

## **Ovariectomili Ratlara Estradiol 17- $\beta$ ve Vitamin E Verilmesinin Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Mine ERİŞİR\* Mustafa TAMSER\*\* Bülent TAŞDEMİR\* Mehmet ÇAY\*\*

\* Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ELAZIĞ-TÜRKİYE

\*\*Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ- TÜRKİYE

**Yayın Kodu: 2006/03-A**

### **Özet**

Bu çalışmada normal ve diabetik ratlarda ovariectominin karaciğer ve böbrek arginazı (L-arginin amidinohidrolaz, EC 3.5.3.1) üzerine etkisi ve tüm ovariectomili ratlara estradiol ve vitamin E ilavesinin arginaz aktivitesi üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

70 adet Wistar Albino türü dişi rat 7 gruba bölünmüştür. 1) kontrol grubu, 2) Ovariectomi grubu, 3) Ovariectomi yapılmış ve Estradiol 17- $\beta$  uygulanmış grup 4) Ovariectomi yapılmış, Estradiol 17- $\beta$  ve vitamin E uygulanmış grup, 5) Ovariectomi yapılmış, diabetik grup (Ovariectomize edilmiş ratlara 45 mg/kg tek doz streptozotosin intraperitoneal olarak uygulanmıştır), 6) Ovariectomi yapılmış, diabetik ve Estradiol 17- $\beta$  uygulanmış grup. 7) Ovariectomi yapılmış, diabetik, Estradiol 17- $\beta$  ve E vitamini uygulanmış grup. Ratlara Estradiol 17- $\beta$  (E2) 40  $\mu$ g/kg/gün dozunda deri altı ve E vitamini (dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) 100 mg/kg/gün dozunda periton içi 28 gün süre ile uygulanmıştır.

Ovariectomi karaciğer arginaz aktivitesini değiştirmemiş fakat böbrek arginaz aktivitesinin önemli (P<0.001) düzeyde azalmasına sebep olmuştur. Ovariectomili ratlara Estradiol 17- $\beta$  ve vitamin E verilmesi karaciğer ve azalmış böbrek arginaz aktivitesini değiştirmemiştir. Ovariectomili diabetik ratlarda karaciğer arginaz aktivitesi önemli (P<0.001) artış göstermiş ve ovariectomili diabetik ratlara tek başına Estradiol 17- $\beta$  verilmesi arginaz aktivitesini değiştirmezken, Estradiol 17- $\beta$  ve vitamin E kombinasyonunun verilmesi aktivitenin normale dönmese sebep olmuştur. Ovariectomili diabetik ratlarda böbrek arginaz aktivitesi değişmezken bu hayvanlara Estradiol 17- $\beta$  verilmesinin arginaz aktivitesini anlamlı (P<0.001) artırdığı saptanmıştır.

Ovariectomi sonucu böbrek arginaz aktivitesinin azalması bu dokudaki glutamat, prolin ve poliaminlerin sentezinde aksamalara ve paralelinde böbrek problemlerinin başlamasına sebep olabilir.

**Anahtar sözcükler:** Arginaz, Ovariectomi, Diabet, Estradiol, Vitamin E

### **Effect of Estradiol 17- $\beta$ and Vitamin E Administration on Arginase Activity in Ovariectomized Rats**

#### **Summary**

This study was carried out to observe the effect of ovariectomy on arginase (L-arginine amidinohydrolyase, EC 3.5.3.1) activities of liver and kidney in normal and diabetic rats and to find out if there is a protective effect of estrogen and vitamin E administration on arginase activity in ovariectomized rats.

Seventy Wistar albino rats were divided into seven groups as follows: 1) Control group, 2) Ovariectomy group, 3) Ovariectomized and Estradiol 17- $\beta$ -treated group, 4) Ovariectomized, Estradiol 17- $\beta$ - and vitamin E-treated group, 5) Ovariectomized, diabetic group (Streptozotocin to ovariectomized rats was intraperitoneally (IP) administered at a dose of 45 mg/kg body weight), 6) Ovariectomized, diabetic and Estradiol 17- $\beta$ -treated group 7) Ovariectomized, diabetic, Estradiol 17- $\beta$ - and vitamin E- treated group. Estradiol 17- $\beta$  (E2) was administered subcutan at a dose of 40  $\mu$ g/kg, vitamin E (dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) was done intra periton at a dose of 100 mg/kg over 24 h for 28 days.

Liver arginase activity was not affected by ovariectomy, but kidney arginase activity significantly decreased (P<0.001). Estradiol 17- $\beta$ - and vitamin E- administration of ovariectomized rats did not change the activities. Liver arginase activity of ovariectomized diabetic rats was found to be significantly increased (P<0.001). In the ovariectomized diabetic group the arginase activity increased significantly (P<0.001) and by the administration of Estradiol 17- $\beta$  alone in ovariectomized diabetic rats, arginase activity in the liver did not change, whereas administration of Estradiol 17- $\beta$  and vitamin E combination made the activity level to turn to normal levels. In the ovariectomized diabetic group kidney arginase activity did not change whereas administration of Estradiol 17- $\beta$  increased the arginase activity significantly (P<0.001).

We suggest that proline, glutamate, and polyamine synthesis in kidneys may decrease by lowering kidney arginase activity in ovariectomy and that may cause to begin the kidney problems.

**Keywords:** Arginase, Ovariectomy, Diabetes, Estradiol 17- $\beta$ , Vitamin E

#### **İletişim (Correspondence)**

Phone: +90 424 2370000/3960

e-mail: mineerisir@yahoo.com



## GİRİŞ

Protein katabolizmasından şekillenen nitrojen artıklarının uzaklaştırılmasında görevli olan üre döngüsünün, beşinci ve son basamağında fonksiyon gören arginaz (L-arginin amidinohidrolaz, EC 3.5.3.1), L-argininin üre ve ornitine hidrolizini sağlayan bir enzimdir. Arginaz enzimi üre döngüsünün en aktif olduğu yer olan memeli karaciğerinde en fazla miktarda bulunmasına rağmen böbrek gibi dokularda da bulunur<sup>1</sup>. Böbrek gibi aktif bir üre döngüsünün bulunmadığı<sup>2</sup> dokulardaki arginaz ise arginini hidrolize eder ve oluşturduğu ornitin glutamat, prolin ve poliaminlerin sentezinde kullanılır<sup>3,4</sup>. Memeli hücrelerinde bulunan poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) hücre büyümesi için gerekli olup, transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasını kolaylaştırır<sup>5</sup>.

Park ve Tappel<sup>6</sup> vitamin E ile arginaz arasında bir ilişkinin olduğunu vitamin E ilave edilmiş diyetle beslenen ratların, vitamin E yetersiz diyetle beslenen ratlardan daha düşük arginaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bir glikokortikoid olan prednisolonun yüksek dozlarıyla muamele edilen ratların karaciğerinde artmış arginaz aktivitesi üzerine vitamin E'nin diyetel ilavesinin önemli bir azaltıcı etkiye sahip olduğu saptanmıştır<sup>7</sup>.

Arginazın hormonlarla indüklenebildiği, karaciğer ve böbrek arginazlarının belirli steroid hormonlar tarafından regülasyonunun farklı olduğu da bilinmektedir<sup>8,9</sup>. Ovariectominin karaciğer ve böbrek arginazını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bundan dolayı ovariectomili ve diabetik ovariectomili ratlarda karaciğer ve böbrek arginazının nasıl etkilendiği, tüm ovariectomili ratlara Estradiol 17- $\beta$  ve vitamin E verilmesinin arginaz üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmada başlangıç vücut ağırlıkları ortalama 180 g olan 70 adet Wistar Albino türü dişi rat kullanılmış ve ratlar aynı laboratuvar ortamında tutulup aynı rat yemi verilerek, *ad libitum* su ve yem alımları sağlanmıştır. Ratlar her grupta 10 adet olacak şekilde 7 gruba bölünmüştür.

*Grup 1 (Kontrol grubu):* Bu gruptaki ratlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

*Grup 2 (Ovariectomi grubu):* Bu gruptaki ratlar

ovariectomize edilmiştir.

*Grup 3 (Ovariectomize + Estradiol 17- $\beta$  (E2) grubu):* Ovariectomize edilmiş ratlara deri altı Estradiol 17- $\beta$  (E2) 40  $\mu$ g/kg/gün olacak şekilde 28 gün süre ile verilmiştir.

*Grup 4 (Ovariectomize + Estradiol 17- $\beta$  (E2) + E vitamini grubu):* Ovariectomize edilmiş ratlara intraperitoneal 100 mg/kg/gün E vitamini (dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) ve deri altı Estradiol 17- $\beta$  (E2) 40  $\mu$ g/kg/gün olacak şekilde 28 gün süre ile verilmiştir.

*Grup 5 (Ovariectomize + Diabet grubu):* Ovariectomize edilmiş ratlara 45 mg/kg olacak şekilde tek doz streptozotosin 0.1M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözülürerek, intraperitoneal olarak uygulanmıştır. 3 gün sonra kuyruk veninden alınan kanın Glikometre cihazındaki ölçümü sonucu, açlık kan glikozu 200 mg/dl'yi geçen ratlar, diabetik olarak kabul edilmiştir.

*Grup 6 (Ovariectomize + Diabet grubu + Estradiol 17- $\beta$  [E2]):* 5. gruptaki gibi diabetik hale getirilen ratlara 40  $\mu$ g/kg/gün dozunda deri altı Estradiol 17- $\beta$  (E2) 28 gün süre ile uygulanmıştır.

*Grup 7 (Ovariectomize + Diabet grubu + Estradiol 17- $\beta$  (E2) + E vitamini grubu):* Beşinci gruptaki gibi diabetik hale getirilen ratlara 40  $\mu$ g/kg/gün dozunda deri altı Estradiol 17- $\beta$  (E2) ve 100 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal E vitamini (dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) 28 gün süre ile uygulanmıştır.

Yirmi sekiz günlük deneysel uygulamaların sonunda tüm ratların eter anestezisi altında abdominal kavileri açılarak alınan karaciğer ve böbrek doku örnekleri %0.9'luk NaCl ile yıkanmıştır. Doku örnekleri iki süzgeç kâğıdı arasında kurutulduktan sonra 1 g olarak tartılıp bir makas yardımı ile küçük parçalara ayrılmış ve distile su (1/10, w/v) ilavesinden sonra kırılmış buz içerisinde cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve süpernatantlar enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Arginaz aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu<sup>10</sup> ile ölçülmesi sonucu saptanmıştır. Protein miktarının ölçümünde ise modifiye edilmiş Lowry<sup>11</sup> metodu kullanılmıştır.



ti<sup>7</sup>. Bu çalışmada ovariectomili diabetik ratların karaciğerinde artmış arginaz aktivitesi üzerine estradiolün etkisiz olduğu, fakat estradiol ve vitamin E kombinasyonunun aktiviteyi normale yakın değerlere restore edebildiği, ilginç olarak ovariectomili diabetik ratların böbreğinde değişmeyen arginaz aktivitesi üzerine estradiolün önemli artırıcı etkisinin olduğu saptanmıştır.

Ratlarda arginazı kodlayan iki farklı yapısal gen lokusu vardır. Birinci gen lokusu karaciğerdeki arginazı ifade eder, ikincisi böbrek, beyin, pankreas gibi karaciğer dışı dokulardaki arginazı ifade eder<sup>34</sup>. Gerek ovariectomili ratlarda karaciğer ve böbrek arginaz aktivitesinin farklı olarak etkilenmesi gerekse diabetik ovariectomili ratlarda karaciğer ve böbrek arginaz aktivitesinin estradiol ve vitamin E muamelesinden farklı olarak etkilenmesi bu iki gen lokusu tarafından kodlanan arginazların farklı özelliklere sahip olduğunun açık göstergesidir.

Sonuç olarak karaciğer arginaz aktivitesinin ovariectomiden etkilenmediği, böbrek arginaz aktivitesinin ovariectomide azaldığı, estradiol ve vitamin E verilmesinin aktiviteyi normale döndürmede etkisinin olmadığı saptanmıştır. Ovariectomide böbrek arginaz aktivitesinin azalmasının bu dokudaki glutamat, prolin ve poliaminlerin sentezinde aksamalara ve paralelinde böbrek problemlerinin başlamasına sebep olabileceğini söyleyebiliriz.

## KAYNAKLAR

- 1 **Herzfeld A, Raper SM:** The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem J*, 153, 469-78, 1976.
- 2 **Ratner S, Petrack B:** The mechanism of arginine synthesis from citrulline in kidney. *J Biol Chem*, 200, 175-185, 1953.
- 3 **Kaysen GA, Strecker HJ:** Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J*, 133, 779-788, 1973.
- 4 **Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzynska W, Peska M, Grzelakowska-Sztabert B:** Arginine and ornithine metabolizing enzymes in testosterone-induced hypertrophic mouse kidney. *Int J Biochem Cell Biol*, 27, 287-95, 1995.
- 5 **Hebby O:** Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*, 19,1-20, 1981.
- 6 **Park JR, Tappel AL:** Protein damage and lipid peroxidation: effects of diethyl maleate, bromotrachloromethane and vitamin E on ammonia, urea and enzymes involved in ammonia metabolism. *Toxicol Letters*, 58, 29-36, 1991.
- 7 **Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M:** Effects of dietary vitamin E and selenium on arginase activity in the liver, kidney and heart of rats treated with high doses of glucocorticoids. *Cell Biochem Funct*, 21, 331-335, 2003.
- 8 **Mimic-Oka J, Cupic Z, Japundzic I:** Effect of adrenal function on level of hepatic and extrahepatic arginase. *Experientia*, 27, 1477-1478, 1971.
- 9 **Kumar AN, Kalyankar GD:** Effect of steroid hormones on age dependent changes in rat arginase isoenzymes. *Exp Gerontol*, 19, 191-198, 1984.
- 10 **Geyer JW, Dabich D:** Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 39, 412-417, 1971.
- 11 **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275, 1951.
- 12 **Swank RT, Davey R, Joyce L, Reid P, Macey M:** Differential effect of hypophysectomy on the synthesis of beta-glucuronidase and other androgen-inducible enzymes in mouse kidney. *Endocrinology*, 100, 473-80, 1977.
- 13 **Traish AM, Kim NN, Huang YH, Min K, Munarriz R, Goldstein I:** Sex steroid hormones differentially regulate nitric oxide synthase and arginase activities in the proximal and distal rabbit vagina. *Int J Impot Res*, 15 (6): 397-404, 2003.
- 14 **Pittner RA, Spitzer JA:** Steroid hormones inhibit induction of spontaneous nitric oxide production in cultured hepatocytes without changes in arginase activity or urea production. *Proc Soc Exp Biol Med*, 202 (4): 499-504, 1993.
- 15 **Annappurna VV, Mukundan MA, Sesikeran B, Bamji MS:** Effects of female sex steroids on concanavalin A-mediated agglutination of hepatocytes from nonregenerating and regenerating rat liver and hepatic tumor marker enzymes. *Biochem Med Metab Biol*, 38 (3): 259-64, 1987.
- 16 **Weiner CP, Knowles RG, Stegink LD, Dawson J, Moncada S:** Myometrial arginase activity increases with advancing pregnancy in the guinea pig. *Am J Obstet Gynecol*, 174 (2): 779-82, 1996.
- 17 **Freeman JJ, Williams MA:** Estrogenic induction of uterine arginase activity. *Horm Metab Res*, 3 (5): 352, 1971.
- 18 **Lamers WH, Mooren PG:** Role of sex steroid hormones in the normal and glucocorticosteroid hormone-induced evolution of carbamoylphosphate synthase (ammonia) and arginase activity in rat liver ontogenesis. *Biol Neonate*, 40(1-2): 78-90, 1981.
- 19 **McLean P, Novello F:** Influence of pancreatic hormones on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem J*, 94, 410-422, 1965.
- 20 **Baxter LCA, Schofield PJ:** The effects of a high fat diet on chronic streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 18, 239-245, 1980.
- 21 **Bond JS, Failla ML, Unger DF:** Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Chem*, 258 (13): 8004-8009, 1983.
- 22 **Failla ML:** Hormonal regulation of manganese metabolism. In, Schramm VL, Wedler FC (Eds): *Manganese in Metabolism and Enzyme Function*. Academic Press, London and New York, 93-105, 1986.
- 23 **Spolarics Z, Bond JS:** Comparison of biochemical properties of liver arginase from streptozotocin-induced diabetic and control mice. *Archs Biochem Biophys*, 274 (2): 426-433, 1989.
- 24 **Upadhyaya SKC, Raju J:** Baquer, N.Z. Modulation of mRNA levels of liver arginase by insulin and vanadate in experimental diabetes. *Indian J Biochem Biophys*, 36, 125-128, 1999.
- 25 **Erişir M, Erçel E, Yılmaz S, Ozan S:** Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Vet Med Czech*, 50 (2): 69-76, 2005.
- 26 **Sochor M, Mclean P, Brown J, Greenbaum AI:** Regulation of pathways of ornithine metabolism. Effects of thyroid hormone and diabetes on the activity of enzymes at the "ornithine crossroads" in rat liver. *Enzyme*, 1981, 26(1): 15-23.



- 27 **Upadhyaya SKC, Baquer NZ:** Effects of vanadate and insulin on the activities of selected enzymes of amino acid metabolism in alloxan diabetic rat kidney. *Biochem Mol Biol Int*, 40(4): 853-860, 1996.
- 28 **Bond JS, Unger DF, Garganta CL:** Properties and regulation of mouse liver arginase. In, Schramm VL, Wedler FC (Eds.): *Manganese in Metabolism and Enzyme Function*. Academic Press, London and New York, 239-257, 1986.
- 29 **Bond JS:** Effect of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim Biophys Acta*, 327 (1): 157-165, 1973.
- 30 **Scolnick LR, Kanyo ZF, Cavalli RC, Ash DE, Christianson DW:** Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry*, 36, 10558-10565, 1997.
- 31 **Hirsch-Kolb H, Kolb HJ, Greenberg DM:** Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *J Biol Chem*, 246, 395-401, 1971.
- 32 **Mendez JD, Arreola MA:** Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Inter*, 28 (4): 569-575, 1992.
- 33 **Gallo-Torres HE:** Absorbtion, blood transport and metabolism of vitamin E. In, Machlin LJ (Ed): *Comprehensive Treatise*, Marcel-Decker, New York, pp. 170-267, 1980.
- 34 **Haggerty DF, Spector EB, Lynch M, Kern R, Frank LB, Cederbaum SD:** Regulation expression of genes for enzymes of the mammalian urea cycle in permanent cell-culture lines of hepatic and non-hepatic origin. *Mol Cel Biochem*, 53/54, 57-76, 1983.

**Tablo 1:** Ovariectomili ratlara estradiol 17- $\beta$  ve vitamin E verilmesinin karaciğer ve böbrek arginaz aktivitesi ( $\mu$ mol üre/mg protein/saat) üzerine etkisi.

**Table 1:** Effect of estradiol 17- $\beta$  and vitamin E administration on liver and kidneys arginase activities ( $\mu$ mol urea/mg protein/hour) in ovariectomized rats.

Doku	Kontrol	Ovariectomi	Ovariectomi Estradiol	Ovariectomi Estradiol Vitamin E	Ovariectomi Diyabet	Ovariectomi Diyabet Estradiol	Ovariectomi Diyabet Estradiol Vitamin E	P
Karaciğer	291.94 $\pm$ 18.62 <sup>a</sup>	336.81 $\pm$ 16.47 <sup>a</sup>	298.26 $\pm$ 22.72 <sup>a</sup>	301.07 $\pm$ 19.42 <sup>a</sup>	510.89 $\pm$ 45.70 <sup>b</sup>	469.92 $\pm$ 38.03 <sup>b</sup>	283.26 $\pm$ 14.30 <sup>a</sup>	<0.001
Böbrek	21.12 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	15.99 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup>	14.13 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	14.13 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	21.41 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	30.82 $\pm$ 2.46 <sup>c</sup>	28.08 $\pm$ 1.30 <sup>c</sup>	<0.001

<sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ( $p < 0.05$ ).