

## **DİAZİNONUN SIÇAN HEPATOSİTLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ**

### *Electron Microscopic Investigation of Effects of Diazinon on Rat's Hepatocytes*

**Yavuz ULUSOY<sup>\*</sup> Burhan TOPRAK<sup>\*</sup> Meltem UZUNHİSARCIKLİ<sup>\*\*</sup> Ayşe ÖĞÜTÇÜ<sup>\*\*</sup>**

#### **ÖZET**

*Diazinon zirai mücadelede yaygın olarak kullanılır ve hem insanlar hem de hayvanlar tarafından sindirim, solunum ve deri yoluyla absorbe olmaktadır. Bu çalışmada 15 mg/kg/gün diazinon mısır yağı içinde erkek Wistar ratlara 5 hafta boyunca oral intübasyon yolu ile verilmiştir. Elektron mikroskopuyla yapılan inceleme sonucunda 1. hafta sonunda hepatositlerde patolojik bir durum gözlenmezken, 2. hafta sonunda mitokondrilerde hafif şişme, 3. hafta sonunda mitokondrilerde aşırı şişme, 4. hafta sonunda hepatositlerde şişme, 5. hafta sonunda hepatositlerde piknotik çekirdek, sitoplazmada vakuolizasyon ve mitokondrilerde şişme ve vakuolizasyon meydana gelmiştir.*

*Anahtar Kelimeler:* Diazinon, pestisit, karaciğer, elektron mikroskopu

#### **SUMMARY**

*Diazinon is widely used in agricultural control and it is absorbed by both human and animals through ingestion, inhalation and percutaneously. In this study diazinon was given to male Wistar rats by oral intubation 15mg/kg/per day in corn oil for 5 weeks. The result of investigations with electron microscopy; at the end of 1<sup>st</sup> week no pathological findings was observed, at the end of 2<sup>nd</sup> week weak swelling of mitochondria, at the end of 3<sup>rd</sup> week extreme swelling of mitochondria, at the end of 4<sup>th</sup> week swelling of hepatocyte, at the end of 5<sup>th</sup> week picnotic nucleus in hepatocytes, vacuolization of cytoplasm and swelling and vacuolization of mitochondria were occurred.*

*Key Word:* Diazinon, pesticides, liver, electron microscopy

---

**Kabul Tarihi: 11.11.2004**

<sup>\*</sup> Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü  
<sup>\*\*</sup> Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

## **GİRİŞ**

Büyük ölçüde çevresel kirliliğe neden olan pestisitler bilinçsiz olarak rastgele kullanılmaktadır ve bu nedenle de çeşitli problemlere sebep olmaktadır. Organofosfatlı ve organoklorlu pestisitlerin kalıntıları toprak, su, sebze ve besin ürünlerinde tespit edilmiştir (7, 8). Organofosfatlı pestisitlerin hedef dokularda asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonuna sebep oldukları bilinmektedir (12). Organofosfatlı pestisitler bir çok organda toksik etkiye sebep olmaktadır (20). Organofosfatlı pestisitler immün sistem (6, 16), üriner sistem (17), üreme sistemi (9), pankreas (5, 10), kalp (11) ve hematolojik ve biyokimyasal (19) parametrelerde değişikliklere neden olmaktadır.

Diazinon (0,0-diethyl-0-[2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl]phosphorothioate) asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe eden, geniş spektrumlu organofosfatlı bir insektisittir. Dünyada geniş ve etkili bir biçimde tarım ürünlerindeki, süs bitkilerindeki, meyvelerdeki ve sebzelerdeki böceklerin kontrolünde kullanılmaktadır (4).

Diazinon rat karaciğerinde sitotoksik etki göstermektedir (15). Bununla beraber karaciğerde enzim sistemini bozmaktadır (12, 18). Aynı zamanda diazinon diğer organizmalarda da toksik etkiye sebep olmaktadır (13).

Bu çalışmanın amacı ratlarda diazinonun sebep olduğu hepatotoksik etkiyi elektron mikroskopu ile göstermektir.

## **MATERYAL VE METOD**

### **Hayvanlar**

Bu çalışmada Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden temin edilen erkek Wistar ratlar (yaklaşık olarak 230-250 g ağırlığında) kullanılmıştır. Ratlar plastik kafesler içerisinde, standart laboratuvar diyeti ve su ile beslenmiştir.

### **Kimyasallar**

Diazinon, 99% teknik saflıkta olup. Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

### **Hayvanlara Muamele Şekli**

Ratlar kontrol grubu (n=10) ve deney grubu (n=50) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Diazinon deney grubundaki ratlara gavage yoluyla mısır yağı içinde (her hayvan için 0.2 ml) 15 mg/kg/gün dozda verilmiştir. Kontrol grubu ratlara eşit miktarda mısır yağı verilmiştir. Deneyler toplam 5 hafta sürmüştür. Deney sürelerinin sonunda ratlar dietileter ile anestezi yapılarak karaciğer dokuları elektron mikroskopik inceleme için alınmıştır.

### **Elektron Mikroskopik Çalışma**

Karaciğerin elektron mikroskopik incelemeleri için sodyum fosfat tamponu (200 mM, pH: 7,4) (Merck, Alfred Paluka Co., Türkiye) içinde hazırlanmış %3'lük Gluteraldehit (Agar Sci.Ltd. Essex, England) içinde 4 °C'de 3 saat bekletilerek ön fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Dokular aynı tamponla yıkanmıştır ve sodyum fosfat tamponu (pH: 7,4) içinde hazırlanmış %1'lik ozmiyum tetraoksit (Agar Sci.Ltd. Essex, England) 4 °C'de 1 saat bekletilerek son fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri aynı tampon ile 4 °C'de 3 saat yıkanmıştır ve dereceli etanol serilerinde (Agar



Sci.Ltd. Essex, England) dehidre edilmiştir ve Araldit (Agar Sci.Ltd. Essex, England) içinde bloklanmıştır. Bu bloklardan Reichert OM U3 (Leica Co. Austria) ultramikrotom ile ince kesitler alınmıştır. Kesitler %2 uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır. İnce kesitler Jeol 100 CXII Elektron mikroskobunun TEM (Jeol Ltd., Japan) kısmında 80 kv'de incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

## BULGULAR

### **Elektron Mikroskop Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Kontrol grubuna ait karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopik incelemelerinde, çekirdek yuvarlak bir yapı gösterirken sitoplazmada çok sayıda mitokondri ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır (Şekil 1). Ratlara diazinon uygulandıktan 1 hafta sonra hepatositlerde herhangi bir patolojik durum gözlenmemiştir. Endoplazmik retikulumlar ve mitokondriler normal bir yapı göstermektedir (Şekil 2). 2. haftanın sonunda hepatositlerde bulunan mitokondrilerde hafif şişme gözlenmiştir, ancak endoplazmik retikulumlarda bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3). 3. haftanın sonunda hepatositlerde bulunan mitokondrilerde aşırı şişmeler meydana gelmiş ve mitokondri matriksi elektron yoğun yapısını kaybederek, elektron opak bir yapı kazanmıştır (Şekil 4). 4. haftanın sonunda hepatositlerde ciddi bir şişme gözlenmiş, bazı mitokondrilerde de vakuolizasyon meydana gelmiştir (Şekil 5). 5. haftanın sonunda hepatositlerde piknotik çekirdek gözlenmiş, sitoplazmada kısmi çözümler ve bazı mitokondrilerde aşırı şişmeler meydana gelmiştir (Şekil 6).

## TARTIŞMA

Diazinon insanda ve hayvanlarda solunum, sindirim ve deri yoluyla absorbe olmaktadır. Diazinon ağız yoluyla alınmasını takiben sindirim sisteminden absorbe edilerek karaciğerde metabolize olmaktadır (3). Diazinon, organofosforlu bir insektisit olup endüstriyel ziraatta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve bu zirai alanlarda çalışanlar ve halk için potansiyel olarak maruziyet riski oluşturmaktadır (2, 21). Teknik diazinon için oral LD<sub>50</sub> değeri ratlarda 1250 mg/kg'dir (21)

Diazinon ile ilgili organ patolojisi çalışmaları nadirdir. Handy ve ark. (6), diazinonu beyaz albino *Mus musculus*'lara (LD<sub>50</sub>=80-135mg/kg) 20 mg/kg/gün dozu 45 gün boyunca oral yolla uygulamışlardır ve timus ve dalak trabeküllerinde nekrotik dejenerasyon, timus ve lenf nodlarının korteksinde ve medullalarında hiperplazi ve dalağın kırmızı ve beyaz bölgesinde hiperplazi ve bu dokular da ara sıra kanama tespit etmişlerdir. Kan sürümlerinde hipokromik kırmızı kan hücreleri ve anormal çekirdekli vakuolleşmiş beyaz kan hücrelerine dikkat çekmişlerdir. Bizim çalışmamızda LD<sub>50</sub> dozunun çok altında diazinon uygulanmasına rağmen hepatositlerde patolojik bulgulara rastlanmıştır.

Neishabouri ve ark. (16) 25, 2 ve 0.2 mg/kg dozlarda diazinonu 28 gün boyunca haftada 5 gün olmak üzere erkek farelere uygulamışlardır. 0.2 ve 2 mg/kg dozlarda timus, kemik iliği, dalak ve periferik kanda histolojik olarak değişiklik gözlenmemiştir. 25 mg/kg doz uygulama yapılan grupta ise dalakta beyaz bölgede ve timusta kapsüller ve trabeküller hasar ile medullar atrofi formunda önemli değişiklikler gözlenmişlerdir. Kemik iliğinde ise



önemli histopatolojik değişiklikler gözlenmemiştir. Dalağın kırmızı bölgesinin beyaz bölgeye oranı önemli ölçüde artmıştır.

Aldana ve ark.(1) piretroid bir insektisit olan cypermethrini intraperitoneal yolla 7 gün boyunca 300 mg/kg/gün dozda uygulamışlar ve hepatositlerin mitokondrilerde şişme, matrikste erime ve kristalarda kısalmalara rastlamışlardır. Aynı zamanda düz endoplazmik retikülumlarda da şişme tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da diazinon hepatosit mitokondrilerinde şişmelere sebep olmuştur. Buna bağlı olarak mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon mekanizmasının bozulduğunu söyleyebiliriz (14).

Sonuç olarak LD<sub>50</sub> dozunun çok altında verilen ve zirai mücadelede çok kullanılan bir insektisit olan diazinon rat karaciğer hücrelerinin ince yapısında bozulmalara sebep olmaktadır. Bu nedenle, diazinon gibi organofosfatlı insektisitlerin kullanımına dikkat edilmeli, özellikle ilaçlama yapılan alanlardan insan ve hayvanların uzak tutulması gerekmektedir.

### **Teşekkür**

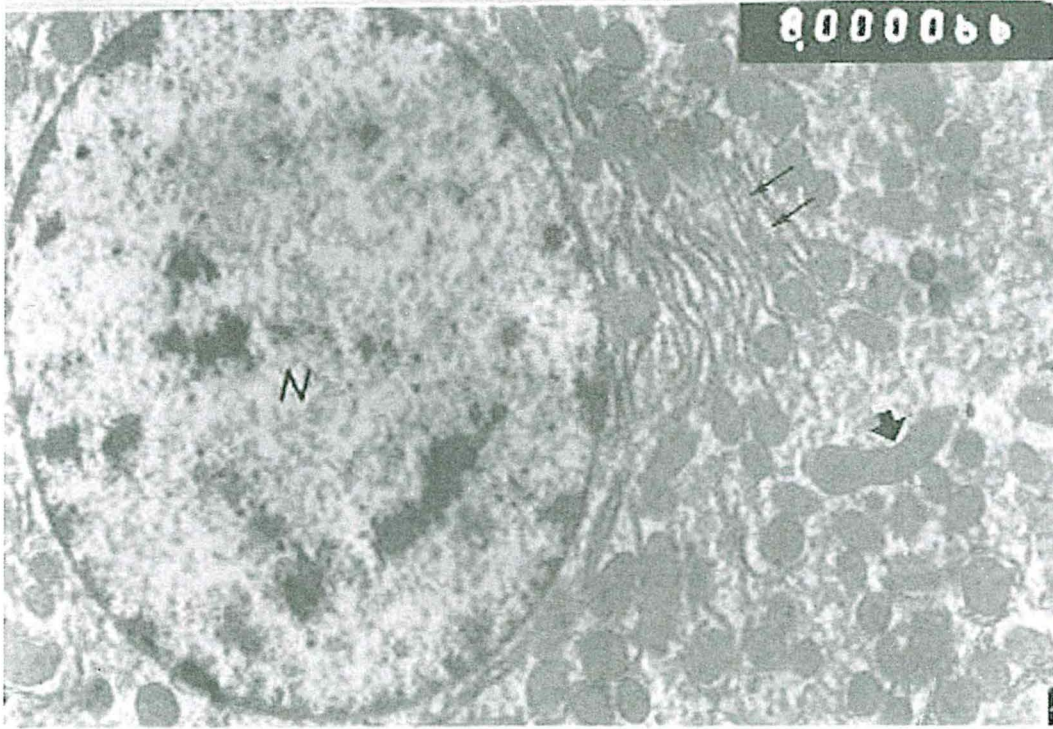
Bu çalışmanın bloklarının kesitleri, gridlerin incelenmesi ve fotoğrafların çekilmesi Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Elektron Mikroskop ünitesinde yapılmıştır. Elektron Mikroskop ünitesinin faaliyete geçmesinde başta Enstitü Müdürü Dr. Nahit YAZICIOĞLU'na ve bize süresiz elektron mikroskop eğitimi veren ve yayının hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yusuf KALENDER'e teşekkür ederiz.

### **KAYNAKLAR**

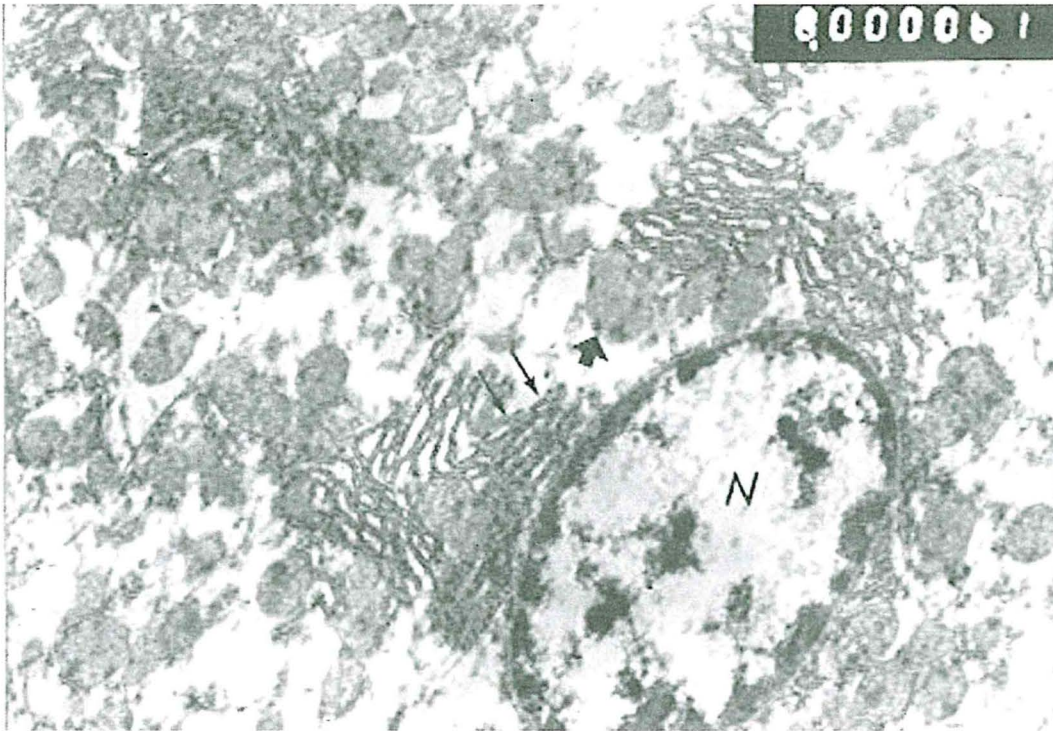
1. ALDANA L, TSUTSUMI V, CRAIGMILL A, SILVEIRA MI, MEJIA EG (2001).  $\alpha$ -Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicol Lett*, 125 (1-3), 107-116.
2. BAILY HC, DEANOVIC L, REYES E, KIMBALL T, LARSON K, CONNER V, HINTON DE (2000). Diazinon and Chlorpyrifos in urban waterways in northern California. USA. *Environ Toxicol Chem*, 19, 82-87.
3. GALLO M, LAWRYK NJ (1991). Organic phosphorus pesticides, In: Hayes WJ, Law (Eds). *Handbook of Pesticide Toxicology*. p.1050-1053.
4. GARFITT SJ, JONES K, MASON HJ, COCKER J (2002). Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses. *Toxicol Lett*, 134 (1-3), 105-113.
5. HAGAR HH, FAHMY AH (2002). A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. *Toxicol Lett*, 133, 161-170.
6. HANDY RD, ABD-EL SAMEI HA, BAYOMY MFF, MAHRAN AM, ABDEEN AM, EL-ELAIMY EA (2002). Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology*, 172 (1), 13-34.
7. IARC (1983). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Miscellaneous Pesticides. vol. 30. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
8. JOHN S, KALE M, RATHORE N, BHATNAGAR D (2001). Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*, 12, 500-504.
9. JOSHI SC, MATHUR R, GAJRAJ A, SHARMA T (2003). Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environ Toxicol Pharm*, 14, 91-98.
10. KALENDER S, KALENDER Y, ÖĞÜTCÜ A, UZUNHISARCIKLI M, DURAK D, AÇIKGÖZ F (2004). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202 (3), 227-235.
11. KALENDER Y, KALENDER S, UZUNHISARCIKLI M, ÖĞÜTCÜ A, AÇIKGÖZ F, DURAK D (2004). Effects of

- endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. *Toxicology*, 200 (2-3), 205-211.
12. **KAPPERS WA, EDWARDS RJ, MURRAY S, BOOBIS AR** (2001). Diazinon is activated by CYP2C19 in Human Liver. *Toxicol Appl Pharm*, 177, 68-76.
  13. **KEIZER J, NAGEL GDR, TERESA VOLPE T, PAOLA GNEMI P, LUCIANO VITTOZZI L** (1995). Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Sci Total Environ*, 171 (1-3), 213-220.
  14. **MOUSSA TA, HAFEZ MM** (1995). The effect of dimethoate on the mitochondria of the guinea pig. *Egypt J Histol*, 6, 101-106.
  15. **NAKAGAWA Y, MOORE G** (1999). Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 58 (5), 811-816.
  16. **NEISHABOURI EZ, HASSAN ZM, AZIZI E, OSTAD SN** (2004). Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. *Toxicology*, 196 (3), 173-179.
  17. **RODRIGON L, HERNÁNDEZ AF, LÓPEZ-CABALLERO JJ, GIL F, PLA A** (2001). Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. implications for its physiological role. *Chem-Biol Interact*, 137 (2), 123-137.
  18. **SAMS C, COCKER J, LENNARD MS** (2003). Metabolism of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes. *Toxicol Lett*, 144, 146.
  19. **SELMANOGLU G, BARLAS N, SONGUR S, KOCKAYA EA** (2001). Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Hum Exp Toxicol*, 20 (12), 625-630.
  20. **SULTATOS LG** (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J Toxicol Env Health*, 43 (3), 271-289.
  21. **WHO** 1998. Diazinon. Environmental Health Criteria 198, International Program on Chemical Safety, United Nations Environmental Program. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.



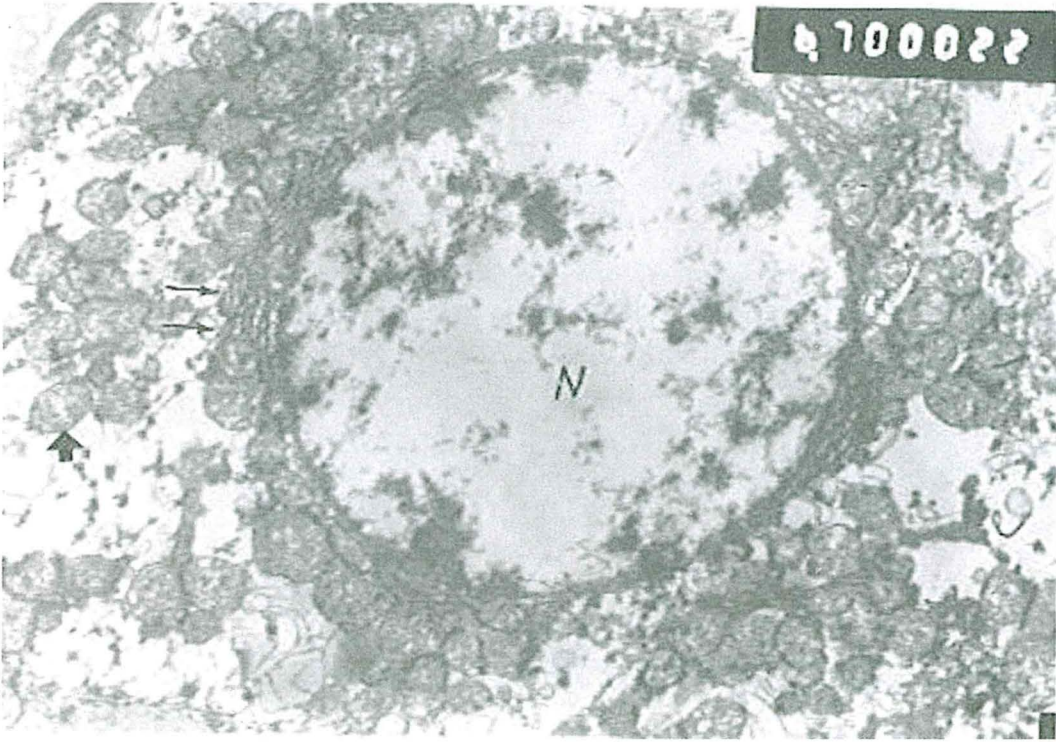


Şekil 1. Kontrol grubu rat karaciğerinde bir hepatositin elektron mikrografı. N: Nukleus;  $\blacktriangleright$  : Mitokondri,  $\blacktriangleright$  : Endoplazmik retikulum, X 8 000.

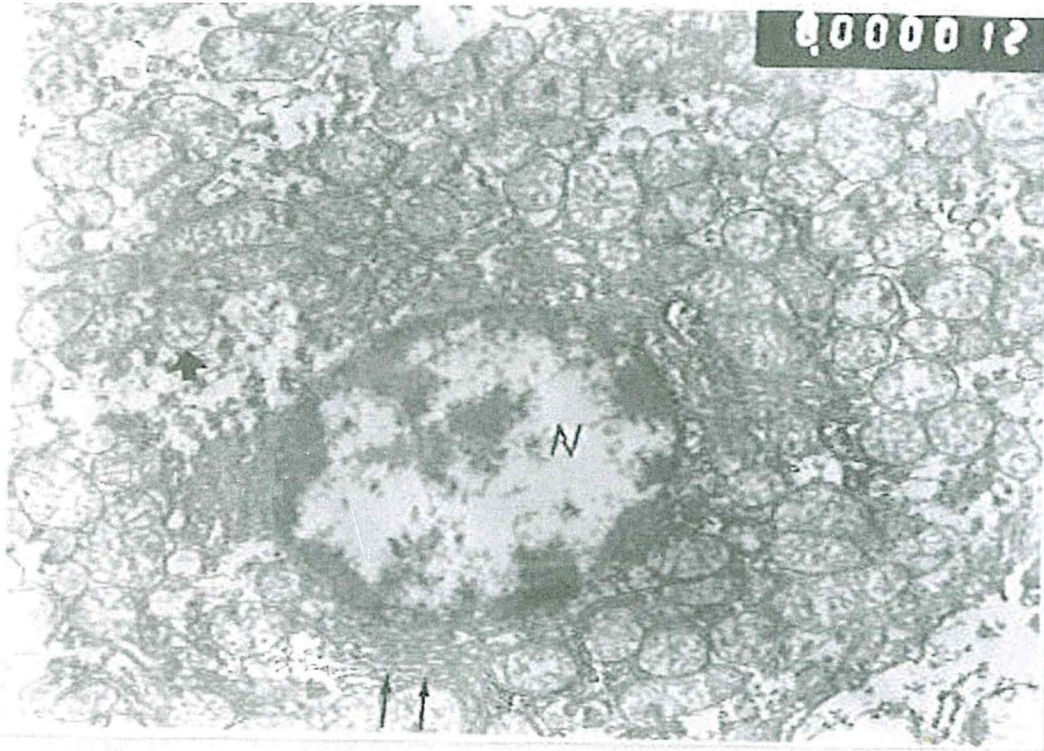


Şekil 2. Ratlara diazinon uygulandıktan 1 hafta sonra bir hepatositin elektron mikrografı. N: Nukleus;  $\blacktriangleright$  : Mitokondri,  $\blacktriangleright$  : Endoplazmik retikulum, X 8 000.



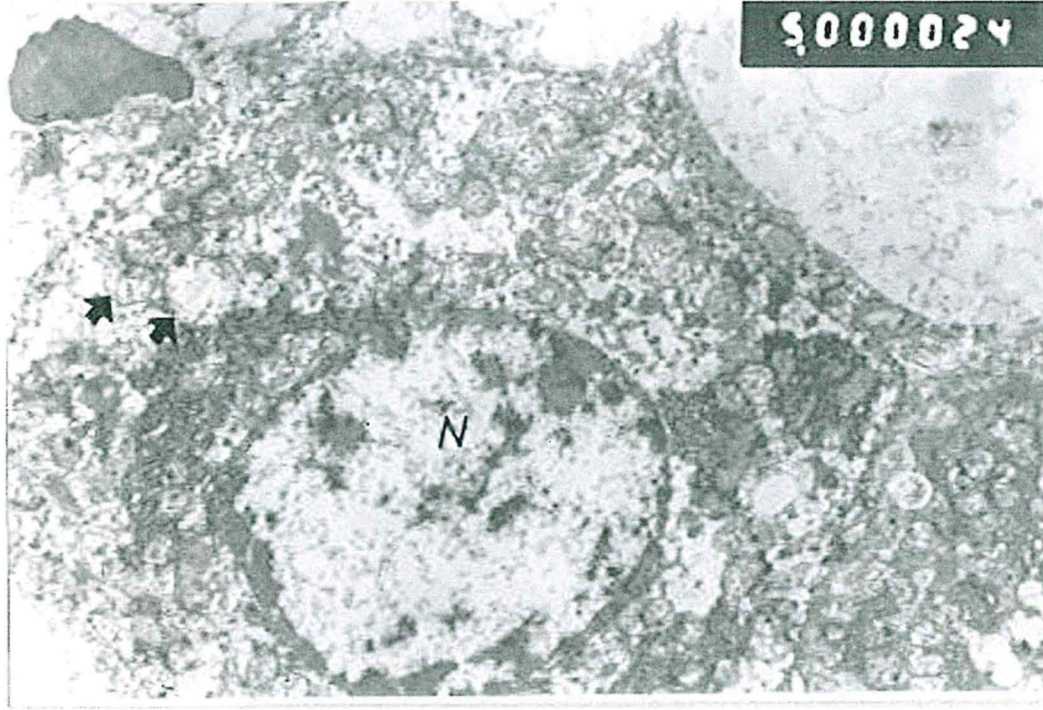


*Şekil 3. Ratlara diazinon uygulandıktan 2 hafta sonra hepatositlerin sitoplazmalarındaki mitokondrilerinde (→) şişmeler; → : Endoplazmik retikulum, N: Nukleus, X 6 700.*

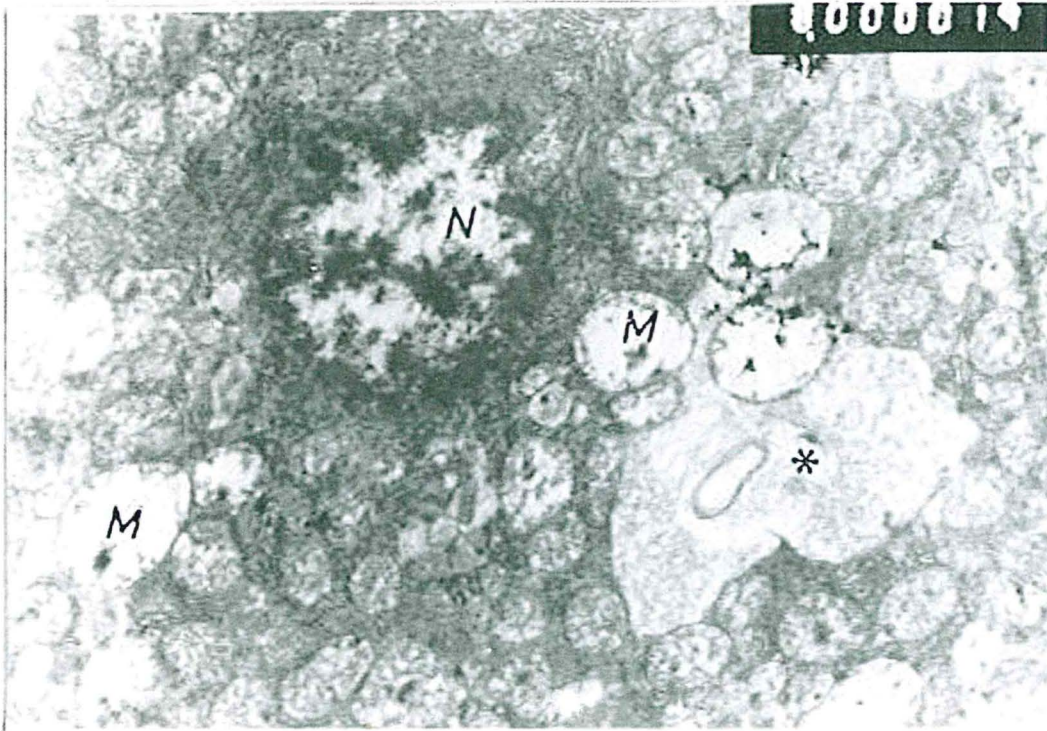


*Şekil 4. Ratlara diazinon uygulandıktan 3 hafta sonra hepatositlerin mitokondrilerinde aşırı şişme (→), X 8 000.*





Şekil 5. Ratlara diazinon uygulandıktan 4 hafta sonra hepatositlerde şişme, bazı mitokondrilerde vakuolizasyon (→), N: Nukleus, X 5 000.



Şekil 6. Ratlara diazinon uygulandıktan 5 hafta sonra hepatositlerde piknotik çekirdek (N), sitoplazmada erimeler (★) ve mitokondrilerde vakuolizasyon, X 8 000