

FARELERDE İMMÜN SİSTEM ÜZERİNE AMİTRAZIN ETKİSİ

THE EFFECTS OF AMITRAZ ON THE IMMUNE SYSTEM IN MICE

Ayhan FİLAZİ*

Cavit KUM*

İsmail KUTLU**

Kabul Tarihi: 16.12.1998

ÖZET

Bu çalışmada amitrazın farelerdeki immün sistem üzerine olan etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bunun için 84 adet sağlıklı beyaz İngiliz ırkı erkek fare kullanıldı. Fareler her grupta 12 adet olacak şekilde 7 gruba bölündü ve birinci gün hepsine 10^9 miktarında *Salmonella paratyphi* BH antijeni periton içi yolla verildi. Aşılama işleminden bir hafta sonra bütün gruplardan kan alınarak antikor titreleri belirlendi. Aşılama 9 gün sonra birinci grup kontrol olarak ayrılırken 2'nci ve 3'üncü gruba 5 mg/kg, 4'üncü ve 5'inci gruba 15 mg/kg, 6'ncı ve 7'nci gruba ise 45 mg/kg amitraz bir mide sondası yardımıyla ağızdan verildi. Aşılama 14 gün sonra yine hepsinden kan alınarak ikinci defa antikor titreleri ölçüldü. İlk aşılamadan 16 gün sonra bütün farelere yeniden aynı dozda ikinci bir aşılama daha yapıldı. Bundan 3 gün sonra 3'üncü gruba 5 mg/kg, 5'inci gruba 15 mg/kg ve 7'inci gruba da 45 mg/kg amitraz ikinci kez uygulandı. Son ilaçlamadan bir hafta sonra yeniden bütün farelerden kan alınıp üçüncü defa antikor titreleri ölçüldü.

Sonuçta amitrazın deneme gruplarının hiç birinde ağızdan kullanıldığında bile *S. paratyphi* antijenine karşı antikor oluşumunu engellemediği ve humoral immuniteye yönelik herhangi bir olumsuzluk riski taşımadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amitraz, immün sistem, fare

* A.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji A.B. Dalı, Dışkapı/ANKARA

** Refiksaydam Hfzıssıhha Enstitüsü Merkezi Başkanlığı, ANKARA

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the effects of amitraz on the immune system in mice. Totally 84 healthy white England strain male mice were used for this purpose. The mice were divided into 7 groups which each of them included 12 mice. On the first day of experiment, *Salmonella paratyphi* BH were injected by intraperitoneal route in the amount of 10^9 . Blood samples were taken after one week of following vaccination and antibody titers were determined. The first group was separated as a control group (Group 1) after 9 day of following vaccination; 5, 15 and 45 mg/kg amitraz were administered orally to groups 2nd and 3rd, groups 4th and 5th, groups 6th and 7th by using the stomach catheter, respectively. After 14 day of following vaccination, blood samples were taken and antibody titers were determined again. On the 16th day of following vaccination, the injection of *S. paratyphi* BH was repeated at the same dose. After 3 day of second vaccination, 5, 15 and 45 mg/kg amitraz were administered to groups 3rd, 5th and 7th, respectively. After one week of last amitraz doses, blood samples were taken and antibody titers were determined on 3rd time.

Finally, the result of experiment had been indicated that eventhough orally given amitraz did not prevent the antibody production against *S. paratyphi* antigene on the all experimental groups. Thus, amitraz has no negative risk about the immunity.

Key Words: Amitraz, immune system, mice

GİRİŞ

Amitraz [N,N-di-(2,4-ksilil iminometil) metil amin] akarısıd, larvisid ve insektısıd amaçlı kullanılan dimetilformamidin türevi bir bileşiktir (1). Veteriner pratikte sığır, köpek, koyun ve keçilerde bit, pire, kene ve uyuzlara, arılarda *Varroa jacobsoni* Oudemans'a karşı etkilidir (9).

İlaç, at (2, 4, 5), kedi (5, 8), Chihuahua ırkı köpekler (5) ile 4 aylıktan küçük köpek yavrularında ve gebelerde (9) duyarlılığın yüksek olması nedeniyle kullanıma uygun değildir.

Amitraz, kullanıldığı deney hayvanlarında ve memelilerde zehirlilik bakımından son derece güvenli bir madde olmasına karşın, bu bileşiğin canlı immün sistemi üzerindeki etkileri yönünden değerlendirildiğini gösteren bir çalışmaya rastlanılamamıştır. O nedenle bu çalışmada veteriner hekimlikte çok yaygın bir kullanım alanı bulan

amitrazın farelerdeki humoral immün yanıt üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Hayvanlar: Çalışmada yaklaşık 2 aylık ve ağırlıkları 25-28 g olan toplam 84 adet sağlıklı beyaz İngiliz ırkı erkek fare kullanıldı. Fareler her grupta 12 adet olacak şekilde 7 gruba bölündü ve maternal antikor seviyesini belirlemek için hepsinin kalbinden hafif eter anestezi altında yaklaşık 0.5 ml kan alındı. İlaç ve aşı uygulamasına başlamadan önce bir hafta farelerin ortama alışması beklendi. Bu arada yiyebilecekleri kadar özel hazırlanmış pelet fare yemi ve içebilecekleri kadar su ortamda hazır bulunduruldu.

İlaç: İlaç olarak 122 mg/ml yoğunluğunda (formülasyonun yoğunluğu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında kapillar kolon gaz kromatografisi ile belirlendi) amitraz içeren Kenecid %12.5 EC (Tay İlaç) ile aşı materyali olarak 1 ml'sinde 2×10^9 oranında bakteri içeren *Salmonella paratyphi* BH antijeni seçildi. İlaç çözeltileri her fareye ağızdan yaklaşık 0.3 ml verilecek şekilde dimetilsülfoksitle (Merck-802912) seyreltildi.

Metot

Her grupta 12 adet olacak şekilde 7 gruba ayrılan farelere 0.5 ml miktarında (her fareye 10^9 miktarında bakteri olacak şekilde) *S. paratyphi* BH antijeni periton içi injekte edildi. Aşılama işleminden bir hafta sonra bütün gruplardan kan alınarak antikor titreleri ölçüldü. Aşılama 9 gün sonra birinci grup kontrol olarak ayrılırken 2'nci ve 3'üncü gruba 5 mg/kg, 4'üncü ve 5'inci gruba 15 mg/kg, 6'ncı ve 7'nci gruba ise 45 mg/kg amitraz bir mide sondası yardımıyla 0.3 ml'lik hacim içerisinde ağızdan verildi. Aşılama 14 gün sonra yine hepsinden aynı teknikle ve aynı yerden kan alınarak ikinci defa antikor titreleri ölçüldü. İlk aşılama 16 gün sonra bütün farelere yeniden aynı dozda ikinci bir aşılama daha yapıldı. Bundan 3 gün sonra 3'üncü gruba 5 mg/kg, 5'inci gruba 15 mg/kg ve 7'nci gruba da 45 mg/kg amitraz ikinci kez uygulandı. Son ilaçlamadan bir hafta sonra yeniden bütün farelerden aynı teknikle ve aynı yerden kan alınıp üçüncü defa antikor titreleri ölçüldü (Tablo 1).

Humoral immünitenin belirlenmesi: Farelerdeki humoral immünitenin değerlendirilmesi için hemaglutinasyon inhibisyon (HI)

testi kullanıldı (10). Bu test ile antikorların antijene bağlanma kapasitesi tayin edildi. Kan alındıktan sonra serum kısmı ayrıldı ve toplam antikor titreleri ölçüldü. İlk tüplere 2.4 ml serum fizyolojik ve 0.1 ml serum konarak, birinci tüpten son tüpe doğru 1/100 ile 1/102 400 aralığında sulandırma işlemi yapıldı. Hazırlanan dilüsyonlar 37°C'de 48 saat süreyle etüvde inkübe edildi. Aglütinasyonun görüldüğü son tüp serumdaki antikor düzeyi olarak kaydedildi. Elde edilen sonuçlar 2 tabanlı logaritmaya (log2) göre değerlendirildi ve gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ile yapıldı (SPSS Release 6.0 bilgisayar programı).

BULGULAR

Maternal antikor seviyelerini belirlemek amacıyla aşı verilmeden önce alınan kan serumlarında maternal antikor olmadığı görüldü. İlk aşılama sonrası 7'nci, 14'üncü ve 26'ncı günlerde alınan kan serumu örneklerinde belirlenen antikor titreleri ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Aşılama sonrası alınan kan serumu örneklerinde ölçülen ortalama antikor titreleri (Log2 tabanına göre)

Grup (n=12)	İlk aşılama sonrası		
	7. gün	14. gün	26. gün
1	3.11±0.24	4.75±0.62	8.42±1.31
2	3.09±0.26	4.42±0.67	8.25±1.29
3	3.10±0.21	4.75±0.75	8.33±1.15
4	3.12±0.31	4.83±0.81	8.18±1.08
5	3.13±0.29	4.92±0.90	8.41±1.18
6	3.11±0.19	4.33±0.98	8.40±1.16
7	3.10±0.20	4.25±0.97	8.17±1.19

Böylece ilk aşılama işleminden bir hafta sonra ölçülen ortalama antikor titreleri bütün gruplarda yaklaşık 3.1 seviyesinde olurken ilaç uygulamasından 5 gün sonra (14'üncü gün) ölçülen ortalama antikor titreleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında farklılık göster-

memiştir ($P>0.05$). İkinci aşılama ve 3'üncü, 5'inci ve 7'nci gruplara yeniden ilaç uygulamasını takiben alınan kan serumu örneklerinde ölçülen toplam antikor titreleri de diğer gruplarla karşılaştırıldığında bir fark görülmemiştir ($P>0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Pestisidler ile immün sistemde görevli hücreler arasında gerçekleşebilen çok yönlü etkileşimler kaçınılmaz bir şekilde humoral immüniteye de yansır. Söz konusu etkileşmenin aynı veya aksi yönde olmasına koşut bir biçimde humoral immüniteye temel oluşturan çeşitli sitokinler, interleukinler ve immünoglobulinlerin de sentezi artar veya azalır. Belirtilen durum ise, immün sistemin bütünlüğü ve immün yanıtların etkin bir biçimde gelişmesi yönünden olduğu kadar, aktif ve pasif immünizasyon temeline dayanan koruyucu sağaltım uygulamalarının başarısı yönünden de belirleyici bir konuma sahiptir. Bu nedenle özellikle veteriner hekimlikte vazgeçilmez bir uygulama halini alan dış parazit ilaçlarının canlı immün sistemine yönelik etkileri ve sonra da aşılama yönünden yaratabileceği olumlu veya olumsuz yönlerinin ortaya konulması hem sağaltım seçenekleri ve hem de ekonomik kayıpların önlenmesi yönlerinden büyük önem taşır (3).

Veteriner hekimlikte ve tarımda oldukça yaygın bir şekilde kullanılan amitrazın canlı immün sistemi üzerine olan etkilerinin araştırılmasını konu alan bu çalışmada elde edilen bulgulara bakıldığında amitrazın farelerde humoral immüniteyi etkilemediği ortaya konulmuştur. Ancak yapılan literatür taramalarında bu bulguları tartışacak benzeri bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son derece geniş boyutta kullanım gören ve uygulama yeri ve çevresindeki canlılar yönünden diğer insektisidlere nazaran oldukça güvenli oldukları belirtilen sentetik piretroid insektisidlerden sipermetrin (6, 7, 11, 12), alletrin ve permetrin (11) ile siflutrinin (13) canlı hayvanlarda hem humoral hem de hücrel immüniteyi baskıladıkları araştırma bulgularıyla ortaya konulmuştur. Bu şekilde değerlendirildiğinde amitrazın farelerin immün sistemi üzerine humoral immünite yönünden olumsuzluk yaratmaması nedeniyle bu yönüyle sentetik piretroidlerden daha üstün olduğu düşünülebilir.

Böylece amitrazın en yüksek dozda (45 mg/kg dozunda) iki defa ağızdan kullanıldığında bile *Salmonella paratyphi* antijenine karşı antikor oluşumunu engellemediği ve humoral immüniteye yönelik herhangi bir olumsuzluk riski taşımadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Ameno K, Fuke C, Ameno S, Kiriu T, Shinohara T and Ijiri I**, (1991). *A rapid and sensitive quantitation of amitraz in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and its application for pharmacokinetics*. J Anal Toxicol, 15:116-118.
2. **Auer D E, Seawright A A, Pollitt C C and Williams G**, (1984). *Illness in horses following spraying with amitraz*. Australian Vet J, 61:257-259.
3. **Bradbury S P and Coats J R**, (1989). *Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides*. Rev Environ Toxicol, 108:133-177.
4. **Cullen L K and Reynoldson J A**, (1987). *Cardiovascular and respiratory effects of the acaricide amitraz*. J Vet Pharmacol Therap, 10:134-143.
5. **Cullen L K and Reynoldson J A**, (1988). *Cardiovascular responses to amitraz in the presence of autonomic antagonists and agonists*. Arch Int Pharmacodin, 296:45-56.
6. **Desi I, Varga L, Dobrony I and Szklenarik G**, (1985). *Immunotoxicological investigation of the effects of a pesticide: Cypermethrin*. Arch Toxicol Suppl, 8:305-309.
7. **Desi I, Dobrony I And Varga L**, (1986). *Immuno-, neuro- and general toxicologic animal studies on a synthetic pyrethroid.: Cypermethrin*. Ecotoxicol Environ Saf, 12:220-232.
8. **Gunaratnam P, Wilkinson G T and Seawright A A**, (1983). *A study of amitraz toxicity in cats*. Australian Vet J, 60:278-279.
9. **Kaya S ve Bilgili A**, (1997). *Dış Parazitleri Etkileyen İlaçlar*. 475-503. *Alınmıştır: S. Kaya, İ. Pirinççi ve A.Bilgili (editörler): Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. 2. Cilt, Medisan Yayınevi, Ankara.
10. **Moyer N P, Holcomb L A and Hausler W J**, (1991). *Manuel of Clinical Microbiology. Essentials and Application*. 5th Ed. American Society for Microbiology, Washington.
11. **Stelzer K J and Gordon M A**, (1984). *Effects of pyrethroids on lymphocyte mitogenic responsiveness*. Res Commun Chem Path Pharm, 46:137-150.

12. Tamang R K, Jha G J, Gupta M K, Chauhan H V S and Tiwary B K, (1988). *In vivo immunosuppression by synthetic pyrethroid (Cypermethrin) pesticide in mice and goats.* Vet Immun Immunopath, 19:299-305.

13. Yavuz H, Filazi A, Bilgili A, Sekkin S, Özdemir M, Kum C ve Kutlu Y, (1996). *Siflutrinin immünotoksikolojik etkilerinin araştırılması.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, 43:209-213.