

FARELERDE KLORPRİFOS VE DİKLORVOS'UN HUMORAL İMMUN YANIT ÜZERİNE ETKİSİ

Ali BİLGİLİ¹ Gökhan ERASLAN² Dinç EŞSİZ³ İsmail KUTLU⁴ Hakan SALTAS⁵

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Ankara – TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Kayseri – TÜRKİYE

³Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Kars – TÜRKİYE

⁴Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Ankara – TÜRKİYE

⁵Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi Ankara – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 01.04.2002

The Effect of Chlorpyrifos and Dichlorvos on Humoral Immune Response in Mice

Summary

In this study, the effects of chlorpyrifos and dichlorvos that are organic phosphorous insecticides were investigated on humoral immune system during 28 days (chlorpyrifos at 10, 20, 40 and 80 mg/kg/bw/day; dichlorvos at 30, 60 mg/kg/bw/day). For this aim, a total of 80, Swiss Albino race, male, three-months-old mice were used. Mice were immunized with *S. thypophi* intraperitoneally at the 1st and 15th day of experiment. Following that, on 13th (primary period) and 28th (secondary period) days, blood samples were taken and antibody titers were evaluated. As a result, statistically significant ($p<0.05$) suppression in humoral immunity was determined in groups including 80 mg/kg/bw/day with drinking water at first period, and including 40 mg/kg/bw/day and 80 mg/kg/bw/day chlorpyrifos and 60 mg/kg/ca/day dichlorvos at second period.

Key Words: Chlorpyrifos, dichlorvos, humoral immunity, mice

Özet

Çalışmada, belirli süre (28 gün) ve dozlarda verilen organik fosforlu insektisit klorprifos ve diklorvosun (klorprifos 10, 20, 40 ve 80 mg/kg/ca/gün; diklorvos 30, 60 mg/kg/ca/gün) humoral bağışıklık üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun için 3 aylık, Swiss Albino ırkı, erkek, 80 adet fare kullanılmıştır. Fareler, çalışmanın 1. ve 15. gününde ölü *S. thypophi* ile periton içi olarak immünize edilmiştir. Takiben 13. (birinci dönem) ve 28. (ikinci dönem) günlerde kan alınmış ve antikor titreleri değerlendirilmiştir. Sonuçta, içme suyu ile birinci dönemde, 80 mg/kg.ca/gün klorpirifos, ikinci dönemde 40 ve 80 mg/kg.ca/gün klorprifos ile 60 mg/kg.ca/gün diklorvos verilen grupların humoral bağışıklık sisteminde anlamlı ($p<0,05$) bir baskınlanma tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klorprifos, diklorvos, humoral bağışıklık, fare

Giriş

Diklorvos (2,2-diklorovinil dimetil fosfat) ve klorprifos (dimetil 3,5,6-trikloro-2-pridin) gerek tarımda, gerekse ev ve işyerlerinde çevre sağlığı ilacı olarak sıkılıkla kullanılan geniş spektrumlu organik fosforlu bileşiklerdir (3,13,18,20). Diklorvos, kehrivar renginde, sıvı bir bileşik olup triklorfonun sudaki yıkımlanma ürünüdür (12,19). Suda belirli oranlarda (10 g/L) çözünmesi sebebiyle deniz canlıları için de tehlikeli bir bileşiktir (6,12). Klorprifosun aktif metaboliti, klorprifos okson'un memelilerde bulunan Tip A-esteraz tarafından yıkımlanması sebebiyle zehirliliği diklorvos'dan daha zayıftır. Bu enzim diklorvos'u da parçalamaktadır fakat bu parçalanma klorpirifosdaki kadar hızlı değildir (14,16,17).

Canlıların, her iki bileşige de solunum, deri ve ağız yolu ile maruz kalmaları kaçınılmazdır. Maruziyet, doğrudan bu bileşiklerin çeşitli dozlarının kısa veya uzun süreli alınması şeklinde olabileceği gibi, dolaylı olarak söz konusu bileşiklerle bulaşmış besinlerin yenilmesi sonucu da gerçekleşebilir. Bu araştırmada, belirli dozlarda içme suyu ile verilen klorprifos ve diklorvos'un farelerde humoral immun yanıt üzerine etkisi incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali: Çalışmada, Swiss Albino ırkı, erkek, 3 aylık, 80 adet fare kullanılmıştır. Klorprifos (Grup I) ve diklorvos (Grup II) için sırasıyla 50 ve 30 fare bulunan iki grup oluşturulmuştur. Fakat her iki

grubu temsil eden iki çalışma farklı dönemlerde gerçekleştirılmıştır. Bu sebeple de, her bir çalışma için ayrı kontrol grubu tutulmuş, alt grup sayıları ise değişkenlik göstermiştir. Şöyle ki; Grup I her birinde eşit sayıda fare bulunan 5 alt gruba (a, b, c, d, e), Grup II de yine eşit sayıda fare bulunan 3 alt gruba (a, b, c) ayrılmıştır. Grup I'deki alt grupların biri kontrol olarak tutulurken diğer 4'üne sırasıyla, 10 mg/kg/ca/gün, (Grup Ia), 20 mg/kg/ca/gün (Grup Ib), 40 mg/kg/ca/gün (Grup Ic), 80 mg/kg/ca/gün (Grup Id)'e denk gelecek şekilde önceden etken madde tayini yapılmış Mostyn Chlorpyrifos %25 EC® isimli preparattan içme sularına ilave edilmiştir. Grup II'deki alt gruplardan biri kontrol (Grup IIa) olarak tutulurken, diğer ikisine 30 mg/kg/ca/gün (Grup IIb) ve 60 mg/kg/ca/gün (Grup IIc)'e denk gelecek şekilde; diklorvos teknik madde (%95)'sinden hazırlanan stoktan (sıvı/sıvı dağılımını kolaylaştırmak için emülgatör madde olarak arabistan zamkı kullanılmıştır) içme sularına belirli oranlarda ilave edilmiş ve ilave edilen oranların içme suyu içinde kolayca dağıldığı tespit edilmiştir. İçme suları her gün yenilenmiş ve çalışma süresi boyunca su tüketimi yönünden kontrol ve deneme grupları arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Farelerden kan alma işlemi 15. ve 28. günlerde kalbe girilerek gerçekleştirilmiş ve alınan kanlar (her bir fareden 0.5'er ml) oda isısında 15 dakika beklettikten sonra serumları çıkarılmış ve serumlar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Immünizasyon: Bağışıklık sistemini uyarmak için ölü *S. typhi* kullanılmıştır. Çalışmanın birinci gününde $2 \times 10^9/\text{ml}$, on beşinci gününde $2 \times 10^8/\text{ml}$ yoğunluğundaki bakteriden 1 ml periton içi olarak verilmiştir.

Titrelerin Değerlendirilmesi: Çalışmada, klorprifos ve diklorvosun birincil ve ikincil humoral bağışıklık sistemi üzerine etkisini tespit etmek için tüp aglutinasyon testi kullanılmıştır (12).

İstatistik Analiz: İstatistik hesaplamalar “SPSS 9.05 for Windows” istatistik paket programında tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular

Çalışmada, gerek klorprifos gerekse diklorvos verilen farelerin antikor titrelerinde hem birinci hem de ikinci dönemde kontrole göre bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş, klorprifos verilenlerde birinci dönemde Grup Ie'de, ikinci dönemde Grup Id ve Ie'de önemli ($p<0.05$) iken, diklorvos verilen farelerde ise sadece ikinci dönemde Grup IIc'de önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Kontrol ve deneme gruplarının log₂ lab-
antikor titreleri.

Grup	Birinci Dönem (Ig M+Ig G)	İkinci Dönem (Ig M+Ig G)
Klorprifos	Grup Ia (n: 10) 9.51 ± 0.83^a	14.39 ± 0.46^e
	Grup Ib (n: 10) 9.26 ± 0.51^a	14.26 ± 0.51^e
	Grup Ic (n: 10) 9.01 ± 0.51^a	14.01 ± 0.51^e
	Grup Id (n: 10) 8.89 ± 0.70^{ab}	13.51 ± 0.64^e
	Grup Ie (n: 10) 8.51 ± 0.64^b	13.39 ± 0.46^e
Diklorvos	Grup IIa (n: 10) 8.24 ± 0.54^a	12.44 ± 0.44^e
	Grup IIb (n: 10) 7.89 ± 0.50^a	11.89 ± 0.50^e
	Grup IIc (n: 10) 7.47 ± 0.40^a	11.14 ± 0.54^e

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$).

Tartışma

Çalışmada, klorprifos verilen hayvanlarda birinci ve ikinci dönemlerde Grup Id ve Grup Ie'nin antikor titrelerinde önemli bir düşüş görülmüştür. Bu gruplara, içme suyu ile verilen klorprifos miktar yüksek sayılabilecek düzeydedir. Ancak, orta ve düşük dozlarda klorprifos verilen gruplarda ise humoral bağışıklık sistemine yönelik anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Grup Ib ve Ic'de ikinci dönemde de düşüşün anlamlı bulunmaması uzun süreli alınma durumunda bile bu düzeylerdeki ($10, 20 \text{ mg/kg/ca/gün}$) bileşigin herhangi bir olumsuz etkisinin olmayıpereceğini gösterebilir. Sonuçlar, insan ve hayvanların kolaylıkla maruz kalabilecekleri bu bileşigin humoral bağışıklık üzerinde, ancak çok yüksek dozlarda ($40 \text{ mg/kg/ca/gün} \geq$) etkili olabileceğini ortaya koymustur. Bileşigin humoral bağışıklık sistemine yönelik etkisini, kimi araştırmacılar (17,18) kolinesteraz etkinliğini engellemesiyle, kimi araştırmacılar (21) ise termoregülatör sistemin baskılanması ve dolayısıyla da vücut ısısının düşmesi ile açıklamıştır. Diğer taraftan, Blakley ve ark. (3) ratlara 5 mg/kg/ca/gün dozunda 28 gün süreyle verdiği klorprifosun humoral bağışıklığı baskıladığını tespit etmiştir. Maruziyet süreleri çalışmamızla aynı olmakla birlikte, farelere verilen en düşük doz bile bu çalışmada kullanılan dozun üzerindedir ve bu dozda, humoral bağışıklıkta anlamlı bir baskılanma tespit edilmemiştir. Araştırma sonuçları, bu yönyle çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Bunun, denemede kullanılan hayvanların türü ve yaşı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü, bileşigin vücutta zehirsiz hale getirilmesinde önemli rolü olan Tip A-esteraz etkinliğinin tür ve yaş ile orantılı olarak değişebileceğii belirtilmiştir (11). Gordon ve ark. (7) ise klorprifosun nöroimmun mekanizmayı

etkilediğini öne sürülmüştür. Araştırmalar, klorprifos verilen hayvanlara daha sonra *E. coli* vermişler ve vücut ısısının kontrol grubuna göre düşük kaldığını bulmuşlardır. Vücut ısısı artışının sıklo oksijenaz ve prostaglandin E₂ (MSS'de) üremesi ile ilişkili olduğu (7,8) bilindiğine göre, çalışmada kullandığımız klorprifosun kesin olmamakla birlikte (çalışma sırasında vücut ısısı ölçülmemiştir), bu yolak üzerinden etkiyebileceği ve artan dozlarda bağışıklık sistemini baskılatabileceği düşündürmektedir.

Çalışmanın ikinci grubunu oluşturan farelere verilen diklorvos, birinci dönemde herhangi bir etki oluşturmadan ikinci dönemde yüksek dozda diklorvos (60 mg/kg/ca/gün) uygulanan grupta anlamlı bir baskılanma görülmüştür. Bileşigin humoral bağışıklık üzerine etkisinin, AkE etkinliğini engellemesi ile yakından ilişkili olduğunu bildirilmiştir (15). Nitekim Casale ve ark. (4) farelere, ağız yolu ile 2 gün süre ile 120 mg/kg/ca/gün dozdonda diklorvos vermiş ve bu dönemde AkE etkinliğinde zayıflama tespit etmiştir. AkE etkinliğinin değişmediği daha düşük (40 mg/kg/ca/gün) dozlarda daha uzun süre (28 gün) verildiğinde ise, Ig G düzeyinde herhangi bir değişiklik görmemiş ve sonuçta, humoral bağışıklıktaki bu baskılanmanın kolinerjik etkiye veya toksik strese bağlı olduğu kanısına ulaşmıştır (4). Yine benzer şekilde tavşanlarda yapılan başka çalışmada da belirli dozlarda içme suyu ile verilen diklorvos'un humoral bağışıklığı baskıladığı tespit

edilmiştir (5). Çalışmamızda da humoral bağışıklıkta baskılanma görülmüş fakat bu baskılanmanın, yalnızca ikinci dönemde 60 mg/kg/ca/gün dozda diklorvos verilen grupta anlamlı olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışma ile, her iki pestisitin de yüksek dozlarda (klorprifos 40 mg/kg/ca/gün≥; diklorvos 60 mg/kg/ca/gün) subakut alınması durumunda humoral bağışıklığın baskılandığı, düşük dozlarda ise bu etkinin oluşmadığı görülmüştür. LD_{50(oral)} yönünden değerlendirildiğinde ise farelerde LD_{50(oral)}'si 133 mg/kg/ca/gün olan diklorvos (9)'un 1/2LD₅₀ ve LD_{50(oral)}'si 60 mg/kg/ca/gün olan klorprifos (10)'un 2/3LD₅₀ ve üzerinde uzun süre (28 gün) alındığı takdirde ancak bağışıklık sistemi üzerinde etkili olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle, her iki bileşigin de bu sürede, belirtilen dozların altında alınması durumunda humoral bağışıklık için bir risk oluşturmayaileceği yüksek dozlarda ise humoral bağışıklık sistemini etkileyebilecegi kanaatine varılmıştır. Fakat yine de gerek klorprifos gerekse diklorvos'un birinci ve ikinci dönemde istatistiksel olarak önemli olmasa da antikor titrelerinde, kontrole göre düşüş görümesi sebebiyle; her iki pestisitin de humoral bağışıklık sistemi üzerine düşük dozlarda da olan etkilerinin tam anlamıyla ortaya konulması için daha ayrıntılı ve çok yönlü bir araştırmanın yapılması gerekliliği kaçınılmazdır.

Kaynaklar

1. Baker FJ. Progress in Medical Laboratory Technique. London. Butterworths, 1962.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 1. baskı. İzmir. Barış Yayıncıları, 1992.
3. Blakley BR, Yole MJ, Brousseau P, Boermans H, Fournier M. Effect of chloryrifos on immune function in rats. Vet Hum Toxicol 1999; 41: 140-4.
4. Casale GP, Cohen SD, DiCapua RA. The effects of organophosphate-induced cholinergic stimulation on the antibody response to sheep erythrocytes in bred mice. Toxicol Appl Pharmacol 1983; 68: 198-205.
5. Desi I, Varga L, Farkas I. The effect of DDVP, an organophosphorus pesticide on the humoral and cell-mediated immunity of rabbits. Arch Toxicol Suppl 1980; 4: 171-4.
6. Dunier M, Siwicki AK, Demael A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicol Environ Safety 1991; 22: 79-87.
7. Gordon CJ, Rowsey PJ. Delayed febrile effects of chloryrifos: Is there cross-tolerance to bacterial lipopolysaccharide? TOXIA 1998; 130: 17-28.
8. Gordon CJ, Rowsey PJ. Poisons and fever. Clin Exp Pharmacol Physiol 1998; 25: 145-9.
9. Haley TJ, Farmer JH, Harmon JR, Dooley KL. Estimation of the LD₁ and extrapolation of the LD_{0.1} for five organophosphate pesticides. Arch Toxicol 1975; 34:103-9.
10. <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips/chloryrifos.htm?26#mfs>. Extoxnet extension toxicology network pesticide information profiles. (Erişim tarihi: 27.01.2002).
11. Karanth S, Pope C. Carboxyesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chloryrifos and parathion in rats. Toxicol Sci 2000; 58: 282-9.
12. Kaya S. Pestisitler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Ed. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. 211-339. Medisan Yayınevi, 1. Baskı, 1998, Ankara.

13. Lemus R, Abdelghani A. Chlorpyrifos: An unwelcome pesticide in our homes. *Rev Environ Health* 2000; 15: 421-33.
14. Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 1997; 154: 11-34.
15. Menner JH. Dichlorvos carcinogenicity: An assessment of the weight of experimental evidence. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994; 20: 354-61.
16. Pond AL, Chambers HW, Coyne CP, Chambers JE. Purification of two rat hepatic proteins with A-esterase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1404-11.
17. Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: A critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health* 1995; 44: 135-65.
18. Slotkin TA. Developmental cholinotoxicants, Nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 71-80.
19. Şanlı Y. Pestisitler. *Veteriner Klinik Toksikoloji*. İstanbul. Güngör Matbaacılık, 2002; 351-487.
20. Wright AS, Hutson DH, Woorder MF. The chemical and biochemical reactivity of dichlorvos. *Arch Toxicol* 1979; 42: 1-18.
21. Zabrodskii PF. The mechanisms of the immunotropic effects of organophosphorus compounds. *Biull Eksp Biol Med* 1993; 116: 181-3.