

ORGANİK FOSFORLU ZİRAİ MÜCADELE İLÂÇLARI İLE MEYDANA GELEN ZEHİRLENMELERİN, KANDAKİ CHOLİNESTERAZ MİKTARINI ÖLÇEREK TESBİTİ

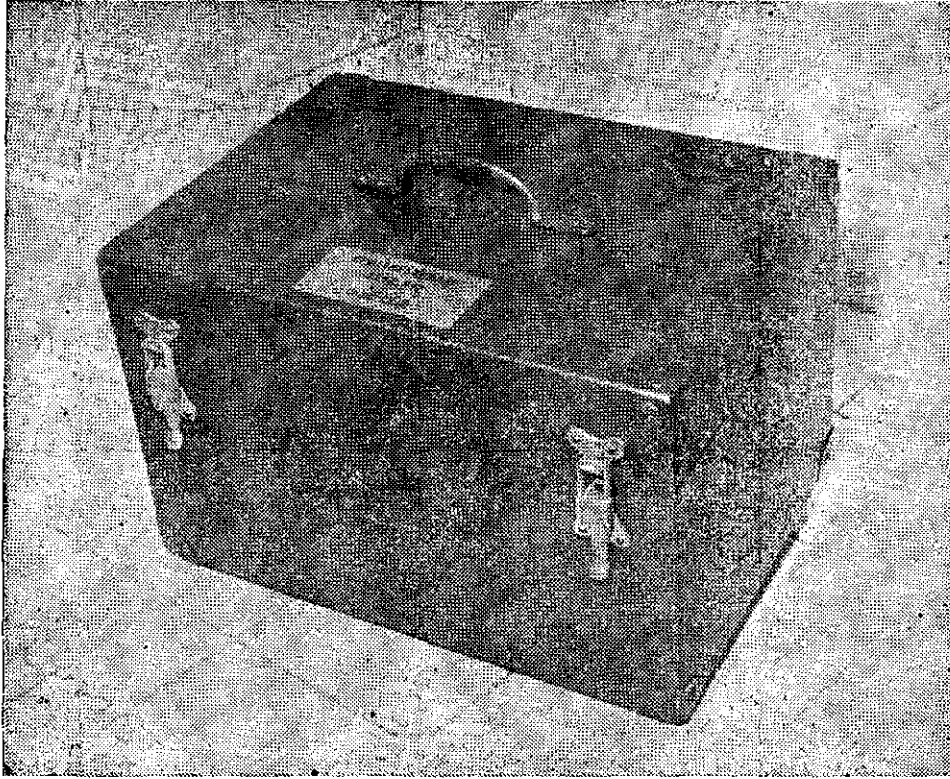
Cevdet SEVİNTUNA¹

Güneri ÖZSUNAR²

GİRİŞ

Tarlada (açık havada) süratle cholinesteraz tesbiti.

Müstahsil, ilâçlama işlerinde çalışanlar ve araştırmacılar koruyucu emniyet tedbirlerinin alınmasına rağmen organik fosforlu ilâçları kullanırken bu zehirli kimyevi maddeleri önemli derecede absorbe ederek bir riske girebilirler. Fazla absorpsiyon ve emniyetli olmıyan çalışma metodları kandaki normal cholinesteraz anzim faaliyetlerinin azalması ile, tesbit edilebilir. Cholinesteraz faaliyetlerini lâboratuvarda hassas olarak ölçmek için çok metod vardır. Fakat ani vak'alarda veya lâboratuvardan uzak olan yerlerde çabuk netice veren bir metoda sık sık ihtiyaç duyulur. Limperos ve Ranta'nın metodu, ani vak'alarda veya âletlerle (Şekil: 1) cholinesteraz



ŞEKİL 1. Cholinesteraz deneme kutusu

¹ Ziraî Mücadele İlâç ve Aletleri Enstitüsü Böcek Toksikolojisi Lab. Şefi

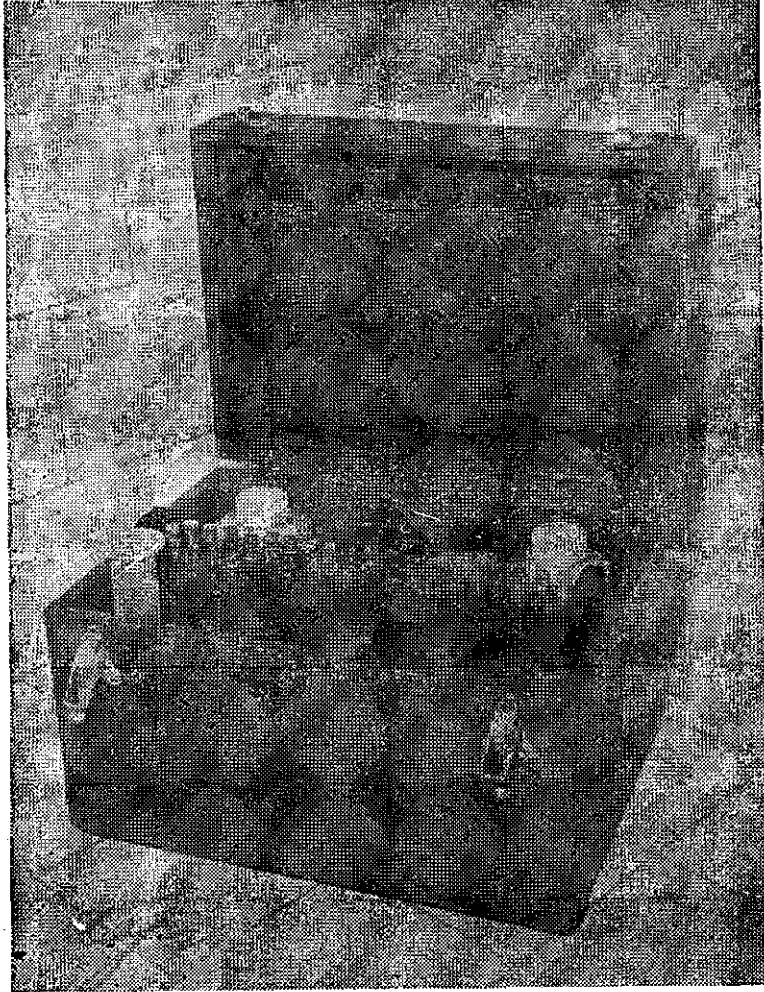
² Ziraî Mücadele İlâç ve Aletleri Enstitüsü Böcek Toksikolojisi Lab. Asistanı

tesbitinde süratli, emniyetli ve itimat edilir neticeler alınmasını kombine eder şekilde Edson tarafından değiştirilmiştir.

Denemelerde mevzubahis olan kanın içindeki Cholinesteraz faaliyeti normal kan faaliyetinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Denemelerden alınan neticelere göre tesirler aşağıdadır :

Tesbit edilen normalin % 100 — % 75 ise ... Tesir yok, fakat yakın bir gelecekte yeniden deneme yapılmalı.

Tesbit edilen normalin % 75 — % 50 ise ... Bir ihtimalle ilâca fazla arz; denemeyi tekrarlar eğer teyit ediyorsa iki hafta için organik fosforlu ilâçlarla çalışmaya ara ver. Sonra normale dönmeyi tesbit için yeniden deneme yap.



ŞEKİL 2. Cholinesteraz araçlarının kutu içinde toplu olarak üstten görünüşü

Tesbit edilen normalin % 50 — % 25 ise ... Ciddi mânada ilâca fazla arz denemeyi tekrarla eğer teyit ediyorsa insektisitlerle çalışmaya ara ver. Eğer rahatsızlık veya hastalık varsa tıbbi muayeneye tabi tut.

Tesbit edilen normalin % 25 — % 0 ise ... Çok ciddi ve tehlikeli mana da ilâca arz. Denemeyi tekrarla eğer teyit ediyorsa, tıbbi muayeneler neticelinceye kadar kazazedeyi iş sahasından alıp, istirahat ettir.

MATERYAL

Kandaki Cholinesteraz miktarını tayin ederek organik fosforlu ilaçlarla olan zehirlenmelerin tesbiti için lüzumlu ayraçlar;

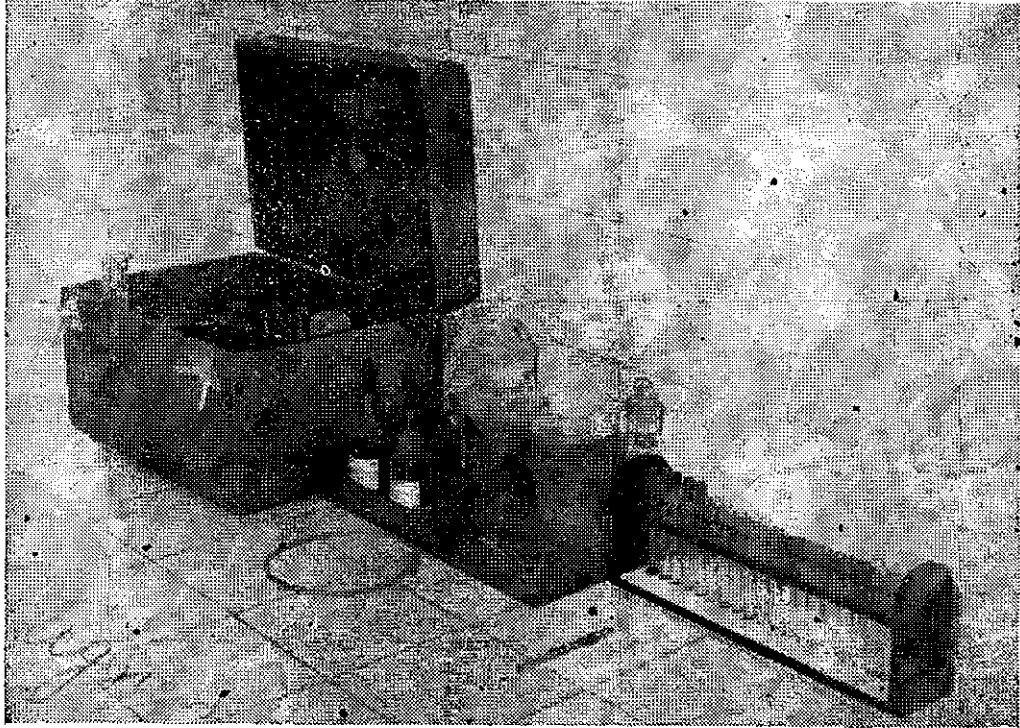
1 — Ayraçlar ve hazırlanmaları (Şekil: 2,3).

a) İndicatör solusyon.

0,25 gr. Brome-Thymol blue'nun (B.D.H. Ltd. Water soluble) sodyum tuzu 560 ml. (CO₂ den ari) destile suda eritilir.

b) Substrate solusyon.

0,5 ± 0,2 gr. acetylcholine perchlorate CO₂ den ari 100 ml. destile suda eritilir.



ŞEKİL 3. İndicatör ve Substrate solusyonlar ve diğer materyalin denemeye hazır görünüşü

METOD¹

Metodun prensibi :

Kan, PH da değişiklik yaparak acetylcholine'den acetik asidi açığa çıkaran cholinesteraz adlı bir enzim ihtiva eder. Kan, indicator ve acetylcholine perchlorate karışımı hazırlanır ve muayyen bir zaman iyice karışması için bırakılır. Bu zaman içinde PH'nin değişmesi cholinesteraz faaliyetinin bir ölçüsüdür.

A — İnsanlarda kandaki cholinesteraz'ın tesbiti :

1 — Ayracın bozulup bozulmamış olduğunun denenmesi için indicator solusyondan 0,5 ml. alınır, reaksiyon tüpüne konur. Üzerine normal bir şahıstan alınan 0,01 ml. kan konur ve 0,5 ml. Substrate solusyondan ilâve edilir. İyice karıştırıldıktan sonra 2,5 ml. lik cam hücreye aktarılır ve bu cam hücre komparatörün sağ gözüne yerleştirilir. Bunu takiben komparatör yeknasak beyaz ışığa karşı tutulur ve deneme solusyonunun rengine uyar renk gelinceye kadar disk çevrilir. Test solusyonu % 12,5 aktif renkten daha sarı (asit) olmamalıdır. Eğer CO₂ absorbsiyonundan dolayı indicator solusyonu yüksek asidite gösteriyorsa kaynatılmak suretiyle normal seviyeye getirilebilir. Eğer kaynatmadan sonra asiditeyi % 12,5 luk rengi azaltmıyorsa bu substrate solusyonun bozulduğuna delâlettir. Bu takdirde dökmeli ve yeni taze solusyon hazırlanmalıdır.

2 — 2,5 ml. lik hücre içindeki 1 ml. destile suya parmaktan alınan 0,01 ml. kan ilâve edilmek suretiyle bir kan «şahidi» yapılır ve bu hücre komparatörün sol gözüne yerleştirilir.

3 — Her hasta için bir reaksiyon tüpü hazırlanır ve her tüpün içine 0,5 ml. indicator solusyondan pipetle konur. (15-20 deneme aynı zamanda yapılabilir.)

4 — Bir reaksiyon tüpünün içine orta parmaktan alınan kandan her hasta için 0,01 ml. pipetle konup, tüpün içindeki indicator solusyonu ile pipet 2-3 defa çalkalıyarak yıkanır. Bir kontrol kan nümunesi (organik fosforlu insektisitlerin tesirlerine maruz kalmamış normal olarak sıhhatli bir şahıstan alınan kan) Tüp No: 1 in içine konmalıdır.

5 — Substrate solusyondan 0,5 ml. Tüp No: 1 in (Kontrol Tüp) içine pipetle konur. Zamana dikkat ederek (Sıfır zaman) bu reaksiyon karışımına 0,5 ml. substrate solusyonu koyar koymaz 2,5 ml. hücreye nakledilir ve komparatör içinde onun rengi tesbit edilir. Bu karışımın asiditesi % 12,5 tan fazla olmamalıdır.

¹ Bu yazının materyal ve metod kısmı (The tintometer Limited Salisbury, England) firmasının prospektüsünden alınmıştır.

Bu metod ile ilgili olarak şu literatürden de istifade edilebilir.

G. Limpers and K.E. Ranta. Science 1953, 117, 453;

E.F. Edson Brit. Med. J. 1955, I, 841;

idem ibid 1955, I, 1218;

H.D. Michel. Lab. Clin. Med 1943, 34, 1954;

J.H. Wolfsie and G.D. Winter, Arch, Ind. Hyo. 1954, 9, 391;

D.W. Jolly and B.D. Rätcliffe, The Vet. Record. 1958, 70, 289;

D.R. Davies and J.D. Nicholls Brit. Med. J. 1955, I, 1373;

E.F. Edson, World Grops 1956, 8, 240;

E.F. Edson, World Grops 1958, 10, 49;



ŞEKİL 4. Parmak ucunun kan alınmak üzere delinmesi

6 — Sıfır zamandan itibaren birer dakika ara ile diğer reaksiyon tüplerine substrate solusyondan 0,5 ml. ilâve edilip tıpa ile kapatılır ve iyice karışması için sallanır.

7 — Kontrol nümune hücre muhtevasının renk aktivitesi yüzde yüze erişinceye kadar beklenir. (Ki bu genel olarak ısıyla alakalı olmak üzere 20-30 dakika alır.) Bu zamandan itibaren birer dakika zaman aralıklarıyla diğer tüplerin muhtevaları hücreye aktarılır. Komparatörün sağ kompartmanına hücreyi koymak ve en yakın rengi bulana kadar diski çevirmek suretiyle her nümunenin diskteki uygun rengi bulunur ve aktivite tesbit edilir. Disk yüzde olarak normal aktiviteye (meselâ kontrol nümunesi) göre derecelendirilmiştir.

B — Hayvanlarda kandaki kolinesteraz'ın tesbiti :

Farelerde kuyruğun kullanıldığı haller haricinde kan kulaktan toplanır. Kobay ve fareler için 0,01 ml. diğer hayvanlar için 0,02 ml. kan alınır.

Kan alınır alınmaz bir tüpe aktarılır ve 0,5 ml. substrate solusyon ilâve edilir. Zamana dikkat edilir. Muayyen ve belirli bir zamanın geçmesinden sonra, ki bu zamanlar aşağıdaki tabloda verilmiştir, karışım 2,5 ml. lik komparatör hücresine aktarılır ve yüzde tesbit edilir.

Sığır	80 Dakika
Köpek	40 »
Koyun	120 »
Fare	20 »
Kobay	80 »

Tesbit edilmiş bir zaman içinde;

% 75 ve daha fazla bir dönme var ise	Kan normal
% 50-75 ise	Ortalama deprasyon
% 35-50 ise	Klinik araz yok fakat tedbir lüzumlu
% 35 şin altında ise	Şiddetli derecede ilâca arz, hafifletici tedbirlerin alınması şart.

Bu metodu keçiler ve tarla fareleriyle kullanmak suretiyle tatmin edici neticeler almak mümkün olmamıştır.

Denemeleri yaparken dikkat edilecek hususlar :

1 — Kan nümunesi almadan önce kan alınacak yer evvelâ sabun ve su sonra saf alkol ile asit, alkali veya insektisit bulaşmasını gidermek için dikkatlice temizlenir ve temiz pamuk ile kurulur.

2 — Kontrol kan nümunesi, nümune alındığı tarihten üç ay evveline kadar organik fosforlu ilâçlara hiçbir şekilde maruz kalmamış bir normal sıhhatli şahıstan alınmalıdır. Bunun yerine bir normal kan stok nümunesi de kullanılabilir fakat bir pıhtılaştırmayıcı madde olarak yalnız Heparin kullanılması uygundur. Citrate veya oxalete PH değişmelerine sebebiyet verebilirler ve katiyen kullanılmamalıdır.

3 — Denemeler arasında reaksiyon tüpleri ve tıplar destile suyla iyice dikkatlice yıkanmalıdır; çünkü denemeler PH değişmesine dayandığından hiçbir asit veya alkol bulaşması katiyen olmamalıdır.

4 — Denemeler sırasında bütün pipetlerin içleri nefesteki CO₂ bulaşması neticesi asiditeyi arttırmak ve neticeden yanlış sonuçlar almaktan kaçınmak için pipet ile mahlül alınmaları nefesle değil puar ile yapılmalıdır.

5 — Cholinesteraz diskindeki % 100 normal cholinesteraz değeri sıhhatli Avrupa erkeklerinde ortalama değerlerine istinat ettirilmiştir. Tropik memleketlerin Avrupalı olmayan insanların cholinesteraz % 75-87 limitleri içinde daha düşük normal değerler gösterir. Dişiler normal olarak erkeklere nazaran biraz düşük cholinesteraz faaliyetine sahiptirler.

6 — Şahıslar arasında normal kandaki cholinesteraz faaliyeti bakımından önemli denebilecek derecede farklar vardır. Bundan dolayı mümkün olduğu takdirde organik fosforlu ilâçlarla çalışmaya başlamadan önce, bütün işçilerin normal kan faaliyetlerini tesbit etmek lâzımdır.

7 — İndicator kan solusyonu ılık iklim şartlarında sadece 4 saate ve sıcak iklim şartlarında iki saate kadar dayanıklıdır.

Bundan dolayı tecrit edilmiş işçilerden ayrı ayrı 0,01 ml. kan nümune-leri toplanmalı ve 0,5 ml. indicatör solusyonu içinde mahlüller olarak kapalı reaksiyon tüpleri içinde muhafaza edilmelidir fakat yukarda verilen zamanlar içinde muhakkak analiz edilmelidir.

8 — Ani olarak Yeşil-Mavi'den portakal sarısına kadar renk değişmesi ekseriya asit bulaşmasına işarettir. Bu gibi hallerde tüpleri destile suyla yıkayarak denemeyi tekrarla. Reaksiyon tüpünde herhangi bir renk değişmesini temin etmekteki muvaffakiyetsizlik çok fazla ilâca maruz kalmış bir işçiden alınan kanda cholinesteraz'ın tamamen kaybolmasından olabileceği gibi kan veya substrate solusyonu veya alkali ilâve etmeyi ihmal etmekten de olabilir. Bundan dolayı bütün bu gibi halleri teyit için denemenin tekrarlanmasına lüzum vardır.

C — Metodun uygulanması ile ilgili lâboratuvar çalışmaları :

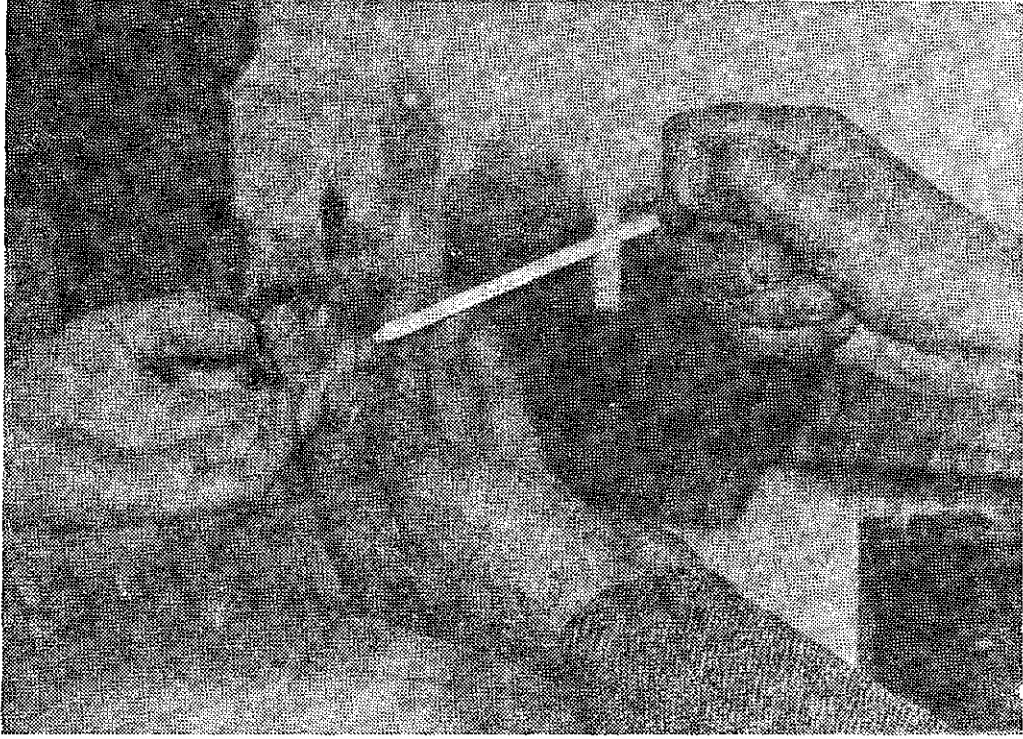
Enstitümüz Toksikoloji Lâboratuvarında, organik fosforlu zirai mücadele ilâçlarıyla meydana gelen zehirlenmeleri kandaki cholinesteraz miktarını ölçerek tesbit eden kolorimetrik kimyevi analitik metodu ile gerek bu metodun uygulanması ve gerekse kontrolü bakımından iki yıl süre ile denemeler yapılmıştır. Daha önce de izah edildiği gibi, organik fosforlu insektisitlerin çalışma esnasında deri ve teneffüs yolu ile absorbe olunması bünyede bir zehirlenme meydana getirmekte ve zehirlenme derecesi de kandaki cholinesteraz miktarı ve buna bağlı olarak da PH. değişmesi ile ifade edilmektedir. Kolorimetrik kimyevi analitik metodu basit ekipmanla kısa bir zamanda çok sayıda şahsın organik fosforlu insektisitlerle zehirlenme derecesini ölçmekte ve gereken emniyet tedbirlerinin kolaylıkla alınmasını mümkün kılmaktadır. Bu metodun uygulanması ile tatbikatta bu tip ilâçlarla vuku bulacak ölümlerin önlenmesi mümkün görülmektedir.

Bu metodun lâboratuvarımızda uygulanması sırasında denemelere başlamadan önce, denemelerde kullanılacak cam, tüp, mahlül kapları, kan almaya yarayan kapılar pipet v.s. gibi bütün malzeme destile su ile yıkanarak yanlış neticeye varılmaması sağlandı.

Denemelere başlamadan 15 dakika önce, yukarıda verilen miktarlar üzerinden brome-tymol blue ile indicatör solisyon acetilcholine percolerate ile substrate solusyon taze destile su ile hazırlandı ve ağzı sıkıca kapana-bilen (mahlülleri havadaki CO₂ tesirinden korumak için) şişelere konuldu. Hazırlanan bu mahlüllerin (Indicatör ve substrate solusyonla) bozuk olup olmadığını kontrol için bir tüp içerisine 0,5 ml. indiactör solusyondan alındı ve bunun içine organik fosforlu insektisitlere maruz kalmamış bir şahıstan alınan 0,01 ml. kan (Şekil: 4-5) konulup üzerine 0,5 substrate solusyon ilâve edildi. Tüp muhtevası iyice karıştırıldıktan sonra 2,5 ml. cam hücre içerisine aktarılarak komparatörün sağ gözüne yerleştirildi ve komparatörde de % 12,5-0 rı temsil eden renkle karşılaştırıldı. Cam hücredeki karışımın rengi % 12,5-0 renginden daha sarı olmadığından mahlüllerin bozuk olmadığına hükmedildi.

Bunu takiben bir tüp içerisine alınan 1 ml. destile suya ilâca maruz kalmamış bir şahıstan alınan 0,01 ml. kan konulup iyice çalkalandıktan sonra 2,5 ml. cam hücreye aktarıldı ve komparatörün sol gözüne yerleş-

tirildi. Komparatörün sağ gözünde (Şekil: 6) aynı şahıstan alınan 0,01 ml. lik kan + 0,5 ml. indicator + 0,5 ml. substrate solusyon ile hazırlanan mahlül iyice çalkalandıktan sonra ağzı kapalı olarak, PH değişmesinin tam manasıyla vuku bulması için 15-20 dakika bekletildikten sonra, yerleştirildi ve cholinesteraz'ın kırılma derecesini tesbit için muhtelif renklerle mukayese edildi ve neticede hiç kırılma olmadığı yani % 100 grubuna girdiği tesbit edildi. Bundan sonra ilâca maruz kalmış şahıslardan alınan kan nümuneleri bu rakam ile mukayese edildi.



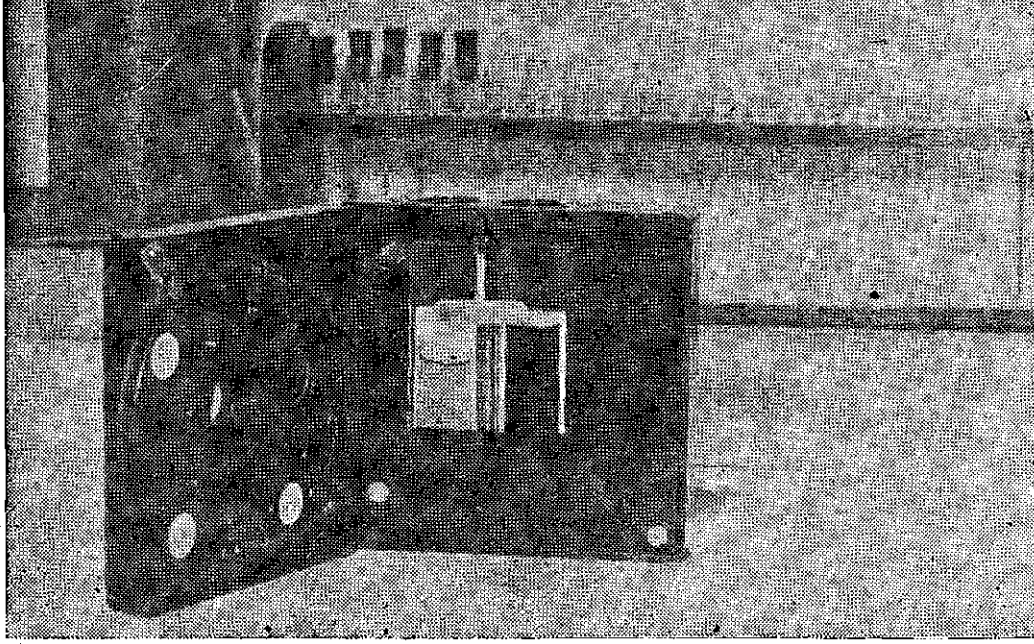
ŞEKİL 5. Kapilar pipette parmak ucundan 0.01 ml. kan alınması

Enstitümüzün muhtelif lâboratuvarlarında organik fosforlu insektisitlerle çalışan ve dolayısıyla bu ilâç grubuna maruz kaldıkları kabul edilen şahıslardan deneme tüpleri 1 den itibaren bu şahıs isimlerine göre işaretlendi ve metodda belirtilen esaslara göre birer dakikalık zaman farklarıyla kan nümuneleri alınarak mahlüller ile karıştırıldı ve 15-20 dakikalık bir beklemeden sonra yine birer dakikalık zaman faşlaları ile komparatörün sağ gözüne konularak (sol gözde bulunan 0,01 ml. kan + 1 ml. destile su mahlülü yerine bırakılarak) disk çevrilmek suretiyle nümunelerin uydukları renklere göre kırılmalar okundu.

Lâboratuvarımızda yapılan denemelerden alınan neticeler şöyledir.

Kimyevi Analiz Lâboratuvarından 3 kişi sıra ile % 25-30, % 25-0, % 50-75.

Fiziki Analiz Lâboratuvarında çalışanlardan sıra ile % 62,5-75, % 50-25, % 50-25, % 37,5-25.



ŞEKİL 6. Sol tarafta normal şahıstan alınan kan şalidi ve sağ tarafta hasta şahıstan alınan kan numune kompratörde okunmaya hazır durumda

Bio assay Lâboratuvarında çalışanlardan sıra ile % 75-50, % 50-25, % 50-25, % 50-25.

Bulunan neticeleri kontrol etmek üzere yapılan ikinci seri denemelerden de aynı neticeler alınmıştır.

Yukarda verilen neticelerin tetkikinden de anlaşılacağı üzere organik fosforlu insektisitlere maruz kalmadan mütevellit kan'daki cho'linesteraz miktarının kırıldığı kolaylıkla görülmektedir. Bu neticeler aynı zamanda metodun verilen esaslar içinde tatbik edildiği zaman, kan'daki cholinesteraz kırılmalarını, dolayısıyla zehirlenmeleri gayet sıhhatli bir şekilde tespit ettiğini ortaya koymaktadır.

Ö Z E T

Tarlada (açık havada) süratle cholinesteraz tesbiti.

Müstahsil, ilâçlama işlerinde çalışanlar ve araştırmacılar koruyucu emniyet tedbirlerinin alınmasına rağmen organik fosforlu ilâçları kullanırken bu zehirli kimyevi maddeleri önemli derecede absorbe ederek bir riske girebilirler. Fazla absorbsiyon ve emniyetli olmıyan çalışma metodları kan'daki normal cholinesteraz anzim faaliyetlerinin azalması ile, tesbit edilebilir. Cholineraz faaliyetini lâboratuvarda hassas olarak ölçmek için çok metod vardır. Fakat ani vak'alarda veya lâboratuvardan uzak olan yerlerde çabuk netice veren bir metoda sık sık ihtiyaç duyulur. Bu makalede, bu metodla Ankara Zirai Mücadele İlâç ve Aletleri Enstitüsünde yapılan denemeler kısaca bahis edilmiştir.

SUMMARY

The rapid field Determination of cholinesterase.

Farmers, spray operators, and research workers using organic phosphorus insecticides may run some risk of significant absorption of these toxic chemicals despite the adoption of protective measures. Over-absorption, and unsafe working methods are detectable by depression of the normal cholinesterase enzyme activity of the blood. Several methods exist for the accurate measurement in the laboratory of cholinesterase activity but a rapid «Field» method is frequently needed for use in emergencies or away from the laboratory. The method of Linperos and Ranta has been modified by Edson to give a combination of speed, convenience and reasonable precision for emergency or routine cholinesterase determination with simple equipment. In this article the experiments which were carried out with this apparatus at the Plant Protection Chemicals and Equipments institute, have been briefly mentioned.