

# F2 Nesil Farelerde İndol-3-Asetik Asitin Böbrek Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisi

H. Ramazan Yılmaz\*, Eşref Yüksel\*\*, Yusuf Türköz\*\*\*

## Özet:

**Amaç:** İndol-3-asetik asit (IAA)'in, reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturduğu bilinmektedir. IAA böbrek yetmezliği, hipoglisemi, myotoniye sebep olmaktadır. Bu çalışmada, IAA'in F2 nesil farelerde böbrek katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerine etkisi araştırıldı.

**Metod:** Dişi fareler (*Mus musculus*) üç gruba ayrıldı. İki dişi bir erkekle çiftleştirildi. Birinci gruptaki dişilere, IAA'in 300mg/kg vücut ağırlığı dozu etanolde 1/40 seyreltilerek üç günde bir deri altına verildi. İkinci gruptaki dişilere, kontrol grubu olarak etanol aynı yolla verildi. Üçüncü gruptakilere de, kontrol etanolün miktarı kadar serum fizyolojik verildi. Bu işlemler iki nesil boyunca yapıldı. Böbrek dokusunda enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

**Bulgular:** IAA verilen gruptaki F2 nesilde, CAT aktivitesi kontrol etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı ( $p<0.002$ ). Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında SOD ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir fark gözlenmedi.

**Sonuç:** IAA'in F2 nesil farelerde böbrek CAT aktivitesini olumsuz yönde etkilediği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** İndol-3-asetik asit, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, böbrek.

Günümüzde, ekonomisi tarıma dayalı ülkeler sınırlı olan tarımsal alanlarını, sürekli artan nüfuslarını besleyebilmek için, verimi arttıracak şekilde kullanmak zorundadırlar. Bitki büyüme hormonlarının yanında bazı pestisit ve herbisitlerin büyük ölçüde ürün artışına yol açtığı bilinmektedir. Ancak, aynı zamanda çevre kirliliğine de sebep olmaktadır. Bu maddeler uzun süre bozulmadan suda, toprakta, sebze ve meyveler üzerinde kalmakta ve besin zinciri ile de insana kadar ulaşmaktadır. Bilhassa bitki büyüme hormonları canlı sistemden tamamen atılmayıp, organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (1,2).

İndol-3-asetik asit (IAA) bitki büyüme maddesi olarak bitkilerde embriyogenezden yaşlanmaya kadar gelişimin her evresinde önemlidir (3).

Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan indol-3-asetik asit birçok hayvanın, embriyo, larva, serebrosipinal sıvı, kan, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyinde tespit edilmiştir (4,5). Embriyonik gelişimdede rolü vardır. IAA'in farelerde karaciğer ve böbrekte triptofandan sentezlendiği ve yüksek konsantrasyonlarda, fare fibroblast 3T3 hücrelerine toksik olduğu gösterilmiştir (4). İnsanda, IAA ve metabolitlerinin plazma düzeylerinin fenilketonuri ve böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda arttığı bulunmuştur (5). IAA'in, kültür ortamlarında rat nötrofillerinin şekil bozukluklarına ve ölümlerine sebep olduğu belirtilmiştir (5). IAA'in deney hayvanlarında güçlü bir teratojenik etkiye sahip olduğu; hem ratlarda hem de insanlarda hipoglisemiye ve ratlarda miyotomiye sebep olduğu ve farelerde bir antiinflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur (5,6).

Bitki büyüme maddeleri tarımda ve seracılıkta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu maddelerin bir kısmı bitkilerde özellikle de sebze ve meyvelerde tam yıkıma uğramadan depolanmakta, böylece bu besinlerin hayvanlar ve insanlar tarafından alınmasıyla da bitki büyüme maddeleri hayvansal dokularda birikmektedirler.

\*Bu çalışma, "17. Ulusal Biyokimya Kongresi, Ankara, 24-27 Haziran 2002" de Poster olarak sunulmuştur.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, \*Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Isparta,

İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, \*\*Biyoloji Bölümü, Tıp Fakültesi, \*\*\*Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye.

**Yazışma Adresi:** Yrd.Doç.Dr. H.Ramazan YILMAZ

Süleyman Demirel Üniversitesi

Tıp Fakültesi (Morfoloji Binası)

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

32260 İSPARTA

Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, bu çalışmada bitki büyüme hormonlarından IAA'nin düşük dozları hamile farelere deri altına uygulanarak, F2 nesilde olabilecek birikimlerin böbrek katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktivitelerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında üretimi yapılan, ağırlıkları 18-22 g olan Albino *Mus musculus* türü dişi fareler kullanıldı. Hayvanlar normal fare diyetiyle beslendi. IAA %70'lik etanol içinde çözülerek kullanıldı. IAA'nin etkisinin açığa çıkarılması için etanol ve serum fizyolojik uygulanan kontrol grupları oluşturuldu. Serum fizyolojik ve etanol uygulanacak grupların her biri için 6'şar dişi ve IAA için 7 dişi kullanıldı. İki dişi bir erkekle çiftleştirilmek üzere kafeslere yerleştirildi ve iki gece bir arada tutularak çiftleştirildi. Hamile oldukları kabul edilen IAA grubundaki dişilere üç günde bir, 300 mg/kg vücut ağırlığı dozu (7) 1/40 seyreltilerek deri altına uygulandı. Bu uygulamaya yavrular doğduktan sonraki 55. güne kadar devam edildi. Bu uygulama iki nesil boyunca yapıldı. 55. günde deney için kullanılacak yavruların boyunları kırılarak öldürüldükten sonra karınları açılarak süratle böbrekler çıkarıldı ve soğuk 0.15 M'lık KCl ile yıkandı ve perfüze edildi. Böbreklerin fazla suyu kurutma kağıdı ile alındıktan sonra 1/3 w/v oranında 0.15 M KCl eklenerek buz izolasyonu altında homojenizatör (PCV, Kinematica, Status) ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Homojenat 48.000 g'de 30 dakika santrifüj (Beckman LS 70 M) edildi. CAT, SOD ve GSH-Px enzimlerinin aktiviteleri süpernatanda spektrofotometrik olarak tayin edildi (8-10).

**CAT Tayini:** Katalaz aktivitesi 240 nm'de, enzim tarafından yıkılan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'in izlenmesi esasına göre tayin edildi (8).

**SOD tayini:** Süperoksit dismutaz aktivitesi, 560 nm'de ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit anyonlarının nitro blue tetrazolium'u (NBT) indirgenmesi esasına dayalı metod ile ölçüldü (9).

**GSH-Px Tayini:** Glutatyon peroksidaz aktivitesi, NADPH'nin 340 nm'deki oksitlenmesinin takibiyle tayin edildi (10). Protein miktar tayini için Lowry yöntemi uygulandı (11).

**İstatistiksel Analizi:** İstatistikler SPSS® 9.05 ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden "One-sample Kolmogorov-Smirnov Test" ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı istatistiksel karşılaştırma için parametrik testlerden "One-way ANOVA" testi ve post-hoc testlerden LSD (Least significance difference) kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

### Bulgular

Böbrek dokusunda CAT, SOD ve GSH-Px aktiviteleri Tablo 1 ve Grafik 1-3'te verilmiştir. Kontrol serum fizyolojik grubu ile kontrol etanol grubu karşılaştırıldığında, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir fark gözlenmedi. IAA grubunun CAT aktivitesi kontrol etanol grubuna göre anlamlı olarak azalırken (p<0.002), SOD ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05).

Tablo 1: IAA uygulanan annelerin F2 nesil yavruların böbrek enzim aktiviteleri (ortalama ± standart hata).

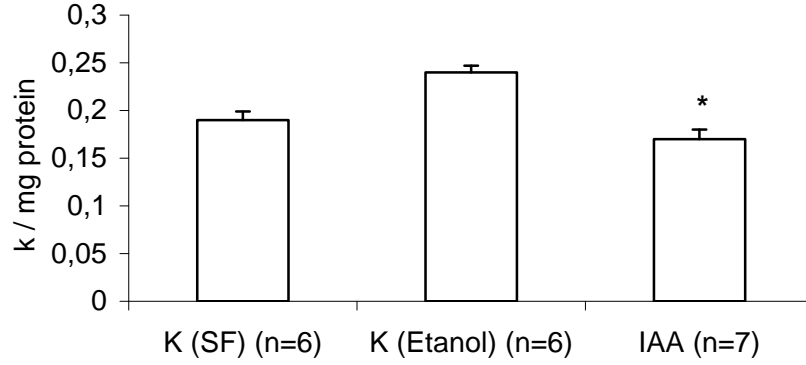
Gruplar	CAT (k/mg protein)	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (mU/mg protein)
Kontrol (Serum fizyolojik) (n=6)	0.19 ± 0.009	7.14 ± 0.7	143.7 ± 17.1
Kontrol (Etanol) (n=6)	0.24 ± 0.007	7.87 ± 0.7	156.4 ± 15.9
IAA (n=7)	0.17 ± 0.01*	8.59 ± 0.7	177.9 ± 13.8

\* P<0.002.

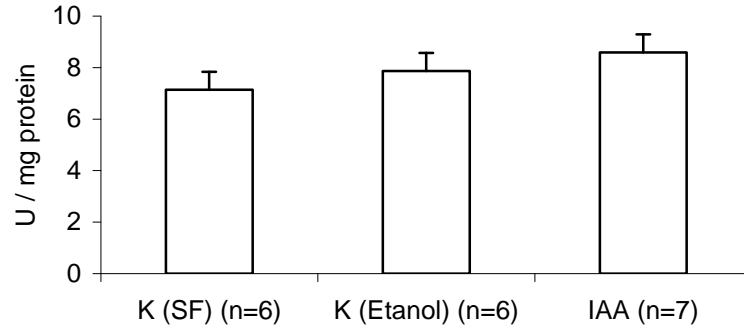
### Tartışma

IAA'nin reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturduğu ve sitotoksik olduğu bilinmektedir (5,12). ROT'lar nükleik asitlerde, lipidlerde, lipoproteinlerde, proteinlerde, serbest amino asitlerde, karbohidratlarda ve bunlardan türeyen kompleks biyomoleküllerde hasarlar meydana getirmektedirler (13,14). Organizmada ROT'ları süpüren CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidanlar bulunmaktadır. SOD, süperoksit anyonlarının dismutasyonunu katalizleyerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i oluşturur. CAT ve GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in su ve oksijene parçalanmasını sağlar (15).

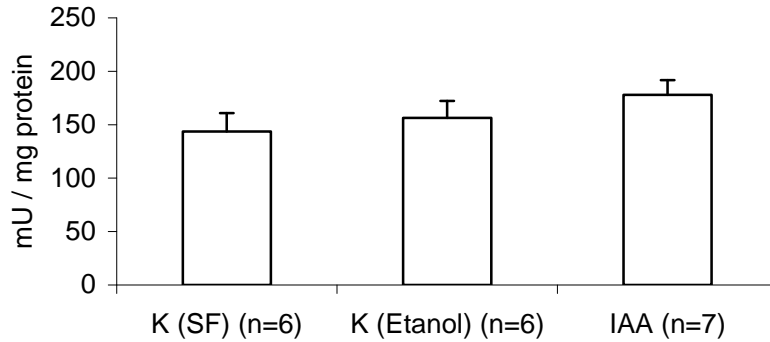
Çalışmamızda, IAA, kontrol etanole göre, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. Pires de



Grafik 1: IAA uygulanan annelerin F2 nesil yavruların böbrek katalaz enzim aktiviteleri. K (SF), kontrol (serum fizyolojik); K (Etanol), kontrol (etanol); IAA, indol-3-asetik asit, \*  $p < 0,002$



Grafik 2: IAA uygulanan annelerin F2 nesil yavruların böbrek süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri. K (SF), kontrol (serum fizyolojik); K (Etanol), kontrol (etanol); IAA, indol-3-asetik asit.



Grafik 3: IAA uygulanan annelerin F2 nesil yavruların böbrek glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri. K (SF), kontrol (serum fizyolojik); K (Etanol), kontrol (etanol); IAA, indol-3-asetik asit.

Melo ve arkadaşları rat nötrofil kültüründe, IAA'ın SOD ve GSH-Px aktivitelerini arttırdığını, ancak lenfosit kültüründe bu enzimlerin aktivitelerini etkilemediğini gözlemişlerdir (5). Yapılan bir çalışmada, IAA'ın ratlarda serum laktat dehidrogenaz, AST ve CPK aktivitelerini arttırdığı belirtilmiştir (16).

Çelik ve ark. IAA'ın rat böbrek ve karaciğerinde malondialdehit düzeyini arttırdığını gözlemişlerdir (17).

Çalışmamızda IAA uygulanan annelerin F2 nesil yavrularında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlemlendi ( $p < 0.002$ ). Bu azalmanın nedeni, IAA'ın, ürettiği ROT'nin

hücrenin ve enzimin yapısını bozmasından ya da enzimin katabolize edeceği substrat miktarının azalmasından dolayı olabilir. Yapılan bir çalışmada, IAA'in kültür ortamında, nötrofillerin yapısını bozduğunu ve ölümlerine sebep olduğu belirtilmiştir. Bu ölümün sebeplerinin de IAA'in ürettiği O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının artmasından dolayı olduğu ifade edilmiştir (5). Ayrıca, SOD tarafından üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya CAT ya da GSH-Px enzimi ile yıkıma uğramaktadır. IAA grubunda kontrol etanole göre CAT aktivitesindeki azalma, GSH-Px aktivitesinin artmasına paralel bir kompenzasyon mekanizması olabilir. Çünkü aktivitesi düşen CAT yeterince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i detoksifiye edemeyecek onun yerine GSH-Px aktivitesini arttıracaktır.

Kontrol etanol grubu kontrol serum fizyolojik grubu ile karşılaştırıldığında, etanol grubunda, CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerine anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Tablo 1). Bu artışların nedeni, etanolün hücre yapısında meydana getirmiş olduğu hasar olabilir. Nitekim Lieber ve DeCarli, yaptıkları bir çalışmada, etanolün düz endoplazmik retikulumda hasarlar meydana getirdiğini ve dolayısıyla mitokondriyal enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir (18). Ayrıca farklı bir çalışmada, etanolün rat karaciğerinde RNA ve protein sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (16).

Sonuç olarak, iki nesil boyunca annelere uygulanan IAA, F2 nesil farelerde CAT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir azalmaya neden oldu. SOD ve GSH-Px aktivitelerinde ise istatistiksel olarak önemli olmayan artmaya neden oldu. Bu etki hücre veya genetik düzeyde olabilir. Enzim aktivitelerindeki azalma ve artmaların sebeplerinin daha iyi açıklanabilmesi için daha ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

### The Effect Of Indole-3-Acetic Acid On Catalase, Superoxide Dismutase, And Glutathione Peroxidase Activities In Kidneys Of The Second Generation Rats

#### Abstract:

**Aim:** Indole-3-acetic acid (IAA) has been known to generate reactive oxygen species (ROS). IAA causes renal dysfunction, hypoglycemia, and myotonia. In this study, the effect of indole-3-acetic acid on mice catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the kidneys the second generation were investigated.

**Methods:** Female mice (*Mus musculus*) were divided into 3 groups. For mating, two females and one male were held in a stainless steel cage. IAA was intraperitoneally administered to maternal mice as 1/40 dilution of 300 mg/kg body weight in 3 day

*intervals. As controls, ethanol and serum physiologic were administrated. This experimental treatment was carried out for over 2 generations. Spectrophotometric methods were used to determine the activities of above-mentioned enzymes in the kidney tissue.*

**Results:** In the second generation of IAA administrated mice, CAT activity was found to be lower than control ethanol group ( $p<0.002$ ). There was no significant difference in the SOD and GSH-Px activities among IAA, control ethanol, and control serum physiologic groups.

**Conclusion:** As a result, we can say that the CAT was affected negatively from IAA toxicity.

**Key words:** Indole-3-acetic acid, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, kidney.

### Kaynaklar

1. WHO (World Health Organization) Environmental health criteria 29, 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Geneva 1984.
2. Göze İ, Yelkovan İ, Çınar Z: Daminozid'in civcivlerdeki enzimatik etkiler ve histopatolojisi. Tr J of Biology 19: 217-222, 1995.
3. Palavan - Ünsal N: Bitki büyüme maddeleri, İ.Ü. Basım Evi ve Film Merkezi, İstanbul, 1993.
4. Sinna GA: The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3 cells. Comp Biochem Physiol 75 C: 433-436, 1983.
5. Melo MR, Curi TCP, Miyasaka CK, Palanch AC, Curi CP: Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. Gen Pharmac 31: 573-578, 1998.
6. Bertuzzi A, Mingrone G, Gandolfi A, Greco AV, Ringoir S, Vanholder R: Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. Clinica Chimica Acta 265: 183-192, 1997.
7. Yamada J, Sugimoto Y, and Horisata K: Indoleacetic acid-induced hypothermia and changes in serotonin metabolism in mice. J Pharmacobio-Dyn 8: 564-570, 1985.
8. Aebi H: In Bergmeter HU(ed), Methods in enzymatic analysis, Weinheim, Verlag Chemie 3: 273-282, 1982.
9. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34: 479-500, 1988.
10. Paglia, D, Valentine, WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 70: 158-163, 1967.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Rondall JR: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.

12. Kanofsky JR: Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* 5: 14171-14175, 1988.
13. Herken H, Uz E, Özyurt H, Söğüt S, Virit O, Akyol Ö. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizopheenia. *Mol Psychiatry* 6: 66-73, 2001.
14. Lunec J. Free radicals: Their involvemet in disease processes. *Ann Clin Biochem* 27: 173-182, 1990.
15. Koltuksuz U, Uz E, Özen S, Aydınç M, Karaman A, Akyol Ö. Plasma superoxide dismutase activity and malondialdehyde level correlate with the extent of acute appendicitis. *Pediatr Surg Int* 16: 559-561, 2000.
16. Çelik İ, Özbek H, Tülüce Y: Effects of subchronic treatment of some plant growth regulator on serum enzyme level of rats. *Turk J Biol* 26: 73-76, 2002.
17. Çelik İ, Tülüce Y, Özok N,: Effects of indoleacetic acid and kinetin on lipid peroxidation levels in various rat tissues. *Turk J Biol* 26: 193-196, 2002.
18. Lieber CS, DeCarli LM: Hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *J Biol Chem* 245: 2505-2512, 1970.
19. Pösö H, Pösö AR: Inhibition of RNA and protein synthesis by ethanol in regenerating rat liver: evidence for transcriptional inhibition of protein synthesis. *Acta Pharm Et Toxicol* 49: 125-129, 1981.