanin transferaz-ALT U/mg protein	613,3+143,17	682,3+155,5	U=20; $p>0,05$
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	27693,3+2957,1	21883,3+4011,5	U=20; $p>0,05$
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	2993,3+22,31	2813+480,4	U=24; $p>0,05$
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	4606,6+276,4	4029+1046,5	U=20; $p>0,05$
glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	0,02+0,00	0,02+0,00	U=24; $p>0,05$

Böbrek homojenatında yapılan ölçümde ise TP (U=36; $p<0,05$), ALT (U=36; $p<0,05$), LDH (U=36; $p<0,05$) ve GST(U=36; $p<0,05$) aktivitelerinde anlamlı değişim izlendi (Tablo 2).

TABLO 2. Denek ve kontrol grubu sıçanların böbrekleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

T.P ve Enzimler	X + Sx DENEK n=6	X+Sx KONTROL n=6	SONUÇ
Total protein-TP U/mg protein	1,37+0,15	2,07+0,15	U=36; $p<0,05^*$
alkalen fosfataz-ALP U/mg protein	3280+536,26	3320+542,01	U=24; $p>0,05$
alanin transferaz-ALT U/mg protein	2376,6+289,7	8900+1081	U=36; $p<0,05^*$
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	37096,6+5731	82748,3+8439,3	U=36; $p<0,05^*$
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	2993,3+223,1	2813+480,4	U=24; $p>0,05$
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	22646,6+5731	35491,6+4074,7	U=28; $p>0,05$
glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	1,37+0,08	0,2+0,04	U=36; $p<0,05^*$

Kalp homojenatında yapılan değerlendirmede ise ALT (U=36;p<0,05) ve AST (U=32;p<0,05) enzim aktivitelerinde anlamlı değişim izlendi (Tablo 3).

TABLO 3. Denek ve kontrol grubu sıçanların kalpleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

T.P ve Enzimler	X + Sx DENEK n=6	X+Sx KONTROL n=6	SONUÇ
Total protein-TP U/mg protein	1,17+0,01	1,27+0,04	u=24;p>0,05
Alkale fosfataz-ALP U/mg protein	900+189,8	394+43,36	u=28; p>0,05
Alanin transferaz-ALT U/mg protein	1747,67+99,9	14950+724,1	u=36;p<0,05*
Laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	11066+10962	130566+953,1	u=24;p>0,05
Gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	33,33+4,22	30,1+3,3	u=20;p>0,05
Aspartat transaminaz-AST U/mg protein	63000+1316,5	69216,6+1770,1	u=32;p<0,05*
Glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	0,03+0,01	0,01+0,0	u=24;p>0,05

Beyinden hazırlanan homojenatta ise ALT (U=36;p<0,05), ALP (U=32;p<0,05) ve GGT (U=36;p<0,05) aktivite değişimi izlendi (Tablo 4)..

TABLO 4. Denek ve kontrol grubu sıçanların beyinleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

T.P ve Enzimler	X + Sx DENEK n=6	X+Sx KONTROL n=6	SONUÇ
total protein-TP U/mg protein	1,07+0,26	0,70+0,04	U=20;p>0,05
alkalen fosfataz-ALP U/mg protein	670+43,05	780+21,91	U=32;p<0,05*
alanin transferaz-ALT U/mg protein	828,6+86,4	1604,6+42,28	U=36;p<0,05*
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	54320+8122,6	41516,6+2220	U=24;p>0,05
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	8,43+1,8	4,67+0,43	U=36;p<0,05*
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	21800+1323,6	22016,6+1990	U=20;p>0,05
glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	0,02+0,0	0,02+0,0	U=24;p>0,05

Böbrek, beyin ve kalp için diğer tüm enzim gruplarında enzim aktivitelerindeki değişiklik istatistiksel olarak anlamsız bulundu. ($p>0,05$).

DES, karaciğerde glukronik asit ile suda çözünebilir glukuronit konjugatını oluşturur. DES-glukuronit safra üzerinden bağırsağa salındıktan sonra değişikliğe uğramadan geri emilip enterohepatik dolaşıma geçer (5). Dolayısı ile uzun süre vücutta varlığı saptanabilir. Bu arada DES'in enzimler üzerindeki etkileri geniş ilgi ve araştırmalara konu olmuştur. Isaksson ve ark. 3 lizozom enzimi -Hekzoaminidaz, β - Glukorinidaz ve a-Fukozidaz- üzerinde yaptıkları incelemede enzim aktivitelerinin östrojen uygulanan ratlarda değiştiğini, ancak DES verilenlerde sadece a -Fukozidaz enzim seviyesinde farklılaşma olduğunu bildirmişlerdir (21). 1, 2 ve 3 aylık periyotlarla DES verilen deneklerde yapılan araştırmada zamana bağlı olarak adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde periyodik artış izlenmiştir (11-13). Nagae ve arkadaşlarının sıçan karaciğerinde yaptıkları araştırmada ise DES'in doza bağlı olarak glutamat-oksalasetat transaminaz (GOT), glutamat piruvat transaminaz (GPT) ve LDH aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (15). Bir diğer araştırmada ise fare kas dokusu üzerine DES'in etkisi incelenmiş ve LDH inhibisyonu saptanmıştır (22) Kas dokusunda yapılan bir diğer araştırmada ise ALP aktivitesinde artış bildirilmiştir (23, 24). Sıçanlarda seks hormonlarının beyin ve karaciğer GST'sine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise GST'de redüksiyon saptanmıştır (25). Nunez-Delicado ve arkadaşları ise cyclodextrin-DES kompleksi ile yaptığı araştırmada, lipoksijenaz aracılığı ile DES oksidasyonunun inhibe edildiğini göstermiş ve DES' in lokal ve sistemik yan etkilerinin azaltılmasında bu kompleksin faydalı olduğunu bildirmişlerdir (26). Sharma ve Slocum ise antioksidan etkili Vitamin C ve N-Asetil Sistein' in DES' in yapması muhtemel DNA arylasyonunu ve genotoksitesiyi önlediğini göstermişlerdir (27). İn vivo II. faz detoksifikasyon yolu sülfasyonun araştırılması ile de sülfatlı DES türevlerinin bu yolla detoksifiye edildiği bulunmuştur (28). Van Der Heyden ve ark. ise DES'in hücre içi pH dengesini plazma membranı ATPaz'ları inhibe ederek değiştirdiğini göstermişlerdir (29).

Bizim çalışmamızda ise yapılmış olan diğer enzim çalışmalarına benzer şekilde (15,22) böbrek homojenatında LDH aktivitesinde inhibisyon izlenmiş, GST enzim aktivasyonunun da ise anlamlı artış bulunmuştur. Tüm dokularda GGT enzim aktivitesinin denek grubunda yüksek olması ve beyin dokusunda anlamlı artış göstermesi dikkat çekicidir. Kalpte ALT ve AST değerlerinde, beyin dokusunda ise ALT değerinde ilgi çekici azalış saptanmıştır.

TCA döngüsündeki metabolitlerin enzimleri olan ALT, AST ve LDH değişimleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemekle birlikte, ALT ve AST dalak haricinde tüm dokularda aktivite kaybına uğramış olarak görülmektedir. Bu da oksaloasetat ve piruvat yönündeki metabolik aktivitenin aspartat ve alanine yöneldiği izlenimini uyandırmıştır. Benzer şekilde LDH' de gözlenen aktivite kaybının da ALT ve AST' de olduğu gibi DES' in anabolik etkisine bağlı olduğunu düşünülebilir.

DES için yapılan pek çok araştırma mevcuttur, ancak enterohepatik dolaşıma geçip vucutta uzun süre varlığını sürdürebilmesi ve hücre içi enzim dengelerini değiştirebilmesi, genotoksitesi gibi nedenlerden dolayı mutajenite ve toksisitesinin daha ileri tekniklerle araştırılması gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. **Bozkurt, M.** "Hayvan ürünlerinde anabolik (hormon) rezütleri ve ulusal yasal düzenlemeler" *Türk Hij. Den. Biyol Derg.*, 45 (2); 260-287. (1988)
2. **Anonim:** American survey ashort of hormon , *Economist* Jan. 29-30 (1988)
3. **Bracbill,Y., Berendes,H.W** "Dangers of Diethylstilbestrol.Rewiew of a 1953 paper" *Lancet* (letter) 2;520(1978)
4. **Şener, S** "Hayvansal ürünlerde kalıntı" *TÜBİTAK , Veteriner ve hayvancılık grubu özel ihtisas komisyonu raporu*, Ankara (1994)
5. **Ergun, H**" Hormon ve hormon benzeri anabolik ajanlar" *A.Ü. Vet. Fak. Dergisi* 35 (2-3); 353-363 (1988)
6. **Wortzman,J.,Hamıdına,A., Winters, S.S** " Hypogonadism long- term treatment with DES" *Am. J.Med. Sci.* 297 (6); 365-368 (1989)
7. **Matias-Guu X.** Clear cell tumors of female genital tract. *Semin Diagn Pathol.* Nov;14 (4):233-9(1997)
8. **Reich O.** Clear cell carcinoma of the uterine cervix: pathology and prognosis surgically treated stage IB-IIIB disease in women not exposed in utero DES. *Gynecol Oncol.* Mar; 76(3):331-5 (2000)
9. **Hatch, E.,Herbst,A., Hoover,R** . Incidence of squamous neoplasia of the cervix and in DES-exposed daughters. *Ann.Epidemiol* 1:10(7):467 (2000)

10. Ersoy, E., Aghte,0., Ergun,Ş.H.. Üresin, T: Etlik piliçlerde DES yönünden ön çalışmalar,A. Ü. Vet. Fak. Dergisi 36(2-3); 1-20(1988)
11. Göze,İ., Yelkovan,İ., Bakır,S Dietilstilbestrol'ün adenosin deaminaz aktivitesine etkisi. *TrJ.of.Biol* 20: 179-182 (1996)
12. Göze,İ.,Çolak,A. Gebelik döneminde DES verilen fareler ve yavrularında ADA enzim aktivitesi ile kromozomal değişimler ve MspI enzimi ile bantalanlarının saptanması. *Türk Ekopatoloji Dergisi* 2(3-4):73-78 (1996)
13. Göze,İ., Bakır,S., Yelkovan,İ. Adenosine deaminase activity in DES administered rat and their offspring. *T.J.Med.Res.* **14(4)**; 125-127 (1996)
14. Nagta,S., Yamagima,M., Inove,K. Estorojen regulates peptidilarginin deaminaz levels in a rat pituatry cell line in culture.*J.of.Cell Physiol* 145;333-339 (1990)
15. Nagae Y., Miyamoto,M., Miyamoto,H; Effect of estrogen on liver plazma membrane in rats. *Toxicol.Sci.* 17(4): 185-195 (1992)
16. Kohigashi,K., Fukuda,Y., Imura,H. Inhibitory effect of tamoxifen on DES promoted hepatic tumorigenesis in male rats and its possible mechanism of action. *J. Cancer Res* 79 (11):1335-1339(1988)
17. Arora,V.K., Bhatia,A., Sood,S.K. Synergestic promoter effect of DES and Phenobarbitone in DENA induced hepatic neoplasia in rats. *İ.J.Med. Res.:* 90 (5)9-16 (1989)
18. Ciba- Corning . Application Guide , 25066x 82 Rev.C 2/93. USA (1993)
19. Habig,W.A., Tabst,M.S., Jacoby,W.V. Glutatyon S transferase *Biolchem..* 7130- 7139 (1974)
20. Sümbüloğlu,K., Sümbüloğlu,V. Biyoistatistik, Özdemir Yay .Ankara, 145-148p (1993)
21. Isaksson,A., Hultberg,B., Bergenfet,M. Lysosomal enzymes in pregnant and steroid treated rats , *Horm Metab Res.*20 (5); 274-277 (1988)
22. Dempsey, R., Morgan,S., Cohen,L. Reduction of enzyme efflux from skeletal muscle by DES *Clin. Pharmacol. Ther* Jul: 18 (1): 104-11 (1975)
23. Song SJ. Bone metabolism in postmenopausal women and after estrogen treatment. *ChungHua Fu Chan Ko Tsa Chih.Feb:28(2):79-8* (Pub Med alıntı) (1993)
24. Cohen,L. Morgan,J. DES effects on serum enzymes and izozymesin muscular dystrohy. *ArckNerol.* 33(7): 480-84 (1976)

25. **Das M, Agarwal AK, Seth PK.** Regulation of brain and hepatic GST by sex hormones in rats. *Biochem Pharmacol.* Dec **1:31** (23):3927-30 (1982)
26. **Nunez-Delicado E, Sojo M, Sanchez-Ferrer A, Garcia-Carmona F.** Cyclodextrin as DES carrier system: charecterization of DES-cyclodextrins complexes. *Pharm Res.* Jun ;**16** (6) : 854-8(1999)
27. **Sharma M, Siocum HK.** Prevention of quinone- mediated DNA arylation by antioxisdants. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 7; **262** (3):769-74 (1999)
28. **Suiko M, Sakakibara Y, Liu MC.** Sulfation of enviromental estrojen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem Biophys Res Commun* Jan 7; **267**(1):80-4 (2000)
29. **Van Der Heyden N, Docampo R.** Intracelluler pH in mammalian stage of Trypanosoma cruzi is K⁺ dependent and regulated by H⁺- ATPases. *Mol Biochem Parasitol* .Feb 5; 105 (2000)

Başvuru Tarihi: 12.09.2000

Kabul Tarihi: 19.04.2001