

Endosülfan ve C Vitamini Uygulamalarının Erkek Yeni Zellanda Tavşanları Üzerindeki Etkisi

Özlem YILDIZ GÜLAY¹, Tülay BÜYÜKOĞLU², Fatma Şefika HATİPOĞLU^{1*},
Mehmet Şükrü GÜLAY¹

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

*Corresponding author e-mail: offermann.sefika@googlemail.com

ÖZ

Çalışmamızda endosülfan uygulaması yapılan erkek Yeni Zellanda tavşanlarında C vitamini (VitC) ilavesinin bazı kan ve biyokimyasal parametreler ile oksidan-antioksidan denge üzerine düzeltici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yaşları 6 ile 8 ay arasında değişen 24 tavşan, her grupta 6 tavşan olacak şekilde, rastgele 4 çalışma grubuna ayrıldı. Kontrol grubundaki tavşanlara (TRT-I) mısır yağı verildi. İkinci grupta bulunan tavşanlara (TRT-II) günlük 1 mg/kg endosülfan mısır yağında eritilerek verildi. Üçüncü gruptaki tavşanlara 20 mg/kg dozunda VitC gün aşırı olarak uygulandı (TRT-III). Son gruptaki tavşanlara (TRT-IV) aynı oranlarda endosülfan ve VitC verildi. Oral yolla yapılan bu uygulamalar 6 hafta boyunca devam etti. Çalışmamızda toplam eritrosit ve trombosit, hemoglobin, hematokrit, ve lökosit değerleri yönünden gruplar arasında fark gözlenmezken, toplam lökosit sayılarında anlamlı bir fark bulundu. Ayrıca serum glukoz, alanin aminotransferaz (ALT), malondialdehit (MDA), glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (G6PD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve eritrosit katalaz (CAT) aktivitelerinde de farklılık tespit edilmedi. TRT-III grubunda serum VitC seviyesi yükselirken, TRT-II grubunda serum alkalin fosfat (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri arttı. Bununla birlikte VitC uygulamasının TRT-IV grubundaki tavşanlarda ALP ve AST seviyelerini TRT-II grubuna göre azalttığı gözlemlendi. Elde edilen bulgulara göre, VitC uygulamasının endosülfanın bazı zararlı etkilerine karşı erkek Yeni Zellanda tavşanlarında koruyucu olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: kan parametreleri, biyokimyasal parametreler, oksidan-antioksidan denge, endosülfan toksikasyonu, insektisit kullanımı, Vitamin C

Effects of Vitamin C on Male New Zealand White Rabbits Exposed to Endosulfan

ABSTRACT

The present study evaluated the protective effect of oral Vitamin C (VitC) against changes in hematological and biochemical parameters, and oxidant-antioxidant status in male New Zealand White rabbits treated with endosulfan. Total of 24 rabbits (6 to 8 years old) were randomly divided into 4 treatment groups (n=6). Rabbits in the control group (TRT-I) received corn oil for 6 weeks. Rabbits in the second group (TRT-II) received endosulfan (1 mg/kg bw per day) in corn oil. Rabbits in the third group (TRT-III) received corn oil daily and VitC (20 mg/kg bw) every other day for 6 weeks. Rabbits in the last group (TRT-IV) received the same amounts of endosulfan and VitC. All treatments were administered by oral route. Although total erythrocyte, trombocyte, hemoglobin and percent hematocrit, lymphocyte, granulocyte and monocyte did not differ among the treatment groups, total leukocyte numbers differed due to treatment. The serum glucose, alanine aminotransferase (ALT), malondialdehyde (MDA), glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathion peroxidase (GPx), and erythrocyte catalase (CAT) in treatment groups were similar. However, serum VitC levels were elevated for rabbits in TRT-II group. In addition, serum alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST) levels increased in the TRT-II group, whereas VitC application decreased ALP and AST levels in the TRT-IV group when compared to the TRT-II group. Thus, results suggested beneficial influences of VitC in neutralizing some harmful effects of endosulfan in male New Zealand White rabbits.

Keywords: blood parameters, biochemical parameters, oxidant-antioxidant status, endosulfan toxication, insecticide use, Vitamin C

To cite this article: Gülay Yıldız Ö. Büyükoğlu T. Hatipoğlu F. Ş. Gülay M. Ş. Endosülfan ve C Vitamini Uygulamalarının Erkek Yeni Zellanda Tavşanları Üzerindeki Etkisi. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(2): 165-172.

GİRİŞ

Endosülfan tarım ürünleri yetiştiriciliğinde bitkileri zararlılardan korumak için dünya çapında ve Türkiye’de de sıkça kullanılan organik klorlu bir insektisitlerdir. Sebze ve meyve zararlılarını kontrol altına almakta kullanılan endosülfan (6,7,8,9,10,10 – hexachloro - 1,5,5a,6,9,9a – hexahydro - 6,9 – methano -2,4,3– benzodioxathiepin – 3 - oxide) geniş spektrumlu, cycloidiene grubuna ait organoklorlu pestisitlerden birisidir (Zhang ve ark, 2017). Ziraî mücadele ilacı olarak bitkilerdeki insektisitlere karşı oldukça etkili bir ilaç olmasına rağmen, bitkilerde ve sularında yüksek konsantrasyonlarda birikebilmekte (Menezes ve ark, 2017; Simonich ve Hites 1995; Xu ve ark., 2016), insan ve hayvanlarda akut toksisiteye de sebep olabilmektedir (Sharma ve ark, 2017). Endosülfanın LD50 dozu uygulama yoluna, türe, içinde bulunduğu maddenin türüne ve hayvanın cinsiyetine göre değişir. Oral LD50 dozu ratlar için 9.6 -160 mg/kg, fareler için 13.5 - 35 mg/kg arasında bulunmuştur (Bremer ve Leist 1998).

Akut endosülfan intoksikasyonunun insanlarda metabolik asidoza, yüksek anyonik duruma, hiperglisemiye ve trombositlerde azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır (Blanco ve ark. 1992). Endosülfanın, eritrosit sayısını azalttığı, eritrosit glutatyon redüktaz (GR) düzeyi ve aktivitesini, kan hemoglobün konsantrasyonu ve MCV’ü düşürdüğü rapor edilmiştir (Naqvi ve Vaishnavi 1993). Yine aynı çalışmada glukoz 6–fosfataz aktivitesi ve kan glukoz düzeyinde artma, plazma Ca düzeyinde ve Na, K, Mg ATPaz düzeylerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Endosülfanın önemli sitotoksik etkiye sahip olduğu, endosülfana maruz kalan fagositik hücrelerin metabolik aktiviteleri ile migrasyonlarını ve lenfositlerin mitojenik aktivasyonlarını önemli ölçüde baskıladığı bildirilmiştir (Pistl ve ark. 2003). Bir başka çalışmada da 0,001 g/ ml (1 ppb) endosülfanın insan eritrosit membran yapısını bozduğu tesbit edilmiş olup, 1g/ml (1ppm) endosülfan konsantrasyonunda hücrelerin belirgin şekilde zarar gördükleri rapor edilmiştir (Daniel ve ark. 1986).

Endosülfan etkisine maruz bırakılan balıklarda da katalaz (CAT) aktivitelerinin endosülfanın düşük dozlarında arttığı, yüksek dozlarında ise azaldığı saptanmıştır (Dorval ve ark. 2003). Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi önemli şekilde azalırken, glutatyon transferaz (GST) aktivitesi artmıştır. Adrenokortikal steroidogenik hücrelerin sekretorik cevaplarının azalması dolayısıyla GPx aktivitesi için önemli kofaktör olan glukokortikoid düzeylerinin düştüğü, oksidatif stres yolunda iş gören enzimlerin aktivitelerinin de değiştiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada lipid

hidroperoksit düzeylerinin yükselmesi, endosülfanla oluşturulan oksidatif stresin bir bulgusu olarak değerlendirilmiştir (Dorval ve ark. 2003).

Vitamin C (VitC), meyve ve sebzelerde doğal olarak üretilen bir antioksidandır. Organik gübrelerle yetiştirilen fakat pestisit kullanılmayan ürünlerde yüksek düzeyde VitC ölçülmüş ve pestisitten fakir ürünlerin daha fazla antioksidan içerdikleri tesbit edilmiştir. VitC, memeli hayvanlarda bağırsaklardan emilen, canlı vücudunda plazmada ve hücreler içerisinde bulunan primer bir antioksidan olup plazma membranları ile etkileşim halindedir ve α tokoferolün geri dönüşümünü sağlayarak membran lipidlerini peroksidasyondan korur (May 1999). VitC, belirli enzimlerin redükte formda tutulmasını sağlayarak dokuları zararlı oksidatif ürünlerden korumaktadır (Padh 1990).

Subakut endosülfan zehirlenmesi ile ilgili çalışmaların çoğu rat ve fareler üzerine olup, tavşanlarda oral endosülfan alımının etkisi üzerine sınırlı bilgiler mevcuttur. Endosülfanın oral yolla verilmesinin sebebi, tehlikeli bölgelerde yaşayan insanların genellikle endosülfan etkisine bu şekilde maruz kalmasından dolayıdır. Bu çalışmanın amacı, endosülfanın bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler, ve oksidan-antioksidan denge üzerine etkisini ve normal değerlerinden sapan bulguların VitC ile düzeltilebilirliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Etik Komitesi tarafından onaylanan bu çalışmada (2004.01.0108.001) Pera Tavşan Firmasından (Yeşilyurt-ANTALYA) tedarik edilen 6–8 aylık ve ağırlıkları 2,8–3,7 kg arasında değişen 24 adet erkek Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar galvanize kafeslerde bireysel olarak tutuldular ve çalışmaya başlamadan önce 1 ay boyunca laboratuvar şartlarına (10 saat aydınlık 14 saat karanlık ve 24 ± 5 °C) alıştırdılar. Çalışma süresince tavşanların ağırlıkları haftalık olarak tartıldı ve ağırlıklarına göre doz ayarlaması yapıldı. Su ve yem ad libitum olarak verildi. Tavşanlar standart ticari tavşan yemi (Burdur Ekinciler yem fabrikasının, % 88 kuru madde, %9 kül, %16 ham protein, %15 ham sellüloz ve 2600 kcal/kg metabolize olabilir enerji içeren) ile beslendiler.

Çalışma Grupları

Erkek tavşanlarda, oral subakut endosülfan toksisitesi oluşturmak amacıyla uygulanacak dozun belirlenmesi için, bu araştırmaya başlamadan önce ön denemeler yapıldı. Ön denemelerde endosülfanın günlük 1.50 mg/kg canlı ağırlık oral doz uygulamalarının, endosülfan toksisitesine bağlı olarak, ölüm ile sonuçlandığı gözlemlendi

(Hatipoglu ve ark, 2008). Bu yüzden en yüksek metabolik etki ve en düşük ölüm oranını elde etmek için endosülfanın oral dozu günlük 1,0 mg/kg canlı ağırlık olarak belirlendi. Buna rağmen, araştırmamız sırasında, TRT-II ve IV gruplarından birer tavşanda endosülfan zehirlenmesine bağlı ölüm gözlemlendi. Çalışmanın ilk 4 haftası alıştırma dönemi, sonraki 6 haftası ise deneysel çalışma dönemi olarak planlandı. Tavşanlar her grupta 6 tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldılar. Gruplardaki çalışma protokolu aşağıdaki gibidir (n = 6).

TRT-I: Kontrol grubu: günlük mısır yağı oral (3 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı);

TRT-II: Endosülfan grubu: günlük endosülfan (1 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içerisinde (1 mL mısır yağı 3 mg endosülfan);

TRT-III: Vitamin C grubu: günlük mısır yağı oral (3 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı) + VitC, iki günde bir (20 mg/kg canlı ağırlık) çeşme suyu içerisinde (1 mL çeşme suyu 20 mg VitC);

TRT-IV: Endosülfan ve Vitamin C grubu: günlük endosülfan (1 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içinde (1 mL mısır yağı 3 mg endosülfan) + VitC, iki günde bir (20 mg/kg canlı ağırlık) çeşme suyu içerisinde (1 mL çeşme suyu 20 mg VitC).

Tavşanlara yaklaşık 3 kg canlı ağırlık için 1 ml mısır yağı verildi. Endosülfan ve VitC'nin dozu haftalık canlı ağırlığa göre ayarlandı. Her tavşan için hesaplanan uygun doz, sıringaya tespit edilmiş olan plastik gavaj ile özafaringeal bölgeye uygulandı. Denemenin son günü 12 saat aç bırakılan tavşanların kulak arterlerinden kan örnekleri alınarak hematolojik ve biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler

Hematolojik parametreler (eritrosit sayısı, hematokrit, lökosit sayısı ve trombositler) tam otomatik hematolojik analiz cihazında (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica GmbH, Germany) ölçüldü. Eritrositlerin sedimentasyon hızları rutin Westergren metoduyla 1 saatlik çökme seviyelerinin okunması suretiyle belirlendi (Jou ve ark, 2011). Eritrositlerin frajiliteleri, spektrofotometrik olarak % 50 hemolizin görüldüğü tuz çözeltileri ile saptanarak takip edildi (Bucher 1988). Özetle, içlerinde NaCl yoğunlukları % 0,85 ile %0,30 arasında değişen 12 tüp hazırlandı (toplam hacim 1 ml). Onüçüncü tüpe ise distile su (%0,0 NaCl) ilave edildi. Her tüpe 0,1 ml kan eklendi. İçerik hafifçe karıştırıldı. Tüpler 26-27 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra 1500 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatantlar küvete aktarıldı. Spektrofotometre aracılığıyla küvetteki hemoglobün miktarı 540 nm'de okundu. Hemoliz yüzdesi test tüpünden elde edilen

okumanın %0,0'lık NaCl tüpündeki okumasına bölünerek ve daha sonra 100 ile çarpılarak hesaplandı (Shimadzu Recording Spectrophotometer UV-1601, Japan). Plazma C vitamini fosfotungstat metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Deneyin prensibi askorbik asidin alkali ortamda fosfotungstik asit ile okside edilmesi ve fosfotungstik asidi indirgemesi sonucu mavi rengin oluşumu esasına dayanır. Meydana gelen mavi renkli çözelti daha sonra spektrofotometre aracılığıyla 690 nm dalga boyunda absorbanı ölçüldü (Kyaw 1978).

Plazma glukozu, primer aromatik bir amin olan o-toluidin'in sıcak glasiyal asetik asit içinde glukozun terminal aldehit grubuyla mavi-yeşil bir renk oluşturmak üzere reaksiyona girmesi prensibine dayalı o-toluidin metoduna göre (Feteris, 1965) belirlendi. Eritrosit CAT aktivitesi; Aebi'nin (1984) tanımladığı metoda göre kısaca serumun, hidrojen peroksit içeren fosfat tamponuyla (30mM, pH 7.0) reaksiyonu sonucu 240nm'deki absorbanındaki azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GPx, Beutler'in (1975) metoduna göre ölçüldü. Bu metoda göre, redükte glutatyon (GSH) t-butil hidroperoksit varlığında GPx aktivitesiyle okside glutatyon (GSSG) dönüşür ve GSSG glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'ye indirgenir ve NADP⁺ meydana gelir. GPx aktivitesi, NADPH'in NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorban farkının 340 nm'de okunmasıyla belirlenir. Plazma Malondialdehid (MDA) düzeyi, MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyona dayalı spektrofotometrik metotla (Satoh, 1978) ve G6PD enzim aktivitesindeki değişimler, spektrofotometrede 37 °C'ta Beutler'in (1983) metoduna göre tespit edildi. Bu metod, substrat glukoz 6-fosfat ve kofaktör NADP'nin G6PD tarafından NADPH'a indirgenmesi esasına dayanır. G6PD aktivitesine bağlı olarak artan NADPH'ın 340 nm'deki absorban değişimi ölçüldü. Enzim aktivitesi, IU.gHb⁻¹.dak⁻¹ (37°C, pH 8.0) olarak açıklandı (IU: 37°C'de dakikada 1mmol NADP⁺ yi indirgeyen enzim miktarıdır). Diğer biyokimyasal parametreler (ALT, AST ve ALP) ise otoanalizör (Roche Modular PP otoanalizör, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Bütün değerler ortalama değerler olarak verildi. İstatistiksel değerlendirme için SAS (PROC GLM prosedürü) istatistik programından faydalandı. Gruplar arası farklılığı karşılaştırmak için "Dunnett post hoc" analizi yapıldı. Gruplar arası farklılık P< 0,05 olduğunda önemli olarak kabul edildi.

BULGULAR

TRT-II ve TRT-IV gruplarından birer tavşan, tipik endosülfan toksisitesi (hipereksitabilite, dispne, hiperpne, tremor ve tonik-klonik konvulsyonlar, kafes duvarlarına çarpma, depresyon, göğüs üzerine yatarak ön ayakların ekstensiyonu) göstererek öldüğü için çalışmadan çıkarıldı. Kontrol ve çalışma grupları arasında ise canlı ağırlık bakımından farklılık görülmedi (Tablo 1).

Hematolojik parametreler arasında sadece lökosit sayısının ve eritrosit sedimentasyon hızının (ESR), biyokimyasal parametrelerden ise VitC, ALP ve AST değerlerinin etkilendiği görülmektedir (Tablo 1 ve 2). Lipit peroksidasyon belirteci olan serum MDA düzeyi ve serum G6PD, GPx enzim aktiviteleri ile eritrosit CAT aktivitesi de gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (Tablo 2). Benzer bir şekilde, eritrosit sayısında, hemoglobün ve hematokrit değerlerinde, lenfosit, granülosit, monosit yüzde oranlarında ve trombosit sayısında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Tablo 1).

Lökosit değerleri TRT-I, TRT-II ve TRT-III gruplarında birbirlerinden farklı değilken, TRT-IV grubunda bulunan tavşanlarda lökosit değerleri TRT-I ve II gruplarına göre bir düşüş göstermiştir. Eritrosit sedimentasyon hızının endosülfanın etkisi ile arttığı (TRT-II), TRT-IV grubundaki tavşanlarda ise VitC ilavesinin sedimentasyon hızını TRT-I grubundaki seviyelere düşürdüğü müşahade edilmiştir (Tablo 1).

TRT-III grubunda ise lökosit değerlerinde bir azalma gözlenmiş olmakla birlikte, bu azalma kontrol grubuna göre önemli bulunmamıştır. VitC

uygulanmasının, lökositlerin sayısındaki bu düşüşe engel olamadığı görülmektedir (Tablo 1). Serum VitC düzeyinde ise, TRT-IV grubunda, TRT-I ve II gruplarına göre fark gözlenmezken, TRT-III grubuyla karşılaştırıldığında azalma saptanmıştır. TRT-II grubundaki serum VitC düzeyleri, TRT-I ve III gruplarına göre önemli ölçüde azalırken, TRT-III grubunda diğer gruplardan daha yüksek serum VitC düzeyi tespit edilmiştir (Tablo 2).

Serum glukoz düzeyleri TRT-II grubunda TRT-I grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen, bu yükselme istatistiksel önemde bulunmamıştır. TRT-III grubunda ise serum glukoz düzeylerinde bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş de TRT-I grubuna göre önemli bulunmamıştır (Tablo 2).

Serum ALT enzim aktivitesinde, gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Fakat, TRT-II grubunda serum ALP ve AST seviyelerinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenmiştir. Endosülfan ile birlikte yapılan VitC uygulamasının ise ALP ve AST seviyelerini TRT-I grubu düzeylerine düşürdüğü gözlenmiştir (Tablo 2).

TRT-I, II ve IV gruplarında % 0,55 NaCl konsantrasyonunda eritrositlerin % 50'sinin dayanıksız olduğu tesbit edilirken, VitC uygulanan grupta osmotik fragilite oranının aynı tuz konsantrasyonunda % 40'da kaldığı görüldü. Eritrositlerin %70-80'i, %0,50'lik NaCl konsantrasyonunda hemoliz olurken, VitC uygulanan grupta bu oranın %60'ta kaldığı gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiksel bir önem olmamasına karşın, VitC uygulanan grupta eritrositlerin diğer gruplara nazaran daha dayanıklı olduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Endosülfan ve C vitamini uygulanan erkek Yeni Zellanda Tavşanlarında vücut ağırlıkları ve hematolojik parametreler.

Table 1. Final body weights and hematological parameters of male New Zealand White rabbits treated with endosulfan and Vitamin C

	TRT-I (n=6)	TRT-II (n=5)	TRT-III (n=6)	TRT-IV (n=5)	P<
Canlı ağırlık (g)	3031,9±142,6	3156,7±156,2	3162,4±141,6	2980,7±154,2	NS
Eritrosit (x10 ⁶ /μl)	6,99±0,19	6,91±0,23	6,60±0,20	6,63±0,24	NS
Hb (g %)	13,45±0,81	12,76±0,46	13,07±0,39	13,56±0,45	NS
Htc (%)	40,65±0,81	38,00±0,96	37,39±0,82	38,96±0,96	NS
Lökosit (x 10 ³ /μl)	9,13±0,58 ^a	8,41±0,69 ^a	7,91±0,59 ^{ab}	6,27±0,70 ^b	0,04
Lenfosit (%)	39,97±2,41	37,82±2,85	35,82±2,42	41,20±2,86	NS
Granulosit (%)	52,46±2,78	49,26±3,31	52,59±2,80	45,90±3,30	NS
Monosit (%)	11,49±0,86	12,88±0,98	11,57±0,86	12,68±1,02	NS
Trombosit (x10 ³ /μl)	480,8±34,5	471,5±35,3	438,5±34,6	407,3±40,9	NS
ESR (mm/saat)	2,5±0,82 ^{ab}	4,33±0,89 ^a	1,14±0,83 ^b	2,99±1,05 ^{ab}	0,05

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık vardır (p<0,05). NS= p>0,1.

TRT-I= Kontrol, TRT-II= 1mg/kg endosülfan, TRT-III=20 mg/kg vitamin C, TRT-IV= 1mg/kg endosülfan + 20 mg/kg vitamin C; ESR=Eritrosit sedimentasyon hızı.

Tablo 2. Endosülfan ve C vitamini uygulanan erkek Yeni Zellanda Tavşanlarında kan antioksidan enzimleri ve biyokimyasal parametreler.

Table 2. Blood antioxidant enzymes and biochemical parameters of male New Zealand White rabbits treated with endosulfan and Vitamin C.

	TRT-I (n=6)	TRT-II (n=5)	TRT-III (n=6)	TRT-IV (n=5)	P<
Glukoz (mg/dl)	139,9±7,69	148,6±7,79	121,8±7,37	128,2±8,56	NS
Vitamin C (mg/dl)	1,60±0,04 ^a	1,43±0,05 ^b	1,72±0,04 ^c	1,53±0,06 ^{ab}	0,01
MDA (nmol/ml)	1,73±0,14	1,51±0,14	1,77±0,12	1,44±0,15	NS
G6PD (U/gHb)	3,78±0,48	3,61±0,61	3,90±0,47	4,88±0,56	NS
GPX(U/gHb)	11,23±0,74	12,23±0,83	12,07±0,79	12,95±0,92	NS
ErKat (U/gHb)	23,17±1,24	24,13±1,29	25,99±1,15	22,97±1,43	NS
ALP (IU/l)	71,2±9,9 ^a	131,5±13,4 ^b	70,7±11,5 ^a	86,9±15,8 ^a	0,02
AST(IU/l)	26,7±4,1 ^a	41,3±5,3 ^b	23,6±3,8 ^a	30,4±4,9 ^a	0,03
ALT(IU/l)	41,6±4,3	47,0±5,6	46,5±1,15	49,5±5,8	NS

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık vardır (p<0,05). NS=p>0,1.

TRT-I= Kontrol, TRT-II= 1mg/kg endosülfan, TRT-III=20 mg/kg vitamin C, TRT-IV= 1mg/kg endosülfan + 20 mg/kg vitamin C; MDA= Malonil dialdehid, G6PD= Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz, GPX= Glutasyon peroksidaz, ErKat= Eritrosit Katalaz

TARTIŞMA

Endosülfan, Türkiye dahil bir çok ülkede tarımsal mücadelede kullanılan güçlü bir insektisittir. Dünya Sağlık Örgütü, endosülfanı orta şiddette zehirli olarak sınıflandırmasına rağmen, akut ölüm oluşturacak kadar şiddetli zehirlenmeye de sebep olabilmektedir (Xu ve ark. 2017).

Çalışmamızda, hematolojik parametreler arasında sadece lökosit sayısının etkilendiği görülmektedir. Lökosit değerleri TRT-I, II ve III gruplarında birbirlerinden farklı değilken, VitC'nin ES ile birlikte verildiği TRT-IV grubunda diğerlerinden farklı olmak üzere bir düşüş olmuştur. Endosülfan total lökosit sayısında azalmaya neden olmakla birlikte, sadece TRT-IV grubunda diğerlerine göre istatistiksel önem arz etmektedir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz VitC dozunun lökositlerin sayısındaki bu düşüşe engel olamadığı görülmektedir. Kanatlılarda yapılan bir çalışmada günlük 30 ppm dozunda verilen endosülfanın beyaz kan hücreleri üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir (Singh ve ark. 2016). Ratsların kullanıldığı farklı bir çalışmada günlük ortalama alım dozunun 100 katı kadar olan (0,6 mg/kg) endosülfan uygulamalarında hiçbir parametrede değişiklik oluşmazken, doz 1000 (6,12 mg/kg) katına çıkarıldığında lökosit sayısında bir düşüşün olduğu bildirilmiştir (Akay ve ark. 1999). Endosülfanın bu etkisinin lökosit göçünü inhibe ederek, lökosit apoptozisini uyarak veya lökositler üzerindeki olası mutajenik ve genotoksik etkileri sebebiyle olabileceği belirtilmiştir (Akay ve ark. 1999; Kannan ve ark. 2000).

ESR, akut faz yanıtını değerlendirmede kullanılan parametrelerden biridir. Akut faz yanıtı ise doku hasarı varlığının belirlenmesi için kullanılacak iyi bir veridir. Doku hasarı geliştiğinde özellikle serum fibrinojen, serum amiloid A proteini ve C-reaktif protein miktarı artar (Gabay ve Kushner 1999). Ayrıca, serum karaciğer enzim seviyelerindeki azalmanın ESR'yi azalttığı, artışın ise ESR'de artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Targer ve ark, 2008). Endosülfanın farklı dozlarda uygulandığı önceki çalışmamızda, tavşanlarda özellikle karaciğer ve böbreklerde doku hasarına yol açtığı gözlenmiştir (Hatipoglu ve ark, 2008). Ayrıca, çalışmamızdaki karaciğer enzimlerindeki artış da bu hasarı desteklemektedir. Çalışmamızda ESR değerleri TRT-II grubundaki tavşanlarda TRT-III grubundakilere göre yükselmesine rağmen, endosülfanla birlikte VitC verilen grupta (TRT-IV) ESR değerlerindeki artışın engellendiği gözlenmektedir. Bu durum, karaciğer enzimlerindeki değişime paralel olarak, VitC'nin endosülfanın oluşturduğu doku hasarı üzerine düzeltici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Daha önceki araştırmalarda da gözlemlendiği gibi (Naqvi ve Vaishnavi 1993; Narra ve ark. 2015; Kumar ve ark 2016) serum glukoz düzeyleri TRT-II grubunda TRT-I grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen, bu yükselme istatistiksel önemde bulunmamıştır. TRT-III grubunda ise glukoz seviyelerinde düşme gözlenmiş, ancak bu da TRT-I grubuna göre önemli bulunmamıştır. Endosülfan uygulamalarıyla, muhtemelen karaciğer hasarına ve strese bağlı olarak meydana gelebilecek serum glukoz artışının, VitC uygulamaları ile düzeltilebileceği daha önce de bildirilmiştir (Narra ve ark. 2015). VitC uygulamalarının, antioksidan özelliğiyle karaciğer hasarını önleyici olabileceği ve

stresi azaltarak glikojen yıkımındaki olası artışı engelleyebileceği düşünülmektedir (Narra ve ark. 2015).

VitC düzeyi ise, TRT-IV grubunda TRT-I grubuna göre fark göstermezken, TRT-II grubunda önemli şekilde düşmüş, TRT-III grubunda ise muhtemelen VitC yüklemesine bağlı olarak yükselmiştir. Ancak, lökosit seviyelerinde gözlemlendiği gibi, TRT-IV grubundaki tavşanların serum ViC seviyelerindeki düşüşün, sadece VitC uygulanan TRT-III grubuyla kıyaslandığında, engellenemediği gözlenmiştir.

Çalışma gruplarındaki tavşanların canlı ağırlıklarında, eritrosit sayısında, hemoglobün, hematokrit, lenfosit, granülosit, monosit ve trombosit değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Tür farklılığı olmakla birlikte, Pal ve arkadaşlarının (2004) broyler tavuklarda yapmış olduğu çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Uygulanan endosülfan dozunun hematolojik parametreler üzerine, deneme süresi içerisinde etkisinin çok sınırlı kaldığı saptanmıştır. Endosülfan toksikasyonundan en fazla etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir (Blanco-Coronado ve ark. 1992; Segasothy ve Pang 1992). Endosülfanın atılımı dışkı ve idrarla olduğundan birikim en fazla bu organlarda şekillenir. Serum ALT, AST ve ALP, karaciğer fonksiyonları hakkında bilgi veren önemli enzimlerdir. Karaciğer dokusunda bir dejenerasyon olduğunda, bu enzimlerin serum seviyelerinde bir artış gözlenmektedir (Henderson ve Moss 2005). Çalışmamızda endosülfan uygulamalarının erkek tavşanlarda ALP ve AST enzimlerinin serum seviyelerini artırdığı sonucuna varılmıştır. Daha önce yaptığımız çalışmada gözlemlediğimiz karaciğer dokusundaki hasar da bu bulguları desteklemektedir (Hatipoglu ve ark. 2008). Farelerde yapılan benzer bir çalışmada da endosülfanın karaciğer enzimlerini yükselttiği belirtilmiştir (Mansour ve ark. 2017). Bu enzimlerin yükselme derecesi hepatoselüler fonksiyon kaybı ile doğru orantılıdır. Endosülfanın oksidatif stresi artırdığı ve organlarda toksisiteye sebep olabileceği konusunda çalışmalar mevcuttur (Korkmaz ve ark. 2010; Daidoji ve ark. 2003). Bu durumun reaktif oksijen ürünlerinde ve serbest radikal seviyelerinde artışa sebep olarak, prooksidan ve antioksidan dengesini bozduğu ve karaciğer dokusunda harabiyete sebep olduğu ileri sürülmüştür (Videla 2009). Endosülfanın VitC ile beraber verildiği TRT-IV grubunda ise bu enzim seviyelerinin yükselmediği, bilakis kontrol düzeylerinde kaldığı gözlenmiştir. Kuvvetli bir antioksidan olan VitC bu etkisini reaktif oksijen türlerini (ROS) sistemden uzaklaştırarak, lipid peroksidasyonunu baskılayarak veya dolaylı yoldan antioksidan savunma sistemini koruyarak göstermiş olabilir.

Etki mekanizması ile ilgili in vitro çalışmalar; endosülfanın oksidatif fosforilasyona karışmadığını (Kannan ve Jain 2003), endojen antioksidanların ve karaciğer superoxide dismutaz (SOD) aktivitesinde azalma meydana getirdiğini (Bebe ve Panemangalore 2003), ve ROS'un ve dolayısıyla ortaya çıkan oksidatif stresin (Sohn ve ark. 2004) dokularda hasara yol açtığını (Rao ve ark. 2005) göstermiştir. Vitamin C'nin iyileştirici etkisi, pek çok metabolik yolda ortaya çıkan toksik etkili serbest oksijen radikallerini yakalamasına ve güçlü bir antioksidan olmasına atfedilmektedir (Dawson ve ark. 1992).

SONUÇ

Çalışmamızda uygulanan endosülfan dozlarının (1mg/kg canlı ağırlık, oral doz) hematolojik parametreler üzerine etkisinin sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Endosülfan etkisiyle ortaya çıkan lökosit sayısındaki azalmanın, VitC uygulamaları ile engellenemediği görülmektedir. Ayrıca, uygulanan endosülfan dozunda, antioksidan enzim aktivitesinde ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeylerinde de önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Buna rağmen, endosülfan toksikasyonunda karaciğer enzimlerinde (ALP ve AST) artış görülmüş ve Vit C'nin bu artışı normal seviyelerine düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak, tavşanlarda subakut endosülfan toksikasyonunun, karaciğer enzimlerindeki düşüş göz önüne alındığında, VitC'nin hücre koruyucu özelliği dolayısı ile endosülfan intoksikasyonunda yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yardımlarından dolayı Sayın Mehmet Uğur Özceylan'a, Sayın Bedri Başakın'a ve Data Medikale teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Akay MT, Ozmen G, Elcuman EA.** Effects of combinations of endosulfan, dimethoate and carbaryl on immune and hematological parameters of rats. *Vet Hum Toxicol.* 1999; 41(5):296-9.
- Bebe FN, Panemangalore M.** Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J Environ Sci Health B.* 2003; 38: 349-363.
- Beutler E.** Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In: *The Metabolic Bases of the Inherited Disease*, Ed; Mc Graw-Hill

- Education - Europe, 8th Ed., Mc Graw-Hill Medical, New York, USA. 1983; pp. 1629-1653.
- Beutler E.** Red Cell Metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods, Grune and Straton, New York, USA. 1975; pp.67-69.
- Blanco-Coronado JL, Repetto M, Ginestal RJ, Vicente JR, Yelamos F, Lardelli A.** Acute intoxication by endosulfan. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1992; 30(4): 575-583.
- Bremer JN, Leist KH.** Endosulfan (AE F002671, substance technical). Valuation of the acute oral and dermal toxicity. Hoechst document A59823, Frankfurt, Germany, 1998.
- Bucher U.** Labormethoden in der Haematologie. Verlag Hans Huber, Bern. 1988.
- Daidoji T, Inoue H, Kat S, Yokota H.** Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metabolism Disposal.* 2003; 31: 993-998.
- Daniel CS, Agarwal S, Agarwall SS.** Human red blood cell membrane damage by endosulfan. *Toxicol Lett.* 1986; 32 (1-2), 113-118.
- Dawson EB, Harris WA, Powell LC.** Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Rev Nutr Diet.* 1990; 62: 1–26.
- Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC.** Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril.* 1992; 58: 1034–1039.
- Dorval J, Leblond VS, Hontela A.** Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorin pesticide. *Aquat Toxicol.* 2003; 63(3): 229-241.
- Feteris WA.** A serum glucose method without protein precipitation. *Am J Med Technol.* 1965; 31: 17-21.
- Gabay C, Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England J Med.* 1999; 340:448-454.
- Hatipoglu FS, Gulay MS, Balic A, Yildiz-Gulay O, Volkan S.** Subacute Oral Toxicity of Endosulfan in Male New Zealand White Rabbits. *Toxicol Mechanisms Methods.* 2008; 18: 705-710.
- Henderson AR, Moss DW.** Tietz fundamentals of clinical chemistry. Ed; Burtis CA, Ashwood ER, Lubbock, Texas, USA. 2005; 352-392.
- Jou J, Lewis S, Briggs C, Lee S, De La Salle B, McFadden S.** ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol.* 2011; , 33, 125-132.
- Kannan K., Holcombe RF, Jain SK, Alvarez-Hernandez X, Chervenak R, Wolf RE, Glass J.** Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Mol Cell Biochem.* 2000; 205: 53-66.
- Kannan K, Jain SK.** Oxygen radical generation and endosulfan toxicity in Jurkat T-cells. *Mol Cell Biochem.* 2003; 247: 1-7.
- Korkmaz A, Ahabab MA, Kolankaya D, Barlas N.** Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(10): 2865-2871.
- Kumar N, Ambasankar K, Krishnani KK, Gupta SK, Bhushan S, Minhas SP.** Acute toxicity, biochemical and histopathological responses of endosulfan in *Chanos chanos*. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2016; 131: 79-88.
- Kyaw A.** A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clinica Chimica Acta.* 1978; 86(2):153-157
- Mansour S, Abdel-Mageed M, Mohamed K, Gad M, Gamet-Payrastre L.** Adverse Effects to Suckling Mice Following Indirect Exposure to a Pesticide Mixture and Ameliorative Effect of α -Tocopherol Coadministration. *J Basic Clin Health Sci.* 2017; 3: 71-78.
- May MJ.** Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* 1999; 13: 995-1006.
- Menezes RG, Qadir TB, Moin A, Fatima H, Hussain SA, Madadin M, Pasha SB, Al Rubaish FA, Senthilkumaran S.** Endosulfan poisoning: An overview. *J Foren Legal Med.* 2017; 51: 27–33.
- Naqvi SM, Vaishnavi C.** Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to nontarget animals *Comp Biochem Physiol C.* 1993; 105(3):347-361.
- Narra MR, Rajender K, Reddy RR, Rao JV, Begum G.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere.* 2015; 132: 172-178.

- Padh H.** Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 1990; 68: 1166-1173.
- Pal AK, Jadhao SB, Garg UK, Jha GJ.** Haemato-biochemical ve immuno-pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *Int Immunopharm.* 2004; 13(4): 1709-1722.
- Pistl J, Kovalkovicova N, Holovska VV, Legath J, Mikula I.** Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro. *Toxicology.* 2003; 188 (1):73-81.
- Rao M, Narayana K, Benjamin S, Bairy KL.** L-Ascorbic acid ameliorates postnatal endosulfan induced testicular damage in rats. *Indian J Physiol Parmacol.* 2005; 49: 331–336.
- Satoh K.** Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 1978; 90: 37-43.
- Segasothy M, Pang KS.** Acute interstitial nephritis due to endosulfan. *Nephron.* 1992; 62: 118.
- Sharma S, Dewan A, Singh G.** Toxicovigilance: an inevitable prerequisite to keep a watch on toxins around you. *J Forensic Leg Med.* 2017; 45: 32–35.
- Simonich SL, Hites RA.** Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science.* 1995; 29:1851–1854.
- Singh PP, Kumar A, Chauhan RS, Pankaj PK.** Effect of endosulfan on immunological competence of layer birds. *Veterinary World.* 2016; 9: 777-782.
- Sohn H, Kwon C, Kwon G, Lee J, Kim E.** Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan induced oxidative damage. *Toxicol Lett.* 2004; 151: 357–365.
- Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, Zoppini G, Muggeo M, Day CP.** NASH Predicts Plasma Inflammatory Biomarkers Independently of Visceral Fat in Men. *Obesity.* 2008; 16(6):1394-1399.
- Xu D, Li S, Lin L, Qi F, Hang X, Sun Y.** Gene expression profiling to identify the toxicities and potentially relevant disease outcomes due to endosulfan exposure. *Toxicol Res.* 2016; 5: 621-632.
- Xu D, Liu T, Lin L, Li S, Hang X, Sun Y.** Exposure to endosulfan increases endothelial permeability by transcellular and paracellular pathways in relation to cardiovascular diseases. *Environ Pollut.* 2017; 223: 111–119.
- Videla LA.** Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatology.* 2009; 1: 72-78.
- Zhang P, Zhu W, Wang D, Yan J, Wang Y, Zhou Z, He L.** A combined NMR- and HPLC-MS/MS-based metabolomics to evaluate the metabolic perturbations and subacute toxic effects of endosulfan on mice. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 24: 18870-18880.