

FARELERDE AMİTRAZ ZEHİRLENMESİNE İLİŞKİN ARAŞTIRMALAR: 2. AKUT ZEHİRLENMELERDE KARACİĞER MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ

Ayhan FİLAZİ* Ender YARSAN** Sezai KAYA*** Cavit KUM****

Investigation of amitraz toxicosis in mice: 2. Liver malondialdehyde levels in acute poisoning

Summary: *This study has been carried out for determining whether amitraz causes lipid peroxidation or not, and to determine the degree of it. Totally 312 healthy white England strain mice, 156 of which female and 156 of which male were used for this purpose. After having been divided of 12 male and 12 female mice as control group (Group 1), the remaining mice were first separated into 2 main groups (Groups 2 and 3) consisting of 72 male and 72 female mice and then these main groups were further separated into 12 sub groups (2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, and 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F) consisting of 12 male and 12 female mice. 97% technical standard of amitraz and veterinary speciality (120 mg amitraz/ml) were used as test agents. These were diluted with dimethyl sulfoxide so as to be given in the amount of 0.3 ml into each mouse. The solutions were given to mice by gavage in the following dosages: 500, 1000, 1500, 1800, 2200 and 2500 mg/kg amitraz of technical amitraz to the groups of 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F respectively, and 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 mg/kg amitraz of veterinary speciality to the groups of 3A, 3B, 3C, 3D, 3E and 3F, respectively.*

Following the application of medicines, a period of a week has been waited. Livers of mice dying during this period were taken immediately, and the livers of the others and of the mice in the control group were taken after they have been killed with ether. Liver malondialdehyde (MDA) levels were determined by spectrophotometric method. While the liver MDA levels of the control group (which were not applied any medicine) were 58.84 ± 22.03 nmol/g for the male mice and 53.67 ± 20.73 nmol/g for the female mice, the values for the mice in groups 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F which were given technical amitraz standard at different dosages orally, were measured as 161.6 ± 56.0 , 335.92 ± 94.45 , 171.76 ± 18.85 , 228.7 ± 63.09 , 52.62 ± 16.14 and 54.48 ± 7.37 nmol/g respectively for the male mice, and 167.49 ± 56.17 , 305.54 ± 96.42 , 308.66 ± 100.18 , 279.39 ± 126.19 , 63.43 ± 36.56 and 51.07 ± 8.63 nmol/g respectively for the female mice. The liver MDA levels of the mice died or killed by being given veterinary speciality, were also determined. Thus, the MDA levels of the mice in groups 3A, 3B, 3C, 3D, 3E and 3F which were given different dosages of veterinary speciality, were measured as 62.60 ± 6.85 , 85.49 ± 14.5 , 87.64 ± 11.1 , 89.49 ± 23.0 , 85.25 ± 15.66 and 61.42 ± 16.14 nmol/g respectively for the male mice, and 55.41 ± 8.18 , 80.23 ± 11.42 , 84.06 ± 15.19 , 88.3 ± 29.70 , 83.55 ± 20.06 and 50.80 ± 13.48 nmol/g respectively for the female mice.

These results indicate that severe damage would occur to cell membrane in amitraz poisoning, and due to oxidative stress, amitraz would cause liver deformation.

Key words: Amitraz, acute poisoning, malondialdehyde, liver, mice.

* Doç.Dr.: A.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA/TÜRKİYE

** Ar.Gör.Dr.: A.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA/TÜRKİYE

*** Prof.Dr.: A.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA/TÜRKİYE

**** Ar.Gör.: ADÜ. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN/TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma amitrazın lipid peroksidasyona yol açıp açmadığını ortaya koymak, lipid peroksidasyona sebep oluyorsa, bunun şiddetini belirlemek amacıyla yapıldı. Bunun için 156 erkek ve 156 dişi olmak üzere toplam 312 adet sağlıklı beyaz İngiliz ırkı fare kullanıldı. Kontrol grubu olarak (Grup 1) 12 erkek ve 12 dişi fare ayrıldıktan sonra, diğerleri önce her birinde 72 dişi ve 72 erkek bulunan 2 ana gruba (Grup 2 ve 3) ve bunlar da her birinde 12 dişi ve 12 erkek bulunan 12 alt gruba (2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F ve 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F) ayrıldı. İlaç olarak %97'lik amitraz teknik standartı ve 1 ml'sinde 120 mg amitraz içeren veteriner müstahzarı kullanıldı. Bunlar her fareye 0.3 ml miktarda verilecek şekilde dimetilsülfoksitle seyreltildi. İlaç çözeltileri mide sondası yardımıyla hayvanlara şu dozlarda verildi; 2A, 2B, 2C, 2D, 2E ve 2F grubuna teknik amitrazdan sırasıyla 500, 1000, 1500, 1800, 2200 ve 2500 mg/kg amitraz, 3A, 3B, 3C, 3D, 3E ve 3F grubuna veteriner müstahzarından sırasıyla 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 mg/kg amitraz. İlaç uygulamasını takiben bir hafta beklendi. Bu süre içerisinde ölen farelerden hemen, ölmeyenler ve kontrol grubundakilerden ise eter ile ötanazi uygulandıktan sonra karaciğerleri alındı. Karaciğer malondialdehid (MDA) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubunda karaciğer MDA düzeyleri erkeklerde 58.84 ± 22.03 ve dişilerde 53.67 ± 20.73 nmol/g olurken, bu değerler ağızdan değişik dozlarda teknik amitraz standartı verilen 2A, 2B, 2C, 2D, 2E ve 2F grubundaki erkeklerde sırasıyla 161.6 ± 56.0 , 335.92 ± 94.45 , 171.76 ± 18.85 , 228.7 ± 63.09 , 52.62 ± 16.14 , 54.48 ± 7.37 ve dişilerde ise yine sırasıyla 167.49 ± 56.17 , 305.54 ± 96.42 , 308.66 ± 100.18 , 279.39 ± 126.19 , 63.43 ± 36.56 , 51.07 ± 8.63 nmol/g olarak ölçülmüştür. Veteriner müstahzarı verilmesiyle ölen veya öldürülen farelerdeki karaciğer MDA düzeyleri de belirlenmiştir. Böylece, değişik dozlarda amitraz verilen 3A, 3B, 3C, 3D, 3E ve 3F grubundaki erkeklerde sırasıyla 62.60 ± 6.85 , 85.49 ± 14.5 , 87.64 ± 11.1 , 89.49 ± 23.0 , 85.25 ± 15.66 , 61.42 ± 16.14 ve dişilerde yine sırasıyla 55.41 ± 8.18 , 80.23 ± 11.42 , 84.06 ± 15.19 , 88.3 ± 29.70 , 83.55 ± 20.06 , 50.80 ± 13.48 nmol/g MDA ölçülmüştür. Bu bulgular amitraz ile zehirlenmede şiddetli hücre zarı hasarı olacağını ve amitrazın oksidatif stres nedeniyle karaciğer bozukluğu yapabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar kelimeler: Amitraz, akut zehirlenme, malondialdehid, karaciğer, fare

Giriş

Amitraz [N-N-di-(2,4-ksililiminometil) metil amin], bitki ve hayvanlarda akarısit, larvisit ve insektisit olarak kullanılan dimetilformamidin türevi bir bileşiktir (3). Sığırlarda özellikle kenelere, koyun ve köpeklerde bit ve uyuz etkenlerine karşı etkilidir. İlaç, ayrıca, arılarda Varroa hastalığı etkeni olan Varroa jacobsoni Oudemans'a da etkilidir (4).

Lipid peroksidasyon olayı, serbest oksijen gruplarının dokulara yönelik olarak meydana getirdiği hasar ve bunun en önemli sonuçlarından biridir. Kısaca hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi şeklinde tanımlanır (9). Yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olan oksijen, serbest oksijen grubu oluşumuna yol açtığı için sonuçta zehirleyici etki de oluşturabilmektedir. Çoğu hastalığın patojenitesinde, yağlanma ve yangı olaylarının açıklanmasında serbest oksijen grupları ortaya

çıkılmaktadır (2). Akut olaylarda veya kanser gibi kronik hastalık durumlarında, kimyasal maddeler serbest oksijen gruplarının artışına, bu da oksidatif strese yol açmaktadır (1). Organik klorlu insektisidler, barbitüratlar ve metallerin karaciğer ve dokularda serbest oksijen gruplarının artışına yol açtıkları bilinmektedir (5). Formamidin türevi pestisidlerin ise böyle bir etkiye yol açıp açmadıkları bilinmemektedir. O nedenle bu çalışma, amitrazın lipid peroksidasyona yol açıp açmadığını ortaya koymak; lipid peroksidasyona sebep oluyorsa, bunun şiddetini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvanlar: Çalışma 156 erkek ve 156 dişi olmak üzere toplam 312 adet sağlıklı beyaz İngiliz ırkı farede yapıldı. Fareler ayrı ayrı hassas bir şekilde tartıldı. Kontrol grubu olarak (Grup 1) 12 erkek ve 12 dişi fare ayrıldıktan sonra, diğerleri önce her birinde 72 dişi ve 72 erkek bulunan 2 ana gruba (Grup 2

ve 3) ve bunlar da her birinde 12 dişi ve 12 erkek bulunan 12 alt gruba (Tablo 1) ayrıldı.

İlaç: Çalışmada teknik amitraz standartı (%97'lik) ve 1 ml'sinde 120 mg amitraz bulunan (Kenecid %12.5 EC, formülasyonun amitraz içeriği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalında, kapillar

kolon Gaz Kromatografisi ile belirlendi) veteriner müstahzarı kullanıldı. Bunlar her fareye 0.3 ml miktarda verilecek şekilde dimetilsülfoksitle (Merck-802912) seyreltildi. Müstahzar çözeltilerinin hazırlanmasında 120 mg/ml'lik amitraz yoğunluğu esas alındı. İlaç çözeltileri mide sondası yardımıyla hayvanlara Tablo 1'de belirtilen dozlarda verildi.

Tablo 1. Hayvan grupları ve amitraz çözeltilerinin dozları.
Table 1. Animal groups and doses of amitraz solutions.

Hayvan Grupları		Doz, mg/kg
Grup 1 (Kontrol)	-	-
Grup 2 (Teknik amitraz)	2A	500
	2B	1000
	2C	1500
	2D	1800
	2E	2200
	2F	2500
Grup 3 (Veteriner Müstahzarı)	3A	50
	3B	100
	3C	250
	3D	500
	3E	750
	3F	1000

Karaciğer MDA düzeylerinin belirlenmesi: İlaç uygulamasını takiben bir hafta beklendi. Bu süre içerisinde ölen farelerden hemen, ölmeyenler ve kontrol grubundakilerden ise eter ile ötanazi uygulandıktan sonra karaciğerleri alındı.

Karaciğer MDA düzeyleri için doku örneğini bir blenderde homojenize etmek, elde edilen homojenizatı kjeldal balonu kullanarak HCl ile asit distilasyona tabi tutmak ve % 90 glasiyal asetik asit içindeki 0.02 M 2-tiyobarbitürik asit ayırıcı kullanarak distilatın optik dansitesini 538 nm dalga boyuna ayarlı bir spektrofotometrede okumak prensibine dayalı metot kullanıldı (6, 8). Böylece, tiyobarbitürik asit ve MDA'in hidroliz ürününün absorbans değerleri ve dalga boyu ile absorpsiyon eğrisi çizildi ve sonuçlar nmol/g cinsinden değerlendirildi.

İstatistik analizler: Gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Farklılıkların

belirlenmesi için Duncan testi uygulandı (SPSS Release 6.0 bilgisayar programı).

Bulgular

İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubunda karaciğer MDA düzeyleri erkeklerde 58.84 ± 22.03 ve dişilerde 53.67 ± 20.73 nmol/g olurken, bu değerler ağızdan değişik dozlarda teknik amitraz standartı verilen 2A, 2B, 2C, 2D, 2E ve 2F grubundaki erkeklerde sırasıyla 161.6 ± 56.0 , 335.92 ± 94.45 , 171.76 ± 18.85 , 228.7 ± 63.09 , 52.62 ± 16.14 , 54.48 ± 7.37 ve dişilerde ise yine sırasıyla 167.49 ± 56.17 , 305.54 ± 96.42 , 308.66 ± 100.18 , 279.39 ± 126.19 , 63.43 ± 36.56 , 51.07 ± 8.63 nmol/g olarak ölçülmüştür. Böylece, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında 2A, 2B, 2C ve 2D gruplarında anlamlı bir farkın olduğu ($P < 0.01$), 2E ve 2F gruplarında ise ölümlerin ilk bir kaç günde olması sebebiyle, önemli bir farkın olmadığı anlaşılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Amitraza bağlı olarak ölen veya ötanazi uygulanan farelerin karaciğerlerinde ölçülen MDA düzeyleri (nmol/g)
Table 2. MDA levels measured in the livers of the mice died due to amitraz or killed by euthanasia (nmol/g)

Grup	Erkek	Dişi
1	58.84±22.03	53.67±20.73
2A	161.6±56.0*	167.49±56.17*
2B	335.92±94.45*	305.54±96.42*
2C	171.76±18.85*	308.66±100.18*
2D	228.7±63.09*	279.39±126.19*
2E	52.62±16.14	63.43±36.56
2F	54.48±7.37	51.07±8.63

*P < 0.01

Veteriner müstahzarı verilmesiyle ölen veya ötanazi uygulanan farelerdeki karaciğer MDA düzeyleri de belirlenmiştir. Böylece, değişik dozlarda müstahzar verilen 3A, 3B, 3C, 3D, 3E ve 3F grubundaki erkeklerde sırasıyla 62.60±6.85, 85.49±14.5, 87.64±11.1, 89.49±23.0, 85.25±15.66, 61.42±16.14 ve dişilerde yine sırasıyla 55.41±8.18,

80.23±11.42, 84.06±15.19, 88.3±29.70, 83.55±20.06, 50.80±13.48 nmol/g MDA ölçülmüştür. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında 3B, 3C, 3D ve 3E gruplarında anlamlı bir farkın olduğu (P<0.05), 3A ve 3F gruplarında ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3. Veteriner müstahzarı verildikten sonra ölen veya ötanazi uygulanan farelerin karaciğerlerinde ölçülen MDA düzeyleri (nmol/g)
Table 3. MDA levels measured in the livers of the mice died or killed by euthanasia after they had been given veterinary speciality (nmol/g)

Grup	Erkek	Dişi
1	58.84±22.03	53.67±20.73
3A	62.60±6.85	55.41±8.18
3B	85.49±14.5*	80.23±11.42*
3C	87.64±11.1*	84.06±15.19*
3D	89.49±23.0*	88.3±29.70*
3E	85.25±15.66*	83.55±20.06*
3F	61.42±16.14	50.80±13.48

*P < 0.05

Tartışma ve Sonuç

Teknik amitraz standartı verilen farelerin karaciğerlerinde ölçülen MDA düzeylerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda 2A, 2B, 2C ve 2D grubunda erkeklerde sırasıyla 2.75, 5.70, 2.92 ve 3.88, dişilerde ise yine sırasıyla 3.12, 5.69, 5.75 ve 5.20 kat arttığı belirlenmiştir; bu bulgular amitrazla zehirlenmede şiddetli hücre zarı hasarının olduğunu vurgulamaktadır (2, 9). Kontrol grubuyla 2E ve 2F grupları arasında

önemli bir farkın olmaması farelerde kısa süre içinde ölüm olaylarına bağlanmıştır.

Veteriner müstahzarı verilen 3üncü grupta ölçülen MDA düzeylerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda 3B, 3C, 3D ve 3E grubunda erkeklerde sırasıyla 1.45, 1.19, 1.52 ve 1.45, dişilerde ise yine sırasıyla 1.49, 1.57, 1.64 ve 1.56 kat arttığı ortaya konulmuştur.

Teknik amitraz standartı verilen farelerin karaciğer MDA düzeyleri müstahzar verilen gruptan oldukça yüksek çıkmıştır. Bu da müstahzarın bileşimine giren çözücü ve taşıt maddelerin bu tür bir etkiye neden olmadıklarını göstermektedir. 500 mg/kg teknik amitraz standartı verilen 2A grubu fareleri ile 50 mg/kg amitraz verilen 3A grubu farelerinde ölüm olmamasına karşın, karaciğer MDA düzeylerinin sadece 2A grubunda oldukça yüksek (erkeklerde 2.75 ve dişilerde 3.12 katı) çıkması, 3A grubunda ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir fark çıkmaması bu görüşü doğrular niteliktedir.

Organik klorlu insektisidler gibi bazı kimyasal maddelerin (dieltrin gibi) vücutta serbest oksijen gruplarının artışına yol açmasının oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (1). Böylece amitrazın da doku ve organlarda ciddi bir oksidatif strese neden olabileceği sanılmaktadır. Çünkü amitraz da dieltrin gibi vücutta MDA düzeylerinin artışına yol açmaktadır.

Serbest oksijen gruplarının dokulara yönelik olarak meydana getirdikleri hasar ve bunların önemli sonuçlarından biri olan lipid peroksidasyonun şiddetini belirleyen en önemli kriterlerden biri MDA düzeylerinin tespit edilmesidir (2). Böylece, MDA seviyesinin artması karaciğerde bozukluğa yol açabilir. Ancak, dokularda meydana gelen hasarlar ile bunların dış etkilere karşı fizyolojik dengeyi sağlamak amacıyla verdiği yanıtlar arasında bir karışıklığa yol vermemelidir. Uzun bir zaman süreci dikkate alındığında, dokularda fizyolojik dengeyi sağlamak için meydana gelen uyum değişiklikleri yıkıcı etkilere neden olabilmektedir. Serbest oksijen grupları bir yandan bir dizi yıkıcı etkiye sahip biyokimyasal olayları başlatırken, bir yandan da ortaya çıkan görev bozukluklarından doğrudan sorumlu olmayabilir. Ayrıca serbest oksijen grupları, doku hasarına neden olan bazı olayların sonucu olarak da ortaya çıkabilir ve bu durum sonuçta ya hiç bir etki göstermez ya da doku hasarını artırabilir (7). O nedenle, amitrazla ilgili kesin bir yargıya varılabilmesi için daha ileri araştırmalara gerek vardır.

Kaynaklar

1. **Bachowski, S. et al.** (1997) *Role of oxidative stress in the mechanism of dieltrin's hepatotoxicity.* Ann Clin Lab Sci, **27**:196-209.
2. **Comporti, M.** (1993) *Lipid peroksidation, biopathological significance.* Molec Aspects Med, **14**:199-207.
3. **Crofton, K.M. et al.** (1989) *Acute effects of amitraz on the acoustic startle response and motor activity.* Pestic Sci, **27**:1-11.
4. **Kaya, S., Bilgili, A.** (1997) *Dış Parazitleri Etkileyen İlaçlar.* 475-503. Alınmıştır: S.Kaya, I.Pirinçci, A.Bilgili (Ed.) Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 2. Medisan Yayın Serisi No:28, Ankara.
5. **Klaunig, J. E. et al.** (1995) *Oxidative stress in nongenotoxic carcinogenesis.* Toxicol Lett, **82-83**:683-691.
6. **Ohkawa, H. et al.** (1979) *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.* Anal Biochem, **95**:351-358.
7. **Southorn, P.A. and Powis, G.** (1988) *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions.* Mayo Clin Proc, **63**:381-389.
8. **Tarladgis, B.G. et al.** (1960) *A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods.* J Am Oil Chem Soc, **37**:44.
9. **Wills, E.D.** (1987) *Evaluation of lipid peroksidation in lipids and biological membrans.* 127-152. In: K. Snell and B. Mullock (Eds): Biochemical Toxicology, IRL Press Limited, Oxford, England.

Not: Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkılarını esirgemeyen Tay İlaç Şti'ne teşekkür ederiz.

Yazışma Adresi :

Doç. Dr. Ayhan FİLAZİ

A.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı, Dışkapı/ANKARA/TURKIYE

Tel: 0-312-317 03 15/435

E-mail: filazi@veterinary.ankara.edu.tr