

Klorprifos'un ratlarda ince bağırsak üzerine etkisi ve kuersetin ve kateşin'in koruyucu rolü

Feriha ÖZMEN¹, Fatma Gökçe UZUN¹, Filiz DEMİR¹, Yavuz ULUSOY²

¹Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü; ²Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Patoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 29.04.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

Özet: Bu çalışmada organofosfatlı bir pestisit olan ve yaygın olarak kullanılan klorprifos'un ratların ince bağırsakları üzerine olumsuz etkileri ve kuersetin ve kateşin'in bağırsakları koruyucu özelliği araştırıldı. Bu amaçla erkek ratlara klorprifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀), kateşin (20 mg/kg), kuersetin (20 mg/kg), kateşin(20 mg/kg) + klorprifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀) ve kuersetin (20 mg/kg) + klorprifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀) kombinasyonları oral olarak dört hafta süre ile uygulandı. Uygulamadan dört hafta sonra ratların ince bağırsak dokuları histopatolojik incelemeler için alındı ve ışık mikroskopunda kontrol grubu ile kıyaslamalı olarak incelendi. Kateşin ve kuersetin uygulanan gruplar ile kontrol grubu ratların ince bağırsak dokularında histolojik olarak farklılık gözlenmedi. Klorprifos uygulanan ratların ince bağırsak dokusunda villuslarda atrofi, nekroz ve muskular mukozada ödem gözlemlendi. Kateşin + klorprifos ve kuersetin + klorprifos uygulanan gruplarda mikroskobik bulguların hafif şiddette olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak kateşin ve kuersetinin, klorprifosun meydana getirdiği hasarı azalttığı tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Kateşin, klorprifos, kuersetin, histopatoloji, ince bağırsak.

Chlorpyrifos induced small intestine toxicity in rats and protective role of quersetin and catechin

Summary: In this study we investigated that chlorpyrifos which is a widely used an organophosphorous pesticide induced small intestine toxicity and protective role of quersetin and catechin. For this reason, chlorpyrifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀), catechin (20 mg/kg), quercetin (20 mg/kg), catechin (20 mg/kg) + chlorpyrifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀) and quercetin (20 mg/kg) + chlorpyrifos (5.4 mg/kg 1/25 LD₅₀) were given to male rats orally for four weeks. At the end of fourth week, histopathological changes in the small intestine tissues were investigated using light microscope comparatively with control group. At the end of the 4th week, there were no histopathological changes between the catechin-treated and quercetin-treated groups compared to the control group. After four weeks of chlorpyrifos exposure shortening and necrosis in intestinal villi and edema in muscular mucosa were observed in the small intestine tissues. Milder histopathological changes were observed in animals co-treated with catechin plus chlorpyrifos or quercetin plus chlorpyrifos. As a result, it appears that catechin and quercetin moderated chlorpyrifos-induced toxicity.

Key words: Catechin, chlorpyrifos, histopathology, quercetin, small intestine.

Giriş

Organofosfatlı (OP) pestisitler tarımsal alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve çevre kirliliği ile birlikte insan ve hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmelere yol açmaktadırlar (17). Organofosfatlı pestisitler asetilkolinesterazın (AChE) ve pseudo-kolinesteraz aktivitesinin inhibisyonu sonucu toksik etki oluştururlar (13, 21). OP'li bileşikler hem insanlarda hem de hayvanlarda merkezi sinir sistemi (3), immun sistem (9), üriner sistem (10), üreme sistemi (22, 23), kardiyovasküler sistem (11) gibi pek çok sistemi, dokuyu ve organı etkilemektedir.

Organofosfatlı bir insektisit olan klorprifos (O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothionate)'un hepatik disfonksiyon, immunolojik anormallikler, genotoksikite ve terotojenik etkilere neden olduğu ve DNA'da hasar meydana getirdiği bilinmektedir (24). Klorprifos'un ratların pek çok doku ve organlarında antioksidan enzim seviyelerinde değişiklikler meydana getirdiği belirtilmiştir (18, 24, 25).

Flovanoidler doğada yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir (19). Flavonoidler anti-inflamatuar, antialerjik, antiviral, antibakteriyel ve antitümöral aktivite (5) ve serbest

radikalleri toplayıcı antioksidan aktivite göstermektedirler (1). Kuersetin ve kateşin yaygın olarak kullanılan flavonoidlerdir (1). Yapılan çalışmalarda kuersetinin antialerjik, antiülseratif, antiviral, anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu belirtilmiştir (2). Kateşinin de anti-inflamatuvar, anti-kanserojenik etkilerinin olduğu bilinmektedir (14) ve bu iki bileşiğin koruyucu etkilerini antioksidan aktivite göstererek meydana getirdiği bilinmektedir (4, 16).

Bu çalışmanın amacı, klorprifosun ratlarda ince bağırsaklar üzerine histopatolojik etkilerinin saptanması ve bu değişikliklerin önlenmesinde kuersetin ile kateşinin koruyucu rolünü araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Hayvanlar: Bu çalışmada Lemali Hayvancılık Merkezi'nden temin edilen 300-320 gr ağırlığındaki 36 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Ratlar uygulamaya yapılmadan 10 gün önce karantina altına alındı. Ratlar özel kafesler içerisinde bakılarak, standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi. Ratlara 18-22°C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı. Ratlar kontrol ve uygulama gruplarındaki her kafeste 6 hayvan bulunacak şekilde yerleştirildi. Bu çalışma için Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Kimyasallar: %99 saflıkta organofosfatlı bir insektisit olan klorprifos National Measurement Institute (Australian)'den temin edildi. Kateşin, kuersetin ve dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich marka kullanıldı.

Hayvanlara uygulama planı: Ratlar kontrol grubu (n=6) ve uygulama grubu (n=30) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Uygulama grubu da kendi içerisinde beş gruba ayrıldı. Bunlar: klorprifos uygulanan grup (n=6), kateşin uygulanan grup (n=6), kuersetin uygulanan grup (n=6), kateşin + klorprifos uygulanan grup (n=6), kuersetin + klorprifos uygulanan grup (n=6). Uygulamalar sabah saatlerinde (09.00-10.00) aç olmayan ratlara yapıldı. Uygulamanın yapıldığı ilk gün deneyin 0'ıncı günü olarak kabul edildi.

Kontrol grubu: Her bir rata günlük 1 ml/kg dozda %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) gavaj yoluyla verildi.

Kateşin muameleli grup: Her bir rata günlük 20 mg/kg dozda kateşin, %0.5 DMSO içinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

Kuersetin muameleli grup: Her bir rata günlük 20 mg/kg dozda kuersetin, %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

Klorprifos muameleli grup: Her bir rata günlük 5.4 mg/kg (1/25 LD₅₀) dozunda klorprifos, %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

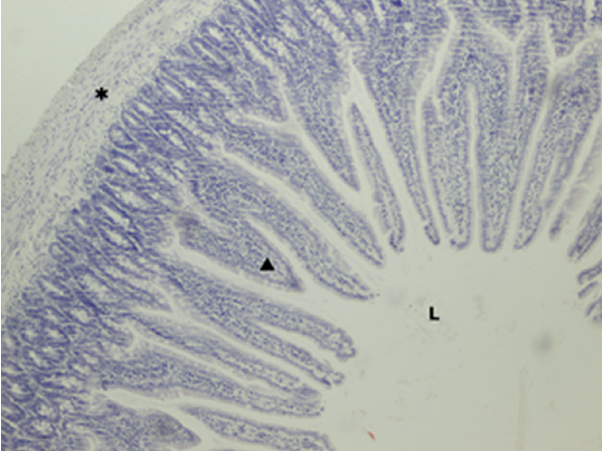
Kateşin + klorprifos muameleli grup: Her bir rata günlük 20 mg/kg dozda kateşin, %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek uygulandı. Uygulamadan yarım saat sonra her bir rata 5.4 mg/kg (1/25 LD₅₀) dozunda klorprifos %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

Kuersetin + klorprifos muameleli grup: Her bir rata günlük 20 mg/kg dozda kuersetin, %0.5 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek uygulandı. Uygulamadan yarım saat sonra her bir rata 5.4 mg/kg (1/25 LD₅₀) dozunda klorprifos %0.5 dimetil sülfoksit içinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

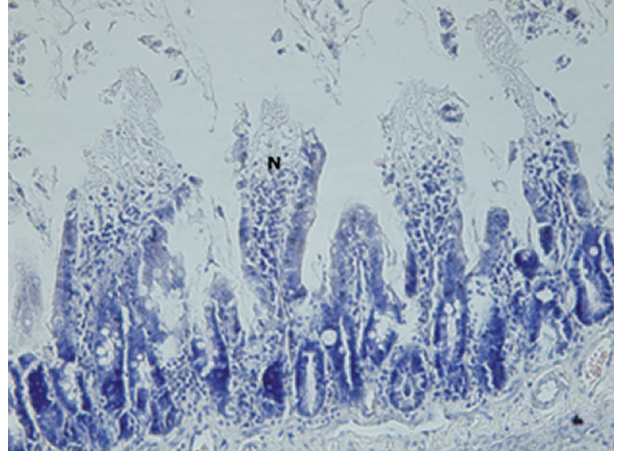
Işık mikroskobu incelemeleri: Histopatolojik incelemeler için dokular %10 nötral formalin fiksatifinde 24 saat tespit edildi. Dokular akarsu altında yaklaşık 1 gece yıkandı ve artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemleri yapıldı. Ardından dokular parafin bloklar haline getirildi. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Microm) ile 6-7 µ kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoxilen-eozin boyası ile boyandı, fotoğraf makinesi ataçmanlı mikroskopta (Olympus E-330, Tokyo, Japan) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Bulgular

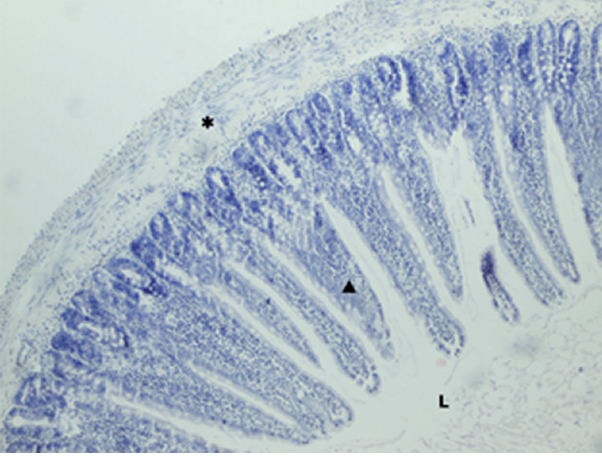
Kontrol grubu ve kateşin ile kuersetin uygulanan ratların ince bağırsak dokularındaki villuslar ve üzerindeki epitel hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3). Klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsak dokusunda villuslarda nekroz, atrofi ve muskular mukozada ödem gözlemlendi (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6). Kateşin + klorprifos ve kuersetin + klorprifos uygulanan grupların ince bağırsak dokularında daha hafif olmak üzere bazı villuslarda epitel hücrelerinde lümene dökülme ve bazı bölgelerde nekrotik alanlar tespit edildi. Kas tabakasının ise düzenli ve normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 7, Şekil 8).



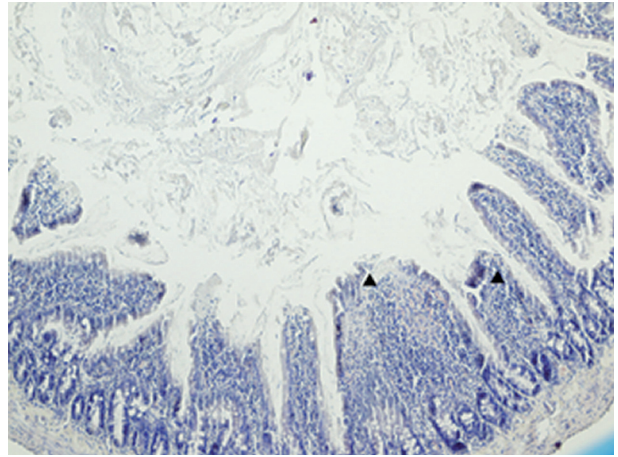
Şekil 1. Kontrol grubu ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. L: Lümen, ▲:Villus, ★:Kas, HE x 100.



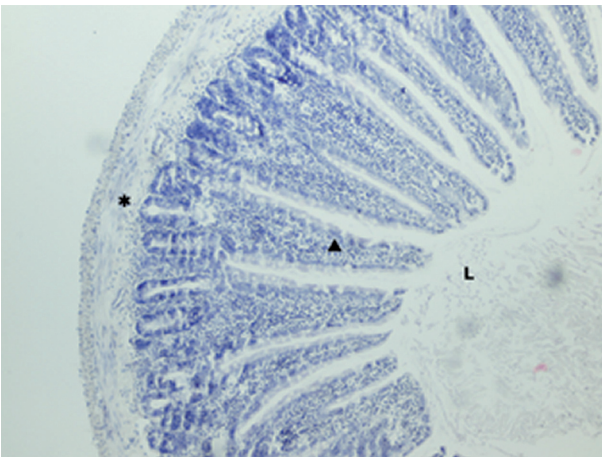
Şekil 4. Klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda nekrotik alanlar (N), HE x 200.



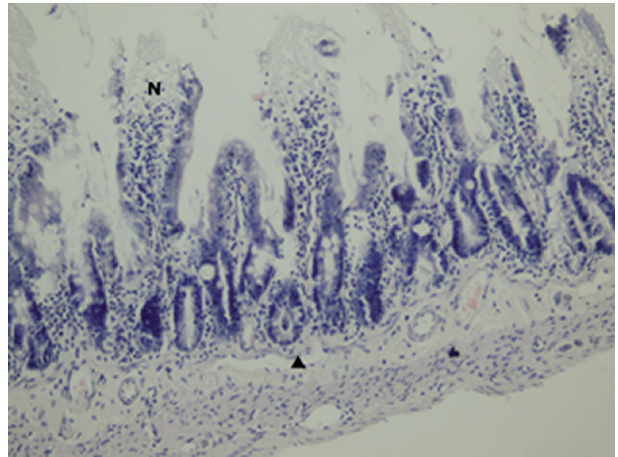
Şekil 2. Kateşin grubu ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. L: Lümen, ▲:Villus, ★: Kas, HE x 100.



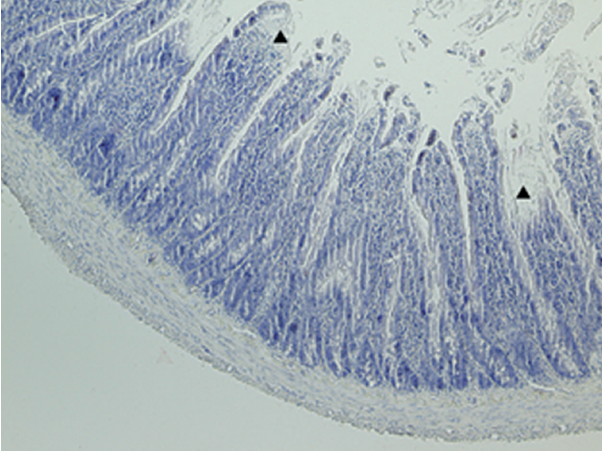
Şekil 5. Klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villus atrofisi (▲), HE x 100.



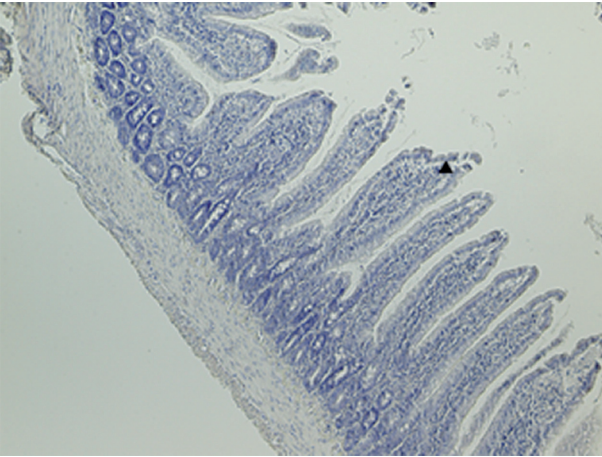
Şekil 3. Kuersetin grubu ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. L: Lümen, ▲:Villus, ★: Kas, HE x 100.



Şekil 6. Klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda nekrotik alanlar (N) ve muskular mukozada ödem (▲), HE x 200.



Şekil 7. Kateşin + klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında yüzey epitelinde dökülme ve bazı bölgelerde nekrotik alanlar (▲), HE x 100.



Şekil 8. Kuersetin + klorprifos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında yüzey epitelinde dökülme ve bazı bölgelerde nekrotik alanlar (▲), HE x 100.

Tartışma ve Sonuç

Organofosfatlı pestisitler ratların çeşitli dokularında histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır (12, 23). Organofosforlu pestisitlerin ince bağırsak dokusunda villuslarda dejenerasyon, hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklere yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur (6, 20).

Ayrıca yapılan çalışmalarda klorprifos'un ratların karaciğer (7), akciğer (15) gibi pek çok dokusunda histopatolojik değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir. Klorprifos'un oral LD₅₀ dozu erkek ratlarda 135 mg/kg'dır (8). Bu çalışmada klorprifos 1/25

LD₅₀ oranında erkek ratlara verildi ve uygulamadan 4 hafta sonra ince bağırsak dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler gözlemlendi. Deney süresi boyunca ratlarda ölüm gözlenmedi. Bu çalışmada klorprifos muamelesinden sonra villuslarda atrofi, nekroz ve muskular mukozada ödem tespit edilmiştir. Bu patolojik değişiklikler klorprifosun ince bağırsakta hücre hasarına neden olmasıyla meydana gelmiş olabilir.

Kateşin ve kuersetin antioksidan bileşiklerdir (4, 16). Kateşin ve kuersetin, biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak antioksidan aktivite göstermektedirler (4). Bu çalışmada kateşin ve kuersetin, klorprifos'un neden olduğu doku hasarını azaltmıştır. Bu koruyucu etkilerini klorprifos'un neden olduğu serbest radikal hasarına karşı antioksidan özellikleriyle sağladığı düşünülmüştür. Benzer şekilde antioksidan özelliği olan vitaminlerle yapılan çalışmalarda doku hasarına karşı koruyucu oldukları görülmüştür (12).

Sonuç olarak klorprifos'un ratların ince bağırsak dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu, kateşin ve kuersetin'in klorprifos'un meydana getirdiği hasarı azalttığı tespit edilmiştir.

Kaynaklar

1. Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR, (2006). *Effect of kuersetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats.* Diabetes Res Clin Pract. 73, 1-7.
2. Anjaneyulu M, Chopra K, (2003). *Kuersetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 27, 1001-1005.
3. Betrosian A, Balla M, Kafiri M, Kofinas G, Marki R, Kakouri A, (1995). *Multiple systems organ failure from organophosphate poisoning.* J Toxicol Clin Toxicol. 33 (3), 257-260.
4. Chander V, Singh D, Chopra K, (2003). *Kateşin, a natural antioxidant protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure.* Pharm Res. 48, 503-509.
5. Coşkun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S, (2005). *Kuersetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas.* Pharm Res. 51, 117-123.
6. Çetin A, Ulusoy Y, Ögütçü A, Uzun, FG, Demir F, (2008). *Dichlorvos'un ratların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve vitamin E'nin koruyucu rolü.* Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 19, 47-52.
7. Goel A, Dani V, Dhawan DK, (2007). *Zinc mediates normalization of hepatic drug metabolizing enzymes in klorprifos-induced toxicity.* Toxicol Lett. 169, 26-33.

8. Goel A, Vijayta D, Dhawan DK, (2005). *Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in klorprifos-induced toxicity*. Chem Biol Interact. 156, 131–140.
9. 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, 13–34.
10. Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcıklı M, Cevrimli BS, Yıldırım M, (2007). *Methyl Parathion Induced Nephrotoxicity in Male Rats and Protective Role of Vitamins C and E*. Pestic Biochem Phys. 88, 213–218.
11. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Acıkgöz F, (2004). *Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E*. Toxicology. 202, 227–235.
12. Kalender S, Uzun FG, Durak D, Demir F, Kalender Y, (2010). *Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamin C and E*. Food Chem Toxicol. 48, 633–638.
13. Kalender Y, Uzunhisarcıklı M, Ogutcu A, Acıkgöz F, Kalender S, (2006). *Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: the protective role of vitamin E*. Environ Toxicol Pharmacol. 22, 46–51.
14. Kalender Y, Yel M, Kalender S, (2005). *Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: The effects of vitamin E and kateşin*. Toxicology. 209, 39–45.
15. Karaöz E, Gultekin F, Akdoğan M, Oncu M, Gokcimen A, (2002). *Protective role of melatonin and combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by klorprifos-ethyl in rats*. Exp Toxic Pathol. 54, 97–108.
16. Korish AA, Arafah MM, (2008). *Kateşin combined with vitamin C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF)*. Arch Gerontol Geriatr. 46, 25–39.
17. Lasram MM, Annabi AB, Elj N, Selmi S, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N, (2009). *Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats*. J Hazard Mater. 163, 1052–1055.
18. Mansour SA, Mossa AH, (2009). *Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by klorprifos and the protective effect of zinc*. Pestic Biochem Phys. 93, 34–39.
19. Morales AI, Vicente-Sanchez C, Santiago Sandoval JM, Egido J, Mayoral P, Arevalo MA, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F, (2006). *Protective effect of kuersetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties*. Food Chem Toxicol. 44, 2092–2100.
20. Ögütçü A, Ulusoy Y, Kahraman K, Uzunhisarcıklı M, Uzun FG, Taştan H, (2007). *Metil Parathion'un sıçanların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 18, 21–26.
21. Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N, (2008). *Caffeic acid attenuates malathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity*. Toxicology. 250, 27–31.
22. Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y, (2009). *Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E*. Food Chem Toxicol. 47, 1903–1908.
23. Uzunhisarcıklı M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Büyükkömürçü F, (2007). *Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E*. Pestic Biochem Phys. 87, 115–122.
24. Verma RS, Mehta A, Srivastava N, (2007). *In vivo klorprifos oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins*. Pestic Biochem Phys. 88, 191–196.
25. Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D, (2008). *Apoptotic effect of organophosphorus insecticide klorprifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E*. Exp Toxicol Pathol. 59, 415–423.