

KOBAYLARDA AKUT NİTRİT ZEHİRLENMESİNİN METHEMOGLOBİN VE HEMOLİTİK ANEMİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Meltem ŞİRELİ*
Bahri EMRE**

Vedat SAĞMANLIGİL*
Mehmet İRİADAM***

The effect of sodium nitrite poisoning on formation of methemoglobin and hemolytic anemia in quinea-pigs

Summary: Investigation was carried out to determine the effect of sodium nitrite induced methemoglobinemia on counts and hemolysis of erythrocytes and also the values of hemoglobin and hematocrit.

In this study 12 adult quinea-pigs weighing 300-450 gr were used. There are equally divided into two groups as the control and experimental.

The quinea-pigs in the experimental group were subcutaneously injected by sodium nitrite as a single dose of 60 mg/kg body weight. The values of erythrocyte, hemoglobin, methemoglobin, hematocrit and percent hemolysis of erythrocytes were measured in the blood samples taken from the control and experimental groups (after one hour of sodium nitrite injection).

In the experimental group, the level of methemoglobin and percent hemolysis of erythrocytes were significantly higher than those in control group. However, values of erythrocyte, hemoglobin and hematocrit were decrease by sodium nitrite injection and these differences were also found statistically significant.

Özet: Araştırma sodyum nitritle oluşturulan methemoglobinemia'nın eritrosit sayısı ve hemoliz oranına, ayrıca hemoglobin ve hematokrit değerlerine etkisinin tespit edilmesi amacıyla yapıldı.

Bu çalışmada 300-450 gr ağırlığında 12 adet kobay kullanıldı. Kobayların yarısı kontrol, diğer yarısı da deney grubu olarak ayrıldı.

Deney grubundaki kobaylara 60 mg/kg canlı ağırlık dozunda sodyum nitrit subcutan yolla verildi. Kontrol grubundan hemen ve deney grubundan bir saatlik bekleme sonrası alınan kan örneklerinde alyuvar, hemoglobin, hematokrit, methemoglobin değerleri ile alyuvarların hemoliz oranları incelendi.

Deney grubunda methemoglobin miktarı ve alyuvar hemoliz oranları kontrol grubuna oranla yüksek ve istatistiksel açıdan önemli bulundu. Buna karşın, sodyum nitrit verilmesiyle alyuvarların sayıları, hemoglobin ve hematokrit değerleri azaldı ve bu farklılıklar da istatistiksel olarak önemli bulundu.

Giriş

Sindirim yoluyla alınan nitratlar, hayvanlarda vücut içinde değişik basamaklardan geç-

rek nitritlere dönüşebilmektedir (10). Nitrat ve nitrit bileşiklerinin zehirliliği bileşiğin cinsine, hayvanın türüne, alınma yoluna, yemlerle ve sularla birlikte alınmasına göre önemli derecede

* Araş. Gvl. Dr., A.Ü. Vet. Fak., Fizyoloji Anabilim Dalı, Ank.

** Prof. Dr. A.Ü. Vet. Fak., Fizyoloji Anabilim Dalı, Ank.

*** Arş. Gvl. Ha.Ü. Fen Edb. Fak. Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa.

değişir (21). Klinik semptomlar ve lezyonlar belirsiz olup, aniden şekillenen bu durumun teşhisi zordur. Methemoglobinemia teşhis edici bir karakteristik bulgu olarak şekillenmektedir (12).

Vücutta kan dolaşımındaki eritrositlerdeki hemoglobin (Hb), yavaş ve az oranda methemoglobine (MHb) okside olur (2, 4, 18). Vücutta dışardan alınan fazla miktarda nitrat ise, nitritlere indirgenir (9, 23). Bu iyonlar ise ferro durumundaki demirin ferri duruma geçirilmesinde ve hemoglobinin methemoglobine oksitlenmesinde rol oynayarak methemoglobinemia tablosunun şekillenmesine yol açar (1, 9, 10, 23).

İnsanda akut veya kronik olarak oluşabilen methemoglobinemia tablosu, eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin genetik olarak yokluğunda, hamile kadınlarda ve bebeklerde daha sık gözlenebilmektedir (6). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda methemoglobinemia oluşturabilecek kimyasalların başında nitrat ve nitritlerin geldiği bildirilmiştir (3, 7, 12, 23). Bu konuyla ilgili ilk çalışma 1897 yılında gerçekleştirilmiş fareler sodyum nitrit verilmesinden sonra methemoglobinemia oluşumu bildirilmiştir (1). Asbury ve Rhode (1), sodyum nitrit verdikleri buzağılarda nitrit zehirlenmesini takiben, hemoglobinin hızla methemoglobine indirgeniğini bildirmiş ve ölmeye yakın %67-90'a kadar yükseldiğini ifade etmişlerdir.

Daha önce de değinildiği gibi, nitrat ve nitritlerin hemoglobini methemoglobine dönüştürmesi sonucu kanda yükselmiş methemoglobin düzeyinin tespit edilmesi önemli bir veridir (12, 23). Saha veterinerleri methemoglobinemia tablosunu kanın renginin kahverengileşmesi ile teşhis etseler de, oda ısısında gözle teşhiste bu gözlem bazı hatalara yol açmaktadır. Diğer yandan birçok veteriner hekim methemoglobin düzeyinin tespit edilmesi için kanı diagnostik amaçlı olarak laboratuvarlara gönderse de, sağlıklı sonuç alınamamaktadır. Çünkü, kanın alınmasından itibaren 5-12 saat içinde, kandaki normal indirgeme mekanizmasına bağlı olarak şekillenen methemoglobin hemoglobine dönüşebilmektedir. Bu yüzden kan numunesindeki methemoglobin stabilizasyonunun sağlanması önemli ve anlamlıdır (20).

Beutler ve Mikus (3), ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, methemoglobin şekillenmesi açısından sodyum nitritin oral veya subcutan yolla verilmesi arasında fark bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Nitritlerin alınmasıyla methemoglobinemia oluşmasına ait yeterli çalışmaların bulunmasına

rağmen, yükseliş methemoglobin varlığında alyuvarların sayısı ve dirençleri, hematokrit ve hemoglobin değerlerinin durumundan söz eden bildirimler sınırlı kalmaktadır. Bu kapsamda, akut nitrit zehirlenmelerinde yukarıda bahsedilen parametrelerde olası değişikliklerle, sodyum nitritin hemolitik anemi oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 300-450 gr ağırlığında 12 adet kobay kullanıldı. Kobayların altısı kontrol ve altısı da deney grubu olarak ayrıldı.

Deney grubundaki kobaylara 60 mg/kg olacak şekilde sodyum nitrit derialtı uygulandı (20). Kontrol grubundan hemen ve deney grubundan bir saatlik bekleme sonrası alınan kanlar EDTA'lı (Etilendiamintetraasetikası) tüplere konuldu.

Alınan kan numunelerinde alyuvar sayısı ve hematokrit değeri belirlendi (24) ve hemoglobin miktarı drapkin eriyiği kullanılarak spektrofotometrik yöntemle değerlendirildi (15).

Alyuvar sayımı, hematokrit değeri ve hemoglobin miktarının değerlendirilmesinin yanı sıra methemoglobin (11), alyuvar ozmotik frajilitesi ve hemoliz oranının belirlenmesi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (17).

Methemoglobin tayini için EDTA'lı tüplere alınan kandan 75 ml alınarak, hemen hemoliz edilebilmesi amacıyla içinde 5 ml fosfat buffer bulunan tüplere alındı (11, 20).

Daha sonra bu hemolize solüsyon dört eşit parçaya ayrılarak 1, 2, 3, 4 olmak üzere numaralandırıldı. %10'luk KCN'den birer damla 2.-4. nolu tüplere, %20'lik $K_3Fe(CN)_6$ 'dan birer damla ise 3.-4. tüplere konuldu. Vortekste karıştırıldıktan sonra 635 nm'de distile suya karşı okundu.

$$\% \text{Methemoglobin} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 \text{ formü-}$$

lüne göre hesaplandı (11).

Alyuvarların ozmotik frajilitesinin ve hemoliz oranlarının belirlenmesi için %10'luk NaCl solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon 180gr NaCl, 27.31 gr Na_2HPO_4 ve 3.74 gr NaH_2PO_4 alınarak distile suyla iki litreye tamamlanarak hazırlandı. Bu stok solüsyondan 5 ml alınarak distile suyla 50 ml'ye tamamlandı ve böylelikle %1'lik tuzlu su solüsyonu hazırlandı. 10 ml kapasiteli tüpler numaralanarak sırasıyla tablo 1'de bildirilen miktarlarda distile su ve %1'lik NaCl solüsyonlarından konuldu.

Bu solüsyonların üzerine 20 ml kan ilave edildikten sonra vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 30 dakika beklendikten sonra 2000 rpm'de santrifüj edildi (Hettich).

Her bir tüpten alınan üstteki sıvıdan 3.5 ml spektrofotometre küvetlerine aktararak 540 nm'de distile suya karşı okundu. 16. tüpteki değer %100'lük hemoliz olarak kabul edildi ve sonuçlar aşağıdaki formüle göre değerlendirilerek yüzde hemoliz oranları belirlendi (17).

$$\% \text{Hemoliz oranı} = \frac{\text{Tüp Optik Dansitesi}}{16. \text{Tüptün Optik Dansitesi}} \times 100$$

Tablo 1. Alyuvarların yüzde hemoliz oranlarının belirlenmesinde kullanılan distile su ve %1'lik NaCl solüsyonlarının oranları

Table 1. The concentrations of 1.0% NaCl and distilled water used in measuring percent hemolysis of erythrocytes

| Tüp No | %1'lik NaCl (ml) | Distile Su (ml) | % NaCl Solüsyonu |
|--------|------------------|-----------------|------------------|
| 1 | 4.25 | 0.75 | 0.85 |
| 2 | 4.00 | 1.00 | 0.80 |
| 3 | 3.75 | 1.25 | 0.75 |
| 4 | 3.50 | 1.50 | 0.70 |
| 5 | 3.25 | 1.75 | 0.65 |
| 6 | 3.00 | 2.00 | 0.60 |
| 7 | 2.75 | 2.25 | 0.55 |
| 8 | 2.50 | 2.50 | 0.50 |
| 9 | 2.25 | 2.75 | 0.45 |
| 10 | 2.00 | 3.00 | 0.40 |
| 11 | 1.75 | 3.25 | 0.35 |
| 12 | 1.50 | 3.50 | 0.30 |
| 13 | 1.25 | 3.75 | 0.25 |
| 14 | 1.00 | 4.00 | 0.20 |
| 15 | 0.50 | 4.50 | 0.10 |
| 16 | 0.00 | 5.00 | 0.00 |

Kontrol ve deney grubu arası değer farklılıkları student "t" testi kullanılarak belirlendi (19).

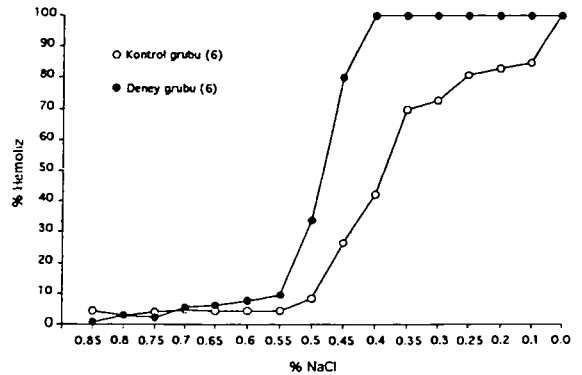
Bulgular

Kontrol grubundaki hematokrit değer ortalama %39.5 iken deney grubunda %30.5'e in-

miştir ($p < 0.001$). Çalışmada kontrol grubunun hemoglobin değeri ortalama 14.3 gr/100 cc, sodyum nitrit verilerek oluşturulan deney grubunda bu değer ortalama 11.5 gr/100 cc'a düşüş gösterirken ($p < 0.01$), methemoglobin değeri kontrol grubunda %3.9'dan, deney grubunda ortalama %85'e yükselmiştir ($p < 0.001$) (Table 2).

Kontrol grubunda alyuvar sayısı ortalama mm^3 'te 5.788.333 olarak bulunmuş, deney grubunda ise bu değer sodyum nitrit verilmesinden sonra mm^3 'te 3.816-666 değerine düştüğü saptanmıştır ($p < 0.01$) (Tablo 2).

Her iki gruba ait 16. tüpte (%100 distile su) elde edilen hemoliz değerleri %100 kabul edilerek diğer tüplerden elde edilen değerlere oranlandığında, kontrol ve deney grubunun ortalama % hemoliz değerleri 1. -7. tüpler arasında (%0.85-0.55 NaCl) benzer seyrettiği gözlemlendi. Deney grubunun 8. tüpünün hemoliz oranı (%34), kontrol grubundakine (%8) oranla oldukça yüksek tespit edildi. 8. tüpte gruplar arasında hemoliz değerleri bakımından başlayan bu farklılık, 9. tüpte de devam etti. Bu tüpte kontrol grubunda %26'lık hemoliz bulunurken, deney grubunda %80'lik bir hemoliz gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1: Kobaylarda normal (kontrol) ve 60 mg/kg dozunda sodyum nitrit (deney grubu) verilmesinden sonra elde edilen ortalama yüzde hemoliz değerleri
Figure 1: The mean values of percent hemolysis in quinea pigs before (control) and after injecting sodium nitrite at the dose of 60mg/kg subcutaneously (experimental).

Tablo 2: Kobaylarda normal (kontrol ve 60 mg/kg Sodyum nitrit verilmesinden sonra (deney elde edilen hematokrit, hemoglobin, methemoglobin ve alyuvar miktarları. Değerler ortalama standart hata olarak gösterilmiştir.
Table 2: The amounts of hematocrit, hemoglobin, methemoglobin and erythrocytes before (control) and after injection of sodium nitrite (60mg/kg). Data are shown as the means SE.

| | Htc (%) | Hb(gr/100cc) | MHb(%) | Alyuvar (mm^3 'te) |
|---------------|----------|--------------|-----------|------------------------------|
| Kontrol (n=6) | 39.5 1.2 | 14.3 0.6 | 3.9 0.8 | 5.788.333 536.310 |
| Deney (n=6) | 30.5 1.0 | 11.5 0.6 | 85.0 15.7 | 3.816.666 207.036 |
| p | <0.001 | <0.01 | <0.001 | <0.01 |

Deney grubuna ait hemoliz değeri 10. tüpte (%0.40 NaCl) %100 olurken, kontrol grubuna ait tüplerde %100'lük hemoliz oluşmadığı tespit edildi. Bu olay her iki grup arasında 8. tüpte görülen farklılıktan sonraki önemli ikinci bulguydu (Şekil 1).

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada koyalara akut sodyum nitrit zehirlenmesinin şekillenmesi amacıyla uygulanan 60 mg/kg'lik doz (20), methemoglobine oluşması açısından yeterli bulunmuştur. Literatürde verilene benzer uygulanan bu dozun üzerindeki değerlerle hayvanlar üzerinde yapılan ön çalışmalarda ani ölümler görülmüştür.

Deney grubundaki hayvanlardan sodyum nitrit uygulanmasından bir saat sonra alınan kan örneklerinde, kontrol grubuna oranla yüksek değerlerde methemoglobin miktarında yükselme göze çarpmış ($p<0.001$), hemoglobin miktarında ise düşüş gözlenmiştir ($p<0.001$). Bu bulgular, nitrit iyonlarının hemoglobini methemoglobine oksitlemesinin sonucu olarak değerlendirilmiştir. Kusumoto ve Nakajima (14), hemoglobin methemoglobine oksitlenmesi üzerine invitro olarak yaptıkları bir çalışmada sodyum nitritin %95 oranında methemoglobin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir. Araştırmada uygulanan kimyasal maddeye bağlı olarak hayvanlarda uykulu hali ve gözlerde çikolatamsı renk oluşumu çıplak gözle tespit edilebilen ilk bulgu olarak değerlendirilirken, deney grubundan alınan kan örneklerinde yüksek oranda methemoglobin şekillenmesine bağlı olarak kanın renginin koyulaşması dikkati çeken diğer bir nokta olarak gözlenmiştir (7, 23).

Çalışmada, oksidant etkili maddeye bağlı olarak şekillenen toksite'nin belirtilerinden birisi de hemoliz ve hemolitik anemi tablosu olmuştur (3,8). Eritrositlerin yüzey ve hacim değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ozmotik frajilite deneyinin kontrol ve deney grubuna ait sonuçlarına bakıldığında 8. tüpten sonra şekillenen % hemoliz değerlerindeki farklılık dikkati çekmiş, kontrol grubuna göre deney grubunda çok daha erken %100'lük hemoliz gözlenmiş ve bu değişiklik ise toksisiteyle bağlantılı olarak şekillenen bir hemolitik anemi tablosu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol grubundan elde edilen ozmotik dirençle ilgili değerler Perk ve ark.'nın (16) bu konu ile ilgili olarak verdikleri değerlere benzerlik göstermektedir.

Diğer yandan, yine çalışmada sodyum nitrit verilerek oluşturulan deney grubundan alınan kan örneklerinde, kontrol grubuna göre dik-

kati çeker bir oranda mm³'deki alyuvar sayısı açısından düşüş gözlenmiş ($p<0.01$), bu bulgu da ozmotik frajilite ile belirlenen hemolitik anemi tablosunu destekleyici bir önemde bulunmuştur. Yine bu düşüş, oksidant etkili sodyum nitritin hemoglobindeki ferro demiri ferri demire çevirerek methemoglobinemia şekillenmesi ve alyuvarların şekillerini bozarak sertleşmesine yol açarak deforme alyuvarların retikuloendotelial sisteme geri dönerek, periferal kanda sayılarının azalması sonucu hemolitik anemi tablosu ile sonuçlandığı düşünülmektedir (5, 10). Ünsüren ve ark. (22), potasyum nitrit vererek oluşturdukları methemoglobin tablosunun yanı sıra atopside karaciğerdeki damar ve sinüsoidlerin eritrositlerle dolu olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, araştırmada tespit ettiğimiz hemolitik anemi tablosunu desteklemekte, eritrositlerin şekil ve yapılarının bozularak retikuloendotelial sisteme gittiklerini göstermektedir (22). Yine bu konuda yapılan diğer bir çalışmada nitrit zehirlenmesi sonucu kan methemoglobin düzeyinde artışla birlikte hemoglobin değerinde ve alyuvar sayısında da artış bildirilmiş (13), ancak literatürdeki bu veriler, bu araştırmada methemoglobin oluşumuyla rölatif olarak ilişkili olan hemoglobin değerindeki düşüşle çelişmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada 60 mg/kg sodyum nitrit verilen grupta oksidant etkili sodyum nitritin, alyuvarlardaki hemoglobini methemoglobine hızla çevrilmesine ve alyuvarların yapısını ve dayanıklılığını bozarak dolaşım kanında sayısal olarak azalmasına ve hemolitik anemiye neden olduğu ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Asbury, A.C. & Rhode, E.A. (1964) Nitrite intoxication in cattle: The effects of lethal doses of nitrite on blood pressure. *Am J Vet Res*, 25, 1010-1013.
2. Baker, D.C. & Gaunt, S.D. (1985) Nicotinamide-adenine dinucleotide-methemoglobin reductase activity in erythrocytes from cats. *Am J Vet Res* 46, 1354-1355.
3. Beutler, E. & Mikus, B.J. (1961) The effect of sodium nitrite and para-amino-propriophenone administration on blood methemoglobin levels and red blood cell survival. *Blood*, 18, 455-467.
4. Burger, A., Wagner, J., Vehleke, H. & Götz, E. (1967) Beeinflussung von Pentosephosphatcyclus und Glykolyse in Erythrocyten während Methämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Exp Pathol*, 256:33-347.
5. Castro, C.E., Wade, R.S. & Belser, N.O. (1978). Conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by organic and inorganic reductants. *J Am Chem Soc* 100, 225-231.
6. Concon, J.M. (1988) *Food Toxicology*. Part A. Principles and Concepts. Marcel Dekker, New York, USA.
7. Diven, R.H., Reed, R.E., Trautman, R.J. Pistor, W.J. & Watts, R.F. (1962) Experimentally induced nitrite poisoning in sheep *Am J Vet Res* 4:494-496.

8. Gaunt, S.D., Baker, D.C. & Green, R.A. (1981). *Clinicopathologic evaluation of n-acetylcysteine therapy in acetaminophen toxicosis in the cat*. Am J Vet Res 42, 1982-1984.
9. Gay, İ. (1978) *Les nitrates dans l'environnement et leur toxicité pour les ruminants*. These pour le doctorat veterinaire. 76:1-110.
10. Hardisty, R.M. & Weatherall, D.J. (1978). *Blood and it's disorders*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London.
11. Harrison, J.H. & Jollow, D.J. (1986). *Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemi*. J Pharmacol Exper Ther 238, 1045-1054.
12. Housholder, G.T., Dollahite, J.W. & Hulse, M.T. (1966). *Diphenylamine for the diagnosis of nitrate intoxication*. JAVMA 148, 662-665.
13. Keleştimur, H. & Piriñçi, İ. (1987) *Koyunlarda nitrat ve nitrit zehirlenmesi üzerine deneysel çalışmalar* Doğa İÜ Vet Hay Derg 11, 255-265.
14. Kusumoto, S. & Nakajima, T. (1970). *Methemoglobin formation by nitrobenzene in vitro* Nauyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 266, 113-118.
15. Merck, E. (1974). *Clinical Laboratory Merck*, 11 th Edition of Medico-Chemical investigation Methods, Germany.
16. Perk, K., Frei, Y.F. & Herz, A. (1964). *Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals*. Am J Vet Res 25, 1241-1248.
17. Schalm, O.W., Join, N.C. & Carrol, E.J. (1975). *Veterinary Hematology*. 3rd Edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
18. Shosuke, Y. & Obara, J. (1983). *Reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in the circulating blood in rabbits and goats*. Jpn J Vet Sci 45, 627-635.
19. Simpson, A.J. (1992). *Statistics Handbook*. University of Sheffield, Department of Psychology, 1-220.
20. Sleight, S.D. & Sinha, D.P. (1968). *Prevention of methemoglobin reduction in blood samples*. JAVMA 152, 1521-1525.
21. Şanlı, Y. ve Kaya, S. (1991). *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri*. Medisan Yayın. Ankara.
22. Ünsüren, H., Emre, B., Özlem, M.B. ve Kurtdede, A. (1989). *Koyunlarda deneysel nitrit zehirlenmelerinin laboratuvar ve klinik bulgularıyla, sağaltımda metilen mavisinin kullanılması üzerinde araşurmlar*. A.Ü. Vet Fak Derg 36, 604-613.
23. Wolff, İ.A. & Wasserman, A.E. (1972) *Nitrates, nitrites and nitrosamines*. Science, 177, 15-19.
24. Yılmaz, B. (1984). *Fizyoloji*. Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara.