

Chlorpyrifos ethyl'in rat pankreası üzerine etkisi

Osman Gökalp*, İnanç Karakoyun**, Süleyman Kaleli***,
Mehmet Kaya Özer*, Fatih Gültekin**

*Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Isparta

**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

***Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Isparta

Özet

Pankreas bazı ksenobiotiklere göreceli olarak daha hassas bir organdır. Organofosfat zehirlenmelerinde ortalama % 12 oranında akut pankreatite rastlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada organofosfat insektisitlerden chlorpyrifos ethyl (CE)'in tolere edilebilir maksimum dozda pankreas üzerine olası etkilerini genç ve erişkin ratlarda araştırmayı planladık. Çalışma grupları; genç kontrol grubu, genç CE verilen grup ve erişkin CE verilen grup şeklinde düzenlendi. Bu gruplarda üçer alt gruba ayrılarak deney başladıktan sonra 2, 7 ve 14 gün sonra kan örnekleri alındı. Her grubun deney süresinin bittiği günde kan örnekleri alınarak plazmada kolinesteraz (ChE), amilaz ve lipaz aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CE uygulanan grubun ChE aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. CE uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında amilaz aktivitesinin ve MDA düzeyinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Sonuç olarak bu bulgulardan CE'nin maksimum tolere edilebilir dozda ratlara uygulandığında hafif pankreas hasarına neden olabileceği fakat bunun oksidatif stres artışı veya kolinesteraz enzim aktivitesinin inhibisyonu ile doğrudan yakın ilişki halinde olmadığı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Organofosfat, pankreatit, chlorpyrifos-ethyl, amilaz, malondialdehit, kolinesteraz.

Abstract

The effects of chlorpyrifos-ethyl on pancreas in rats

Pancreas is an organ which relatively vulnerable to various xenobiotics. It is reported that organophosphates cause acute pancreatitis at approximately 12% rate. We aimed to investigate effects of chlorpyrifos-ethyl (CE) [O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate], an organophosphate insecticide, on pancreas at the maximum tolerable dose within various duration. Study groups designed as control group, CE treated (administered single tolerable dose) adult group and CE treated (administered single tolerable dose) infant group. Each group divided into three subgroups. Animals were sacrificed at days 2, 7, and 14. We examined effects of CE on serum activities of cholinesterase (ChE), amylase and lipase enzymes in plasma and, blood levels of malondialdehyde (MDA) in erythrocytes. Compared to control group, ChE activity was found to be significantly decreased while amylase activity and MDA level were found to be significantly elevated in CE treated group. Compared to CE treated group, lipase activity was found to be increased in CE treated group. Based on the findings that were obtained from this study we can conclude that maximum tolerable dose of CE may cause pancreas disorder that is probably not directly related to increased oxidative stress or inhibition of cholinesterase enzyme activity.

Key words: Organophosphate, pancreatitis, chlorpyrifos-ethyl, amylase, Malonyldialdehyde, Cholin esterase.

Giriş

Pankreas çeşitli toksik maddelere ve ilaçlara göreceli olarak duyarlı bir organdır. Bu maddelerin pankreas üzerine toksik etkilerini oksidatif stres aracılığıyla yapabildikleri son zamanlarda sıklıkla literatürde bildirilmektedir (1,2,3). Bu maddelere örnek olarak streptozotisin ve alloxan verilebilir. Bu her ikisinin de pankreas kanserinin tedavisi için kullanılmış fakat sonradan oksidatif stres aracılığıyla başta beta

hücreleri olmak üzere pankreası tahrip ettikleri ortaya konmuştur. Pankreas beta hücrelerinin daha fazla tahrip olmasının mekanizmasının da bu hücrelerin antioksidan savunma sisteminin diğer hücrelere göre göreceli olarak daha zayıf olması bildirilmiştir (4). Ayrıca rat zehiri olarak kullanılan Vakoron yanlışlıkla yenilmesi ve i.v. Pentamidin injeksiyonu kalıcı pankreas beta hücre hasarına neden olabilmektedir (5).

Pankreasın organofosfatlar gibi kolinesteraz inhibitörlerinden önemli derecede etkilendiği bildirilmiştir (2,6,7,8). Organofosfat zehirlenmelerinde

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr. Osman Gökalp
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji AD 32260/ Isparta
Tel: 0 246 211 36 23 Faks: 0 246 237 11 65
E-mail: ogokalp@med.sdu.edu.tr

hastalar, zehirlenmeyi takiben birkaç gün içinde daha sık olmak üzere pankreatit olabilmektedirler. Literatürde organofosfat zehirlenmelerinin % 12'sinde pankreatit meydana geldiği bildirilmiştir (2). 1996 verilerine göre yılda 363 bin insanın organofosfat zehirlenmesinde pankreatit olduğu düşünülebilir (9). Fakat organofosfat zehirlenmelerinde hastanın şuurunun çoğunlukla kapalı olması ve oluşan tablonun karışık olması pankreatit tanısının hekimler tarafından zor konulmasına neden olmaktadır (1). Ayrıca hekimlerin organofosfatların pankreatite neden olabileceği hakkında ki bilgileri günümüzde oldukça kısıtlıdır. Buna neden olarak, bu konuda çoğu olgu sunumlarından ibaret olan literatür bilgisinin azlığı olduğu söylenebilir (10). Çok sayıda organofosfat bileşiği olmakla birlikte bunlardan sadece Parathion, Malathion, Diphonate, Coumaphos, Diazinon, Mevinphos ve Dimethoate'nin pankreatite neden olduğu bildirilmiştir (1). Organofosfatlar ile yaptığımız diğer çalışmalarda çiftçiler tarafından kullanılan organofosfatların pankreatite neden olup olmadıklarını ve pankreas hasarının oksidatif stres ile ilişkisini araştırdık. Bunlardan Diazinon'un ratlarda bariz şekilde pankreatite neden olduğu halde kullanılan diğer organofosfatlardan Fenthion, Methidathion ve Fosalon'un aynı dozda verildikleri halde bariz bir pankreatite neden olmadıklarını gösterdik (7,8,10,11). Organofosfatların neden olduğu pankreatit oluşmasındaki mekanizmanın kolinesterazın aşırı inhibisyonu ve buna bağlı pankreas içi basınçtaki fazla artışa bağlı olabileceği, aynı zamanda oksidatif stresin katkısı ve bunun antioksidanlarla önlenebileceğini gösterdik (1,10). Bu çalışmamızda da; 1- maksimum tolare edilebilen dozda chlorpyrifos-ethyl'in (CE) pankreas hasarı yapıp yapmadığını biyokimyasal olarak değerlendirmeyi, 2 – erişkin ve genç yaş grubunda olası pankreas hasarına duyarlılıkta farklılık olup olmadığını CE'ye uygulamasından sonra 2., 4. ve 14. günlerde araştırmayı planladık.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları:

Bu çalışmada Sprague Dawley cinsi toplam 24 adet erkek rat kullanıldı. 1 aylık genç ve 3 aylık erişkin olmak üzere iki grup oluşturuldu. Ratlar; genç kontrol grubu (n=4), genç CE grubu (n=8), erişkin kontrol grubu (n=4) ve erişkin CE grubu (n=8) olmak üzere toplam dört gruba ayrılarak, özel olarak hazırlanmış kafeslerde dörderli gruplar halinde tutuldular. Genç kontrol grubu, ağırlıkları 48±16 gr olan 1 aylık

4 adet rattan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara CE grubundakilerle aynı hacimde tek doz sc serum fizyolojik uygulandı.

Genç CE grubu, ağırlıkları 54±9 gr olan 1 aylık 8 adet ratdan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara 40 mg/kg dozda akut olarak sc CE (Dursban 4, Dow AgroSciences) uygulandı. Kullanılan CE ratlara uygulanmadan önce serum fizyolojik ile çözüldü.

Erişkin kontrol grubu, ağırlıkları 156±13 gr olan 3 aylık 4 adet ratdan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara CE grubundakilerle aynı hacimde tek doz sc serum fizyolojik uygulandı.

Erişkin CE grubu, ağırlıkları 157±16 gr olan 3 aylık 8 adet sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara 70 mg/kg dozda akut olarak sc CE uygulandı.

Sıçanlar injeksiyon uygulanmasını takiben 2., 7. ve 14. günde 12'şerli gruplar halinde im. olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.)-% 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında dekapite edilerek deney sonlandırıldı.

Malondialdehid Ölçümü:

Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan Malondialdehid (MDA), plazmada Draper ve Hadley'in çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (151).

Asetilkolin Esteraz (AChE), Amilaz ve Lipaz aktivitesinin ölçümü:

Heparinli tüplere alınan numuneler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Buradan elde edilen plazmada ChE, Amilaz ve Lipaz aktivitesinin ölçümü, ticari kitler (Roche, USA) kullanılarak, kinetik metodlara, biyokimya otoanalizöründe (Roche modular P800, Japan) çalışıldı.

İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 11.0 for Windows" paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Tablo 1'de görüldüğü gibi Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CE uygulamasının 2 ChE aktivitesini anlamlı olarak azaltırken MDA düzeyini anlamlı olarak artırdığı görüldü (P<0,05). CE uygulamasının 2. gün genç grubu ile kontrol grubu

karşılaştırıldığında amilaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($P<0,05$).

Tablo 1: Çalışma gruplarının enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri (\pm SS).

	Yaş	Gün	Kontrol	CE
MDA (nmol/mL)	Genç	2.gün	5.91	5.27*
		7.gün	4.79	5.81* ¹
		14.gün	5.48	5.63
	Erişkin	2.gün	6.40	8.01* ¹
		7.gün	5.90	6.28
		14.gün	6.31	6.79*
Amilaz (U/L)	Genç	2.gün	1797	2054*
		7.gün	1634	1964
		14.gün	1981	2055
	Erişkin	2.gün	2432	2064
		7.gün	2184	2237
		14.gün	2382	2394
Lipaz (U/L)	Genç	2.gün	8.50	8.50
		7.gün	8.50	8.50
		14.gün	9.75	8.75
	Erişkin	2.gün	8.00	7.00
		7.gün	7.50	8.25
		14.gün	8.75	7.75
Kolinesteraz	Genç	2.gün	209	104*
		7.gün	193	168* ¹
		14.gün	199	199
	Erişkin	2.gün	188	44* ¹
		7.gün	232	125* ¹
		14.gün	194	165* ¹

*: $p<0.05$, kontrol ile CE grubu karşılaştırıldığında.

¹: $p<0.05$, erişkin CE grubu ile genç CE grubu karşılaştırıldığında.

Tartışma

Organofosfatların canlı organizmalar üzerinde istenmeyen etkilere neden olduğu bilinmektedir (12,13). Organofosfatlar, hem insanlarda hem de hayvanlarda santral sinir sistemini, kardiyovasküler sistemi, ürogenital sistemi, nöromusküler kavşağı, metabolik ve endokrin sistemi, kolinesterazları inhibe ederek etkilemektedirler (14). Şu ana kadar bizim laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda Methidathion, Fenthion, Klorpirofos etil, Fosalon ve Diazinon'un karaciğer, böbrek, pankreas ve eritrositlerde lipid peroksidasyonunu artırarak toksik etkilere neden olmuştur (7,8,15,16). Bu mekanizma diğer araştırmacılar tarafından da günümüzde giderek güçlenen bir şekilde desteklenmektedir (17). Ayrıca melatonin, vitamin E ve C kombinasyonu gibi antioksidanların klorpirofosun da içinde olduğu organofosfatların neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltarak toksisitenin iyileşmesinde olumlu rol oynayabilecekleri bildirilmiştir

(7,8,10,15,16,18).

Yapılan bu çalışmada CE kolinesteraz aktivitesini azaltırken kan MDA düzeyini artırmıştır. Bu bulgu yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumludur. Pankreas fonksiyonlarını değerlendirmek için yaptığımız biyokimyasal analizlerde ise, Klorpirofos sadece genç grupta 2. gün anlamlı amilaz aktivite artışına neden oldu. Ancak amilaz aktivitesindeki bu artış anlamlı olmakla birlikte, pankreatit tanısı koymak için yeterli değildir. Çünkü tükrük bezleri gibi pankreas dışı amilaz salgılayan organların vücutta bulunması lipaz aktivitesinde % 100'lük bir artışla birlikte pankreatitin bir göstergesi olabilir. Fakat Dressel ve arkadaşları Diazinon uygulanan köpeklerde amilaz ve lipaz aktivitesinin normal sınırlarda olmasına karşın birlikte histolojik olarak pankreatitin meydana geldiğini göstermişlerdir. CE grubunda ki yükselmenin 2. gün olması bize organofosfatlarla zehirlenmelerde pankreatitin ilk bir hafta içinde olabileceğini düşündürmektedir. Bu da klinik gözlemlerle uyumludur. Organofosfatların pankreatite neden olma mekanizmasının oksidatif stres ve aşırı kolinerjik uyarımla ile pankreas ve kanallarında aşırı basınç artışı olabileceği bildirilmiştir (1,10). Başka bir çalışmada akut organofosfat uygulamasının histopatolojik olarak pankreasta vakuol artışına neden olduğu ve bunun da pankreasta salgı artışının bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür (1,19-21). Fakat bu çalışmamızda görüldüğü gibi kolinesteraz aktivitesi anlamlı olarak azaltılmasına ve MDA düzeylerini de anlamlı olarak yükseltmesine karşın CE'nin tolare edilebilir maksimum dozunda pankreas enzimlerinden sadece amilaz aktivitesinin genç grupta 2. günde anlamlı olarak artırması pankreas hasarının bu dozda ratlarda hafif pankreatit yapabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca genç grupta 2. gün amilaz yükselişinin olması yetişkinlere göre genç ve çocuk yaştakilerin organofosfat zehirlenmelerinde pankreaslarının daha duyarlı olabileceğini düşündürülebilir, çünkü genç gruba 40 mg/kg dozunda CE verilmesine karşın erişkin gruba 70 mg/kg dozunda verilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre CE'nin tolare edilebilir maksimum dozunda hafif pankreatite neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca 2. gün amilaz aktivitesinde ki artış çocuk ve genç yaştakilerin erişkinlere göre CE'nin pankreas toksisitesine daha duyarlı olabileceklerini ve duyarlı dönemin ilk hafta içinde olabileceğini düşündürülebilir.

Kaynaklar

1. Hsiao CT, Yang CC, Deng JF, Bullard MJ, Liaw SJ. Acute pancreatitis following organophosphate intoxication. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1996;34:343-47.
2. Sahin I, Onbasi K, Sahin H, Karakaya C, Ustun Y, Noyan T. The prevalence of pancreatitis in organophosphate poisonings. *Hum Exp Toxicol.* 2002;21:175-77.
3. Hegyi P, Takacs T, Tiszlavicz L, Czako L, Lonovics J. Recovery of exocrine pancreas six months following pancreatitis induction with L-arginine in streptozotocin-diabetic rats. *J Physiol Paris.* 2000;94(1):51-5.
4. A.J. Bone, D.J. Gwillam, Animal models of insulin-dependent diabetes mellitus. 1998, Chapter 16, pp. 16.1-16.
5. The Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Car* 1999;22 (Supplement 1): S5-S19.
6. Rizos E, Liboropoulos, Kosta P, Efremidis S, Elisaf S. Carbofuran-induced acute pancreatitis. *JOP. J Pancreas* 2004; 5(1):44-7.
7. Gökalp O, Mollaoğlu H, Yılmaz HR, Altuntaş İ. Fenthion'un pankreas üzerine etkileri: Vitamin E ve C'nin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 10(2): 21-3.
8. Mollaoğlu H, Yılmaz HR, Gökalp O, Altuntaş İ. Methidathion'un pankreas üzerine etkileri: Vitamin E ve C'nin rolü. *Van Tıp Dergisi* 2003; 10: 98-100.
9. Tinoco R, Halperin D. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organo-phosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* 1998; 53: 29-35.
10. Gokalp O, Buyukvanlı B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, Koylu H. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Pes Bio and Phy*2005; 81(2): 123-8.
11. Demirin H, Büyükvanlı B, Öztürk Ö, Gökalp O, Yılmaz HR, Koyu A, Altuntaş İ, Köylü H. Karaciğerde organofosfat insektisit fosalonun yaptığı hasar: vitamin E ve C'nin etkileri. 30. Ulusal Fizyolojik Bilimler Kongresi. 31 Ağustos-3 Eylül 2004, Konya-TURKEY.
12. Dabrowski S, Hanke W, Polanska K, Makowiec-Dabrowska T, Sobala W. Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 2003;16:31-9.
13. Lotti M. Promotion of organophosphate induced delayed polyneuropathy by certain esterase inhibitors. *Toxicology* 2002;27:181-182:245-248. Carr RL, Richardson JR, Guarisco JA, Kachroo A, Chambers JE, Couch TA, Durunna GC, and Meek EC. Effects of PBC exposure on the toxic impact of organophosphorus insecticides. *Toxicol Sci* 2002;67:311-21.
14. Karalliadde L. Organophosphorus poisoning and anesthesia. *Anesthesia* 1999;54:1073-88.
15. Altuntaş İ, Delibaş N. The effects of Fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: The possible protective role Vitamins E and C. *Turk J Med Sci.* 2002;32:293-97.
16. Gültekin F, Delibaş N, Yaşar S, Kılınç İ. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 2001;75:88-96.
17. 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. *Toxicol* 1995;104:129-40.
18. Appenroth D, Frög S, Kersten L, Splinter FK. Protective effects of vitamin E and C on Cisplatin nephrotoxicity in developing rats. *Arch Toxicol*1997;71:677-83.
19. Dressel TD, Goodale RL Jr, Zweber B, Borner JW. The effect of atropine and duct decompression on the evolution of Diazinon-induced acute canine pancreatitis. *Ann Surg.* 1982 Apr;195(4):424-34.
20. Liu S, Oguchi Y, Borner JW, Runge W, Dressel TD, Goodale RL. Increased canine pancreatic acinar cell damage after organophosphate and acetylcholine or cholecystokinin. *Pancreas* 1990;5(2):177-82.
21. Panieri E, Krige JE, Bornman PC, Linton DM. Severe necrotizing pancreatitis caused by organophosphate poisoning. *J Clin Gastroenterol.* 1997;25:463-65.