

DAMİNOZİT UYGULANAN SIÇANLARIN BÖBREK, DALAK, KALP, KARACİĞER VE BEYİNLERİNDE BAZI ENZİM DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

THE INVESTIGATION OF SOME ENZYME LEVELS IN THE KIDNEY, SPLEEN,
HEART, LIVER AND BRAIN OF DAMİNOZİDE ADMINİSTERED RATS

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

*Cumhuriyet University, Vocational School of Health Services, Sivas, TURKEY

**Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Medicinal Biology, Sivas, TURKEY

***Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Sivas, TURKEY

****Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Bioistatistics, Sivas, TURKEY

ÖZET

Daminozit'in total protein ve dokulardaki enzim parametreleri üzerindeki olası değişimlerini izlemeyi amaçladığımız çalışmamızda, sıçanlara 15 gün süreyle 150 mg/kg/gün dozunda daminozit intraperitoneal injeksiyon ile uygulandı. Denekler 15. gün bitiminde servikal dislokasyonla öldürüldü. Böbrek, dalak , beyin, karaciğer ve kalplerinden hazırlanan homojenatlarda total protein (TP) ile alanin amino transferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamil transpeptidaz (GGT), alkalin fosfataz (ALP), aspartat amino transaminaz (AST) ve glutatyon -s- transferaz (GST) enzim aktiviteleri ölçüldü. GST aktivitesi spektrofotometrik yöntemle çalışıldı diğer tüm enzim aktiviteleri ise Ciba Corning Express Plus otoanalizörde ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubu sıçanların enzim aktivite sonuçları ile karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel analizde deneklere ait enzim aktivite ölçümleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Böbrek ve karaciğerde tüm enzim aktivite değerlerinde gruplar arası farklılık anlamsız olarak bulunurken ($p>0,05$) . dalakta T.P ($u=32;p<0,05$) ve GGT ($36;p<0,05$) değeri hariç tüm gruplarda fark anlamsız bulundu ($p>0,05$), kalpte GST aktivitesi ($u= 36; p<0,05$), beyinde ise GST ($U=36;p<0,05$) ile GGT ($u=32;p<0,05$) enzim aktiviteleri yönünden gruplar arası fark istatistiksel yönden anlamlı ($p<0,05$) bulundu. Diğer gruplarda ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

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

ABSTRACT

In this study, it was aimed to examine possible changes in enzyme activities and total protein levels in tissues of rats given daminozit at the dose of 150 mg/ kg/ day for 15. days introperitonly. Rats were killed by cervical dislocation on the end of 15 day . total protein (TP), alanin amino transferase (ALT), laktate dehidrogenase (LDH), alkaline fosfatase (ALP), gamma glutamil transpeptidaz (GGT), aspartat amino transaminaz (AST) enzyme activities were measured In prepared homogenates of spleen, kidney, heart, liver and brain tissues 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. There were no statistically differences between experimental group and control group in terms of enzymes in liver and kidney ($p>0,05$) . There were significant differences in experimental group compared to control rats in spleen TP ($u=32;p<0,05$) and GGT ($u=36 ;p<0,05$) in heart GST ($u=36;p<0,05$) and brain GST ($u=36;p<0,05$) and GGT ($u=32;p<0,05$) enzymes ($p<0,05$), but the other enzyme activities did not show significant differences between two group ($p>0,05$).

Key Words: Daminozide, ALT ,LDH ,ALP, GGT, TP ,AST, GST, enzyme, rat

* Bu araştırma çalışması 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresinde (14-17 Ekim 2003-Adana) poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Bitki büyüme hormonu grubundan bir pestisit olan Daminozit (Süksinik asit 2-2 dimetil hidrazid) tarımda verimliliği artırmak amacı ile kullanılır (1). Yapraktan absorbe edildiği için bitki ve meyvelerde kalıntı bırakabilir (2-4). Daminozitin hidrolizi ile oluşan metaboliti UDMH'nın (1.1 dimetil hidrazin) yüksek dozda kan damarları ve karaciğerde tümör oluşumuna neden olabildiği ve dolayısı ile zayıf karsinojen olduğu (5) ve DNA'yı metillediği bildirilmiştir (6-9). Ancak düşük dozların denendiği bazı araştırmalarda ise daminozit ve metaboliti UDMH'nın karsinojen olmadığı rapor edilmiştir.(10,11). Yüksek dozlarda uygulamanın karaciğer fonksiyonlarını değiştirdiği ve safra kanalında genişlemeye yol açtığı, ovaryumda atrofiye neden olduğu , teratojen olabileceği belirtilmektedir (12-14)

Araştırmamızda metabolitleri nedeni ile karsinojenik etkilerinin olabileceği, hormon ve enzim salınımında değişime yol açacağı belirtilen 'daminozit' in dalak, böbrekler, beyin, karaciğer ve kalpde total protein değeri ve bazı sitoplazmik enzimlerin aktivitelerine etkisi ve olası değişimleri izlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde 4 haftalık yaklaşık 150 gr ağırlığında 6 adet sıçan kullanıldı. (*Rattus Norvegicus var.albino*). Uygulanan doz miktarı 10 µg/ g/ gün (yaklaşık 150 µg/kg/ gün) daminozit olup araştırmalarda belirtilen LD 50 değerine göre belirlendi (15). Tüm denek grubuna 15 gün süreyle daminozit intraperitoneal injeksiyon ile uygulandı. Kontrol grubunu oluştururken aynı sayıda ve özellikte sıçan seçildi. Daminozit uygulanan denek grubu ve kontrol grubu sıçanların tümü 15. günde servikal dislokasyonla öldürülüp böbrek, dalak, beyin, karaciğer ve kalpleri alındı. Organlar 0,15 M KCl ile iyice yıkandı. Kaba terazide tartıldı ve 1 gramlık parçalar özütleme için kullanıldı. Bu doku parçaları üzerine 1:3 (ağırlık/ hacim) oranında 0,15 M KCl ilave edilip, 1400 devir/dakika hızla dönen teflon cam özütleyicide (*B.Braun*) üç vuruş yapılarak parçalandı. Elde edilen homojenat soğutmalı ve vakumlu olan *Beckman Model J 2 Santrifuj* de 4800 g' de 15 dakika santrifüje edildi. Doku supernatanlarında GST dışındaki enzim aktiviteleri *Ciba Corning Express Plus* otoanalizöründe ölçüldü. Çalışmalarımızda bioklinikadan temin edilen standard otoanalizör kitleri kullanıldı (16). GST enzim aktivitesi ise glutatyonun substratı ile arasındaki tiyoeter bağı oluşumunun 340 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi ile saptandı (17). Daminozit uygulanan denek grubundan sağlanan veriler, kontrol grubu sıçanların enzim aktivite sonuçları ile karşılaştırıldı. 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 (18).

SONUÇLAR

15 gün daminozit verilen sıçanların karaciğer, 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 ,Tablo 4 ve 5' de gösterilmiştir.

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

Tablo 1.). Daminozit uygulanan denek ve kontrol grubu sıçanların dalakları arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

	X + S DENEK n:6	X+ S KONTROL n:6	SONUÇ
total protein - T.P U/mg protein	1,37+ 0,11	2,23+0,3	U=32; p<0,05*
alkalen fosfataz- ALP U/mg protein	283,33+ 73,79	650+144,9	U=30;p>0,05
alanin transferaz-ALT U/mg protein	783+73,79	733,3+38	U=24;p>0,05
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	32116,6+10284	21816+6333,1	U=20;p>0,05
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	9,17+1,39	58,3+12,43	U=36;p<0,05*
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	4350+348,3	4716,6+196,9	U=24;p>0,05
glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	1,10+0,00	0,83+0,13	U=24,p>0,05

X:Aritmetik ortalama S:Standard sapma U:Mann Whitney U testinde test istatistik sonucu

Böbrek homojenatlarında yapılan ölçümde enzim aktivitelerinde ve total protein değerlerinde gruplar arasında anlamlı değişim izlenmedi (Tablo 2)

Tablo 2. Daminozit uygulanan denek ve kontrol grubu sıçanların böbrekleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

	X + S DENEK n=6	X+ S KONTROL n=6	SONUÇ
Total protein-TP U/mg protein	1,90+0,17	1,88+0,20	U=21;p>0,05
alkalen fosfataz-ALP U/mg protein	1866+231,9	1816,6+322,6	U=20;p>0,05
alanin transferaz-ALT U/mg protein	7600+316,7	6966+823,2	U=24;p>0,05
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	44300+11730	69466,63+8236,3	U=28;p>0,05
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	2250+162,2	1900+137,84	U=28;p>0,05
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	36000+3771,1	33033,3+4118	U=20;p>0,05
Glutasyon S transferaz-GST U/mg protein	1,67+0,08	1,53+0,11	U=22;p>0,05

X:Aritmetik ortalama S:Standard sapma U:Mann Whitney U testinde test istatistik sonucu

Kalp homojenatlarında yapılan değerlendirmede ise gruplar arasında Total protein değerinde (U=36;p<0,05) ve GST (U=36;p<0,05) enzim aktivitelerinde anlamlı değişimler gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Daminozit uygulanan denek ve kontrol grubu sıçanların kalpleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

	X + S DENEK n=6	X+ S KONTROL n=6	SONUÇ
Total protein-TP U/mg protein	1,73+0,90	0,66+0,05	u=36;p<0,05*
Alkalen fosfataz-ALP U/mg protein	883,3+38	800+18,26	u=28; p>0,05
Alanin transferaz-ALT U/mg protein	24500+7656,3	16783,3+1261,2	u=20;p>0,05
Laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	85966+8477,6	80150+1610	u=20;p>0,05
Gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	68,33+16,36	38,33+11,74	u=28;p>0,05
Aspartat transaminaz-AST U/mg protein	41050+12399,8	67316,6+2465,3	u=28;p>0,05
Glutatyon S transferaz-GST U/mg protein	1,73+0,90	0,66+0,05	u=36;p<0,05*

X:Aritmetik ortalama S:Standard sapma U:Mann Whitney U testinde test istatistik sonucu

Beyinden hazırlanan homojenatlarda ise sadece GST (U=36;p<0,05), ve GGT (U=32;p<0,05) aktivitelerinin gruplar arası değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4)..

Tablo 4. Daminozit uygulanan denek ve kontrol grubu sıçanların beyinleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

	X + S DENEK n=6	X+ S KONTROL n=6	SONUÇ
total protein-TP U/mg protein	1,0+0,06	1,60+0,37	U=24;p>0,05
alkalen fosfataz-ALP U/mg protein	563,6153,8	575+46,10	U=22;p>0,05
alanin transferaz-ALT U/mg protein	2516,6+352,2	2158,6+380,0	U=22;p>0,05
laktat dehidrogenaz-LDH U/mg protein	300669519,9	26333+7505,4	U=20;p>0,05
gamaglutamik transferaz-GGT U/mg protein	100+20,3	50+9,49	U=32;p<0,05*
aspartat transaminaz-AST U/mg protein	21866+3411,9	22016,6+2100,3	U=20;p>0,05
glutatyon S transferaz-GST U/mg protein	1,67+0,08	0,84+0,09	U=36;p<0,05*

X:Aritmetik ortalama S:Standard sapma U:Mann Whitney U testinde test istatistik sonucu

Karaciğerden hazırlanan homojenatta ise total protein ve tüm enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (tablo 5).

TABLO 5. Daminozit uygulanan denek ve kontrol grubu sıçanların karaciğerleri arasında total protein ile enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.

	X + S	X+ S	SONUÇ
total protein - T.P	DENEK n:6 3,53+ 0,2	KONTROL n:6 3,67+0,18	u=22; p>0,05
U/mg protein			
alkalen fosfataz- ALP	500+ 79,58	500+79,58	u=20;p>0,05
U/mg protein			
alanin transferaz-ALT	31600+4489	37866+5314	u=24;p>0,05
U/mg protein			
laktat dehidrogenaz-LDH	94733,3+8867	84355+16466	u=20;p>0,05
U/mg protein			
gamaglutamik transferaz-GGT	141,67+1,05	126,6+36,76	u=24;p>0,05
U/mg protein			
aspartat transaminaz-AST	58750+5306,6	63750+1834	u=20;p>0,05
U/mg protein			
glutasyon S transferaz-GST	3+0,04	3+0,09	u=22,p>0,05
U/mg protein			

X:Aritmetik ortalama S:Standard sapma U:Mann Whitney U testinde test istatistik sonu

TARTIŞMA

Özellikle elmada sertliği ve dayanıklılığı artırma amacı ile 1960 yılından beri kullanılan (1,19) daminozit'in yaprak ve meyvede kalıntı bıraktığı belirlenmiştir (4,20). Bu kalıntılar besin zinciri yoluyla organizmayı etkilemektedir. Bu konuda yapılan bir araştırmada domuzlara yüksek dozda daminozit verilmiş, 96 saat sonra yapılan ölçümde dokularda 0,073 mg/kg daminozit varlığı belirlenmiştir (12). Bazı çalışmalarda ise daminozit'in % 84'ü idrar ile atılırken % 1'inin zayıf karsinojen etkili olduğu iddia edilen UDMH'ya metabolize olduğu tesbit edilmiştir (12-15). Daminozit ve UDMH'nın karsinojenik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda DNA'da metilasyon yaptığı (7), düşük dozda karsinojenik olmadığı (9,10,21) ancak bu dozda uzun süreli etkileşimde veya yüksek tek dozda zayıf karsinojenik etkili olabileceği (12-15,22) bildirilmiştir. Aynı araştırmalarda yüksek ve sürekli dozlarda ovaryumda atrofiye neden olabileceği, benign ve malign tümör oluşumuna, benzer şekilde UDMH'nın da kan damarları ve karaciğerde tümöre yol açabileceği belirtilmiştir (12-15). Bu ihtimallerden sonra daminozit kullanımına 1989 senesinde sınırlama getirilmiştir (23). Tavuk embriyoları ile yapılan bir araştırmada ise daminozit'in enzimlerde değişimlere yolaçabildiği ve civcivlerde tümöre benzer hamartomatöz değişimler ortaya çıkardığı bildirilmiştir (24), mikronukleus'a neden olduğu da saptanmıştır (25). Bir diğer araştırmada ise mikrozomal oksidasyonu inhibe edebileceği superoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz enzim aktivitelerini baskıladığı bildirilmiştir (26). Araştırmamızda dalak, böbrek, beyin ve kalpte GST aktivitesinin arttığı açıklanmıştır. Ancak dalak ve böbrekte bu değerler istatistiksel olarak önemsiz iken (p>0,05), beyin ve kalpte aktivasyon değerleri istatistiksel olarak da önemli (p<0,05) bulunmuştur. GGT değerleri ise beyinde yüksek aktivite gösterirken (p<0,05), dalakta

inhibisyon göstermiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde böbrek ve kalptede GGT değerleri istatistiksel anlamlılık vermese de önemli inhibisyona uğramıştır.

TCA döngüsündeki metabolitlerin enzimleri olan ALT, AST ve LDH değişimleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemekle birlikte, ALT ve AST beyin ve karaciğer haricinde tüm dokularda aktivite olmuş görülmektedir. Benzer şekilde LDH' de böbrek dışında tüm dokularda aktivite artışı izlenmiştir.

Özellikle daminozid uygulandıktan sonra vucutta uzun süre varlığını sürdürebilmesi ve DNA'da metilasyona yol açması hücre içi enzim dengelerini değiştirebilir. Bu nedenle daminozitin DNA-protein etkileşiminde farklılık veya UDMH'nın DNA da hasar yaparak bazı enzim aktivasyonuna ait değerleri değiştirebildiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. **Nickell, L.G.**, "Plant Growth Regulating Chemicals" Vol 2. CRC Pres. Inc. Boca. Ratr., SBN 08493-5009(6), Florida USA, (1983).
2. **Kvien, C.S., De Palma, R.A., Raczynski, A.R.**, "Effect of soil and foliar daminozide application on residue levels in peanut" *J.Agric.Food Chem.*, 37, 200-203 (1989).
3. **Mol, H.G., Van Dam, R.C., Vreeken, R.J., Steijger, O.M.** "Determination of daminozide in apples and apple leaves by liquid chromatography-mass spectrometry" *J.Chromatogr A*, Feb 12;833(1), 53-60 (1999).
4. **Bici, C., Cordero, C., Rubiolo, P., Occelli, A.** "Determination of daminozide residues in apple pulp using HPLC-DAD-UV" *J.Agric.Food Chem.*, 49(8),3548-52 (2001).
5. **US Environmental Agency** Chemical Fact Sheet Number 26: "Daminozide. Office of Pesticides and Toxic Substances" Washington Dc. 10-169 (1986).
6. **Mott, L.** "Alar again science, the media, and the public's right to know" *Int.J.Occup.Environ.Health*, 6(1), 68-70. (2001).
7. **Mott, L.** "Alar: The Aftermath" *Science*; Feb 7; 255(5045), 665 (1992).
8. **Sagelsdorff, P., Lutz, W.K., Schlatter,** "DNA methylation in rat liver by daminozide, 1,1 dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine" *Fundem.Appl.Toxic.*, 11, 723-730 (1998).
9. **Papadopoulou-Mourkidou, E.** "Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables" *J.Assoc. Anal.Chem.*, 74(5),745-65 (1991).

10. **Cabral, R., Hakoi, K., Hoshiya, T., Hasegawa, R., Ito, N.** “Lack of carcinogenicity of daminozide, alone or in combination with its contaminant 1,1 dimethylhydrazine, in medium-term bioassay” *Terat.Carcinog.Mutagen.*, 15(6), 307 (1995-96).
11. **Hasegawa, R., Cabral, R., Hoshiya, T., Hakoi, K.** “Carcinogenic potential of some pesticides in a medium-term multi organ bioassay in rats” *Int.J.Cancer*, May 28; 54(3), 489-93 (1993).
12. Uniroyal Database on Daminozide: Health and Regulatory Compliance Department. Uniroyal Corporation, Middlebury CT, 110-170 (1993).
13. **US Environmental Protection Agency** “Daminozide notice of final determination for nonuses and termination of the daminozide” *Special Review.Fed.Regist.*, 57:4643644.10-171 (1992).
14. **US Environmental Protection Agency** “Pesticide tolerance for Daminozide” *Fed.Regist.*, 54:63926. 10-172 (1989).
15. **Ware, G.W.** “Complete Guide to Pest Control” 2nd edition, Thomson Publications, Fresno. California (1988).
16. **Ciba- Corning. Application Guide**, 25066x 82 Rev. C 2/93. USA (1993).
17. **Habig, W.A., Tabst, M.S., Jacoby, W.V.** “Glutatyon S transferase” *Biochem.*, 7130-7139 (1974).
18. **Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.** “Biyostatistik” Özdemir Yay. Ankara, p.145-148 (1993).
19. **Jukes, T.H.** “Alar and apples”. *Science*, May 5; 224(4904), 515 (1989).
20. **Fan, A.M., Jakson, R.J.** “Pesticides and Food Safety” *Reg.Toxicol.Pharmacol.*, 9(2), 158-74 (1989).
21. **Cabral, R., Hoshiya, T., Hakoi, K., Hasegawa, R., Fukushima, S., Ito, N.** ” A rapid in vivo bioassay for the carcinogenicity of pesticide”. *Tumori.*, 77, 185-188 (1991).
22. **Rahden-Staron, I., Saumilo, M., Ziemkiwicz, P.** “Daminozide-lack of the genotoxic activity in the short-term bacterial tests” *Rocz.Panstw.Zahl.Hig.*, 48(2), 111-7 (1997).
23. **Rosenberg, B.J., Barbeau, E.M., Moure-Eraso, R., Levenstein, C.** “The work environment impact assessment:A methodologic framework for evaluating health based interventions” *American J.Ind .Medicine*, 218-226 (2001).
24. **Göze, İ., Yelkovan, İ., Çınar, Z.** “Daminozitin civcivlerdeki enzimatik etkileri ve histopatolojisi” *Tr.J. Biol.*, 19, 217-222 (1995).
25. **Siliğ, Y., Çelik, V.K., Atalay, A.** “Daminozid uygulanmasından sonra elde edilen civcivlerde karaciğer stoplazmik GST ve mikrozomal nitrozo dimetilamin demetilaz aktivitesindeki değişiklikler” *Tr. J.Biol.*, 24,119-126 (2000).
26. **Korkmaz, M., Çolak, A., Sezgin, İ.** “Fare kemik iliği hücrelerinde in vivo olarak mikronukleus testi ile daminozitin etkisinin incelenmesi” *Tr.J. Biol.*, 18, 235-241 (1994).

27. **Koshkarian, A.O., Kocharian, E.S., Aloian, G.A., Avakian, A.K.** "Effect of plant growth regulators, hydrazine derivates, on the state of the microzomal systems of the liver"
Biull.Eksp.Biol.Med., 106(7), 40-2 (1988).

Received: 30.04.2005

Accepted: 17.05.2005