

Sıçan Karaciğer ve Böbrek Dokularında Endosulfan Toksisitesinde Oksidatif Hasarın Rolü; Histolojik ve Biyokimyasal Bir Çalışma

THE ROLE OF OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY ENDOSULFAN TOXICITY ON RAT LIVER AND KIDNEY TISSUES; A HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY

Erdal KARAÖZ*, Tuncer ETYEMEZ**, Mehmet AKDOĞAN***, Alpaslan GÖKÇİMEN****, Meral ÖNCÜ**, F.Eda AKALIN*****

* Doç.Dr. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,
** Dr. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,
*** Yrd.Doç.Dr. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD,
**** Yrd.Doç.Dr. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,
*****Bio. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, ISPARTA

Özet

Sıçanlarda organiklorlu bir insektisit olan endosulfanın neden olduğu hepatotoksisite ve nefrotoksistide oksidatif hasarın rolü histolojik ve biyokimyasal olarak araştırıldı. Deneysel grupları; kontrol (Grup I), düşük doz endosulfan (Grup II), orta doz endosulfan (Grup III) ve yüksek doz endosulfan (Grup IV) şeklinde oluşturuldu. Grup II, III ve IV'deki sıçanlara (n=18) tek doz sırasıyla 11 mg/kg (LD50'nin %10'u), 22 mg/kg (LD 50'nin %20'si) ve 33 mg/kg (LD50'nin %30'u) endosulfan intragastrik olarak uygulandı. Kontrol grubuna eşit hacimde serum fizyolojik uygulandı. 24 saat sonra tüm hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldü. Biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için uygun teknikler kullanılarak karaciğer ve böbrek doku örnekleri çıkartıldı. Dokuda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) düzeyleri tayin edildi. Histolojik çalışmalar için, doku örnekleri %10'luk nötral formalin solusyonunda tesbit edildi ve rutin ışık mikroskopik takip yöntemleriyle parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan elde edilen seri kesitlere Hematoksilin-Eozin ve Masson üçlü boyaları uygulandı. Işık mikroskopisi düzeyinde karaciğer ve böbrek histolojik yapıları incelendi.

Bu çalışmada, karaciğer SOD aktiviteleri Grup I-Grup II, Grup I-Grup IV, Grup II- Grup IV ve Grup III-Grup IV arasında anlamlı bir artış gösterdi (sırasıyla; p<0,01, p<0.01, p<0.01 ve p<0.05). Böbrek dokusunda ise, Grup I-Grup III, Grup I-Grup IV ve Grup II-Grup IV arasında anlamlı bir fark

Summary

The histological and biochemical roles of oxidative damage were investigated in relation to hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by endosulfan an organochlorine insecticide, in rats. The experimental groups in present study were as follows: Control (Group I), low dose of endosulfan (Group II), medium dose of endosulfan (Group III) and high dose of endosulfan (Group IV). A single dose was administered via intragastric way to 18 rats in each treatment group at the following levels: 11 mg/kg (10% of LD50) for Group II, 22 mg/kg (20% of LD50) for Group III and 33 mg/kg (30% of LD50) for Group IV, respectively. An equal amount of physiologic saline was also given to control rats. The rats in all treatment groups were killed by cervical dislocation after 24 hours. The tissue samples of liver and kidney were taken by using appropriate techniques for biochemical and histological examination. The level of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were determined in tissue samples. Furthermore, tissue samples were kept in 10% neutral formaline solution and then transferred into the paraffine blocks for histological examination. Paraffine sections was stained with Haematoxylin-Eosin and Masson trilet then examined by light microscope.

In this study, a significant increase in liver SOD activity was statistically significant, p<0.01, p<0.01, p<0.01, p<0.05 and between the groups of I and II, I and IV, II and IV, and III and IV, respectively. The increases in kidney SOD activity were also found to be significant, p<0.05, p<0.01 and p<0.05 between the groups of I and III, I and IV, and II and IV, respectively. MDA levels in both kidney and liver increased due to increasing dose of endosulfan. No changes were observed in the activities of GR and G6PDH as well. CAT and GSH-Px activities in liver tissue significantly (p<0.01) reduced in group I and II.

Geliş Tarihi: 12.01.2000

Yazışma Adresi: Dr.Erdal KARAÖZ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
32100, ISPARTA

sözkonusuydu (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.05$). Dokudaki (karaciğer ve böbrek) MDA düzeyleri de endosulfan dozuna bağımlı olarak arttı. GR ve G6PDH aktivitelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. CAT ve GSH-Px aktiviteleri ise, karaciğer dokusunda Grup I-Grup IV arasında anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.01$).

Sonuç olarak, sıçan karaciğer ve böbrek dokularında endosulfana bağlı olarak SOD aktivitesinde ve MDA düzeylerindeki artış, endosulfan metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller ve onların lipid peroksidatif hasarının bir göstergesidir. Sonuçta, endosulfana bağlı bir peroksidatif hasar söz konusudur. Bu biyokimyasal bulgularımızı histolojik bulgularımız da desteklemektedir. Karaciğerde, özellikle santral ven periferinde lokalize hepatositlerde daha belirgin olmak üzere parankimde hidropik ve vakuoler dejenerasyonlar, sinüzoidlerde dilatasyon ve Kupffer hücre proliferasyonu gözlemlendi. Böbrek dokusunda karaciğere oranla daha fazla yapısal değişiklikler saptandı. Perivasküler ve peritubuler mononükleer hücre infiltrasyonları, glomeruler ve tubuler dejenerasyonlar başlıca mikroskopik bulgularımızdı.

Anahtar Kelimeler: Biyokimya, Endosulfan, Histoloji, Peroksidatif hasar, Sıçan

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:1-10

In conclusion, an increase in MDA level and SOD activity in rat liver and kidney tissues due to endosulfan may be an indicator of the free radicals occurred during the metabolism and their lipid peroxidative inducing damage. Finally, a peroxidative damage occurs inevitably due to endosulfan. The histological results also showed such a damage, similar with the biochemical results. In liver, dilatation in sinusoidal capillaries, hidropic and vacuolar degenerations in the hepatocytes and Kupffer cell proliferation was examined. The microscopical results in the kidney were mainly perivascular and peritubular mononuclear cell infiltrations, glomerular and tubular degenerations.

Key Words: Biochemistry, Endosulfan, Histology, Peroxidative damage, Rat

T Klin J Med Sci 2001, 21:1-10

İnsektisit kullanılan tarım alanlarında insektisitlerin doğal dengeyi bozarak, besin maddeleri üzerinde, toprakta ve suda uzun süre parçalanmayan kalıntılar bırakarak, besin zinciri yoluyla yüksek yapıları organizmalara ve insanlara geçerek dokularda biriktiği ve bu yolla insan ve hayvan sağlığını tehlikeye soktuğu anlaşıldıktan sonra araştırmacılar bu kez insektisitlerin olumsuz etkilerini araştırmaya yöneldiler.

Çok sayıda tamamlanan çalışmalarda çeşitli hayvan türlerinde endosulfanın akut, subakut ve kronik toksikolojik etkileri tanımlanmıştır. Endosulfan insan ve çeşitli deney hayvanlarında genotoksik, nefrotoksik, hepatotoksik, embriyotoksik, teratojenik, hematolojik toksisite, immünolojik toksisite ve respiratuar toksisite etkileri çeşitli araştırmalarla (in-vivo ve in-vitro) ayrıntılı şekilde çalışılmıştır. Yakın zamanda gerçekleştirilen çalışmalarda da endokrin organlarda (tiroid, paratiroid gibi) da entoksikasyonları gösterilmiştir.

Endosulfanın toksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, primer lezyonların temelde artan kromozomal hasarlar olduğunu göstermiştir. Arpa ve mercimeklerde multipolar iğ oluşumu (1,2), fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumu (1,3) ve endosulfana maruz

kalmış tarım işçilerinin lenfositlerinde kromatid kırıklarında artışlar görülmüştür (4). Hamsterlerde de kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterildi (5). İlâveten, genç Swiss albino farelerin kemik iliği hücrelerinde mitozu bozucu değişikliklere neden olduğu (6) ve meyva sineklerinde mutajenik etkilere sahip olduğu (7) rapor edilmiştir.

Literatürde endosulfanın toksik etkileriyle ilgili çok sayıda rapor bulunmaktadır. Histopatolojik bulgular, ticari endosulfan uygulanmış deney hayvanlarında sekonder paratiroid hiperplazi (8), karaciğerinde kanlanma ve sinüzoidlerde genişleme olduğunu göstermiştir (9-11). Böbrek dokusunda, mononükleer hücre infiltrasyonu tesbit edilmiş, aynı zamanda proksimal tubul hücrelerinin tahrip olduğu, çekirdeklerin kontrol grubuna göre aşırı derecede şiştiği görülmüştür (9). Patolojik bozukluklar incelendiğinde en fazla etkinin böbrek dokusunda olduğu gözlenmektedir (9,12-17). Böbrekte kanlanma, özellikle damarlar çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonunun daha yoğun görülmesi, böbrekte yer yer yağ dokunun oluşması organoklorlu bir bileşik olan endosulfan ve metabolitlerinin yağ metabolizmasını hızlandırarak yağ oluşumunun artmasıyla buralarda biriktiğini

Tablo 1. Deney planı

Deney Grupları	Hayvan Sayısı	Tedavi	Doz	Süre
I	6	Kontrol	-	24 saat
II	6	Endosulfan	11 mg/kg*	24 saat
III	6	Endosulfan	22 mg/kg**	24 saat
IV	6	Endosulfan	33 mg/kg***	24 saat

* Düşük doz, LD₅₀'nin %10'u (10).

** Orta doz, LD₅₀'nin %20'si (10).

*** Yüksek doz, LD₅₀'nin %30'u (10).

göstermektedir. Proksimal tubullerde çekirdeklerin lümenine atılması şeklinde görülen aşırı harabiyet bu hücrelerin fonksiyonlarını kaybettiğinin bir göstergesidir (9,13). Rauber (18), endosulfanın hayli toksik olduğunu, özellikle erkek sıçanlarda, paratiroid bezlerinde hiperplaziye neden olduğunu rapor etmiştir. Bununla birlikte, fare tiroid bezlerinin genellikle hücre membran hasarı ile ilgili olduğu gözlenmiştir (7). Yapılan birçok çalışmada çeşitli hayvan türlerinde endosulfanın akut ve subakut etkileri tanımlanmıştır. Son zamanlarda endosulfanın toksik etkilerinin hepatik ve ekstrahepatik dokularda metabolik bazı parametreler üzerinden olduğuna ilişkin kanıtlar da mevcuttur. p450, glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi ve glutatyon (GSH) miktarları hepatik ve ekstra hepatik dokularda çalışılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (10).

Bu araştırmada, endosulfanın sırasıyla düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı dozunun sıçan karaciğer ve böbrek dokuları superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri ile malon dialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkileri saptanarak, endosulfanın etki mekanizmasında oksidatif stresin önemini incelemeyi amaçlıyoruz. İlâveten, histolojik çalışmalarla biyokimyasal parametrelerin karşılaştırması yapılarak sonuçlar tartışılacaktır.

Materyel ve Metod

Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 190 - 250 gram arasında değişen, erkek, Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır (n=24). Her biri ayrı kafese konan sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

Uygulama Dozları

Çalışmada kullanılan 24 sıçan dört eşit gruba ayrıldı; Grup I (kontrol), Grup II (Endosulfan, düşük doz), Grup III (Endosulfan, orta doz), ve Grup IV (Endosulfan, yüksek doz). Tüm hayvanlar 24 saat aç bırakıldıktan sonra, Grup II, III ve IV'deki hayvanlara sırasıyla düşük doz (LD₅₀'nin %10'u; 11 mg/kg), orta doz (LD₅₀'nin %20'si; 22 mg/kg) ve yüksek doz (LD₅₀'nin %30'u; 33 mg/kg) endosulfan 8 numara feeding tüp yardımıyla intragastrik yoldan tek doz olarak verildi (13). Kontrol grubu hayvanlara eşit hacimde serum fizyolojik uygulandı (Tablo 1).

Biyokimyasal Materyaller

Deney süresinin sonunda (24 saat sonra) sıçanların göğüsleri açılarak SOD, GSH-Px, GR, CAT, G6PDH aktivitelerini ve MDA düzeylerini tayin etmek için sol böbrekleri ve karaciğer sol lobları uygun teknikler kullanılarak çıkartıldı.

Histolojik Materyaller

Histolojik çalışmalar için ise; sağ karaciğer lobu ve sağ böbrek doku örnekleri çıkartıldı ve %10'luk nötral formalin solusyonunda tesbit edildiler.

Histolojik Çalışmalar

%10 'luk nötral formalinde tesbit edilen doku örnekleri yıkama işleminden sonra parafin bloklara gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan Lipshaw tipi kızaklı mikrotom ile 4-6 mikrometre kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler Hematoksilen - Eozin ve Masson triple (üçlü) boya ile boyanmıştır. Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelenen kesitlerden mikrofotograflar elde edilmiştir.

Biyokimyasal Çalışmalar

Karaciğer ve böbrek dokuları önce, kanı uzaklaştırmak amacıyla deiyonize suyla yıkandı. Bundan sonra 1000 U'da yaklaşık 3 dakika süreyle homojenizatörle (1 KA Loborteknik Ultra-Turrax T25 model) homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10 dakika süreyle 6000 g'de santrifüj edilerek çekirdek ve sitoskeleton çöktürülmüştür. Protein konsantrasyonu (Lawry yöntemi ,19), SOD, GSH - Px, CAT, G6PDH ve GR aktiviteleri ile MDA seviyeleri bu fraksiyonda ölçüldü. Bütün deneyler +4°C'de yapıldı. SOD, GSH - Px ve G6PDH U/mg protein GR mU/mg protein, CAT k/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

Doku SOD, GSH-Px, G6PDH ve GR aktiviteleri ticari kitler (SOD için Ransod; GSH-Px, G6PDH ve GR için Randox) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit radikalının H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizler. SOD aktivitesi ksantin - ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen süperoksit radikalının 2-(4-iyodo-fenil)- 3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolium klorür (INF) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik densitenin (OD) spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanarak ölçüldü. Sonuçlar GR için mU/mg protein, SOD, GSH-Px ve G6PDH için U/mg protein ve CAT k/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

Glutasyon peroksidaz, H₂O₂ tarafından redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. GSH-Px reaksiyonunda oluşan GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir . GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında oluşan absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülmüştür. Sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

CAT aktivitesi Aebi'nin yöntemi ile ölçülmüştür (20). Deneyde 240 nm dalga boyunda H₂O₂ miktarının katalaz tarafından azaltılması 15 saniye aralıklarla 2.5 dakika süresince belirlendi. Hesaplanan regresyonlara göre her bir analiz için uygun absorbanslar alınarak, katalaz aktivite değeri elde edildikten sonra sonuçlar k/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

G6PDH aktivitesi ticari kit kullanılarak ölçüldü. G6PDH, NADP⁺ varlığında glukoz 6-fosfat, 6-fosfoglukonata oksitlenirken bu esnada okside NADP⁺, NADPH+H⁺'a redüklenir. G6PDH aktivitesi NADPH+H⁺'ın artan absorbans hızınının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Glutasyon redüktaz (GR) NADPH+H⁺ mevcudiyetinde glutasyonun redüksiyonunu katalize eder ve sonuçta GSH (redükte glutasyon) oluşur. GR redükte NADPH+H⁺'ın okside NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında oluşan absorbans farkınının 340 nm'de okunmasıyla ölçülmüştür.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde Schimadzu marka 1208 . UV - VIS (Japan) spektrofotometresi kullanılmıştır.

Doku lipit peroksidasyon düzeyleri Uchiama ve Mihara yöntemiyle (21) doku homejenatında tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) konsantrasyonları ölçülerek saptandı. 3 ml %1'lik H₃PO₄ (Fosforik asit) ve %0.6'lık 1 ml TBA (Thiobarbitürik asit) solusyonu %10'luk 0.5 ml doku homejenatı ile karıştırıldı. Karışım 45 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutuldu. Çeşme suyunda soğutuldu. 4 ml n - butanol eklendi. Vortekslendi Absorbans 532 nm'de butanole karşı (e = 1.56 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹) okundu, nmol/gram protein cinsinden ifade edildi.

İstatistiki değerlendirmeler için 'SPSS 7.50 for Windows' istatistik paket programından yararlanılmıştır, veriler aritmetik ortalama + standart deviasyon şeklinde ifade edilmiştir. Farklı grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann - Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular

Biyokimyasal Sonuçlar

Karaciğer dokusu SOD aktivite düzeyleri Grup I'de 10.75±0.7, Grup II'de 13.85± 2.28, Grup III'de 16.38±4.21 ve Grup IV'de 22.86±6 U/mg protein olarak saptanmıştır. Grup I ile Grup II arasında, Grup I ile Grup IV arasında, Grup II ile Grup IV arasında ve Grup III ile Grup IV arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p<0.01, p<0.01, p<0.01 ve p<0.05) (Tablo 2).

Tablo 2. Endosulfanın sıçan karaciğer dokusu SOD, GSH-Px, GR, CAT, G6PDH aktiviteleri ve MDA düzeyleri üzerine etkisi

GRUPLAR	SOD U/mgprotein	GSH-pX U/mgprotein	GR mU/mgprotein	CAT k/mgprotein	G6PDH U/mgprotein	MDA nmol/gprotein
I	10.75± 0.7	0.95± 0.1	136± 12.9	0.79± 0.072	0.46± 0.072	248±12.7
II	13.85±2.28	0.91±0.141	132±13.9	0.72±0.13	0.48±0.092	292±25.5
P(grupI/grupII)	<0.01	öd	öd	öd	öd	<0.05
III	16.38±4.21	0.80±0.15	130±21.1	0.65±0.87	0.54±0.081	427±57
P(grupI/grupIII)	öd	öd	öd	öd	öd	<0.01
P(grupII/grupIII)	öd	öd	öd	öd	öd	<0.01
IV	22.86±6	0.65±0.13	126±20.1	0.62±0.052	0.56±0.123	514±73
P(grupI/grupIV)	<0.01	<0.01	öd	<0.01	öd	<0.01
P(grupII/grupIV)	<0.01	<0.01	öd	öd	öd	<0.01
P(grupIII/grupIV)	<0.05	öd	öd	öd	öd	<0.05

öd: önemli değil

Tablo 3. Endosulfanın sıçan böbrek dokusu SOD, GSH-Px, GR, CAT, G6PDH aktiviteleri ve MDA düzeyleri üzerine etkisi

GRUPLAR	SOD U/mg protein	GSH-pX U/mg protein	GR mU/mg protein	CAT k/mg protein	G6PDH U/mg protein	MDA nmol/g protein
I	9.04±1.45	0.33±0.035	244±18.5	0.276±0.035	0.35±0.051	86±11
II	9.86±1.68	0.35±0.051	250±20.4	0.290±0.054	0.36±0.058	102±20
P(grupI/grupII)	öd	öd	öd	öd	öd	öd
III	11.94±1.90	0.326±0.029	253±39.9	0.295±0.039	0.41±0.066	138±37
P(grupI/grupIII)	<0.05	öd	öd	öd	öd	<0.01
P(grupII/grupIII)	öd	öd	öd	öd	öd	öd
IV	12.65±2.06	0.27±0.059	256±26.9	0.31±0.052	0.425±0.092	167±24
P(grupI/grupIV)	<0.01	öd	öd	öd	öd	<0.01
P(grupII/grupIV)	<0.05	öd	öd	öd	öd	<0.01
P(grupIII/grupIV)	öd	öd	öd	öd	öd	öd

öd: önemli değil

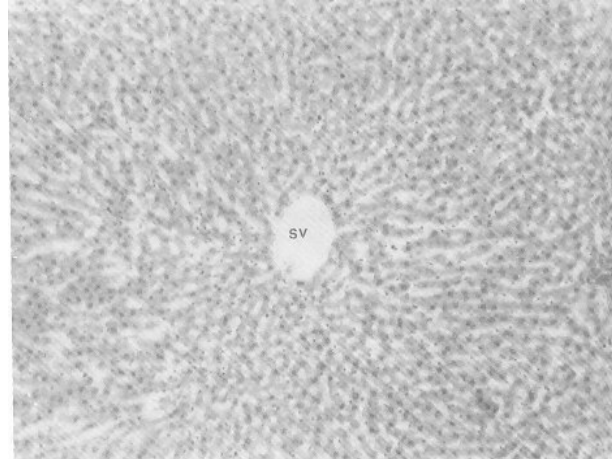
CAT ve GSH-Px aktivitelerine bakıldığında, Grup I ile Grup IV arasında anlamlı bir azalma ($p<0.01$) olduğu görülmektedir (Tablo 2).

MDA düzeylerinde ise kontrol grubundan başlayarak düşük, orta ve yüksek doz endosulfan uygulanan deney grupları arasında yüksek doza doğru gidildikçe anlamlı ($p<0.05$ ve $p<0.01$) artışların olduğu saptandı (Tablo 2).

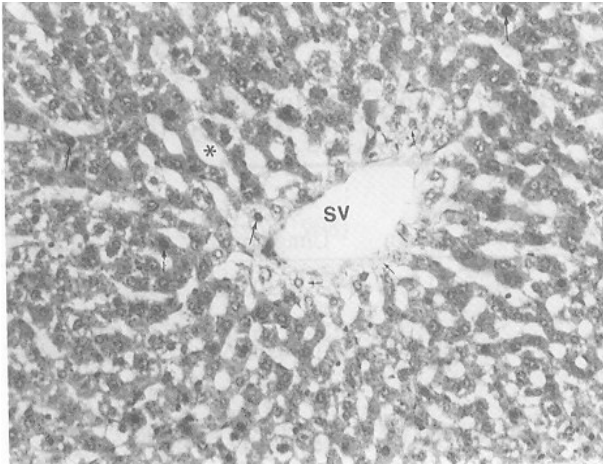
Kontrol ve deney grubu hayvanlara ait böbrek dokusu GSH-Px, GR, CAT ve G6PDH aktiviteleri-

ne bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptanmamıştır. Ancak, Grup III'deki SOD aktivitesi Grup I'den, Grup IV'deki SOD aktivitesi de Grup I ve Grup II'den anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.05$) (Tablo 3).

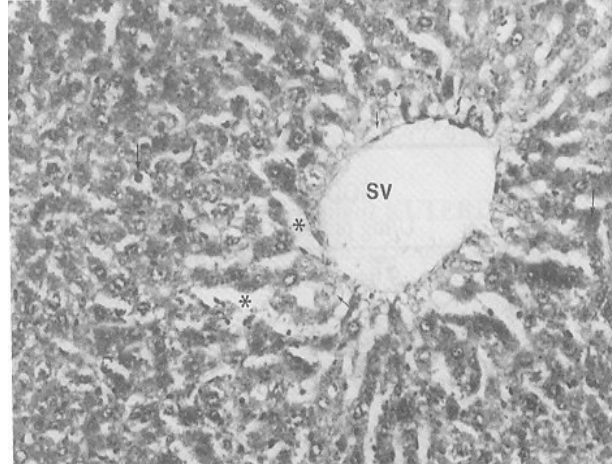
Böbrek dokusu SOD aktiviteleri, Grup III - Grup I, Grup IV - Grup I, ve Grup IV- Grup II arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak farklıydı (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.05$). SOD ak-



Şekil 1a,b. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğinin normal histolojik görünümü. *: portal alan, sv: santral ven (Hematoksilen-Eozin; (a)x48,(b)x120).



Şekil 2. Düşük doz endosülfan alan gruba ait görünüm. Vena sentralise yakın sinüzoidlerde genişleme (*) ve özellikle v. sentralis periferindeki hepatositlerde belirgin olmak üzere lipit damlacıklarına benzer yaygın vakuoler yapılar izlenmektedir (küçük ok). Bazı çekirdek yapıları normal izlenmekle beraber bazıları heterokromatikleşme gösteriyor (büyük ok). (Hematoksilen-Eozin;x240).



Şekil 3. Yüksek doz endosülfan almış gruba ait karaciğer örneğinin histolojik görünümü. Sinüzoidlerde genişlemenin (*) yanısıra santral vene komşu parenkim hücrelerindeki vakuolizasyon (küçük ok) ve heterokromatikleşmiş çekirdekler (büyük ok) izlenmekte (Masson üçlü boyası;x240).

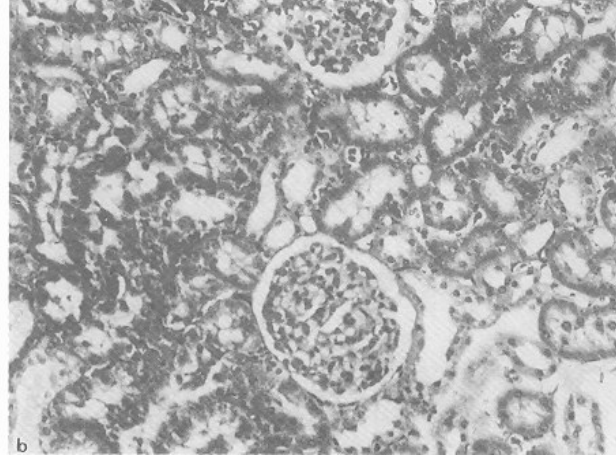
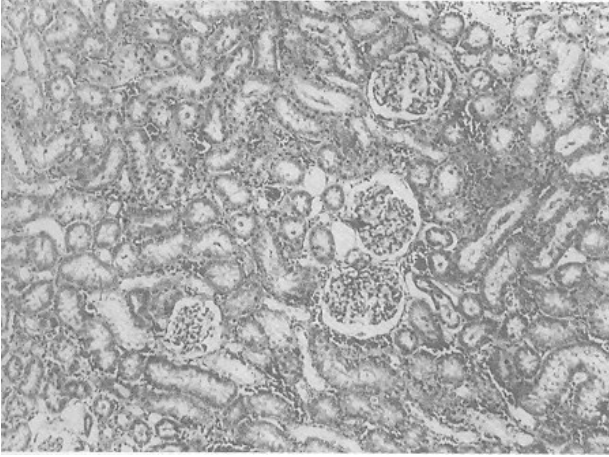
tivitelerinde dozdaki artışa bağımlı olarak bir artış söz konusuydu (Tablo 3). Dokudaki MDA düzeyleri de endosülfan dozuna bağımlı olarak anlamlı şekilde artmıştı. Grup I'de 86 ± 11 iken, Grup III'de 138 ± 37 ve Grup IV'de ise 167 ± 24 nmol/g protein olarak saptandı (Tablo 3).

Histolojik Sonuçlar

Kontrol grubu olarak alınan ve oral tek doz intragastrik serum fizyolojik uygulanan sıçanlara ait karaciğer ve böbrek kesitlerinde, bu organa özgü

histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 1a,b; 4a,b; 5).

Farklı dozlarda (düşük, orta ve yüksek) intragastrik endosülfan uygulanmış sıçanların karaciğer doku örneklerinin histolojik incelemelerinde, portal alanlarda herhangi bir yapısal değişiklik gözlenmezken, klasik karaciğer lobullerinde, özellikle santral ven etrafındaki hepatositlerde daha belirgin olmak üzere hidropik dejenerasyonlar mevcuttu. Bununla birlikte, hepatositlerde lipit damlacıklarına benzer yaygın vakuolümsü yapılar ve heterokro-



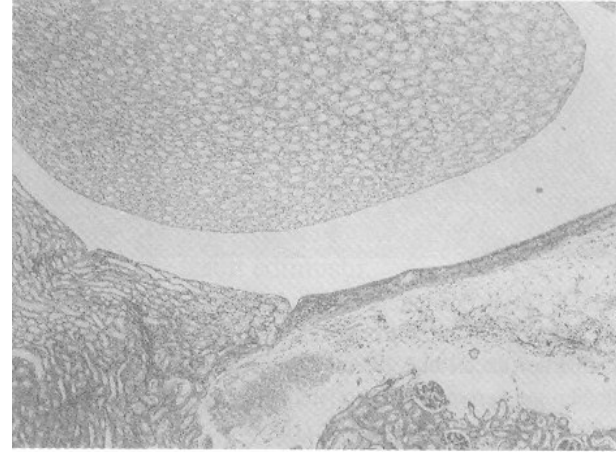
Şekil 4. Kontrol grubuna ait sıçanın böbrek dokusunun korteks bölgesinden iki farklı büyütmadaki (a:x120; b:x240) görünüm izlenmekte. Normal glomerül ve tübüler yapılar görülmektedir (Masson üçlü boyası).

matikleşmiş çekirdek yapıları gözlenmiştir. Sinüzoidlerde dilatasyon ve Kupffer hücre proliferasyonu endosulfan uygulanmış hayvanların karaciğer dokularında dikkati çeken diğer bulgular idi. Tüm bu yapısal değişiklikler doza bağlı olarak hafif artış göstermekteydi (Şekil 2,3).

Böbrek dokularının histolojik incelemelerinde ise, öncelikle karaciğere oranla yapısal değişiklikler daha belirgin olarak izlendi. Endosulfan almış hayvanların böbrek dokularında, glomeruller ve tübüllerde yapısal düzensizliklerin yanı sıra peritübüler ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmekteydi. Hasarlanmış tübül hücre sitoplazmaları artmış vakuoler dejenerasyon nedeniyle köpüğümsü bir yapı kazanmıştı. Böbrek tübüler parankim hücrelerinde hidropik değişiklikler mevcuttu. Damarlar çevresinde odaklanmış olarak gözlenen hücre infiltrasyonları özellikle korteks ve kortiko - medullar bileşkede yer almıştı (Şekil 6,7,8a,b,c). Tüm bu yapısal değişiklikler doza bağımlı olarak hafif artışlar göstermekteydi.

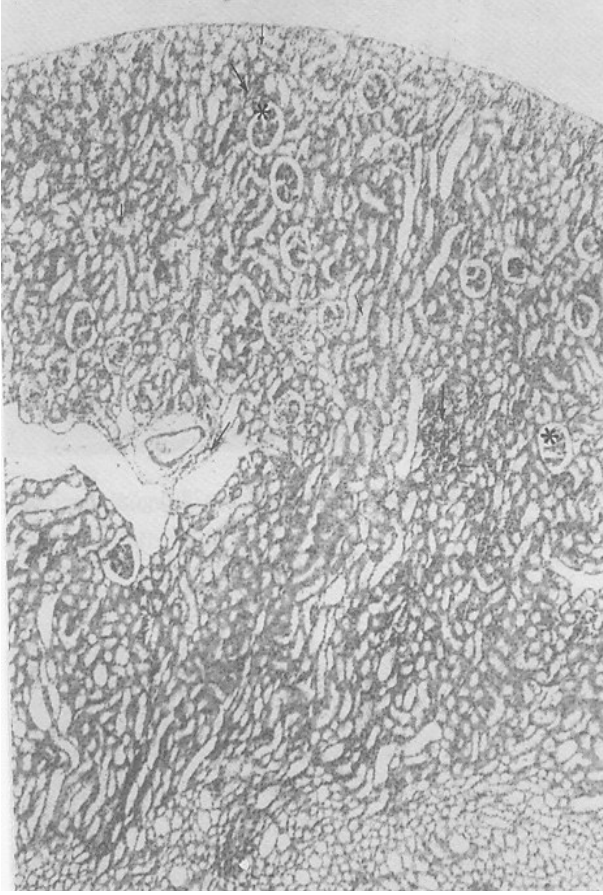
Tartışma

Çalışmamızda, deney grubunda SOD aktivitelerinin doza bağlı olarak yükselmesi karaciğer ve böbrek dokularında serbest radikal üretimi artışının bir göstergesi olabilir. MDA seviyesinin deney gruplarında (karaciğer ve böbrek dokusu için) artışı ise artmış serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Endosulfan uygulanmış

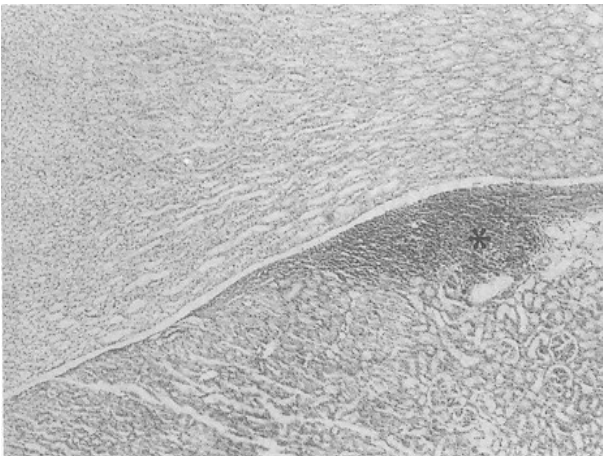


Şekil 5. Kontrol grubuna ait sıçanın böbrek dokusunun korteks-medulla bileşkesinden geçen bir görünüm izlenmekte. Normal histolojik yapılar görülmektedir (Hematoksilen-Eozin;x48).

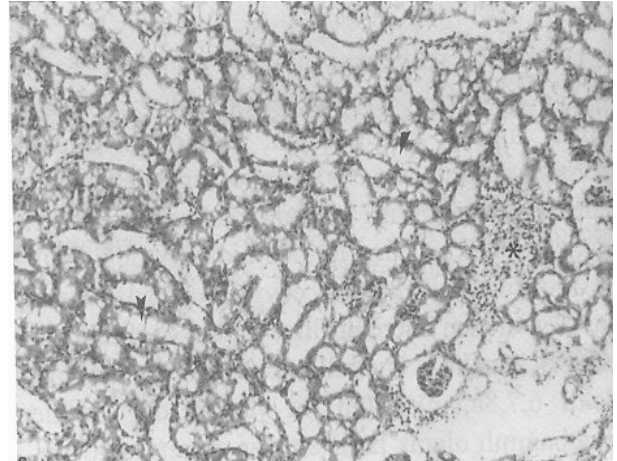
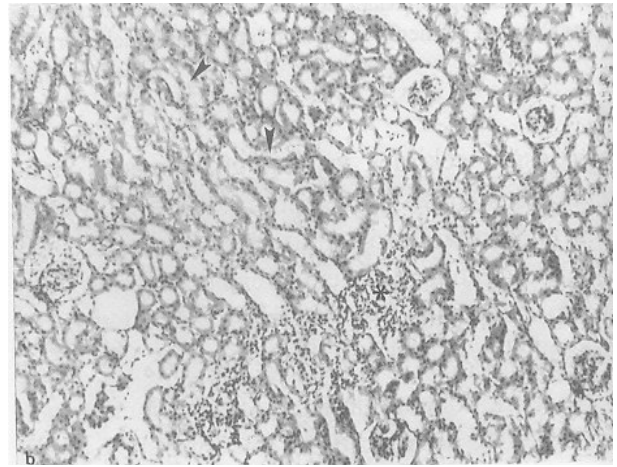
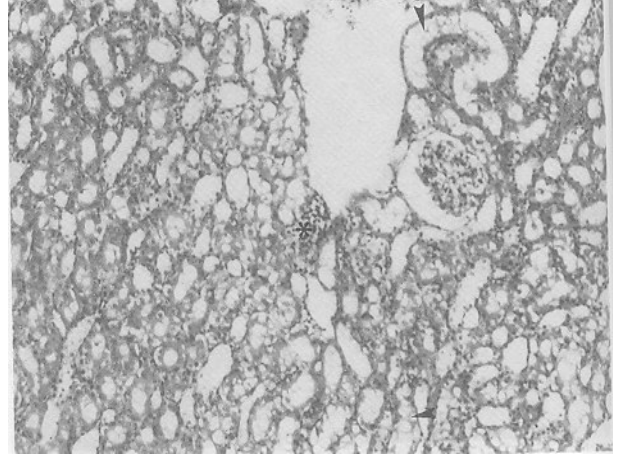
hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında enzim aktivitelerindeki artış serbest radikallere karşı enzimatik savunma mekanizmasının arttırılması çabalarını gösteriyorsa da, MDA artışı bu çabaların yetersiz kaldığını göstermektedir. Önceki bir çalışmada, endosulfanın oksidan stres üzerindeki etkisi araştırılmış, tek doz (30 mg/kg LD₅₀'nin yaklaşık %30'u) endosulfan uygulanmasının sıçan karaciğer ve beyin dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan tiobarbitürik asit reaktif maddelerinde (TBARS) önemli bir artış bildirilmiştir (22).



Şekil 6. Düşük doz intragastrik endosülfan uygulanmış sıçana ait böbreğin panoramik görünümü. Glomerüller (*) ve tübülde yapısal düzensizliklerin yanı sıra peritübüler ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları (büyük ok) dikkati çekmektedir (Hematoksilen-Eozin;x48).



Şekil 7. Aynı deney grubuna ait sıçanın korteks-medulla bileşkesinden geçen kesitte diffüz mononükleer hücre infiltrasyonu izlenmekte (*) (Hematoksilen-Eozin;x48).



Şekil 8. İntragastrik düşük (a), orta (b) ve yüksek (c) doz endosülfan uygulanmış hayvanlara ait böbrek histolojik görünümü. Perivasküler ve peritübüler alanlarda odaklanmış mononükleer hücre infiltrasyonları (*), tübülde vakuoler dejenerasyona bağlı olarak köpüğümsü görünüm (ok uçları) ve hidropik değişiklikler izleniyor (Hematoksilen-Eozin;a,b,c;x120).

Bu çalışmada, GR ve G6PDH aktiviteleri karaciğer ve böbrek dokularında endosulfandan

etkilenmedi. Önceki bir çalışmada, endosulfanın eritrosit glutatyon redüktaz aktivitesinde önemli bir azalmaya, G6PDH aktivitesinde ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (23). G6PDH aktivitesindeki bu artışın glutatyon redüktaz aktivitesindeki azalmadan dolayı azalmış glutatyon düzeylerini kompanse etmek için bir yanıt olabileceği ileri sürülmüştür.

Mevcut çalışmada, CAT ve GSH-Px aktivitelerine bakıldığında; karaciğer dokusunda CAT aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek doz endosulfan uygulanan gruplarda anlamlı şekilde azalmıştı. Böbrek dokusunda ise bir değişiklik gözlenmedi. GSH-Px ise, böbrek dokusunda bir farklılık göstermezken, karaciğer dokusunda doza bağlı olarak anlamlı bir düşüş göstermişti. GSH-Px aktivitesindeki azalma; yeteri kadar indirgenmiş glutatyonun sağlanamaması (glutatyon redüktaz reaksiyonuyla), GSH-Px'in substratı (glutatyon) yeteri kadar olmadığından H_2O_2 'yi suya indirgeyememesiyle sonuçlanır. H_2O_2 düzeylerinin yükselmesi de hücre hasarına neden olmaktadır. Bununla birlikte ortamda fazla miktarda O_2 (süperoksit) radikali varsa bu CAT ve GSH-Px 'i inhibe edebilmektedir. Nitekim SOD'deki artış ortamda fazla miktarda süperoksit radikalının bir göstergesi olabilir. Fakat, SOD'deki oluşan bu artış oluşan bu serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında yeterli olmadığı için de lipid peroksidasyonundan hücreyi koruyamadığı ve sonuçta bunun göstergesi olan MDA'nın arttığı düşünülebilir.

Önceki hiçbir çalışmada CAT ve GSH-Px'e ilişkin sonuçlar bulunmamaktadır.

Endosulfan uygulanmış sıçanların kan ve beyin glutatyon düzeylerinde önemli artış (24), karaciğer ve beyin glutatyon-S-transferaz aktivitelerinde de önemli oranda artışlar (45) bildirilmiştir. Bununla birlikte, testiküler sitosolik konjugasyon enzim glutatyon-S-transferaz aktivitesinde inhibisyon rapor edilmiştir.

Siddiqui ve arkadaşları (10) yaptıkları çalışmada farklı dozlarda (11 mg/kg, 22 mg/kg, 33 mg/kg) oral endosulfan uygulanmasını takiben hepatik ve ekstrahepatik dokularda GST (Glutatyon-S-transferaz) aktivitelerini ve GSH (redükte glutatyon) düzeylerini çalışmışlardır. Sonuçta SOD'a benzer bir etki gösteren GST aktivitesinin karaciğerde değişmediğini, böbrekte ise anlamlı şekilde azal-

dığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda benzer olarak, GSH-Px düzeyleri, karaciğer dokusunda düşük ve yüksek doz endosulfan uygulanan gruplar için düşerken, orta dozda yükselmekteydi. Böbrekte ise, üç farklı dozda da anlamlı düşüşler söz konusuydu. Görüldüğü gibi, iki farklı dokunun aynı doz ve sürede uygulanan etkene karşı yanıtları oldukça önemli farklılıklar göstermektedir. Bundan başka, aynı substratı kullanan fakat hücresel kompartmanları farklı olan bu iki enzimin böyle farklı davranış göstermesi kinetik incelemeler açısından anlamlılık ifade edebilir. Bu bulgular CAT ve GSH-Px için daha detaylı araştırmalar yapma gereğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, karaciğer ve böbrek dokularında endosulfana bağlı olarak SOD aktivitesinde ve MDA düzeylerindeki artış, endosulfan metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller ve onların lipid peroksidatif hasarının bir göstergesidir. Sonuçta, endosulfana bağlı bir oksidatif hasar söz konusudur. Bu biyokimyasal bulgularımıza paralel olarak karaciğer ve böbrek dokularının histolojik incelemelerinde, peroksidatif hasara uygun bulgular (hücresel hasarlar, mononükleer hücre infiltrasyonları gibi) tesbit edilmiştir.

Karaciğer doku örneklerinin histolojik incelemelerinde, özellikle santral ven periferinde lokalize hepatositlerde daha belirgin olmak üzere doza bağlı olarak artan oranlarda, hidropik ve vakuoler dejenerasyonlar, sinüzoidlerde dilatasyon ve Kupffer hücre proliferasyonu gözlemlendi. Böbrek dokusunda ise, endosulfana bağlı harabiyet karaciğer dokusuna oranla daha ağır bir tablo göstermekteydi. Perivasküler ve peritubuler mononükleer hücre infiltrasyonları, dejenere glomerüller ve tubuler yapılar dikkati çeken önemli yapısal değişikliklerdi. İlâveten, böbrek tubul hücrelerinde hidropik değişiklikler ve vakuoler dejenerasyonlar saptandı.

Biyokimyasal bulgularımıza göre, gerek SOD aktivitesi gerekse MDA düzeylerine bakıldığında, karaciğer ve böbrek dokularında kontrol grubuna oranla benzer oranlarda artışlar olmuştur. Buna göre, oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun her iki organda da oluştuğu görülmektedir. Histolojik yönden incelendiğinde ise, biyokimyasal bulgularımıza zıt olarak böbrek dokusunun daha fazla etkilendiği saptanmıştır. Bunun olası nedeni, endosulfana bağlı böbrek dokusunda gözlenen histopa-

tolojik değişikliklerin patogenezinde oksidatif stresin yanısıra başka mekanizmaların devreye girmesi olabilir.

Sonuç olarak, sıçan karaciğer ve böbrek dokusunda endosulfana bağlı olarak oksidatif stres olduğu ve bunun sonucunda lipit peroksidasyonu son ürünlerinden MDA'nın arttığı ve bu hasarı engellemek için koruyucu olarak antioksidan enzimlerden SOD'un aktivitesinin arttığı saptanmıştır. SOD'un aksine GSH -Px ve CAT'deki azalmanın nedeni, endosulfanın bu enzimler üzerindeki direkt inhibisyonundan kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, ortamda fazla miktarda süperoksit radikalinin bulunması (SOD aktivitesindeki ve MDA düzeyindeki artış bunun göstergesidir) CAT ve GSH-Px'i inhibe edebilir. Histolojik incelemelerimizde böbrek dokusunun karaciğere oranla daha belirgin harabiyet göstermesi de, böbrek dokusunda endosulfana bağlı oksidatif stresin yanısıra başka mekanizmaların da rol oynadığını düşündürmektedir. Bu konuda gerek in vivo gerekse in vitro daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- Grover IS, Tyagi PS. Cytological effects of some common pesticides in barley. *Environ Exp Bot* 1980; 20:243-5.
- Aktaş T, Ekinci F, Sıdal U, Sıdal F. Endosulfanın mercimek (*Lens esculenta*) kök ucu hücreleri üzerindeki etkileri. *Tr J of Biology* 1994; 18:27-37.
- Usha-Rani MV, Reddi OS, Reddy PD. Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phoshamidon, carbaryl and ceresan. *Environ Contam Toxicol* 1980; 25:227-8.
- Yoder J, Watson M, Benson WW. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutation Res* 1973; 21:335-40.
- Dzwonkowska A, Hubner H. Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides tested in vivo. *Arch Toxicol* 1986; 58(3):152-6.
- Naqvi SM, Vaishnavi C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non target animals. *Biochem Physiol* 1993; 105(3):347-61.
- Çerkezayabekir A, Aktaş T. Endosulfanın fare tiroid bezi üzerine histopatolojik etkileri. *Tr J of Biology* 1997; 21:339-444.
- C.P.V., Health Information Thiodan 50 WP Insecticide 1980; 10:80.
- Özata A. Endosulfan enjeksiyonu yapılmış farelerin (*Mus Musculus*) karaciğer, böbrek ve ince barsaklarındaki ince yapı değişiklikleri üzerine çalışmalar. *Doğa Dergisi Temel Bilimler Seri A* 1983; 7(3):524-31.
- Siddiqui MKS, Anjum F, Quadri SH. Some methabolic changes induced by endosulfan in hepatic and extrahepatic tissues of rat. *J Environ Sci Health* 1987; 22(5):553-64.
- Singh SK, Pandey RS. Ethanol potantates in vivo hepatotoxicity of endosulfan in adult male rats. *Indian J Exp Biol* 1991; 29(11):1035-8.
- Ansari RA, Siddiqui MKS Gupta PK. Toxicity of endosulfan distributions of isomers of raesmic endosulfan following oral administration in rats. *Toxicol Lett* 1984; 21:29-33.
- Barlas NE, Kolonkaya D. Endosulfanın ticari ve mikroorganizmalarda parçalanmış solusyonlarının albino farelerdeki histopatolojik etkileri. *Tr J of Zoology* 1994; 18(1):7-12.
- Christie A, Knudsen ALL Toppel JAN. Multiple antioxidants protect against heme protein and lipit oxidation in kidney tissues. University of California 1995.
- Lo RS, Chan JC, Cockram CS, Lai FM. Acute tubular necrosis following endosulfan insecticide poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1995; 33(1):67-9.
- Segasothy M, Pang KS. Acute intersititial nephritis due to endosulfan. *Nephron* 1992; 62(1):118.
- Singh SK, Pandey RS. Toxicity of endosulfan on kidney of male rats in relation to drug metabolizing enzymes and microsomal lipid peroxidation. *Indian J Exp Biol* 1989; 27(8):725-8.
- Rauber MD. The role of toxicity in the carcinogenicity of endosulfan. *Sci Total Environ* 1981; 20(1):23-47.
- Lawry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 182:265.
- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, London, 1974: 673.
- Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 1990; 48:301-9.
- Hincal F, Gurbay A, Giray B. Induction of lipit peroxidation and alteration of glutathion redox status by endosulfan. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47(1-3): 321-6.
- Kiran R, Varma MN. Age related toxic effects of endosulfan on certain enzymes of rat erythrocytes. *Indian J Exp Biol* 1990; 28(7):694-6.
- Singh SK, Pandey RS. Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. *Indian J Exp Biol* 1989; 27(4):341-6.
- Srikanth NS, Seth PK. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 1990; 10(3):157-60.