

SİPERMETRİN UYGULANAN RATLARDA ARGİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE VİTAMİN E ve SELENYUMUN ETKİSİ

Fulya BENZER*

Seval YILMAZ**

Yayın Kodu: 2004/61-A

Özet: Bu çalışma, sipermetrin uygulanan ratlarda doku arginaz aktiviteleri üzerine vitamin E ve selenyumun etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 180-250 g ağırlığında, erkek, 30 adet Wistar Albino cinsi rat kullanılmıştır. Ratlar 5 ayrı gruba bölünmüştür. 1. gruba plasebo (mısır yağı), 2. gruba ise 5 gün süre ile sipermetrin (50 mg/kg) ağızdan verilmiştir. 3, 4 ve 5. gruplara sipermetrin verilmeden önce sırasıyla vitamin E (100 mg/kg SC), selenyum (0.1 mg/kg SC) ve vitamin E ile birlikte selenyum (100 mg/kg SC + 0.1 mg/kg SC) 3 gün süreyle uygulanmıştır.

Arginaz aktivitesi Tiosemicarbazide Diacetyl-Monoxime Urea (TDMU) metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Sipermetrin uygulaması hiçbir dokuda arginaz aktivitesini değiştirmemiştir. Sipermetrinden önce uygulanan vitamin E, selenyum ve vitamin E + selenyum kombinasyonu arginaz aktivitesini kontrole göre karaciğer ve böbrek dokusunda düşürmüş, kalp ve beyin dokusunda ise artırmıştır ($p<0.05$). Vitamin E, selenyum ve vitamin E + selenyum kombinasyonu çeşitli dokularda arginaz aktivitesini aynı doğrultuda değiştirmiştir.

Anahtar sözcükler: Sipermetrin, arginaz, vitamin E, selenyum

The Effects of Vitamin E and Selenium on Arginase Activity in Cypermethrin Administered Rats

Summary: This study was carried out to determine the effects of vitamin E and selenium on arginase activities in cypermethrin administered rats. Thirty female Wistar Albino rats weighing 180-250 g were used in this study. The rats were divided into five equal groups. The first group was fed placebo (corn oil), and the second group was given cypermethrin (50 mg/kg orally) for five days. To the groups 3, 4 and 5 prior to cypermethrin administration, vitamin E (100 mg/kg SC), selenium (0.1 mg/kg SC) and both vitamin E and selenium (100 mg/kg SC + 0.1 mg/kg SC) respectively were administered for three days.

Arginase activity was spectrophotometrically measured using the Thiosemicarbazide Diacetyl Monoxime Urea (TDMU) method.

Cypermethrin administration did not change arginase activity in any of tissues. Prior to cypermethrin administration, administration of vitamin E and selenium alone or as combination decreased the arginase activity in liver and kidney tissues and increased in brain and heart tissues compared to controls ($p<0.05$). Vitamin E, selenium and vitamin E + selenium combination increased the activity of arginase in several tissues in the same way.

Keywords: Cypermethrin, arginase, vitamin E, selenium

GİRİŞ

Pestisidler, pest adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan maddelerdir. Pestisidlerin ilk olarak uygulananları piretrin ve rotenon gibi bitkisel kaynaklı olanlardır. Piretrinler hızla yere serici, diğer bir ifadeyle geçici olarak felç yapıcı etkinliği olan pestisidlerdir. Piretroidler piretrinlere benzer sentetik maddeler olup, doğal piretrinlerden daha güçlü yere serici ve uzun süreli etkiye sahiptirler. Piretroidler parazitleri önce uyarır, hareketlerini artırır, daha sonra onları felç eder ve öldürürler¹. Sipermetrin günümüzde kullanılan en etkili sentetik piretroid olup, tarım ve evde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sipermetrin (3-(2,2-Dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid cyano (3-phenoxyphenyl)-methyl ester) özellikle sodyum kanalları için toksiktir ve sodyumun girişini artırarak yüksek konsantrasyonlarda sinir ileti-

mini engeller ve sinir membranlarının uzun süreli depolarizasyonuna sebep olur. İyi insektisit etki göstermesi ve memelilerde toksisitelerinin düşük olması nedeniyle organik fosfatlar, arilkarbamatlar ve organik klorlu bileşikler göre daha caziptirler^{2,3}.

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalizleyen bir enzimdir⁴. Üre döngüsünün tüm enzimlerini içeren karaciğer, hem üre sentezinin hem de arginaz aktivitesinin en yoğun olduğu organdır⁵. Üre üretimi, azotun en iyi çözülebilir ve nontoksik formda atılmasını sağlayan bir mekanizmadır, böylece yüksek seviyedeki amonyanın asıl tehlike yaratan toksik sonuçlarından kaçınılmış olur. Arginaz enzimine böbrek, barsak, beyin, rumen, akciğer, kalp, dalak, iskelet kası, eritrosit, fibroblast, makrofaj, tükürük bezleri gibi nonüreotelik dokularda düşük düzey-

* Veteriner Kontrol ve Araştırma enstitüsü, Elazığ-TÜRKİYE

** Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

lerde rastlanılmaktadır⁶⁻⁹.

E vitamini biyolojik sistemler için önemli bir antioksidandır. Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücre altı membranların bütünlüğünün korunması E vitamininin başlıca fonksiyonlarından biridir¹⁰. E vitamini hücrelerde homeostazisi sağlar¹¹. Selenyum dokuların oksidatif hasardan korunmasında önemli bir rol oynar ve bazı kimyasal maddelerin toksik etkilerini antagonize edebilir¹².

Çalışmanın amacı; sipermetrin uygulanmış ratlarda karaciğer, beyin, böbrek ve kalp dokularındaki arginaz aktivitesi üzerine vitamin E ve selenyumun etkisini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada 180-250 g ağırlığında, 6 aylık, 30 adet erkek Wistar Albino cinsi rat kullanılmıştır. Deney hayvanlarına standart şartlar altında *ad libitum* yem ve su verilmiştir. Ağırlıkları 180-250 g arasında olan ratlar kontrol ve deneme grupları olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Çalışma etik kurul kararına uygun olarak yapılmıştır. Sipermetrin (Novartis, İstanbul) ve vitamin E (Merck, Darmstadt) sırasıyla 10 ve 20 mg/ml çözeltiler şeklinde mısır yağı içinde hazırlanmıştır. Selenyum (Merck, Darmstadt) ise 0.02 mg/ml çözeltisi halinde distile suda çözdürülmüştür. Birinci gruba plasebo (mısır yağı), 2. gruba 5 gün süreyle sipermetrin (50 mg/kg) ağızdan verilmiştir. Sipermetrin verilmeden önce 3. gruba vitamin E (100 mg/kg, SC), 4. gruba selenyum (0.1 mg/kg, SC) ve 5. gruba vitamin E + selenyum kombinasyonu (100 mg/kg SC + 0.1 mg/kg, SC) 3 gün süre ile uygulanmıştır.

Aynı laboratuvar şartlarında tutulan kontrol ve deney grubu ratlar en son yemlemeden 24 saat sonra eter anestezisi altında uyutularak doku örnekleri alınmıştır. Doku örnekleri soğuk serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile yıkanarak iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra 1 g tartılıp, 4 mM MnCl₂ (1/10, w/v) ilavesinden sonra kırılmış buz içerisinde (Potter-Elvehjem, cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 21.000 g'de +4°C'de 15 dakika¹³ santrifüje tabii tutulmuş ve işlemden sonra peletler atılarak süpernatantlar alınıp, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Dokulardaki arginaz aktivitesi, L-argininin arginaz

ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin, Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim-Üre (TDMU) metodu¹⁴ ile ölçülmesi sonucu saptanmıştır. Protein miktarının ölçümünde ise Lowry¹⁵ metodu kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz: Elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları (\pm SE) sunulmuştur. Gruplar arasında karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında ise Duncan testi uygulanmıştır ($p<0.05$).

Çalışmada spesifik aktivite, 1 saatte, 37°C'de, L-argininden 1 mmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesi olup, mmol üre/mg protein/saat olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR

Sipermetrin uygulanan ratların karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularındaki arginaz aktiviteleri Tablo 1'de sunulmuştur. Sipermetrin uygulaması bu dokuların hiç birinde arginaz aktivitesini değiştirmemiştir. Sipermetrin uygulamasından önce vitamin E (3. grup), selenyum (4. grup) ve vitamin E + selenyum (5. grup) uygulaması, kontrolle (1. grup) karşılaştırıldığı zaman arginaz aktivitesini karaciğer ve böbrek dokusunda düşürürken, kalp ve beyin dokusunda ise artırmıştır ($p<0.05$). Vitamin E ve selenyumun sinerjik etki yaptığı, meydana gelen bu etkinin karaciğer ile böbrek ve kalp ile beyin dokularında aynı yönde olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Sipermetrin uygulanan ratlarda arginaz aktivitesi (U/mg protein) üzerine vitamin E ile selenyumun etkileri.

Table 1. The effects of vitamin E and selenium on arginase activity (U/my protein) in cypermethrin administered rats.

	Karaciğer	Böbrek	Kalp	Beyin
Kontrol (Grup 1)	238.74 \pm 19.36 ^c	14.37 \pm 1.59 ^b	14.83 \pm 2.36 ^c	3.07 \pm 0.21 ^a
CYP (Grup 2)	212.72 \pm 13.58 ^b	12.30 \pm 1.05 ^b	10.33 \pm 0.79 ^b	3.58 \pm 0.57 ^{ab}
Vit E-CYP (Grup 3)	126.56 \pm 7.62 ^a	7.07 \pm 0.70 ^a	100.97 \pm 5.38 ^c	4.61 \pm 0.34 ^{ab}
Se-CYP (Grup 4)	118.87 \pm 29.18 ^a	7.22 \pm 1.18 ^a	77.49 \pm 1.85 ^b	4.93 \pm 0.52 ^b
(Vit E-Se)-CYP (Grup 5)	134.48 \pm 27.88 ^{ab}	8.69 \pm 0.16 ^a	139.08 \pm 10.58 ^d	9.28 \pm 0.81 ^c

Gruplar arasında karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında ise Duncan testi uygulanmıştır ($P<0.05$)
^{abc}: aynı organlardaki değişiklikler farklı gruplar yönünden karşılaştırılmıştır.

CYP(sipermetrin): 50 mg/kg dozunda oral yolla 5 gün süreyle verilmiştir.

Vit E: 100 mg/kg dozunda SC olarak uygulanmıştır.

Se: 0.1 mg/kg dozunda SC olarak uygulanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Piretiroidler nöronal sodyum kanallarının açılma zamanlarını uzatarak hiperekstatör etkilerini açığa çıkarırlar. Sodyum kanalları piretiroidler için büyük bir hedefdir, vitamin E sodyum kanallarının değiştirilmesinde piretiroidlerle çatışır. Piretiroidlere maruz kalma sıklıkla anormal deri hassasiyeti ve paresteziye yol açmaktadır. Vitamin E'nin deri parestezisini azalttığı bilinmekte olup, etki mekanizması tam olarak açık değildir¹⁶.

Arginaz, ornitin karbamoil transferaz ve arginino süksinat sentaz enzimleri karaciğere özgü enzimler olup, karaciğer hasarının spesifik göstergeleridir¹⁷⁻¹⁹. Yüksek dozda insektisidlere maruz kalan insanlarda karaciğer hasarı meydana gelebileceği, hatta düşük dozlara maruz kalmanın bile kan ve karaciğeri etkileyebileceği rapor edilmiştir. Bu amaçla çevre temizliği ile uğraşan 37 erkek işçi üzerinde yapılan çalışmada²⁰ işçilerin hepsi aynı tip ve miktarda pestisidlere maruz bırakılmış ve bunların hepatotoksik maddelere maruz kalmayan 60 adet kontrol ile mukayesesi yapılmıştır. Pestisidlere maruz kalan grupta karaciğer fonksiyon testlerinin değiştiği bulunmuştur. Pestisidleri kullanan çevre işçilerinde karaciğer fonksiyon testlerinin değişmesi pestisidlerin hepatotoksikite için risk olduğunu düşündürmektedir.

E vitamini ile arginaz ve selenyum ile arginaz arasındaki ilişkiyi açıklayan birçok çalışma vardır; bu çalışmalara göre E vitamini ilave edilmiş yemlerle beslenen ratlardaki arginaz aktivitesi E vitamini ilave edilmeden beslenen ratlarla kıyaslandığı zaman düşük bulunmuştur²¹. Yapmış olduğumuz çalışmada sipermetrin arginaz aktivitesini hiçbir dokuda değiştirmemiş, ancak sipermetrin verilmeden önce uygulanan E vitamininin karaciğer ve böbrekte arginaz aktivitesini düşürmesi bu çalışmayla uyum göstermiştir.

Aynı zamanda yılanlar üzerinde selenyumun toksik etkisinin araştırıldığı çalışmada²² yüksek dozda selenyum ilavesiyle hepatopankreas arginazında azalma gözlenmiştir. Çalışmamızda sipermetrinden önce selenyum verilmesinin karaciğer ve böbrek arginazını düşürmesi bu çalışma ile uyum göstermektedir.

Erişir ve ark²³'ları tarafından yapılan çalışmada, ratlar 5 ayrı gruba bölünmüş, 1. grup kontrol, 2. gruba 3 gün süre ile sadece prednisolon, 3, 4 ve 5. gruplara 30 gün boyunca sırasıyla vitamin E, selenyum ve vitamin E + selenyum kombine olarak verilmiştir. Daha sonra bu gruplara 3 gün süreyle prednisolon uygu-

landıktan sonra 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde hayvanlar dekapite edilerek gerekli doku örnekleri alınmıştır. Kontrollerle karşılaştırıldığı zaman prednisolon uygulaması karaciğer arginaz aktivitesini 4. saatten itibaren artırmaya başlarken, böbrekte herhangi bir değişikliğe neden olmamış, kalpte ise sadece 48. saatte düşüşe neden olmuş, diğer saatlerde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Vitamin E uygulaması kontrolle karşılaştırıldığı zaman karaciğerde sadece 12. saate kadar enzim aktivitesini düşürmüş sonra normale dönüştürmüştür. Yine aynı çalışmada vitamin E uygulaması kalpte ve böbrekte enzim aktivitesini bütün saatlerde de artırmıştır. Bizim çalışmamızda da sipermetrinden önce vitamin E uygulaması enzim aktivitesini karaciğer ve böbrekte düşürmüş, kalpte ve beyinde ise artırmıştır.

Sonuçlar incelendiği zaman görülmüştür ki, karaciğer ve böbrek doku arginazı sipermetrin uygulamasından önce verilen vitamin E, selenyum, vitamin E + selenyum kombinasyonunda düşüş göstermiş, kalp ve beyin doku arginaz aktivitesi ise artış göstermiştir. Vitamin E ve selenyum hücrelerde sinerjik fonksiyonlara sahiptirler²⁴. Mevcut çalışmada da karaciğer ile böbrek dokusunda ve kalp ile beyin dokusundaki enzim aktivitesi üzerine vitamin E ve selenyumun etkisi sinerjik yönde olmuştur.

Vitamin E, selenyum ve bunların kombinasyonunun dokulardaki arginaz aktivitesi üzerine etkisini ve arginaz için bunların önemini bu çalışmada elde edilen bulgularla açıklamak mümkün değildir. Bunları açıklayabilmek için daha ileri düzeylerde çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1 Şanlı Y, Kaya S, Pirinççi İ, Yavuz H, Baydan E, Demet Ö, Bilgili A: Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yay, 187-192, Ankara, 1995.
- 2 Hemming H, Flodstrom S, Warngard L: Enhancement of altered hepatic foci in rat liver and inhibition of intercellular communication in vitro by the pyrethroid insecticides fenvalerate, flucythrinate and cypermethrin. *Carcinogenesis Dec*;14 (12): 2531-5, 1993.
- 3 Gabbianelli R, Falcioni G, Nasuti C, Cantalamessa F: Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: Reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology, Jun* 14;175 (1-3): 91-101, 2002.
- 4 Powers SG, Meister T: Urea synthesis and ammonia metabolism. Edited by I Arias, H Popper, D Schachter and Shafrits. In, *The Liver: Biology and pathobiology*. Raven Press, Newyork, 251-263, 1982.
- 5 Herzfeld A and Raper SM: The heterogeneity of arginases rat

- tissues. *Biochem J*, 153: 469-478, 1976.
- 6 **Aminlari M and Vaseghi T:** Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp Biochem Physiol*, 103(2): 385-389, 1992.
 - 7 **Chen PC and Broome JD:** Mouse macrophage arginase. *Analyt Biochem*, 163: 354-359, 1980.
 - 8 **Ikemoto M, Tabata M, Murachi T and Totani M:** Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem*, 26: 547-553, 1989.
 - 9 **Nikumb SK, Santhanam K, Rama K and Rao MV:** Hepatic and serum arginase and ornithine transcarbamylase activities of rats maintained on diets of different protein quality. *Ann Nut Metab*, 31: 387-394, 1987.
 - 10 **Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D:** Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: A possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, Apr 12;105 (3):197-205, 1999.
 - 11 **Galltorres HE:** Absorbtion, blood transport and metabolism of vitamin E. In, *Comprehensive Treatise*, Machlin LJ(Ed). Marcel-Decker: New York, 170-267, 1980.
 - 12 **Raneva V, Shimasaki H, Furukawa Y, Ueta N, Yanishlieva N, Aaseng JE, Partali V, Sliwka HR, Yoshida Y, Niki E:** Action of 1-(11-selenadodecyl)-glycerol and 1-(11-selenadodecyl)-3-trolox-glycerol against lipid peroxidation. *Lipids*, Jul;37 (7): 633-40, 2002.
 - 13 **Ozan S, Gülen Ş:** Farklı türlerin organlarında bulunan arginazların metilen mavisi ile fotoinaktivasyonu. *Doğa Tr J Biol*, 15: 222-229, 1991.
 - 14 **Geyer JW, Dabich D:** Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analyt Biochem*, 39 (2): 412-417, 1971.
 - 15 **Lowry By OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
 - 16 **Song JH, Narahashi T:** Selective block of tetrametrin-modified sodium channels by (+/-)-alpha-tocopherol (vitamin E). *J Pharmacol Exp Ther Dec*; 275(3): 1402-11, 1995.
 - 17 **Boric O, Straus B:** Separation of arginase from human tissues by agar gel electrophoresis. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1: 533-535, 1976.
 - 18 **Cabello J, Prajoua V, Plaza M:** Immunodiffusion studies on human liver and erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*, 105: 583-593, 1965.
 - 19 **Zamecka E, Porembaska Z:** Five forms of arginase in human tissues. *Biochem Med Metab Biol*, 39:258-266, 1988.
 - 20 **Tomei F, Biagi M, Baccolo TP, Tomao E, Giuntoli P, Rosati MV:** Liver damage among environmental disinfestation workers. *J Occup health*, 40: 193-197, 1998.
 - 21 **Park JR, Tappel AL:** Protein damage and lipid peroxidation; effects of diethyl maleate, bromotrichloromethane and vitamin E on ammonia, urea and enzymes involved in ammonia metabolism. *Toxicol Lett*, 58: 29-36, 1991.
 - 22 **Rizk MZ, Farrag EK:** Some aspects of nitrogen metabolism in Biomphalaria alexandrina snails treated with selenium. *J Egypt Soc Parasitol*, 29:531-546, 1999.
 - 23 **Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M:** Effects of dietary vitamin E and selenium on arginase activity in the liver, kidneys and heart of rats treated with high doses of glucocorticoid. *Cell Biochem Funct*, 21: 1-5, 2003.
 - 24 **Meydani M:** Modulation of platelet thromboxane A2 and aortic prostacyclin synthesis by dietary selenium and vitamin E. *Biol Trace Elem Res*, 33: 79-86, 1992.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Fulya BENZER
Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
Elazığ-TÜRKİYE