

**DAMINOZİT'İN TAVŞAN KARACİĞER GLUTATYON-S-TRANSFERAZ
AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI****İsmihan GÖZE¹
Sevtap BAKIR³****İzzet YELKOVAN²
Ziynet ÇINAR⁴****ÖZET**

Çalışmada tavşan karaciğerinden izole edilen Glutatyon-S-Transferaz'ın etkili bir pestisit olan daminozit ile etkileşimi incelenmiştir. Glutatyon -S-Transferaz enzimi in vitro şartlarda değişik dozlarda daminozit ile muamele edilerek, reaksiyonları gözlenmiştir. Bulgular 1-kloro 2,4 dinitro benzen (CDNB) substrat olarak kullanıldığında elde edilen aktivite ile karşılaştırılmıştır. Regresyon ve korelasyon analizi yapılmış ve sonuçlar spesifik aktivite olarak verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Daminozit, Glutatyon -S-transferaz

**AN INVESTIGATION ON EFFECT OF DAMINOZIDE TO THE
GLUTATION-S-TRANSFERASE ACTIVITY IN RABBIT LIVER****SUMMARY**

We analyzed the interaction between glutation-S-transferase, which is isolated from the liver of rabbits, and daminozide which is an effective pesticide. Glutation-S-transferase enzymes were treated with daminozide in vitro conditions at various doses, and the reactions were recorded. The observed activities were compared with the activity of 1-chloro 2, 4 dinitrobenzen substrate and a regression analysis was performed to investigate the correlation. The result were expressed as spesific activites.

Key words: Daminoside, Glutation S-Transferase

GİRİŞ

Çalışmada kullanılan daminozit (Süksinik asit 2-2 dimetil hidrazid) pestisitlerin bitki büyüme hormonu grubuna dahildir, verimliliği artırmak için tarımda kullanılır (1). Yapraktan absorbe edildiği için bitki ve meyvelerde kalıntı bırakabilir (2,3). Daminozitin hidrolizi ile oluşan metaboliti UDMH'nın (1.1 dimetil hidrazin) karsinojen olduğu ve DNA'yı metillediği bildirilmiştir (4-6). Glutatyon-

S-transferaz (GST) detoksifikasyonda görevli bir enzimdir. İnsan dokularında farklı substrat özgüllüğü gösteren GST tipleri mevcuttur. Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik xenobiyotikler ile glutatyonun (GSH) sulfidril (SH) gruplarının konjuge olmasını sağlar. Bunlar çok işlevli enzim gruplarıdır, sadece GSH konjugasyonu katalizlemez; steroid yapılı hormonlarla tiroid

¹C.Ü. S.H.M.Y.Okulu

²C.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ABD

³C.Ü. Tıp Fak. Biyokimya ABD

⁴C.Ü. Tıp Fak. Biyoistatistik ABD

Geliş tarihi: 18.07.2000 Kabul edilmiş tarihi: 15.01.2001

Yazışma Adresi: Dr. İsmihan GÖZE, C.Ü.Sağlık Hizmetleri M.Y.Okulu Öğretim üyesi, SIVAS

hormonlarını ve bazı ksenobiyotikleri bağlar ve yığılmasını azaltarak sitotoksik etkilerini engeller (7-9). Bu çalışmada, besin zinciri yoluyla insanları etkileyen daminozit ile tavşan karaciğerinden izole edilen GST enzimi arasında in vitro şartlardaki etkileşimin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ketamin anestezisi ile tavşanların karaciğerleri çıkarıldı. Tartılıp ağırlıklarının üç katı izotonik sıvı (0.15 M KCl) ilave edilip homojenize edildi (B.Braun Tıp 85 3202). Homojenat 1.5 saat 1000 g'de santrifüj edilip (Beckman Model J2, JA21 rotor) süpernatant DEAE-selüloz kolondan geçirildi. Aktivitenin görüldüğü kısma amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Presipitat potasyum fosfat tampununuda çözülüp diyalizlendi. Dialize edilen materyal CM-selüloz kolondan geçirildi (10). Kolondan çıkan ve aktivite gözlenen kısım GST enzim kaynağı olarak kullanıldı ve aktivite saptandı (11). GST enziminin tepkime karışımı-substrat glutatyon, recipient 1 kloro 2,4 dinitro benzen (CDNB)-varlığında 12.5mM'dan, 300mM'a kadar bir skala içerisinde, her bir tepkime karışımına inhibitör olarak 0.1mM ve 0.01 mM hazırlanmış daminozit çözeltisi eklenerek, aktiviteler spektrofotometre de (Shimadzu UV-1201, UV-Vis, Nüve BM101 benmari ataşman) kinetik olarak ölçüldü. Bulunan enzim aktivite değerleri, kontrol (daminozit içermeyen tepkime karışımı) CDNB'nin normal aktivitesi ile karşılaştırıldı. Protein tayini Lowry yöntemi ile yapıldı (12).

Araştırmanın verilerinin değerlendirilmesinde regresyon, korelasyon analizleri ve Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı (13).

BULGULAR

Araştırmamızda saptanan spesifik aktivite değerleri ve regresyon analizi sonuçları tablo 1'de verilmiştir.

Verilere logaritmik dönüşüm yapılarak regresyon yöntemi uygulandığında CDNB doz miktarları ile 0.1M ve 0.01 M daminozit çözeltisi verilen gruplar ile daminozit uygulanmayan kontrol grubunun GST aktiviteleri arasında aşağıda regresyon denklemleri verilen doğrusal

bağıntı bulunmuştur.

Tablo 1: Tavşan karaciğer GST ile CDBN (1kloro 2,4 dinitrobenzen) ve daminozit'in spesifik aktivite değerleri (lineer regresyon analizi)

	CDNB mM										r
	12.5	25	50	75	100	150	200	250	300		
Daminozit											
0.1M	0.097	0.225	0.325	0.437	0.500	0.575	0.612	0.687	0.725	0.97	
0.01M	0.075	0.187	0.300	0.325	0.412	0.537	0.575	0.515	0.587	0.95	
Kontrol	0.087	0.187	0.310	0.337	0.460	0.525	0.595	0.587	0.580	0.96	

$$ygst = -1.58 + 0.58X \text{ CDNB (Kontrol-daminozitsiz)}$$

$$ygst = -1.63 + 0.6X \text{ CDNB (0.01M daminozit)}$$

$$ygst = -1.53 + 0.58X \text{ CDNB (0.1M daminozit)}$$

Aynı şekilde CDNB doz miktarı ile 0.1 M daminozit uygulanan grup arasında Aynı yönlü korelasyon vardır. CDNB doz miktarı arttığında GST aktivite değerleri yükselmektedir ($r=0.97$). Aynı yönlü korelasyon 0.01 M daminozit çözeltisi için ($r=0.95$) ve kontrol grubu için de saptanmıştır ($r=0.96$). Bu üç korelasyon da istatistiksel olarak önemlidir.

0.1M. ve 0.01M daminozit çözeltisi uygulanan gruplar ile daminozit verilmeyen kontrol grubuna ait GST aktivite değerleri Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Tablo 2.

Tablo 2: Daminozit verilen gruplar ile kontrol arasındaki GST Aktivite değerleri (Kruskal Wallis varyans analizi)

GST aktivite değişimi	$x \pm Se$
0.1M-daminozit-GST	0.464 \pm 0.007
0.01M daminozit-GST	0.390 \pm 0.006
Kontrol GST	0.407 \pm 0.006
Sonuç	KW=1.3 $p>0.05$

TARTIŞMA

Özellikle elmada verim artırıcı olarak kullanılan daminozit ile yapılan bazı çalışmalarda, yaprakta 0.02 mg/kg, meyvede 0.008 mg/kg kalıntı bıraktığı bildirilmiştir (3,14). Daminozitin hidrolizi sonucu oluşan (1-1 dimetil hidrazid)

UDMH'nin DNA'yı metillediği (5,6), ayrıca mikroküres artışına neden olduğu bildirilmiştir (15). Ancak bazı çalışmalarda ise karsinojenik etkisinin olmadığı belirtilmiştir (16,17) Daminozid verilen civcivlerde AST, ALP ve GGT değerlerinde anlamlı değişimler izlenmiş ve tümöre benzer yapılarla neden olduğu belirlenmiştir (18). Kosharian ve ark. hidrazit türevleri LD50 dozlarının rat karaciğerlerinde etkisi üzerine yaptığı çalışmada bu dozun mikrozomal oksidasyonu inhibe ettiği, SOD aktivitesini azalttığı, lipid peroksidasyonunu aktive ettiğini göstermiştir (19).

GST ksenobiyotiklerin etkisiz hale getirilmesinde görevli enzimlerden biridir Vessey ve Boyer (2-4 dikloro fenoksiasetik asit) 2-4 D, (2-4-5 trikloro fenoksiasetik asit) 2-4-5 T herbisitleri ile yaptıkları çalışmada, bu maddelerin GST'nin bazı izoenzim formlarında inhibisyona

neden olduğunu bildirmişlerdir (20). Ancak Cabral ve ark (21) GST aktivasyonunda değişime neden olmadığı bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada daminozid uygulanan civcivlerde in vivo GST aktivasyonu incelenmiş, ince barsaklarda doza bağlı artış izlenirken, karaciğerde LD10'da artış, LD30'da ise inhibisyon bildirilmiştir (22). Araştırmamızda da in vitro şartlarda denediğimiz daminozid dozları, CDNB doz miktarına bağlı olarak GST aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bulgularımız in vivo şartlarda daminozid kullanılarak yapılan çalışmada bulunan sonuçla paralellik taşımaktadır. Bu sonuca göre in vitro şartlarda daminozitin GST ile etkileştiği ve aktivitesinde değişime neden olduğu ileri sürülebilir. Ancak bu bulgunun daha hassas metotlarla ve ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- 1.Nickell LG. Plant growth regulating Chemicals Vol 2. CRC Pres. Inc Boca Ratr ISBN 08493-5009 (6) Florida USA1983
- 2.Kvien C.S, De Palma R A, Raczynski A R; Effect of soil and foliar daminozide application on residüe levels in peanut J Agric Food Chem 1989; 37: 200-3
- 3.Mol HG, Van Dam RC, Vreeken RJ, Steijger OM. Determination of daminozide in apple leaves by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1999; 12: 833(1): 53-60.
- 4.Mott L. Alar again: science, the media, and the public's right to know. Int J Occup Environ Health 2000; 6 (1): 68-70.
- 5.Mott L. Alar the aftermath. Science 1992; 7: 25 (5045) 665.
- 6.Sagelsdorff P, Lutz W.K, Schlatter; DNA methylation in rat liver by daminozide, 1.1 dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine. Fundem Appl Toxic 1988; 11: 723-730
- 7.Murray KR, Mayes P. A, Granner D. K, Rodwell WV. Harper'in Biyokimyası I.Böl. 1993; 60: 811-7
- 8.Zubay G. Biochemistry. 3rd Ed. Addison Wesley CoUSA 1983; 543.
- 9.Boyer TD, Vessey D.A, Holcomb C, Soly N; Studies of the relationship between the catalytic activity and binding of nonsubstrate ligands by GST. Biochem J 1984; 217: 179-85.
- 10.Habig W, Jacoby W. Methods in Enzymology 1981; 77: 213-31 .
- 11.Habig W, Pabst M, Jacoby W. Glutatlon-S-transferases. J Biol Chem 1974; 249 (25): 7130-9.
- 12.Kaleti G, Leder WH. Protein-Lowry handbook of micromethods for the biological sciences. New York, Van Nostrand Reinhold Co. 1974;87-88.
- 13.Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. 4. Baskı Özdemir Yayın. Ankara.1993
- 14.Papadopoulou-Mourkidou E. Postharvest- applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. J Assoc Anal Chem 1991; 74 (5): 745-6
- 15.Korkmaz M, Çolak A, Sezgin I. Fare kemik iliği hücrelerinde in vivo olarak mikroküres testi ile daminozitin etkisinin incelenmesi. Tr J Biology 1994
- 16.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 1995-96 ;15 (6): 307-12.

- 17.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*. 1993; 28; 54 (3): 489-93
- 18.Göze İ, Yelkovan İ, Çınar Z; Daminozitin civcivlerdeki enzimatik etkileri ve histopatolojisi. *Tr J Biology* 1995; 19: 217-22
- 19.Koshkarian AO, Kocharian ES, Aloian GA, Avakian AKh. Effect of plant growth regulators, hydrazine derivates, on the state of the microzomal systems of the liver. *Biull Eksp Biol Med*. 1988 ; 106 (7): 40-2.
- 20.Vessey DA, Boyer TD. Differential activation and inhibition of diferent forms of rat liver GST by the herbicides 2-4 D and 2-5 D. *Toxic Appl Pharm* 1984; 73: 492-9 .
- 21.Cabral R, Hoshiya T, Hakoi K, Hasegawa R,Fukushima S, Ito N. A rapid in vivo bioassay for the carcinogenicity of pesticides. *Tumor* 1991; 77 (3): 185-8.
- 22.Siliğ Y, Çelik VK, Atalay A. Daminozıt uygulanmasından sonra elde edilen civcivlerde karaciğer sitoplazmik GST ve mikrozomal nitrozo dimetilamin demetilaz aktivitesindeki değişiklikler. *Tr J Biology* 2000; 24; 119-26.