

Akut diazinon toksisitesinin testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler ve bu değişikliklere C vitamini ve E vitaminin etkisi

Mehmet Ural*, Meltem Özgüner*, Bora Büyükvanlı**, Hüseyin Kuplay***, Halis Köylü**

*Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Isparta

** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Isparta

***Siyami Ersek Kalp Damar ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi, İstanbul

Özet

Amaç: Akut diazinon toksisitesinde sıçan testis dokusunda oluşan yapısal değişiklikler ve bu değişikliklere E ve C vitaminlerinin etkilerinin araştırılması amaçlandı. **Materyal ve Metod:** 200-290 gram (gr) ağırlığında, 24 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Grup I'e (kontrol grubu) oral olarak mısır yağı verildi. Grup II'ye mısır yağında eritilmiş diazinon (Bazidin) preparatı 335mg/kg dozunda oral olarak, Grup III'e 335 mg/kg dozunda diazinon oral olarak, 200 mg/kg C vitamini (Redoxan) intraperitoneal olarak, 150 mg/kg E vitamini (Evigen) intramüsküler olarak uygulandı. Histolojik inceleme için rutin takip yöntemleri uygulandıktan sonra elde edilen testis dokusu kesitlerinde her grup için ayrı ayrı Johnsen testiküler biyopsi skoru hesaplandı ve histolojik değerlendirme yapıldı. **Bulgular:** Johnsen testiküler biyopsi skoru değerlendirmesinde Grup II ve III, Grup I ile karşılaştırıldığında skordaki azalış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Grup II ve Grup III arasındaki biyopsi skoru farkı ise istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grup II ve III'de germinal epitel diziliminde organizasyon bozukluğu tespit edildi. **Sonuç:** Akut tek doz diazinonun testis dokusu üzerine toksik etkileri olduğunu saptadık. Fakat bu yüksek doz diazinonun etkisi ile oluşan morfolojik değişikliklerin belirtilen doz ve sürede verilen E ve C vitamini kombinasyonu ile önlenemediğini tespit ettik.

Anahtar kelimeler: Diazinon, testis, vitamin C, vitamin E, yapısal değişiklikler

Abstract

Histological changes in acute diazinon toxicity in testis tissue and effects of Vitamin C and Vitamin E on structural changes

Aim: It was aimed to investigate the effects of a single dose diazinon on adult rat testis tissue and the protective effects of vitamin E and C on damage. **Materials and Methods:** 24 male Wistar albino rats, weighing 230-280 gr were divided into three groups. Group I were given corn oil, Group II were given 335 mg/kg diazinon (Bazidin) solved in corn oil, Group III were given 335 mg/kg diazinon, 200 mg/kg vitamin C (Redoxan), 150 mg/kg vitamin E (Evigen). Histologic evaluation of testis tissue including Johnsen testicular biopsy score was performed for each group after practicing routine histologic procedures. **Results:** Johnsen's testicular biopsy score of Group II and III were significantly decreased when compared to Group I ($p<0.05$). Difference between Group II and III was not significant. In Group II and III germinal epitel disorganization was observed. **Conclusion:** We have observed that single high dose of diazinon has toxic effects on rat testis tissue. This morfolological alterations were not healed by the vitamin E and C administration at this dose.

Key words: Diazinon, testis, vitamin C, vitamin E, structural changes

Giriş

Diazinon (0,0-Diethyl 0-(2-isopropyl 1-6-methyl-4-pyrimidinyl) phosphorothioate) tarımda pestisit amaçlı bir organofosfat olarak meyvaların, ekinlerin ve bitkilerin zararlılardan korunmasında 1950 yılından

beri kullanılmaktadır (1,2). Uygulanma aşamasından sonra diazinon kolayca suya karışır ve suda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir (3,4). Çok düşük düzeyde uygulanan pestisitler havadan suya geçerek besin zincirine katılırlar. Sudaki kalıntıları alan hayvanların insan tarafından yenmesi ile ve kontamine suların içilmesi ile uzun vadede insanlarda ve hayvanlarda zararlı etkiler görülür (1). Subletal dozlar memelilerde kolinerjik bulgularda artma, vücut ağırlığında azalma

Yazışma Adresi: Uzm. Dr. Mehmet Ural
SDÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Çüntür- İSPARTA

ve seksüel matürasyonda gecikme gibi bulgulara yol açabilir (5). Diazinonun etkileri diğer organofosfatlarda olduğu gibi kolinesteraz aktivitesinin azalması ile oluşur (6). Ayrıca organofosfatlar reaktif oksijen türevlerini arttırarak oksidatif doku hasarını arttırlar (7). Reaktif oksijen türevlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücut antioksidan savunma sistemleri devreye girer (8). C vitamini güçlü indirgeyici etkisi nedeniyle ideal bir antioksidandır (9,10). Vitamin E (Vit E), oksijen radikallerinin hücre membranı lipitlerine karşı başlattıkları oksidatif reaksiyonu antioksidan etkisi ile önler ve hücreyi koruyucu etkinlik gösterir (11,12). Bu çalışmayı, tek doz subletal dozda verilen diazinonun sıçan testis dokusunda oluşturduğu hasarı ışık mikroskopik düzeyde gözlemek, ve bu hasarın oluşma mekanizmalarından biri olan oksidatif etkinin, antioksidan vitaminler olan E ve C vitaminleri ile önlenip önlenemeyeceğini araştırmak için planladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada 12 haftalık 200-290 gram (gr) ağırlığında, 24 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar tel kafeslerde oda ısısında tutularak standart sıçan yemi ile beslendi.

Sıçanlar; Kontrol, Diazinon verilen, Diazinon + Vitamin E+ Vitamin C verilen olmak üzere , her grupta 8 hayvan bulunacak şekilde üç gruba ayrıldı. Grup I'e (Kontrol grubu) nazogastrik sonda aracılığı ile oral olarak mısır yağı verildi. Grup II'ye nazogastrik tüp aracılığı ile mısır yağında eritilmiş LD₅₀ değeri 1340 mg /kg (13) diazinon (Bazidin) preparatı 335mg/kg dozunda uygulandı. Grup III'e 335 mg/kg dozunda diazinon nazogastrik tüp aracılığı ile, 200 mg/kg C vitamini (Redoxan) intraperitoneal olarak, 150 mg/kg E vitamini (Evigen) intramüsküler olarak uygulandı.

İlaç uygulamasından 24 saat sonra eter anestezisi altında sıçanların testis dokuları alındı. Histolojik inceleme için alınan testis dokuları %10'luk formalin ile tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinin ardından, dokular parafine gömüldü ve elde edilen parafin bloklardan Leica SM2000R marka mikrotomda 5 im'lik kesitler alındı. Alınan kesitler hematoxilen eozin (H-E) ile boyandı. Her 3 gruptan da rastgele 10 adet 5 Mm'lik testis dokusu preparatı incelendi. Her grup için ayrı ayrı 100 adet tübül değerlendirilerek ortalama Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (14) hesaplandı (Tablo 1). Ayrıca her grup için seminifer tübüller ve interstisyel alana ait hücreler histolojik açıdan değerlendirildi.

Tablo 1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

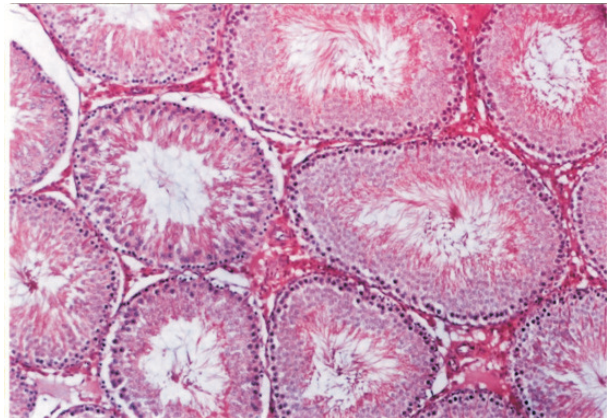
Skor	Histolojik Bulgular
10	Komplet spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte
9	germinal epitel, normal çaplı tübüler lümen
8	Çok sayıda spermatozoa, disorganize germinal epitel, oblitere tübüler lümen
7	Tübüler kesit başına 5±10'dan daha az spermatozoa
6	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatotogonia
5	Spermatozoa yok, 5±20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatotogonia
4	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatotogonia
3	Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia
2	Sadece spermatogonia
1	Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri var (Sertoli-cell-only sendromu)
0	Tübüllerde hiç hücre yok

Bu çalışmada gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

İşık Mikroskopik Bulgular

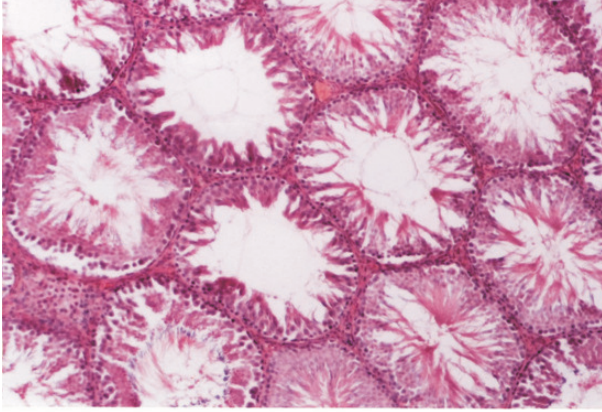
Rutin H-E ile boyanan Grup I'e ait (kontrol grubu) testis kesitlerinde seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu, seminifer tübüllerde germ hücrelerinin düzenli dizildikleri ve spermatogonyumlardan spermiyumlara kadar spermiyogenezin tüm evrelerindeki germ hücrelerinin varlığı tespit edildi. İnterstisyel aralıkta mavi-eflatun boyanan sitoplazmaları ile Leydig hücrelerinin, pembe boyanan sitoplazmaları ve daha küçük çekirdekleri ile makrofajların, damar duvarına yaslanan fuziform çekirdekli perisitlerin, ve damarların normal histolojik yapılarını korudukları tespit edildi (Resim 1).



Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusu (Hematoksilen-Eozin) x10

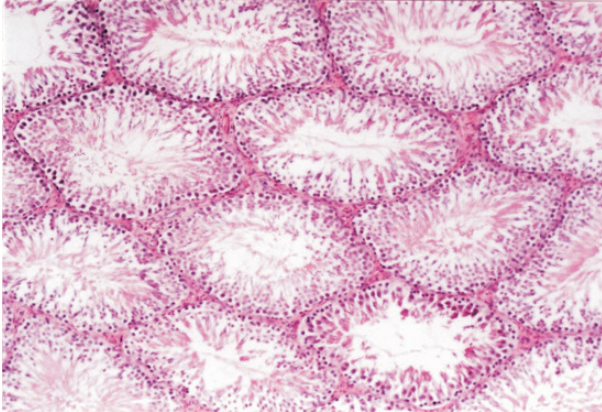
Grup II'deki sıçanların testis dokuları histolojik olarak incelendiğinde germinal epitel diziliminde organizasyon bozukluğu tespit edildi. Seminifer tübül

kontürlerinin düzensizleştiği gözlemlendi. Bazı tübüllerde ise olgunlaşma basamaklarında duraksama olduğu saptandı. Seminifer tübüllerde germinal hücre sayısı azalmasına rağmen lokal olarak spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi. Damar duvarının normal yapısını koruduğu ancak kapiller dilatasyonun olduğu saptandı (Resim 2).



Resim 2. Diazinon verilen gruba ait sıçan testis dokusu (Hematoksilen-Eozin) x10

Grup III'e ait sıçanların testis dokularında seminifer tübül kontürleri düzgün izlenmesine rağmen germinal epitel diziliminde organizasyon bozukluğu belirgin olarak gözlemlendi. Bazı seminifer tübüllerde olgunlaşma basamaklarında duraksama olduğu saptandı (Resim 3).



Resim 3. Diazinon + Vitamin E + Vitamin C verilen gruba ait sıçan testis dokusu (Hematoksilen-Eozin) x10

Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Johnsen testiküler biyopsi skoru değerlendirmesinde Grup I'in (kontrol grubu) ortalama skoru 9.8 ± 0.4 , Grup II'nin ortalama skoru 8.93 ± 0.63 ve Grup III'ün skoru 9.02 ± 0.76 olarak hesaplandı. Grup II ve III, Grup I ile karşılaştırıldığında skordaki azalış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$). Grup II ve

Grup III arasındaki biyopsi skoru farkı ise istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tartışma Ve Sonuç

İnsektisit olarak tarımda kullanılan organofosfatlar gerek kazayla, gerekse intihar amaçlı alımları sonucunda insanlarda olumsuz etkilere yol açmaktadır. Diazinon geniş spektrumlu bir organofosfattır. Diazinonun temel toksisite mekanizması sinir kavşaklarında AChE (asetil kolin esterase) inhibisyonudur (15). Diazinon vücut içerisine gastrointestinal sistemden, temas ile deriden ve inhalasyonla akciğerlerden alınır. Vücuttan atılımı üriner sistem yoluyla olur (16). Daha önce yapılan çalışmalarda organofosfatların insan ve çeşitli hayvan türlerinde genotoksik, sitotoksik, hepatotoksik, embriyotoksik, nörotoksik ve adrenotoksik olduğu gösterilmiştir (2).

Organofosfatların yukarıda belirtilen etki mekanizmalarının yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalar bazı organofosfatların serbest oksijen radikalleri üretimini artırarak oksidatif doku hasarına neden olduğunu göstermiştir (4,17). Diazinonun tarımda çok yaygın kullanımı bu ajan ile karşılaşan insan sayısını arttırmaktadır. Çalışmamızda diazinon alan grupta rastladığımız testis patolojileri bu preparatın kısa dönemde dahi gonadlara yan etkileri olduğunu göstermektedir. Diazinonun testis üzerindeki ana etkisi spermatozoa gelişiminin tamamen veya kısmen durdurmasıdır. Bu diazinonun doğrudan testis dokusuna veya dolaylı olarak gonadotropinlerin salgılandığı hipofiz bezine etkisi sonucu olabilir (18). Dipankar ve arkadaşları bir organofosfat olan quinalphos'un intraperitoneal uygulanması sonucu oluşan testis hasarının başlangıcından serbest radikallerin oluşumunu sorumlu tutmuşlardır (19). Organofosfatlar subletal dozlarda kuşlarda ve memelilerde üreme performansında değişikliklere yol açmaktadırlar (20,21). Fakat organofosfat kaynaklı gonadal disfonksiyonun oluşum mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Organofosfatların gonadlar üzerindeki yan etkileri için olası birkaç mekanizma vardır: Testise doğrudan inhibitör etki yapabilirler. Hipofiz bezine etki ederek gonadotropin konsantrasyonlarını azaltabilir ve dolayısıyla bozulmuş spermatogenezise neden olabilirler, nörotransmitterlerin konsantrasyonlarını değiştirebilirler. Bu çalışmada, olası mekanizmalardan özellikle oksidasyon ürünleri ile bağlantılı olarak gerek doğrudan testise gerekse de dolaylı olarak hipofize etki ederek oluşan hasarın güçlü

antioksidanlar olan E ve C vitaminleri ile önlemek mümkün olmamıştır. Diazinon verilen grup ile diazinon + vitamin E, C verilen gruplar arasında ışık mikroskopik olarak ve Johnsen testiküler biyopsi skorun açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ancak çeşitli oksidanların neden olduğu oksidatif hasara karşı E ve C vitamini kombinasyonunun koruyucu olduğuna ilişkin birçok çalışma mevcuttur (22, 23,24).

Sonuç olarak çalışmamızda akut tek doz diazinonun testis dokusu üzerine toksik etkileri olduğunu saptadık. Fakat bu yüksek doz diazinonun etkisi ile oluşan morfolojik değişikliklerin belirtilen doz ve sürede verilen E ve C vitamini kombinasyonu ile önlenmediğini tespit ettik. Diazinonun, testis dokusu üzerine olan toksik etkilerinin önlenmesi amacıyla kullanılacak E ve C vitamini kombinasyonunun daha uzun süreli verilmesiyle ilgili çalışmaların veya daha düşük doz diazinonun etkilerinin önlenmesinde bu kombinasyonun etkilerinin araştırılması ile ilgili başka çalışmaların da faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

- Öztürk S. Tarım İlaçları. Ak Basımevi. İstanbul, 1997
- The world pesticide market, Anonymus. Global Crop Protection Federation Website, 1999
- Delen N., Toros S., Tosun N., Öztürk S., Yücel A., Çalı S. Tarım ilaçları kullanımı ve üretimi. Türkiye ziraat mühendisliği 4. Teknik Kongresi. T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları 1995 No:26, 1015-1028,
- Öztürk S., Özgen N., Bitki koruma ilaçları. Eser Matbaası yayını, 1978
- Berksan N. Tarım ilaçları ve çevre. Tarım ilaçlarının kullanımı semineri. ODTÜ Gaziantep Kampüsü Yayın No:1-7, 1996
- United States environment protection agency Washington DC, 20460 office of prevention pesticides and toxic substances 2000
- Jayati G., Chhabi D. Effect of malathion on antioxidant defence system in human fetus- An in vitro study. Indian J Exp Biology. 1992; 30(4): 352-354.
- Cheeseman KH., Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br.Med.Bull. 1993; 49(3): 479-80.
- Lunec J, Blake D, Oxygen Free Radicals. Their relevance to disease processes . In : Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London. 1990; pp.189-212..
- Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants . Clin Cardiol . 1993;16: 1-9.
- MaCay PB, King MM: Vitamin E: Its role as a biological free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system. Vitamin E, New York, 1980, Marcel Dekker Inc, pp:289-317.
- Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. Free Radical Biology and Medicine , 1989; 6: 209-24.
- Registration branch 3 health effects division office of pesticide program U.S. Environmental Protection Agency, 2000.
- Johnsen SG. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1970;1:2-25.
- Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low dose exposure to organophosphates. Toxicol Lett. 2001;120: 343-351.
- Gaines, T.B. Acute toxicity of pesticides. Toxicol appl. Pharmacol., 1969;14: 515-534.
- Dwivedi PD, Das M, Khanna SK. Role of Cytochrome P450 on Quinalfos Toxicity. Food Chem Toxicol. 1998; 36(5): 437-444.
- Dutta HM., Meijer HJM. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. Environmental pollution, 2003; 125: 355-360.
- Dipankar D., Tapas KM. Study of quinalphos formulation-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in sprague-dawley albino rats. Jour. Of Appl. Toxicol. 2000; 20: 197-204.
- Somkuti SG., Lapadula DM., Chapin RE., Lamb JC.,IV and Abau-Donia MB. Testicular toxicity following oral administration of TOCP in roosters. Toxicol Letters, 1987; 37: 279-290.
- Maitra SK., Sarkar R. Influence of methyl parathion on gametogenic and acetylcholinesterase activity in the testis of whitetroated munia. Archives of Enviro Contam Toxicol, 1996; 30: 384-389.
- Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. Arch Toxicol 2003;76: 470-473.
- Mollaoğlu H, Yılmaz HR, Gökalp O, Altuntas İ. Methidation' un pankreas üzerine etkileri: Vitamin E ve C'nin rolü. Van Tıp Dergisi. 2003; 10(4): 98-100.
- Gökalp O, Mollaoğlu H, Yılmaz HR, Altuntaş İ. Organofosfat insektisit Fenthion'un rat amilaz ve lipaz enzimleri üzerine etkisi: Vitamin E ve C'nin rolü. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 10(2): 21-23.