

Endosülfanın Mus Musculus'ta Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi[¶]

THE EFFECT OF ENDOSULFAN ON HEMATOLOGIC PARAMETERS IN MUS MUSCULUS

Ergül BELGE KURUTAŞ*, Figen DORAN**

* Dr., Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

** Dr., Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji AD, ADANA

Özet

Amaç: Bu çalışmada, farklı zaman periyodlarında uygulanan endosülfan pestisitinin Mus musculus'ta hematolojik parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alınan 23-40 g ağırlığında 60 adet anaç Mus musculus (30 kontrol, 30 deneme) kullanılmıştır. Deneme grubuna endosülfan (0.24 mg/100 g vücut ağırlığı/gün) 90 ve 180 gün oral yolla uygulanmıştır.

Bulgular: Endosülfanın 90 günde lökosit düzeyini arttırdığı ve eritrosit, hemoglobin, hematokrit, ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit hemoglobin düzeylerini düşürdüğü ($p<0.05$), ancak 180 günde hematolojik parametre değerlerinin kontrol değerlere yaklaştığı gözlenmiştir.

Sonuç: Canlıda 90 gün sürede endosülfan toksisitesine karşı hematolojik parametrelerde fizyolojik bir yanıt gelişirken, 180 gün sürede adaptasyon mekanizmasının geliştiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endosülfan, Anaç Mus musculus, Hematolojik Parametreler

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:359-362

Summary

Purpose: To investigate the effect of endosulfan pesticide administration in different lengths of time on hematologic parameters in Mus musculus.

Material and Methods: Sixty mature Mus musculus (30 control, 30 experimental), weighing between 23 and 40 g, were obtained from the Medical Experimental Surgery Research Center of Çukurova University. The effect of oral administration of endosulfan (0.24 mg per 100 g body weight) daily for 90 and 180 days was investigated.

Results: There has been an observation that the leucocyte level increased in 90 days and levels of erythrocyte, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin decreased ($p<0.05$) but values of hematologic parameters in 180 days approached the control's.

Conclusion: While physiologic response of the hematologic parameters to endosulfan toxicity was developing in 90 days in the living, adaptation mechanism was completed in 180 days.

Key Words: Endosulfan, Mature Mus musculus, Hematologic Parameters

T Klin J Med Sci 2001, 21:359-362

Pestisitler insan vücuduna deri, solunum veya sindirim organı yolu ile geçerek karaciğerde sitokrom P450 (Cyt P450) bağımlı monooksijenaz sistemi ile metabolize edilmektedir (1-3). Pestisitler hepatik mikrozomlarda lipid peroksidasyonunu stimüle ederek, Cyt P450 ve "hem" miktarının azalmasına, glukoz 6-fosfataz ve pirofosfataz enzim aktivitelerinin önemli derecede azalmasına ve UDP-glukuronil transferaz enziminin stimülasyonuna neden olmaktadır (4,5). Bazı organik klorlu ve organik fosforlu pestisitlerin (poliklorlu bifeniller (PCBs), heksaklorosikloheksan (HCH), diklorodifeniltrikloroethan (DDT), dime-

toat, metilparation, malation ve paration) immünotoksik ve hematopoietik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (6,7). Organik fosforlu pestisitlerin metabolitleri in vitro olarak insan kemik iliği hücrelerine maruz bırakıldığında doza bağlı olarak eritroid ve myeloid seride baskılanma oluştuğu ve yüksek dozlarda uygulandığında ise kemik iliği hücrelerinin normale döndüğü bildirilmiştir (7).

Endosülfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide), organik klorlu pestisitlerin siklodien grubunda yer alan bir pestisittir. Ürün korunmasında yaygın olarak kullanıldığından önemli çevresel kirlilik etkeni olarak önem kazanmaktadır (8). Endosülfanın solunum enzimlerini, porfirin metabolizma enzimlerini ve ince bağırsak enzimlerini etkilediği bildirilmiştir (9).

Yapılan literatür taramalarında endosülfan pestisitinin hematolojik parametreler üzerine etkisini inceleyen yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu

Geliş Tarihi: 06.12.2000

Yazışma Adresi: Dr.Ergül BELGE KURUTAŞ
Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Biyokimya AD, ADANA

[¶]Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi SBE.96.7 nolu (Doktora tezi) proje ile desteklenmiştir.

T Klin J Med Sci 2001, 21

359

çalışmada; farklı zaman periyotlarında uygulanan endosülfanın hematolojik parametreler üzerine etkisi incelenerek elde edilen bulgularla literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Materyel ve Metod

Araştırmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) alınan 23-40 g ağırlığında 60 adet anaç *Mus musculus* (30 kontrol, 30 deneme) kullanılmıştır. Denekler 22-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlatma periyodunda tutularak ve standart laboratuvar yemi ile beslenmişlerdir. Çalışmamız başlıca iki gruptan (kontrol ve deneme) oluşmuştur. Kontrol grubuna standart laboratuvar yemi (12.7 g/100 g vücut ağırlığı/gün) 90 gün (Grup Ia) ve 180 gün (Grup Ib) uygulanmıştır. Deneme grubuna endosülfan standart laboratuvar yemi içinde karıştırılarak (0.24 mg /100 g vücut ağırlığı/gün) 90 gün (Grup IIa) ve 180 gün (Grup IIb) süreyle oral yolla uygulanmıştır. Kanlar deney öncesi kuyruktan deney sonrası kalpten alınmıştır.

1 mm³ kandaki eritrosit (RBC) miktarının tayini için, kan eritrosit pipetinin 0.5 çizgisine kadar çekilmiştir. Daha sonra eritrosit hücrelerini belirlemeye yarar HAYEM solüsyonu hazırlanmış, bu da pipetin 101 çizgisine kadar çekilerek iyice karıştırılmıştır. Solüsyon ile homojenize edilen kandan, 1 damla alınarak Neubauer marka Thoma lamının iki gözüne damlatılmış ve sayım Kyowa marka binoküler mikroskop altında x40 büyütmede gerçekleştirilmiştir (10).

1 mm³ kandaki lökosit (WBC) hücrelerinin belirlenmesinde kan aynı şekilde alınmış, lökosit pipetinin 1 çizgisine kadar çekilmiştir. Lökosit hücrelerinin belirlenmesi için ise TURK solüsyonu pipetin 11 çizgisine kadar çekilip kan ile karıştırılmıştır. RBC sayımında olduğu gibi, pipetten alınan solüsyonlu kan Thoma lamına damlatılıp, sayım gerçekleştirilmiştir (10).

Kandaki hemoglobin (Hb) miktarını belirlemek için, araştırmada syanomethemoglobin yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde, pıhtılaşmayı engelleyen %1'lik heparinli tüplere kan alınmıştır. Hemoglobin tayininde, 5 ml drabkin üzerine 20 mikrolitre heparinli kan eklenmiştir. Bu şekilde 10 dk

bekledikten sonra spektrofotometrede (Bausch and Lomb. Spectronic 20) 540 nm dalga boyunda örnek içermeyen drabkine karşı okunmuştur (10).

Hematokrit (Hct) tayininde *M. musculus*'tan alınan kan doğrudan içi heparinli mikrohematokrit pipetlerine alınmıştır. Daha sonra 12000 rpm'lik hızla 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hematokrit tüp okuyucuları ile pipetteki şekilli elemanların plazmaya olan oranı belirlenmiştir (10).

RBC, Hb ve Hct sonuçlarından, eritrositin içerdiği hemoglobin miktarı (MCH) ve her bir eritrositin hacmi (MCV) hesaplanmıştır (10).

Lökosit hücrelerinin morfolojik incelenmesini (periferik yayma) yapmak için, *M. musculus*'tan alınan kanlardan frotiler hazırlanmış ve Giemsa ile boyanmıştır. Daha sonra boyalı preparatlar x100 büyütmede binoküler mikroskopta incelenmiştir. Preparatlarda öncelikle monosit, lenfosit, nötrofil, eozinofil ve bazofil hücreler saptanmış, sonra birbirine karşılık gelen yüzdeleri belirlenmiştir (10).

Araştırma süresince elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Version 6.0) paket programından yararlanılmıştır. Her gruba ait araştırma verileri Wilcoxon ve Mann-Whitney-U Test'inde 0.05 önem seviyesinde değerlendirilmiştir (11,12). Sonuçlar ortalama (X) ve standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

Bulgular

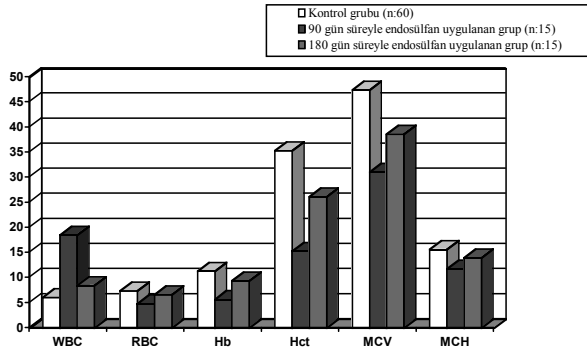
Tablo 1'de, kontrol ve deneme gruplarının deney öncesi ve sonrası alınan kanlarda ölçülen hematolojik verilerinin sonuçları gösterilmiştir. Deney öncesinde ölçülen WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinin kontrol ve deneme grupları arasında anlamlı farklılıklar göstermediği saptanmıştır (p>0.05). Deney sonrasında deneme gruplarının her birinin hematolojik verileri ile kontrol gruplarının her birinin hematolojik verileri karşılaştırıldığında gruplar arasında p<0.05 düzeyinde fark saptanmıştır. Endosülfan uygulanan gruplarda WBC düzeyinde artış ve RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı düşmeler gözlenmiştir (Tablo 1). Deney sonrasında hematolojik parametre değerlerinin kontrol grupları arasında anlamlı farklılık

Tablo 1. Kontrol ve deneme gruplarının deney öncesi ve sonrası ölçülen hematolojik parametre değerleri

Gruplar	Deney Öncesi						Deney Sonrası					
	WBC (x10 ⁹ /L)	RBC (x10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	WBC (x10 ⁹ /L)	RBC (x10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
Kontrol Ia	6.0±1.1	7.30±0.90	11.0±1.1	34.7±4.3	47.5±1.8	15.1±0.5	6.0±1.2	7.00±1.16	10.5±1.8	33.8±5.7	48.2±1.1	14.9±0.4
Kontrol Ib	6.2±1.2	7.78±0.73	11.7±0.7	35.9±2.3	46.2±1.8	15.1±0.7	5.3±0.7	7.87±0.93	11.8±0.8	35.7±3.6	45.4±2.0	15.0±1.1
Deneme IIa	6.3±1.1	7.22±1.13	11.1±1.5	34.9±4.6	48.1±1.1	15.3±0.5	**18.5±2.9	*4.86±0.9	*5.7±1.1	*15.3±3.9	*31.1±3.9	*11.8±1.1
Deneme IIb	6.2±1.4	7.46±0.70	11.4±0.6	35.2±2.2	47.2±2.2	15.2±0.8	**8.5±1.8	*6.63±1.20	*9.4±2.2	*26.2±8.5	*38.7±8.5	*14.0±1.4

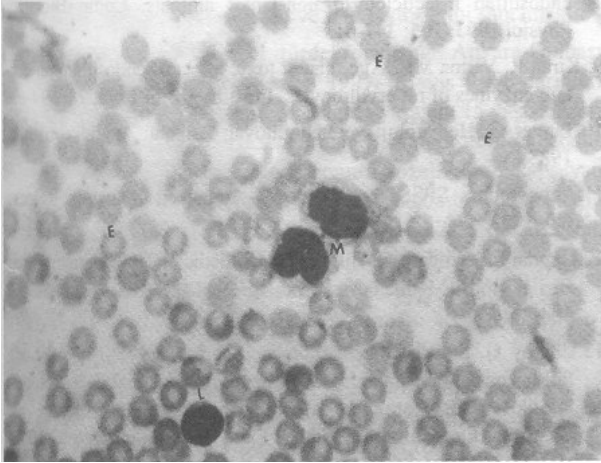
* p<0.05, **p<0.05

WBC: Lökosit, RBC: Eritrosit, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama Eritrosit Hacmi, MCH: Ortalama Eritrosit Hemoglobini



WBC:Lökosit, RBC:Eritrosit, Hb:Hemoglobin, Hct:Hematokrit, MCV:Ortalama Eritrosit Hacmi, MCH:Ortalama Eritrosit Hemoglobini.

Şekil 1.



Şekil 2.

göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). Şekil 1'de, deney öncesinde 60 fare bireyinden (Grup Ia, Ib, Iia ve Iib) alınan kanlarda ölçülen hematolojik verilerinden tek bir kontrol grubu oluşturulmuş, deneme gruplarının her biri ile (Grup Iia ve Iib) karşılaştırılması yapılmıştır. Benzer şekilde, grup

Iia ve Iib'nin WBC düzeylerinde artış ve RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde düşme gözlenmiştir. Ayrıca, endosülfan uygulanan örneklerin periferik yaymalarında lenfosit ve nötrofil sayılarında anlamlı artış kaydedilmiştir (Tablo 2). Kontrol ve deneme gruplarında bazofil hücrelerine rastlanılmamıştır. Şekil 2'de deneme gruplarına ait kan hücreleri görülmektedir. Endosülfan uygulanan örneklerde eritrosit morfolojisinin normal görünümde olduğu saptanmıştır.

Tartışma

Bu çalışmada, 90 ve 180 gün sürelerle oral yolla uygulanan endosülfanın hematolojik parametreler üzerine toksik etkileri gözlenmiştir. Endosülfanın 90 günde WBC düzeyini arttırdığı ve RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerini düşürdüğü ancak 180 günde hematolojik parametre değerlerinin kontrol değerlere yaklaştığı gözlenmiştir (Tablo 1). Yapılan bazı araştırmalarda, lökosit sayılarında görülen artış, canlılığın toksik maddelere karşı savunma mekanizmasında oluşturduğu fizyolojik bir tepki olarak ifade edilmiştir (13). Endosülfanın toksik etkisiyle 90 günde WBC düzeyi %308 oranında artarken, 180 günde %160 oranında azalarak kontrol değerlere yaklaşmıştır. WBC düzeyinin artması canlılığın endosülfan toksisitesine karşı bir savunma mekanizması geliştirdiğini düşündürmektedir. Hazırlanan boyalı kan yaymalarında elde edilen lökosit hücreleri, agranüler (monosit, lenfosit) ve granüler (nötrofil, eozinofil ve bazofil) hücreler Tablo 2'de verilmiştir. Araştırmada bazofil hücrelerine hiç rastlanmadığından, yüzdesel değerlendirilmesi yapılamamıştır. Endosülfanın toksik etkisiyle 90 günde lenfosit ve nötrofil hücrelerin sayılarında artış olduğu ancak 180 günde lenfosit ve nötrofil hücrelerin sayılarında düşüş ile kontrol değerlere yaklaştığı gözlenmiştir. Lenfosit ve nötrofil hücreler, vücudun doğal savunma mekanizmasının temelini oluşturduklarından, bu hücrelerdeki artış canlılığın endosülfan toksisitesi ile ortaya çıkmaktadır. Elde edilen sonuçların immun sistem ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bağışıklık sisteminin temelini oluşturan lenfosit hücreleri canlılığın ilk gelişim aşamalarında oldukça fazla üretilir ve bu miktar vücuda giren antijeni tanımlayan mekanizma da zamanla farklılık gösterir (14). Bunun yanında vücutta doğal mekanizmanın temelini ise monosit, nötrofil, eozinofil ve bazofil hücreler oluşturur. Bu hücreler vücutta herhangi bir ekto

Tablo 2. Kontrol ve deneme gruplarından elde edilen lökosit hücrelerinin yüzde oranları

Grup	Agranüler Hücreler		Granüler Hücreler		
	Lenfosit (%)	Monosit (%)	Nötrofil (%)	Eozinofil (%)	Bazofil (%)
Kontrol Ia	8.3±1.9	0.30±0.08	5.3±1.0	0.37±0.10	-
Kontrol Ib	7.5±2.1	0.27±0.10	4.8±1.6	0.41±0.15	-
Deneme Iia	*17.3±4.9	0.31±0.13	*18.5±3.8	0.35±0.17	-
Deneme Iib	*12.9±3.4	0.28±0.07	*11.0±4.0	0.39±0.12	-

* $p<0.05$

veya endoparazit durumunda ya da bakteriyel enfeksiyonlarda faaliyete geçerler ve sayılarında artış kaydedilir (14). Çalışmamızda nötrofil ve lenfosit hücrelerinin artışı endosülfanın toksik etkisiyle reaksiyonel ya da mikst tipte bir enfeksiyonun oluşmasından kaynaklanabilir. Belge Kurutaş ve ark. (1999) anaç *M. musculus*'a 90 ve 180 gün sürelerle oral yolla uygulanan endosülfanın (0.24 mg/100 g vücut ağırlığı) karaciğer ve meme dokularının portal alanlarında mononükleer hücrelerin hakim olduğu mikst tipte iltihabi hücre infiltrasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir (15). Çeşitli pestisitler hematolojik parametreleri ve lökosit sistemini farklı şekillerde etkileyebilmektedir. Karbamatlı bir pestisit olan klorprophamın sıçanlarda doza bağlı olarak WBC sayısını arttırdığı ve RBC sayısı, Hb ve Hct düzeylerini düşürdüğü, dalak, karaciğer ağırlıklarını ve hemopoietik hücre hiperplazisini arttırdığı bildirilmiştir (16). DDT pestisitinin quinea-fowl kuşların (*Numida meleagris*) hematolojik parametre değerlerinde önemli değişimlere neden olduğu, 10 hafta sonra hematolojik parametre değerlerinin kontrol değerlere yaklaştığı bildirilmiştir (17). Organik fosforlu bir pestisit olan fenitrothion'un Pharaoh quail balığında RBC sayısını, Hb ve Hct düzeylerini azalttığı fakat eritroblast ve retikülosit sayısını arttırdığı, lökosit sisteminde nötrofilik lökositosis, lenfopeni ve eozinopeni'ye neden olduğu ve 3 hafta sonra fenitrothionun etkisiyle oluşan değişimlerin normale dönüşmeye başladığı bildirilmiştir (18). Nuvakron (0.8 mg/kg) ve furadan (0.25 mg/kg) pestisitleri farelere intraperitoneal olarak uygulandığında kemik iliğindeki etkisinin eritroid seride baskılanma, myeloid seri hücrelerinde artış ve dalak büyümesi olduğu bildirilmiştir (19). Klorfenvinfos ve fosklor pestisitlerin Japanese quail balıklarında (*Coturnix japonica*) retikülosit ve eritroblastlarda artış, lökosit sisteminde nötrofilik lökositosis ve eozinopeni gözlenirken, fosklor enjeksiyonundan sonra RBC sayısında düşüş olduğu, buna karşılık klorfenvinfos enjeksiyonundan sonra RBC sayısında değişim olmadığı bildirilmiştir (20). Lembowicz ve ark. (1991) organik klorlu pestisitlerin (DDT, α , β ve γ -HCH) konsantrasyonuna bağlı olarak fare eritrositlerinde Heinz cisimciklerinde ve lenfosit sayısında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (21).

Araştırmamızda, canlıda 90 gün sürede içerisinde endosülfan toksisitesine karşı hematolojik parametrelerde fizyolojik bir yanıt gelişirken, 180 gün sürede adaptasyon mekanizması gelişmiş ve hematolojik parametre değerlerinin kontrol değerlere yaklaştığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, endosülfana bağlı 90 gün içinde eritrositer seride baskılanma olurken, nötrofil ve lenfosit sayısında artış olmuştur. 180 günde eritrositer seride artış kaydedilirken nötrofil ve lenfositlerde düşüş meydana gelmiştir. Çalışmamızda eritrositer serideki baskılanma, nötrofil ve lenfosit artışının mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Konunun aydınlatılabilmesi için eş zamanlı kemik iliği incelenmesi ve inflamasyonda rol alan sitokin ve büyüme faktörleri ölçülmesinin daha uygun olacağı kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Falck F, Ricci A, Wolff MS, Godbold J, Deckers P. Pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 1992; 47, (2): 143-6.
2. MacMahon B. Pesticide residues and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86, (8): 572-3.
3. Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85, (8) : 648-52.
4. Vural N. Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1984.
5. Kitchin KT. An enzymatic approach to biotransformation. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol* 1984; 6: 303-10.
6. Institoris L, Siroki O, Desi I. Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14: 879-83.
7. Gallicchio VS, Casale GP, Wats T. Inhibition of human bone marrow-derived stem cell colony formation (CFU-E, BFU-E, and CFU-GM) following in vitro exposure to organophosphates. *Exp Hematol* 1987; 15, (11): 1099-1102.
8. Maqvi SM, Vaishnavi C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105: 347-61.
9. Kiran R, Varma MN. Age related toxic effect of endosulfan on certain enzymes of rat erythrocytes. *Ind J Exp Biol* 1990; 28: 694-6.
10. Tanyer G. Hematoloji ve Laboratuvar. Ankara: Ayyıldız matbaa, 1985.
11. Anonymous. SPSS for Windows Advanced Statistics Release 6.0., 1993, 578.
12. Hayran M, Özdemir O. Bilgisayar, İstatistik ve Tıp Hekimler Yayın Birliği HYB. Medikal Araştırma Birimi MEDAR. Ankara. 1995: 484.
13. Uluköy G. Sudak (*Stizostedion lucioperca* L., 1758) balıklarında farklı konsantrasyondaki bazı pestisitlerin oluşturabileceği hematolojik ve histopatolojik değişimlerin incelenmesi üzerine bir araştırma. *Ege Üniv. Su Ürünleri Fak., Su Ürünleri Derg C* 1992; 10, (37-38-39): 1-96.
14. Konuk T. Pratik Fizyoloji. Ankara: Ankara Üniv. Vet Fak Yay. 1981: 378.
15. Belge Kurutaş E. Endosulfanın *Mus Musculus* Kan, Karaciğer ve Meme Dokusu Üzerine Etkisi. Ç Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), 1999.
16. Fujitani T, Tada Y, Noguchi AT, Yoneyama M. Hemotoxicity of chlorpropham (CIPC) in F344 rats. *Toxicology* 1997; 123, (1-2): 111-24.
17. Fourie FR, Hattingh J. DDT administration: Haematological effects observed in Crowned Guinea-Fowl (*Numida meleagris*). *J Environ Pathol Toxicol* 1979; 2 (6): 1439-46.
18. Szubartowska E, Gromysz-Kalkowska K. Blood morphology in quails after poisoning with fenitrothion. *Comp Biochem Physiol C* 1992; 101, (2), 263-7.
19. Gupta M, Bagchi G, Bandyopadhyay S, Sasmal D, Chatterjee T, Dey SN. Hematological changes produced in mice by Nuvacron or Furadan. *Toxicology* 1982; 25, (2-3): 255-60.
20. Gromysz-Kalkowska K, Szubartowska E, Kaczanowska E. Peripheral blood in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) in acute poisoning by different insecticides. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81, (1): 209-12.
21. Lembowicz K, Starska E, Gorski T, Ludwicki JK. The effect of organic chlorine compounds and their metabolites present in human milk on newborn mice. *Toxicol Lett* 1991; 57, (2): 215-26.