

**İNEKLERDE METRİTİS TEDAVİSİNDE KULLANILAN DİETİLSTİLBESTROL'ÜN
SÜT VE SERUMDAKİ KALINTISININ RADİOİMMUNOASSAY YÖNTEMİ
KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Salmanoğlu, B.¹, Sel, T.¹, Salmanoğlu, R.², Ergun, H.³

**Radioimmunologische Bestimmung von Diethylstilbesterorückstand in der
Milch und im Serum nach der Behandlung der Metritis bei den Kühen**

Zusammenfassung: Die intrauterine Verabreichung von Chloramphenicol (1 g), Oxytetracycline (1,5 g) und Diethylstilbesterol (DES: 50 mg) gilt noch heute nach der Geburt bei der Behandlung der Metritis des Rindes.

In dieser Arbeit wurde der Rückstand von DES in der Milch und im Serum mittels einer empfindlichen Radioimmunologiemethode erfaßt. In dem ersten Tag der Behandlung wurde im Serum höhere DES-Menge festgestellt (1.014 ng/ml). In den nächsten Tagen wurde die Menge niedriger gemessen.

Statistisch waren die DES-Werte in der Milch und im Serum mit $p > 0.05$ nicht signifikant.

Özet: Klinikte metritis tedavisinde kullanılan Oksitetrasiklin 1.5 g, Kloramfenikol 1 g ve Dietilstilbestrol (DES) 50 mg dozlarına sadık kalınarak 8 ineğin metritis tedavisi yapılmıştır.

İntra-uterin uygulanan DES'in süt ve seruma geçebilirliği radioimmunoassay metodu ile izlenmiştir.

Tedavi sonrası birinci günde serumda yükselen DES miktarı (1.014 ng/ml), sonraki günler azalmıştır. DES in süt ve serumdaki değerleri arasında yapılan eş yapma analizi sonucunda, istatistik bakımdan önemli bir farklılık ($p > 0,05$) bulunmamıştır.

1 Dr. Araş. Gör., AÜ. Veteriner Fak. Biyokimya Anabilim Dalı.

2 Doç.Dr., A.Ü. Veteriner Fak. Doğum ve Reprod. Hast. Bilim Dalı

3 Prof. Dr. , AÜ. Veteriner Fak. Biyokimya Anabilim Dalı.

Giriş

Süt ineklerinde doğum sonrası gelişen ve üreme kapasitesini önemli düzeyde azaltan hastalıkların başında metritis gelmektedir (8). Nedenleri arasında, güç doğumlarda genital kanal yaralanmaları, plasenta kalıntısı (retentio sekundinarum) ve uterus involusyonundaki gecikmeler sayılabilir (19). Aynı zamanda doğum sonrası uterus içeriği, bakterilerin üremesi için iyi bir ortam sağlamaktadır (24).

Klinikte metritis sağtımında kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerin yanında, sentetik östrojen içeren preparatlarda kullanılmaktadır (8). Östrojenler uterus ve diğer dişilik organlarında vaskularizasyona, sekresyon ve endometrium faaliyetlerinde artışa neden olmaktadır (13). Doğal östrojenler uterus tonusunda artmaya neden olurlar, fakat oluşturdukları kontraksiyonlar zayıftır. Sentetik östrojen olan dietilstilbestrel (DES)in uyardığı uterus kontraksiyonları, uterus içeriğini boşaltacak kuvvettedir (21). Ayrıca intrauterin kullanılan östrojen preparatları uterusun mikroorganizmalar tarafından invazyonlarında savunma mekanizmasını kuvvetlendirir (21). DES'in sağladığı uterotopik aktivite, uygulanan anatibiyotikğin etkisini kuvvetlendirir (20) ve tedavi süresini kısaltır. Birçok avantajı yanında, insan ve farelerde DES'in intrauterin uygulanması sonucu kanserojenik etkili olduğu gösterilmiştir (14, 25, 26).

Organizmaya dışardan verilen DES ve steroidal ürünler mikrozomal sitokrom P⁴⁵⁰/sitokrom P⁴⁵⁰-redüktaz enzimleri tarafından katalize edilirler ve oluşan metabolitlerinin östrojene bağlı olarak gelişen kanserlerde çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir (29).

Özellikle süt ineklerinde metritis tedavisinde DES kullanıldıktan sonra, süte geçip geçmediğinin bilinmesi insan sağlığı yönünden önemlidir. 1958 yılında Turner (31)'in günde 10-20 mg DES verilen süt ineklerinde süte geçebilen DES miktarları üzerinde yaptığı çalışmada önce DES'in süte geçebilirliğine fazla önem verilmemiştir. Yapılan çalışmalarda östrojenin meme dokusunda yaptığı olumlu etkinin süt verimine yöneltilmesi üzerinde durulmuştur (7, 11). Sentetik östrojenin süte geçebilirliği araştırılırken kullanılan biyolojik metodun hassasiyeti miligram düzeyindedir (16).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Topluluğu ülkelerinde et, süt ve yumurta veriminden yararlanan hayvanlarda kullanılması yasak olan DES (5, 23), Türkiye de halen tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Tedavi amacıyla intrauterin olarak 50 mg dozda uygulanan DES'in serum ve sütteki kalıntı miktarı ile serum ve süttten uzaklaştırılma süresinin Radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle tesbiti bu çalışmada amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 3-8 yaş arası toplam 8 adet siyah beyaz Holstein ırkı en az bir kez doğum yapmış inekler kullanılmıştır. Bu ineklerden her biri doğumdan sonra yavru zarlarının zamanında veya tam atılmaması, uterus involüsyonunun geç oluşması veya güç doğum gibi problemlerle karşılaşmışlar ve hayvan sahipleri ineklerinin 3-4 kez tohumladıkları halde gebe kalmadığı şikayeti ile başvurmuşlardır. İneklerde endometritis tanısı anamnez alınması yanında vaginal ve rektal muayenelerle konulmuştur.

Sağıtımda, kateter aracılığı ile intra-uterin olarak 1. günde 30 cc oksitetraksiklin (Geosol inj.; 50 mg/ml), 20 cc kloramfenikol (Venikol inj.; 50 mg/ml), 10 cc dietilstilbestrol (östrojenin amp. 5 mg/ml) birlikte verilmiştir. 2., 3., 4. ve 5. günlerde sadece 30 cc Geosol ve 20 cc Venikol intra-uterin olarak uygulanmıştır. 1. Gün ilaç verilmeden önce alınan kan ve süt örneği kontrol olarak kabul edilmiştir. Tedavinin devam ettiği diğer dört gün boyunca her gün süt ve kan örnekleri alınmaya devam edilmiştir.

Sütte ve serumda DES miktarları radioimmunoassay tekniği ile saptanmıştır (1, 2). Analizlerde β sıvı sintilasyon cihazı (1211/1212 LKB), vakumlu etüv (Heraeus), soğutmalı santrifüj cihazı (6000 rpm, Heraeus) kullanılmıştır.

Çalışmalarda, Monoethyl 3H dietilstilbestrol (250 u Ci/ml; Amersham International plc, England), DES antikör (Prof. Dr. H. Karg-München-Institut für Physiology der südd. Versuch. und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan'dan temin edilmiştir.), sintilasyon solusyonu ((PPO: 2,5 Diphenyloxazole; POPOP: 1,4-bis(2-(5-Phenylloxazolyl)-benzene; Toluene ve Triton X 100 (12)) kullanılmış, standartlar 800 ng/ml DES'in etanoldeki çalışma solusyonundan 12,5-800 pg/0,1 ml olarak hazırlanmıştır.

Serbest DES, numuncenin dietileter ekstraksiyonundan çeşitli basamaklarda solvent halinde izole edildikten sonra, kalıntı fazı işaretleli antijen ve DES antikör kullanılarak RIA ile ölçüm yapılmıştır.

DES'in süt ve serumda kalış sürelerinin önemlilik derecesi eş yapma analiz yöntemi kullanılarak saptanmıştır (9).

Bulgular

Doğumdan sonraki dönemde endometritis tanısı konulan ineklerde sağıtımdan önce ve sağıtım uygulandığı sırada alınan süt ve kan örneklerinde DES miktarları tablo 1 ve 2'de, şekil 1 ve 2 gösterilmiştir.

Tablo 1. Ortalama süt DES miktarları (ng/ml)

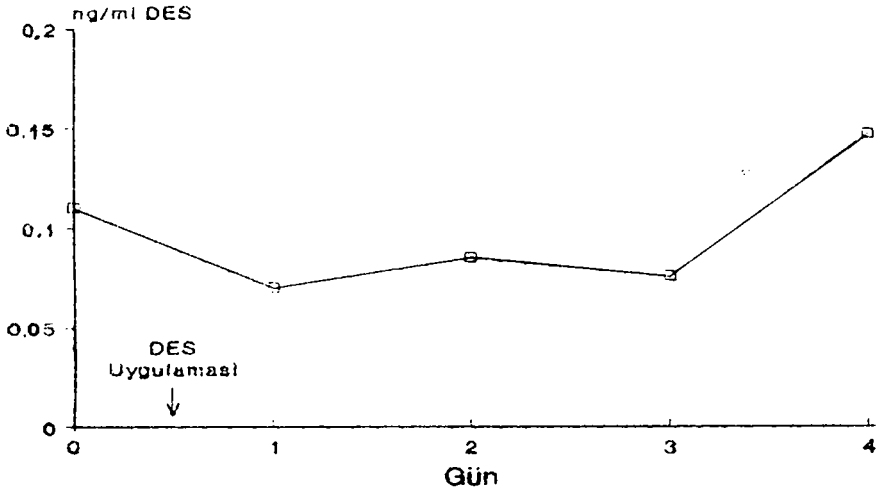
	n	x	Sx
Tedaviden önce	10	0.11 ^a	0.11
Tedaviden sonra 1. Gün	10	0.07 ^a	0.065
2. Gün	10	0.085 ^a	0.065
3. Gün	9	0.076 ^a	0.045
4. Gün	10	0.117 ^a	0.215

Tablo 2. Ortalam serum DES miktarları (ng/ml)

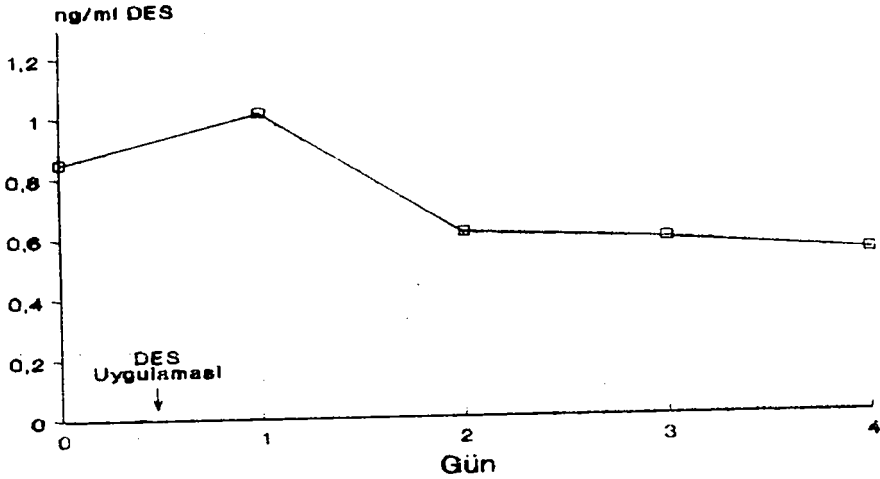
	n	x	Sx
Tedaviden önce	8	0.847 ^a	0.263
Tedaviden sonra 1. Gün	7	1.014 ^a	6.245
2. Gün	7	0.611 ^a	0.187
3. Gün	8	0.588 ^a	0.181
4. Gün	8	0.541 ^a	0.145

a: aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistik bakımdan bir fark bulunamamıştır.

DES'in süt ve serumdaki değerleri arasında yapılan eş yapma yöntemleri sonunda, istatistik bakımdan önemli bir farklılık saptanamamıştır (tablo 1 ve 2).



Şekil 1. Sütte ortalama DES miktarları



Şekil 2. Serumda ortalama DES miktarları

Tartışma ve Sonuç

Önceleri dokularda, serumda ve sütte artık madde miktarını belirlemek için özellikle biyolojik metodların kullanıldığı bildirilmektedir (30). Ovariectomi uygulanarak östrojenik etkiye aşırı duyarlı hale getirilen farelerde, kriter olarak kabul edilen uterus ağırlık artışı ölçülerek, süte geçebilen DES miktarının belirlenmesi ilk defa Voelker ve Becker (32) tarafından bildirilmiştir.

Ovariectomi uygulanan farelerin uterus ağırlık artışının kriter olarak kullanıldığı bir başka çalışmada (16), 0-15 mg arasında DES verilen süt ineklerinden alınan süt 2 ay boyunca östrojenik aktivite yönünden izlenmiştir. Süre sonunda herhangi bir uterus ağırlık artışı bildirilmemiştir. Aynı çalışmada biyolojik metodun belirlediği en düşük DES konsantrasyonunun 0.048 mg olduğu belirtilmiştir. Günümüzde hayvansal kökenli materyallerde DES'in kalitatif ve kantitatif olarak tesbitini sağlayacak birçok metod geliştirilmiştir. Rutin olarak kullanılacak metodlar arasında RIA metodu en hassas, ucuz ve hızlı olarak uygulanabilen ve en fazla miktardaki numunenin kısa sürede çalışılabilmesine olanak sağlayabilen bir methoddur (10). Hassasiyeti pikogram düzeyindedir (13).

Serumda, tedavi sonrası 1. günde yükselen (1.014 ng/ml) DES miktarı sonraki günlerde azalmıştır (Tablo 2, Şekil 2). Yapılan farklı çalışmalarda, ilacın uygulama yolundan başka, hayvanda hastalığın patojenitesi, yaş, ırk ve bireysel farklılıkların DES'in vücuttan uzaklaştırılma süresi üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (6,26).

Radyoaktif olarak işaretlenmiş DES ile sığırlarda yapılan çalışmalarda oral olarak verildikten 16 saat sonra serumda maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir (3). 96 saat sonra ise bu değer, ölçüm sınırının altına düşmüştür. DES'in vücuttan serbest olarak atılması yalnızca gaita yolu ile olmaktadır (15). Barsağa ulaşan konjuge formları barsak mikroflorası tarafından hidrolize edilerek serbest hale dönüştürülür (4, 27). Serbest DES'in büyük bir kısmı tekrar absorbe edilerek portal kana karışır. Bu Entero hepatic sirkülasyon sonucunda DES'in vücuttan uzaklaştırılma süresi uzamaktadır (17).

Radyoaktif işaretli DES peletlerinin deri altı uygulandığı başka bir çalışmada DES'in dokular ve serumda uzaklaştırılma süreleri izlenmiştir. Uygulamanın 30. gününde karaciğer, böbrek üstü bezleri, böbrek ve serumda belirlenen miktarlar, 90-120. günlerde artarak daha yüksek düzeyde ölçülmüştür (4). Benzer çalışmalarda gözlenen

ortak nokta, DES uygulamasını takip eden kısa dönemde dokularda ölçülen kahrıtı miktarı yüksek değildir. Sonraki dönemde daha yüksek değerlerin ölçülmesi enteropıepatik DES sirkülasyonu ile açıklanmaktadır.

Çalışmamızda, sütte belirlenen DES'in 4. günde ölçülen miktarında (0,147 ng/ml) istatistik olarak önemsiz bulunmasına rağmen 1. günde (0,07 ng/ml) göre artış gözlenmiştir.

Amerika Birleşik Devletlerinde kullanılması, Avrupa Topluluğu ülkelerinde kullanılması ve üretimi yasak olan DES'in (26, 28) gıda maddelerinde hiç bulunmaması gerekmektedir.

Sonuç olarak DES ve östradiol gibi fenolik yapıda olan, kanserojenik ve teratojenik etkisi sabit bulunan maddelerin (22), tedavi amacı ile kullanılabilecekleri dikkate alınarak, dokulardan ve sütten tam olarak uzaklaştırılmasının izlenmesi, insan sağlığı açısından gerekli ve önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

RIA analizlerinde kullandığımız DES antikorlarını temin ettiğimiz München-Weihenstephan Fizyoloji Enstitüsü'ne teşekkür ediyoruz.

Kaynaklar

1. **Aghte, O., Frenne de D. and Sperveslage, C.M.** (1979). *Über die Verbreitung der Anwendung von Östrogenen in der Kalbmast im Raum Weser-Ems*. Arch. f. Lebensmittelhyg., 30-67
2. **Aghte, O.** (1980). *Die Anwendung des Radioimmunoassay für Diethylstilbesterol auf Kotproben von Mastkälbern*. Arch. f. Lebensmittelhyg. 31-102.
3. **Aschbacher, P. W.** (1972). *Metabolism of 14 C-Diethylstilbesterol in Sheep*. J. Anim. Sci., 35 (5): 1031-1035.
4. **Aschbacher, P. W., Tacker, E.J. and Rumsey, T.S.** (1975). *Metabolic fate of diethylstilbesterol implanted in the ear of steers*. J. Anim. Sci., 40 (3): 530-538.
5. **Bagnati, R., Castelli M. G. and Airdi, L.** (1990). *Analysis of diethylstilbesterol, dienestrol and hexestrol in biological samples by immunoaffinity extraction end gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr., 527: 267-278.

6. **Brahmakshatriya, R. D., Saetsinnger, D.C. and Waibel, P.W.** (1969). *Effects of endogenous estrogen and/or androgen on performance egg shell characteristics and blood plasma changes in laying hens.* Poultry Sci., 48 (2): 444-445.
7. **Browning, C.B., Fountaine, F.C., Marion, G.B. and Atkeson, F.W.** (1957). *Milk-response from feeding diethylstilbesterol to identical twin cows during complete lactations.* J. Dairy Sci., 40(2): 1590-1598.
8. **Dozsa, L.,** (1972). *Postparturient complications in a dairy herd.* Mod. Vet. Prac., 17: 48-51.
9. **Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F.** (1983). "İstatistik Metotları I," AÜ. Ziraat Fakültesi Yayınları: 861, Ders Kitabı: 229, AÜ. Basımevi, Ankara.
10. **Economou, E. V., Kakabakos, T.E., Evangeles, G. and Ithakissios, D.S.** (1990). *Direct radioimmunoassay for DES in serum.* Steroids, 55: 545-549.
11. **Foreman, C.F. and Porter, A.R.** (1956). *The effects on milk production of feeding stilbesterol to dairy cows.* J. Anim. Sci., 15: 1286.
12. **Gibbs, J.A., Everett, L.J. and Moore, D.** (1976). *Sample preparation for liquid scintillation counting.* Packard Instrument Co. Inc. Zürich, Schweiz.
13. **Grodsky, G.M.** (1981). *Chemistry and Functions of the hormones.* (ed.): D.W. Martin, P. A. Mayes, V.W. Riodwell, II: Harper's Review of Biochemistry Maruzen Asian Edition, p: 468.
14. **Harrington, J. M., Rivera, R.O. and Lawry, L.K.** (1970). *Occupational exposure to synthetic estrogens-the need to establish safety standards.* EAm. Ind. Hyg. Assoc., 39: 139-143.
15. **Herbst, A.L., Ulfeder, H. and Postkanser, D.C.** (1971). *Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbesterol therapy with tumor appearance in young women.* N. Engl. J. J. med. 281: 878-881.
16. **Herrick, E.H. Paulson, Cj, Baron, R. and Browning, C.B.** (1959). *Estrogenic activity in milk of cows and the bile of calves fed toxic levels of diethylstilbesterol.* J. Dairy Sci., 42: 1966-1969.
17. **Hinds, F.C., Draper, H.H., Mitchell, G.E. and Neumann, A.Lj** (1965). *Metabolism of labeled diethylstilbesterol in ruminants.* J. Agr. Food Chem., 13: 256.
18. **Huis, L.G. Veld and Both-Madena, R.** (1979). *Radioimmunoassay of diethylstilbesterol in various calf tissues.* Laboratory for Endocrinology, Sterrenbos 1, Utrecht.
19. **Lotthammer, K.H.** (1984). *Diagnostik und Maßnahmen bei Fruchtbarkeitsstörungen als Bestandsproblem.* In: Grunert, E. (ed.). Buiatrik, Verlag, M.u.H. Shaper, Hannover, p. 230-262.
20. **Maydl, R., Newbold, R.R., Metzler, M. and Mc. Lachlan, J.A.** (1983). *Diethylstilbesterol metabolism by the fetal genital tract.* Endocrinology, 113: 146-151.

21. **Mc Donald, L.E.** (1988). *Endocrin pharmacology*. In: Booth, N.H. and Mc Dodnald, L.E. (ed.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6 th. ed., p: 571-616.
22. **Mc Lachlan, J.A., Newbold, R.R. and Bullock, B.C.** (1980). *Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbesterol*. *Cancer Res.*, 40:3988-3999.
23. **Metzler, M.**, (1989). *Metabolism of some anabolic agents: Toxicological and Analytical aspects*. *J. Chromatogr.*, 489: 11-21.
24. **Murray, R. D., Allison, J.D. and Gard, R.P.** (1990). *Bovine metritis: Comparative Efficacy of alfabrostol and i, trauterine therapies and other factors influencing clinical success*. *Vet. Rec.*, 127: 86-90.
25. **Ozawa, S., Iguchi, T., Sawada, K., Ohta, Y., Takasugi, N. and Bernd, H.A.** (1991). *Postnatal vaginal nodules induced by prenatal diethylstilbesterol treatment correlate with later development of ovary-independent vaginal and uterine changes in mice*, *Cancer Letters*, 58: 168-175.
26. **Page, S. W.** (1991). *Diethylstilbesterol clinical pharmacology and alternative in small animal practice*. *Austr. Vet. J.*, 68 (7): 226-230.
27. **Rico, A. G., Burgat-Scaze, V., Braun, J.P. and Benard, P.** (1981). *Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle*. In: *Anabolic agents in beef and real production proceeding of a workshop held at Brussels, March 5 th. 6 th.*, p: 45-56.
28. **Ross, D.B.** (1981). *Toxicology of exogeneous anabolic agents* 139-154. In: *Anabolic agents in beef and veal production*. Proceedings of a workshop held at Brussels, March 5 th and 6 th.
29. **Roy, D., Strobel, H.W. and Liehr, J. G.** (1991). *Cytochrome b5-mediated redox cycling of estrogen*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 285 (2): 331-338.
30. **Turner, L. W.** (1956). *Biological assay of beef steer carcasses for estrogenic activity following feeding of diethylstilbesterol at a level of 10 mg per day in the ration*. *J. Anim. Sci.*, 15: 13-24.
31. **Turner, L.W.** (1958). *Estrogen Content of colostrum and milk of dairy cattle*. *J. Dairy Sci.*, 41: 631-640.
32. **Voelker, H.H. and Sykes, J.F.** (1957). *Effects of feeding stilbesterol to lactating dairy cows*. *J. Dairy Sci.* 40 (2): 1581-1584.