

Klorprifos-Etil Tarafından Oluşturulan Oksidatif Hasarın Sıçan Karaciğerine Etkileri

THE EFFECTS OF OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY CHLORPRYFOS-ETHYL ON THE RAT LIVER

Meral ÖNCÜ*, Fatih GÜLTEKİN**, Erdal KARAÖZ***, İrfan ALTUNTAŞ**, Namık DELİBAŞ****

* Uzm.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Yrd.Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

*** Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

****Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD, İSPARTA

Özet

Amaç: Bu çalışmada klorprifos-etil'in sıçan karaciğer dokusuna toksik etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada 40 Wistar albino sıçan kullanıldı. Bunlardan 20'si kontrol grubuna aitti. Deney grubuna klorprifos-etil (41mg/kg) iki eşit dozda iki gün intragastrik uygulandı. Son uygulamadan üç saat sonra deney sonlandırıldı. Histolojik ve biyokimyasal çalışmalar için uygun teknikler kullanılarak karaciğer doku örnekleri çıkarıldı. Histolojik çalışmalar için doku örneklerine ışık mikroskopik takip yöntemleri uygulandı. İlâveten, doku homojenatlarında tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) ve antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayin edildi.

Bulgular: Doku homojenatlarında tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorprifos-etil grubunda anlamlı olarak artmıştı. Antioksidan potansiyelin ise Grup I'e göre Grup II'de anlamlı olarak düştüğü saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorprifos-etil grubunda (Grup II) glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde bir azalma vardı (p<0.05). Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ise Grup I'le karşılaştırıldığı zaman Grup II'de düşüktü fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).

Karaciğer dokusunda histolojik olarak izlenen önemli yapısal değişiklikler; safra kanalı proliferasyonu, bazı santral venlerin çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonu sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon gözlemlendi. İlâveten, bazı portal alanlarda bağ dokusu artışı gözlemlendi.

Sonuç: Sonuçta, klorprifos-etil'in karaciğer dokusunda antioksidan savunma sistemini bozduğunu ve antioksidan savunma potansiyelini azalttığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Klorprifos-etil, Karaciğer, Oksidatif hasar, Histoloji

Summary

Purpose: In this study, we aimed to evaluate the toxic effects of chlorpryfos-ethyl, histologically and biochemically in the rat liver.

Materials and Methods: In this study, 40 Wistar albino rats were used. Twenty of them were belonging to control group. Chlorpryfos-ethyl was administered in two equal doses (41 mg/kg body weight) by gastric intubation to the experimental group for two days. The experiment was ended after three hours from the last application. The tissue samples were taken by using appropriate techniques for histological and biochemical examination. Light microscopic techniques were used to the tissue samples for histological examination. In addition, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and antioxidant potential (AOP) levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) activities were determined in the tissue homogenates.

Results: In tissue homogenates, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were found to be increased in Group II, when compared to Group I (p<0.05). But, antioxidant potential (AOP) was found lower in Group II than in Group I (p<0.05). Glutathione peroxidase and catalase activities were decreased in Group II (p<0.05), when compared to Group I. Superoxide dismutase activities were lower in Group II than Group I, but it was not significant statistically (p>0.05).

In the liver tissues of the rats exposed to chlorpryfos-ethyl, the significant structural changes we observed were as follows; biliary proliferation, mononuclear cell infiltration around some central veins, sinusoidal dilatation and congestion. In addition, connective tissue proliferation was observed in the some portal area.

Conclusion: In conclusion, we showed that chlorpryfos-ethyl impairs the antioxidant defence system and reduces the antioxidant defence potential in liver tissue.

Key Words: Chlorpryfos-ethyl, Liver, Oxidative damage, Histology

T Klin J Med Sci 2002, 22:50-55

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:50-55

Klorprifos-etil (KE; 0,0'- diethyl 0 - [3,5,6 - trichloro - 2 - pyridyl] phosphorothionate) bahçe, tarım ve orman zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan dolayısı ile

insanların sıkça maruz kaldığı bir organofosfat insektisitir (1). Klorprifos'un metabolitleri, klorprifos-okson ve 3,5,6-trikloro-2-pridinol klorprifos'dan daha toksiktir (1,2).

Klorprifos-etil'in metaboliti, klorprifos-okson sinir kavşaklarında asetilkolin esterazı inhibibe ederek ciddi bir kolinerjik toksisite oluşturur (3-11). İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda, akut ve kronik organofosfat uygulamalarının sonucu ortaya çıkan toksik etkilerin (hepatotoksisite, nörotoksisite, genetik toksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi) patogenezinde oksidatif doku hasarının rol oynadığı ortaya konulmuştur (12-19).

Serbest radikaller, özellikle DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'ya saldıran serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar. Bu zararlar karsinojenik mutasyonlara neden olabilir (20).

Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içindeki sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondriyodaki enzimatik sistemleri değiştirerek veya indükleyerek serbest radikaller oluştururlar. İlâveten, serbest radikalleri toplayarak hücreyi koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan sistemleri tüketirler veya inhibe ederler veya taşıyabileceklerinden fazla yük yüklerler. Hücrede oksidatif hasar oluşturarak lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine yol açarlar. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF-kB) aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya hücre ölümü gibi hücre fonksiyon değişikliklerine yol açabilir (19).

Yapılan çalışmalarda, organofosfat uygulanmasını takiben karaciğer, beyin, tiroid gibi çeşitli doku örneklerinde lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinde değişiklikler olduğu saptanmıştır (12-19).

Bagchi ve ark.(17), organofosfatların in vivo ve in vitro olarak, süperoksit dismutaz aktivitesi inhibisyonu, glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma ve malondialdehit üretiminde artışa yol açarak hepatositlerde oksidatif hasar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırma, ziraaatte sıklıkla kullanılan ve birçok toksisiteye neden olabilen klorprifos-etil'in sıçan karaciğer dokusuna etkisini ve peroksidatif hasarın rolünü deneysel bir model üzerinde histolojik ve biyokimyasal parametrelerle göstermek amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Metod

Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 190-240 gram arasında değişen, erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır

(n=20). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi. Sıçanlar iki eşit gruba ayrıldı: Kontrol grubu (Grup I) ve KE verilen grup (KE; Grup II). Klorprifos-etil (Chlorpryfos - ethyl; Dursban 25; Dow Agrosience), KE grubuna iki eşit dozda olmak üzere 0. ve 21. saatte 8 numara feeding tüp yardımıyla 41 mg/kg dozunda (0.25 LD₅₀) intragastrik (i.g) verildi (17). Kontrol grubu hayvanlara ise, benzer şekilde eşit hacimde serum fizyolojik uygulandı. Deney, KE ve serum fizyolojik uygulamalarını takiben 24. saatte sonlandırıldı.

Biyokimyasal Materyaller

Deney süresinin sonunda, her gruptan 5'er hayvanın göğüsleri açılarak karaciğer loblarından biri (sağ lob) uygun teknikler kullanılarak çıkartıldı. Karaciğer örnekleri önce soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra 150 mm soğuk potasyum fosfat tamponu içinde homojenizatörle (Ultra-Turrax T25 model) 1000 U'da 5 dakika süreyle homojenize edildi. Bu süre sonunda elde edilen %10'luk homojenatlar +4°C'de 10 dakika süreyle 6000 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu homojenatlarda protein, tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS), antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri ile GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

Histolojik Materyaller

Histolojik çalışmalar için ise, biyokimyasal çalışmalar için açılan her gruptan 5'er hayvanın karaciğerinin diğer bir lobu (sol lob) çıkartıldı ve immersiyon tespit yöntemi kullanıldı. Buna göre, çıkartılan doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildiler. Her gruptan diğer 5'er hayvana (biyokimyasal çalışmalar için kullanılmayan) ise daha iyi histolojik kesitler alınabilmesi için vasküler perfüzyon yöntemi uygulandı.

Vasküler Perfüzyon Yöntemi

Bu yöntemde, sıçanlar önce sodyum pentobarbital ile derin anestezi altına alındılar. Beşbin ünite sodyum heparin, 1 ml %0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriuma makasla bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı gözlemlendi. Kalp kontraksiyona devam ederken, bir kanül ile apeks tarafından sol ventrikül içine girildi. Bu kanül vasıtasıyla, kan vücuttan tamamen uzaklaşmaya kadar, yani sağ atriümden akan sıvı renksiz olana kadar, sol ventriküle %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu verildi (yaklaşık 100 ml). Ardından aynı şekilde, 0.1 M'luk sodyum fosfat tamponu (pH:2) içinde %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu ventrikülden dolaşıma verildi. Perfüzyona, bütün vücut sertleşinceye ve özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşmaya kadar devam edildi (21).

Tespit sonrası çıkartılan karaciğer dokuları aynı tespit solüsyonunda 24 saat bekletildikten sonra, dokulara rutin ışık mikroskopu takip yöntemleri uygulandı.

Hazırlanan parafin bloklardan Lipshaw tipi kızaklı mikrotom ile 4-6 mikrometre kesitler alındı. Bu kesitler, Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı. Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelenen kesitlerden mikrofotograflar elde edildi.

Biyokimyasal Çalışmalar

TBARS (Tiobarbitürik asitreaktif substans) Ölçümü

TBARS için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (22). Bunun için, 0.5 ml homojenat 2.5 %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) ile karıştırılarak 15 dakika süreyle kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra çeşme suyunda soğutulmuş 1000 g'de 10 dak. santrifüj edildi. Bu işlemden sonra, süpernatandan 2 ml alınarak 1 ml %0.67'lik TBA (Tiobarbitürik asit) ile karıştırıldı ve karışım kaynar su banyosunda 15 dak süreyle bekletildi. Kaynar sudan çıkarılan tüpler çeşme suyunda soğutulmuş 532 nm.de absorbansları okutuldu. MDA-TBA kompleksinin 532 nm. deki ekstinksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) yararlanarak nmol/ml cinsinden TBARS değeri bulundu. Daha sonra, sonuçlar ml.deki protein miktarına bölünerek nmol/mg protein cinsinden TBARS değeri bulundu.

AOP (Antioksidan Potansiyel) Ölçümü

AOP Durak ve ark.'nın (23) yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde, reaksiyon ortamı balık yağı ile zenginleştirildi. Balık yağı, çoklu doymamış olduğundan ve bu nedenle serbest radikal ataklarına çok hassas olduğu için tercih edildi.

Numuneler, ksantin/ksantin oksidaz (xantine / xantine oxidase) sistemi ile üretilen süperoksit radikallerine (O_2^-) bir saat süreyle maruz bırakıldı. Bilindiği gibi hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmada yetersizlik olduğu zaman doymamış serbest yağ asitleri kolayca okside olur ve TBARS konsantrasyonu artar. Yukarıda oluşturulan reaksiyon sistemi kullanılarak, doku ve hücrelerde total (enzimatik ve enzimatik olmayan) antioksidan potansiyel hakkında daha doğru bilgi edinmek mümkündür. Bu amaçla, reaksiyon ortamındaki TBARS konsantrasyonu, O_2^- radikal oluşmadan önce ve oluşturulduktan sonra ölçüldü. İki değer arasındaki fark antioksidan potansiyele ters orantılıdır.

Analiz Şeması

0.5ml homojenat, 0.1ml 10 nM ksantin, 0.1ml ksantin oksidaz (XO) ve 0.01ml balık yağı karıştırılarak 25 °C de 1 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon başında ve sonunda TBARS ölçüldü. XO hazırlamak için, XO (Sigma X- 4500, 2.9mg protein /ml 1.6 U/mg protein) 40 kat 2 mol/L lik $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ solüsyonu ile dilüe edildi. Ölçüm ortamındaki son XO miktarı 0.012 U idi. Balık yağı miktarı, total lipid miktarı 0.706 g/ml olacak şekilde

ayarlandı. Bunun için ml homojenat başına 0.2 µl balık yağı kullanıldı.

AOP, inkübasyon sonrası ve öncesi arasındaki TBARS farkı ile hesaplandı. Bu değer AOP ile ters orantılı olduğundan "1" bu farka bölündü. Sonuçlar 1/nmol/mg protein h cinsinden ifade edildi.

Protein Ölçümü

Homojenatın protein miktarı Lowry (24) yöntemine göre belirlendi.

SOD Ölçümü

SOD ölçümünde ticari kit (Ransod, UK) kullanıldı.

Deneyin prensibi: Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.

GSH-Px Ölçümü

GSH-Px aktiviteyi Paglia ve Valentina'nın yöntemine göre ölçüldü (25). Yöntemin prensibi: GSH-Px kümen hidroperoksit varlığında glutatyonun oksidasyonunu katalizler. Ortamda glutatyon reduktaz ve NADPH varlığında ise okside glutatyon redukte glutatyona dönüştürülürken NADPH'da NADP^{+} ya dönüşür. NADPH'ın 340 nm'deki absorbans düşüklüğü spektrofotometrik olarak ölçülür.

Katalaz Ölçümü

Katalaz (Catalase; CAT) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre çalışıldı (26). Bu yöntemin prensibi, hidrojen peroksidin (H_2O_2) katalaz tarafından parçalanma hız sabitinin belirlenmesi esasına dayanır.

İstatistiksel Çalışmalar

Grupların tek tek karşılaştırılması için Mann – Whitney U testi kullanıldı. Anlam sınırı 0.05 olarak kabul edildi. İstatistikler "SPSS 7.0 for Windows" paket programında yapıldı.

Bulgular

Biyokimyasal Bulgular

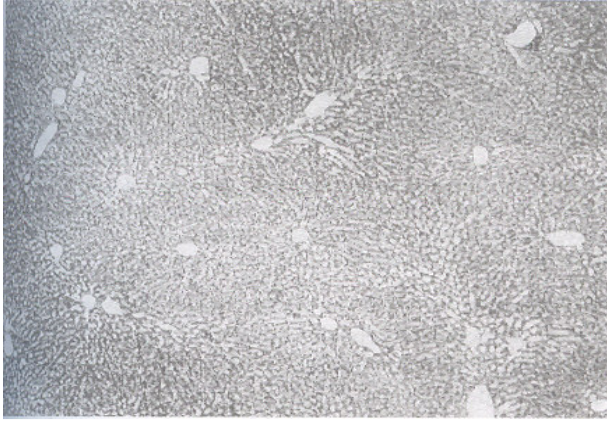
Kontrol ve deney grubu hayvanlara ait karaciğer dokusu SOD, GSH-Px ve CAT aktivite değerleri ve AOP ile TBARS düzeyleri aritmetik ortalamaları \pm standart deviasyon şeklinde Tablo 1'de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda kontrol grubu (Grup I) ile karşılaştırıldığında klorprifos-etil grubunda (Grup II) GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir azalma ($p < 0.05$), SOD aktivitesinde ise anlamlı olmayan ($p > 0.05$) bir azalma saptandı.

Tablo 1. Parametrelerin ortalama ve standart sapmaları ile grupların karşılaştırılması (tüm gruplar için n=5, KE: Klorprifos-etil).

	TBARS (nmol/mgprot)	AOP (1/nmol/mg prot.h)	SOD (U/g prot)	GSH-Px (U/g prot)	CAT (k/g prot)
Grup I (Kontrol)	2.066 ± 0.346*	1.749 ± 1.269*	31.601 ± 2.317	21.126 ± 2.525*	0.814 ± 0.065*
Grup II (KE)	4.016 ± 0.991	0.111 ± 0.044	29.034 ± 2.794	15.632 ± 3.553	0.459 ± 0.075

* p < 0.05; Kontrol ve KE grupları karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, Mann Whitney U testi



Şekil 1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusundan bir görünüm. Normal histolojik yapılar izlenmektedir (Hematoxilen- Eozin; x48)

TBARS düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorprifos-etil grubunda anlamlı olarak artmıştı (p<0.05). AOP düzeylerinin ise kontrol grubuna (Grup I) göre klorprifos-etil grubunda (Grup II) anlamlı olarak düştüğü saptandı (p<0.05).

Histolojik Bulgular

Kontrol grubu sıçanların karaciğer doku kesitlerinin histolojik incelemesinde, bu organa özgü histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmadı (Şekil 1).

İki eşit doz (41mg/kg) intragastrik klorprifos-etil (KE) uygulanan sıçanların karaciğer doku kesitlerinin histolojik incelemelerinde şu yapısal değişiklikler izlendi. Özellikle portal alanlarda belirgin olmak üzere, perivasküler alanlarda artmış mononükleer ve polimorfonükleer hücreler gözlemlendi. Bunun yanında, portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu, mast hücre hiperplazisi ve kollajen artışı gözlemlendi. Bazı santral venlerin çevresinde karışık (mono- ve polimorfonükleer) hücre infiltrasyonları, sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon gözlemlendi (Şekil 2a,b,c ve 3).

Tartışma ve Sonuç

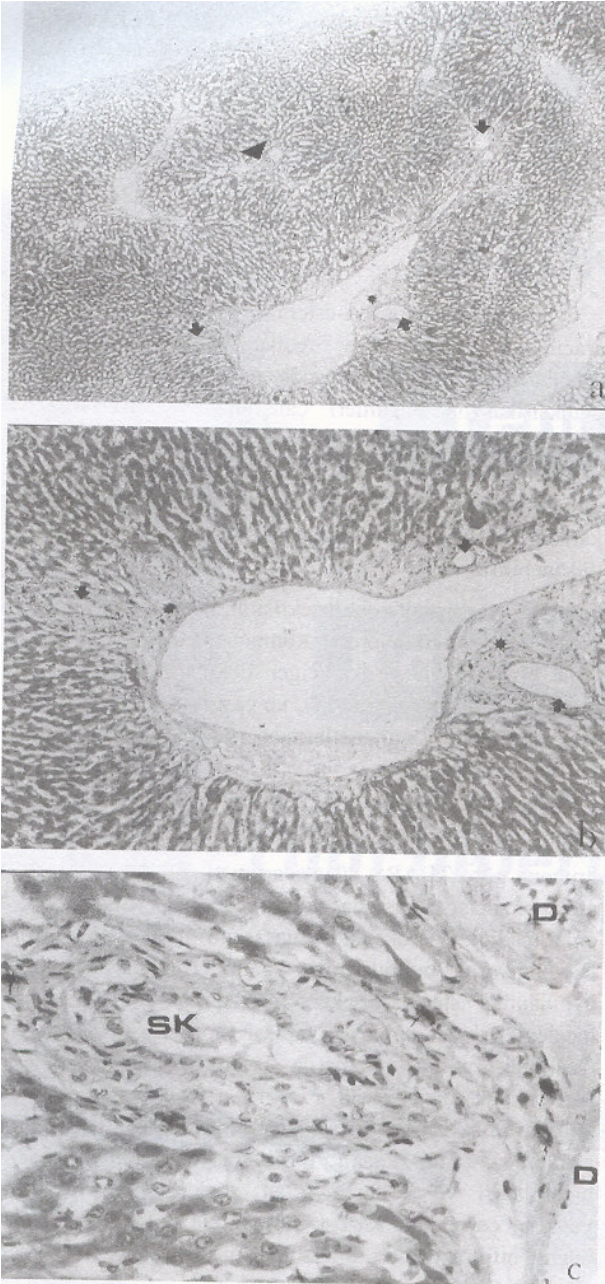
Klorprifos-etil ve/veya metabolitlerinin insan ve çeşitli hayvan türlerinde, hepatotoksik, nörotoksik, tirotoksik, embriyotoksik etkileri gösterilmiştir. İlaveten, hematolojik toksisite, immunolojik toksisite ve testiküler toksisite etkileri bildirilmiştir (1,4,12,14,27-29).

Klorprifos-okson, A-esteraz ve aliesteraz enzimleri aracılığıyla detoksifiye edilebilir. Sprague-Dawley sıçanlarının çeşitli dokularında A-esteraz ve aliesteraz detoksifikasyon enzimleri çalışılmış ve A-esteraz ve aliesteraz enzim aktivitelerinin karaciğerde en yüksek olduğunu, böbrek ve akciğerde ise düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır (30). Buna göre, klorprifos'un başlıca karaciğer, böbrek ve akciğerde detoksifiye edildiğini düşünebiliriz.

Birkaç organofosfat insektisit, kemirici karaciğer ve beyin dokularının hücresel komponentlerinde (12,16,17), fetal insan beyin ve karaciğer dokularında (15), insan eritrosit ve plazmasında (14), ve çeşitli amfipod ve balık türlerinin doku homojenatlarında (31,32) oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir.

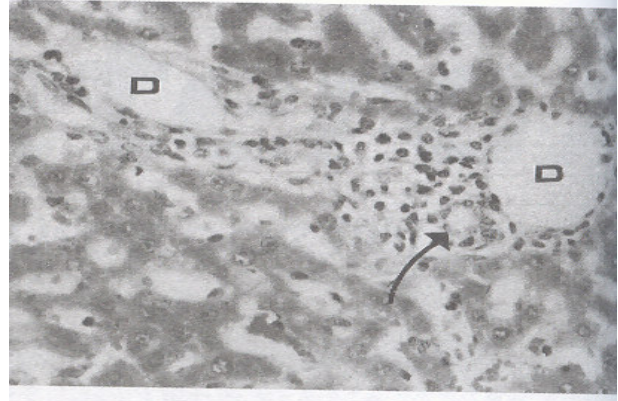
Çalışmamızda da iki eşit doz (41mg/kg) klorprifos uygulamasını takiben sıçan karaciğer dokusunda, kontrol grubuna göre TBARS düzeyi artmıştı. Bu artış klorprifos metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller ve onların lipid peroksitler hasarının bir göstergesidir. Biyokimyasal bulgularımıza paralel olarak klorprifos uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının histolojik incelemelerinde belirgin yapısal bozukluklar saptadık. Özellikle portal alanlarda belirgin olmak üzere, perivasküler alanlarda artmış mononükleer ve polimorfonükleer hücreler gözlemlendi. Bunun yanında, portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu, mast hücre hiperplazisi ve kollajen artışı gözlemlendi. Bazı santral venlerin çevresinde karışık (mono- ve polimorfonükleer) hücre infiltrasyonları, sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon gözlemlendi (Şekil 2a,b,c).

Memeli hücrelerinde biyolojik membranların peroksitler hasarına karşı en hayati savunma antioksidan enzim sistemidir. Bu enzimlerden, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz birlikte hücreyi peroksitler moleküllerden korumayı amaç edinen ortaklaşa bir sistem oluşturur. Glutatyon peroksidaz; indirgenmiş glutatyon tarafından H₂O₂ ve lipid peroksitlerinin parçalanmasını katalize eder böylelikle, membran lipitlerini ve hemoglobini, peroksitlerin oksidasyonuna karşı korur. Katalazın görevinin oksidaz etkisi ile oluşan hidrojen peroksidin yıkımı olduğu sanılmaktadır. Süperoksit dismutaz, oluşan süperoksidin H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizler (33).



Şekil 2. İki eşit doz klorprifos-etil (41mg/kg) uygulanmış deney grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görünüşleri. (a)'daki küçük büyütmedeki görünümde, portal alanlarda bağ dokusu artışı (yıldız), karışık hücre infiltrasyonları (ok ucu) ve safra kanalı proliferasyonu (kalın ok) ile karakterize yapısal değişiklikler izlenmektedir. (b)'de aynı kesitin daha büyük büyütmesinde ise bir portal alandaki benzer yapısal değişiklikler görülüyor. (c)'de ise aynı portal alanda damarsal yapıların (D) ve safra kanalının(SK) çevresinde artmış bağ doku componentleri (hücre ve kollagen) izleniyor. İlaveeten, sitoplazmaları granüllerle dolu tipik mast hücreleri (ince oklar) mevcut (Hematoksilen-Eozin, a:x48, b:x120, c:x480).

Antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilgili enzimler in vitro ve in vivo pestisit ve insektisitlerin etkileriyle değişir (12-15). Bir organofosfat insektisit olan



Şekil 3. Deney grubuna ait hayvanın karaciğer dokusunun ayrıntılı görünümü. Portal alanda artmış mononükleer ve polimorfonükleer hücreler izleniyor. D: damarsal yapılar, ok ucu: safra kanalı. (Hematoksilen-Eozin, x480).

malathion'un in vitro şartlarda insan fetuslarından elde edilen karaciğer ve beyin doku homojenatlarına etkileri araştırılmış; her iki dokuda SOD ve CAT aktivitelerinde önemli inhibisyonla beraber MDA oluşumunda artış olduğu saptanmıştır (15). Aynı çalışmada, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili olarak bilinen GSH-Px aktivitesi ise, düşük konsantrasyonlardaki malathion muamelesi ile artarken, yüksek konsantrasyonlarda değişmeden kaldığı gösterilmiştir. Bu da, düşük konsantrasyonlardaki toksik ajanın dokuda oluşturduğu oksidatif hasara karşı GSH-Px artmış aktivitesi ile bir adaptasyon gösterirken, yüksek konsantrasyonlardaki maruz kalmaya adaptasyon mekanizmasının gözlenmediğini gösterir.

Bir başka çalışmada organofosfat pestisit olan quinalphos'un (LD₅₀ dozunda) sıçan beyin ve karaciğer dokularında antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (12). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, karaciğer ve beyin dokuları in vivo quinalphos muamelesine farklı yanıtlar vermiştir. SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri karaciğerde artarken, beyin dokusunda yalnızca CAT aktivitesi artmıştır. Bu farklı bulgular neticesinde organofosfatın beyin ve karaciğer dokusunda farklı metabolik yollar izlediği kanısına varılmıştır.

Trichlorfon, dichlorvos ve phosphamidon gibi organofosfatların GSH-Px ve SOD aktivitelerini inhibe ederek ve MDA üretimini artırarak hepatositlerde oksidatif hasarı teşvik ettiği rapor edilmiştir (34,35).

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorprifos-etil deney grubunda GSH-Px, CAT aktivitelerinde anlamlı bir azalma, SOD aktivitesinde ise anlamlı olmayan düşüşler saptandı. AOP değerlerine bakıldığında ise, klorprifos uygulanmış grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş saptandı. Bu da karaciğer dokusunda klorprifos'un antioksidan enzim aktiviteleri ile

enzimatik olmayan antioksidanların düzeyini anlamlı derecede azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve AOP, TBARS düzeyleri saptanarak ve histolojik bulgular ile klorprifos'un sıçan karaciğer dokusunda neden olduğu toksisitenin klorprifos-etilin peroksidatif etkisinin bir sonucu olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Hunter DL, Lassiter TL, Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos : comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158(1) : 16-23.
- Muscarella DE, Keown JF, Bloom SE. Evaluation of the genotoxic and embryotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environ Mutagen* 1984; 6(1) : 13-23.
- Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995;76(3) : 219-26.
- Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorous compounds : a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health*. 1995;44(2): 135-65.
- Abou-Donia MB, Wilmarth KR, Abdel-Rahman AA, Jensen KF, Oehme FW, Kurt TL. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundam Appl Toxicol* 1996;34(2) : 201-22.
- Chanda SM, Pope CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53(4) : 771-6.
- Swann JM, Schultz TW, Kennedy JR. The effects of the organophosphorous insecticides Dursban and Lorsban on the ciliated epithelium of the frog palate in vitro. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996;30(2) : 188-94.
- Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, Padilla S. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats : an in vitro and in vivo comparison. *Fundam Appl Toxicol*. 1997; 38(2) : 148-57.
- Ehrich M, Correll L, Veronesi B. Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase inhibitions in neuroblastoma cells to distinguish organophosphorus compounds causing acute and delayed neurotoxicity. *Fundam Appl Toxicol* 1997;38(1) : 55-63.
- Amitai G, Moorad D, Adani R, Doctor BP. Inhibition of acetylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(3) : 293-9.
- Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL. Morfogenik role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect*. 1999; 1:81-7.
- Dwivedi PD, Mukul D, Khanna SK. Role of cytochrome p-450 in quinalphos toxicity: Effect on hepatic and brain antioksidant enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology* 1998;36 , 437-444.
- Agrawal D, Sultana P, Gupta GSD. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Fd Chem Toxic* . 1991;459-62.
- Datta C, Gupta J, Sarkar A, Sengupta D. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian Journal of Experimental Biology* 1992; 30 : 65-7.
- Jayati Gupta, Chhabi Datta. Effect of malathion on antioxidant defence system in human fetus-An in vitro study. *Indian Journal of Experimental Biology* 1992; 352-4.
- Lodowici M, Aiolli S, Monserrat C, Dolara P, Medica A, Symlicio P. Effect of a mixture of 15 commonly used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1994; 13(3) : 163-8.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 1995; 104(1-3) : 129-40.
- Lodovici M, Cassalini C, Briani C, Dolara P. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology* 1997; 117(1) : 55-60.
- Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1997; 27(3) : 196-208.
- Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. *Sendrom*. Temmuz, 1997;14-23.
- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods . Theory and Practise*. Second Ed. Pergamon Press. Oxford, 1990.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
- Durak I, Karabacak HI, Büyükkocak S, Çimen MYB, Kaçmaz M, Ömeroğlu E, Öztürk HS. Impaired antioxidant defence system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. *Nephron*. 1998;78:207-11.
- Lawry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;182:265.
- Paglia DE, Walentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-69.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- Prasanta KM, Anand K. Dimethoate inhibits extrathyroidal 5' - monodeiodination of thyroxine to 3,3', 5- triiodothyronine in mice: the possible involvement of the lipid peroxidative process. *Toxicology Letters* 91. 1997; 1-6 .
- Muto MA, Lobelle F Jr, Bidanset JH, Wurlpel JN. Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to DURSIBAN. *Vet Hum Toxicol* 1992; 34(6) : 498-501.
- Thrasher JD, Madison R, Broughton A. Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos : preliminary observations. *Arch Environ Health* 1993; 48(2) : 89-93.
- Pond AL, Chambers HW, Chambers JE. Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A - esterase and alioesterase activities. *Toxicol Lett* 1995;78(3) : 245-52.
- Hai DQ, Varga SI, Matkovic B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997; 117(1): 83-8.
- Stevens JA, Benson WH. Toxicological interactions of chlorpyrifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyalella azteca*. *Toxicol Sci* 1999; 52(2):168-77.
- Özcan O, Karaöz E, Sarsılmaz M, Ozan H, Sınay A, Oba G. Sıçanlarda karbontetraklorür hepatotoksitesine karşı E vitamininin etkisi. *Doğa Tr J of Medical Sci* 1992;16:45-54.
- Naqvi SM, Hasan M. Acetylhomocysteine thiolactone protection against phosphamidon-induced alteration of regional superoxide dismutase activity in central nervous system and its correlation with altered lipid peroxidation . *Ind J Exp Biol* 1992; 30:850-2.
- Yamano T, Morita S. Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. *Toxicology* 1992;76:69-77.

Geliş Tarihi: 16.04.2001

Yazışma Adresi : Dr.Meral ÖNCÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji AD, ISPARTA