

Malathion'un Fare Karaciğer Böbrek ve İnce Bağırsak Alkalen Fosfataz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Egemen DERE

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 16059 Bursa - TÜRKİYE

Sevtap BAKIR, Atilla ATALAY

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 58140 Sivas - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.07.1996

Özet: Çalışmamızda malathion'un karaciğer, böbrek ve ince bağırsak alkalen fosfataz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Farelere intraperitoneal (I.P.) enjeksiyonla 40 mg kg⁻¹ malathion dozu verildi. Malathion uygulamasından 0,4,8,16 ve 24 saat sonunda hayvanlar, servikal dislokasyon yoluyla öldürüldü ve dokuları çıkartıldı. Enzim kaynağı olarak dokuların tüm homojenatınının 48000xg de 30 dak santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant kullanıldı. Malathion'un böbrek alkalen fosfataz aktivitesini artırıp, karaciğer ve ince bağırsak alkalen fosfataz aktivitesini azalttığı bulundu.

Anahtar Sözcükler: Malathion, Karaciğer, Böbrek ve İnce Bağırsak Alkalen fosfataz

The Effects of Malathion Alkaline Phosphatase Activity in the Liver, Kidney and Small Intestine in Mice

Abstract: The effects of malathion on alkaline phosphatase activity in the liver, kidney and small intestine was investigated. Malathion doses of 40 mg kg⁻¹ were injected intraperitoneally (I:P) into mice. At 0, 4, 8, 16 and 24 hours after treatment with malathion, mice were decapitated and tissues were removed. Homogenate of the tissues was centrifugated at 48000xg for 30 minutes. The supernatant was used as an enzyme source. It was found that the malathion increased alkaline phosphatase activity in the kidney and decreased alkaline phosphatase activity in the liver and small intestine.

Key Words: Malathion, Liver, Kidney and Small intestine Alkaline phosphatase

Giriş

Zirai mücadelede yaygın olarak kullanılan kimyasal maddeler genelde güçlü ve seçici enzim inhibitörlerini kapsamaktadır. Ancak insektisitlerin kendileri her zaman toksik etki göstermezler. Bazen, sonuçta biyokimyasal veya biyofiziksel bir lezyon oluşturan, bir ya da bir kaç metabolitin öncüsü olabilirler. Bir çalışmada organik fosforlu bir insektisit olan malathionun, düşük memeli toksisitesine sahip olduğu gösterilirken (1), başka bir çalışmada sinir sisteminde ve bazı organlarda asetil kolin esteraz aktivitesini inhibe ederek, akut toksik etki oluşturduğu gösterilmiştir (2).

Pestisitler organizmanın normal işleyişini olumsuz yönde etkileyerek istenmeyen bazı durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Uzun süre bozulmadan toprakta kalan (3), besin zinciri yoluyla vücuda giren pestisitler, ya da onların yıkım ürünleri, zamanla doku ve

organlarda kansere kadar gidebilen bazı ağır klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (4).

Malathion, suda çözünme derecesi oda ısısında 145 ppm olan açık kehribar renkli bir sıvıdır. Petrol yağlarında sınırlı olarak çözülmekle beraber bir çok organik çözücüde çözünebilir. Genel olarak fitotoksik değildir. Ancak sera şartlarında salatalık, çalı fasülyesi ve kabağa zararlı olabilir. Tarımda ve bahçecilikte geniş bir kullanma sahası vardır. Ayrıca sivrisineklerin, sineklerin, ev haşerelerinin, hayvan dış parazitlerinin ve insan bitinin kontrolünde halen kullanılmaktadır. LD₅₀ değeri akut ağızdan sıçanlara 2800 mg kg⁻¹, akut deriden 24 saat temasla tavşanlara 4100 mg kg⁻¹ dir (5). Akut ağızdan farelere LD₅₀ değerinin, bir kaynaktan 480-5800 mg kg⁻¹ arasında değiştiği belirtilirken (6), bir başka kaynaktan 1375 mg kg⁻¹ olduğu belirtilmektedir (7). Farelere dermal yolla LD₅₀ değeri >4444 mg kg⁻¹ olarak

verilirken, çocuklardaki letal doz miktarı 100 mg kg^{-1} olarak verilmiştir. Ayrıca arılara ve balıklara zehirli olduğu da vurgulanmaktadır (7,8)

Alkalen fosfataz (AP) aktivitesi membran aktif transportunu ve pinositik aktivitenin çok yoğun olduğu ince bağırsak mukoza epiteli ve böbrek proksimal tübülüs epitelinde çok fazladır (9,10). Bu enzimin fosforik asit esterlerini hidrolizlemede (11) ve metabolitlerin hücre zarından alış verişini kolaylaştırmada önemli görevleri vardır (12).

AP enziminin kandaki seviyesi bazı hastalıkların tanısında ve tedavisinde önemli ip uçları vermektedir örneğin AP aktivitesi bir çok karaciğer hastalığında, kemik hastalıklarında, kemik rejenerasyonu meydana gelen hastalıklarda yükselebilmektedir. Özellikle raşitizm de bu artış çok belirgin ve hastalığın ağırlığı ile oldukça paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada malathion'un LD_{50} dozunun farelere intraperitoneal uygulanmasıyla kemik iliği preparatlarında mikronükleuslu eritrosit sayısının arttığı saptanmıştır (13). Kullanılan pek çok insektisit içerisinde memelilere toksik etkisinin en az olduğu ileri sürülen malathion'un farelere klastojenik etkisinin olduğu (13,14), fakat mutajenik etkisinin olmadığı rapor edilmektedir (15). Bir başka çalışmada da 40 mg kg^{-1} dozunda malathion uygulanmış farelerde malat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, heksokinaz ve laktat dehidrogenaz aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (16).

Organik fosforlu insektisitler grubundan olan malathion, böceklere karşı yaygın bir şekilde kullanıldığından çok çeşitli yollardan vücuda alınabilmektedir. Malathion'un sadece Bursa ilinde 1996 yılında, sıvı şekilde yaklaşık 8 litre, %25 lik toz halinde ise 40 kg kadar tüketildiği rapor edilmektedir (17). Vücuda giren bu insektisidin enzim aktiviteyi üzerine etkilerine katkıda bulunmak amacıyla çalışmamızda malathion'un, başlıca hücre membranına yerleşmiş ve transport mekanizmasında önemli rolü olan AP enziminin Swiss-Albino farelerin (*Mus musculus*) karaciğer böbrek ve ince bağırsaktaki aktivitesine etkisi araştırılmıştır

Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda 20-25 gr ağırlığında Swiss-Albino (*Mus musculus*) fareler kullanıldı. Hayvanlar, Sivas yem fabrikası tarafından üretilen standart fare yemi ile

beslendi. Su ise serbest olarak verildi. Fareler, enjeksiyondan 24 saat önce aç bırakıldı. Farelere, %57 saflıktaki veterinerik malathion süt renginde süspansiyon şeklinde 0.1 ml serum fizyolojik içinde uygulandı. Kontrol grubu farelerine de sadece serum fizyolojik verildi. Belirli derişimdeki malathion çözeltisi ve serum fizyolojik, farelere aynı hacimlerde sterilize edilmiş 1 ml lik enjektörlerle intraperitoneal (I.P) enjeksiyon yoluyla verildi. Hiç uygulama yapılmamış fareler kontrol grubuna alınmadı. Deneylerimizde veterinerik preparatın, farelerde akut oral LD_{50} değerinin $1/12$ 'i olan 40 mg kg^{-1} vücut ağırlığı dozu kullanıldı. Enjeksiyon işleminden 0,4,8,16 ve 24 saat sonra fareler servikal dislokasyon yolu ile öldürüldü. Homojenat elde etmek için karaciğer ve böbrek dokuları ayrı ayrı 0.15 M soğuk KCl ile yıkandıktan sonra $1/3$ w/v olacak şekilde 0.15 M KCl ile B.Brawn tipi homojenizatörün 1000 devir dak^{-1} hız durumunda 4 vuruşla homojenize edildi. İnce bağırsak dokusu ise aynı şekilde hazırlanarak 10 vuruşla homojenize edildi. Homojenatlar $48000 \times g$ de 30 dak Beckman ultrasantrifüjünde JA 20 başlığında çevrildi. Enzim stabilizasyonunu sağlamak için homojenizasyon ve santrifüj işlemleri $0-4 \text{ }^\circ\text{C}$ de yapılmasına özen gösterildi. Elde edilen süpernatanttan AP aktivitesine bakıldı. Her bir kontrol grubu için 5, deney grubu için 10 fare deneye alındı.

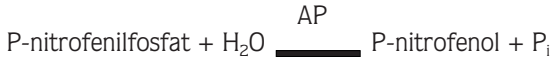
AP özgül aktivitesi spektrofotometrik olarak 405 nm dalga boyunda 25°C 'de paranitrofenilfosfat'ın nitrofenol'e hidrolizi sonucu artan absorbans, 5 dakika boyunca kaydedilerek başlangıç hızının doğrusal kısmından elde edilen ΔA değerinden aşağıdaki formüllerle hesaplandı. Özgül aktivite tayini için Garen ve Levinthal adlı araştırmacıların yöntemi kullanıldı (18,19).

$$\text{Volüm aktivite} = \frac{3,00}{18,5 \cdot 1,0 \cdot 0,10} \cdot \Delta A \text{ dak}^{-1} [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

$$\text{Özgül aktivite} = \frac{\text{Volüm aktivite}}{\text{derişim}} \cdot [\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}]$$

Özgül enzim aktiviteyi Unit mg^{-1} protein olarak hesaplandı. Spektrofotometrede kör olarak 1.5 M $\text{pH} = 8.0$ Tris (hidroksimetil - aminometan) tamponu kullanıldı. Her bir fareden elde edilen doku homojenatları, spektrofotometrede 3 tekrarlı olarak okundu ve ortalama değerler alındı. Homojenatların 1 ml sindeki protein miktarları Technicon RA 1000 otoanalizöründe Biüre yöntemi ile tayin edildi.

AP enzimi aşağıdaki tepkimeyi katalizlemektedir.



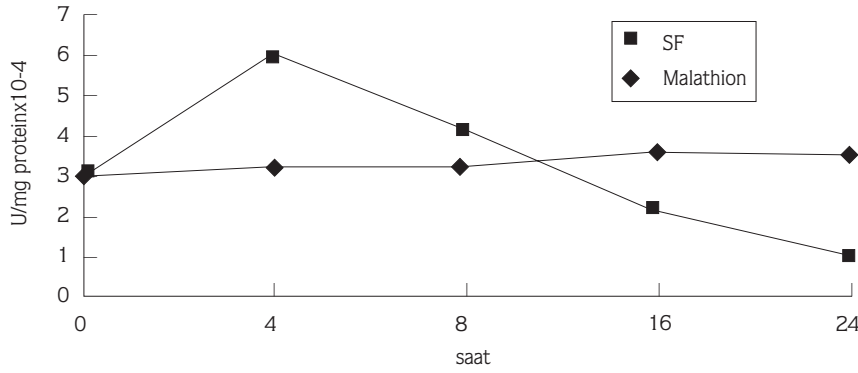
Spektrofotometre deney ortamına, önce tampon sonra substrat ve en son olarak da enzim kaynağı konup deneyler başlatılmıştır.

Tris tamponu (Hidroksimetil - aminometan) (1.5 M, pH=8.0) 1.90 ml
P-nitrofenilfosfat (14.56 mM) 1.00 ml
Enzim kaynağı 0.10 ml

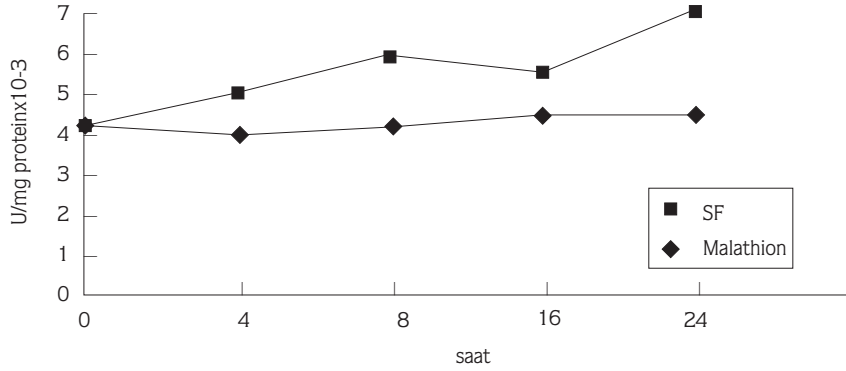
Bulgular

Serum fizyolojik ve malathion uygulanmış farelerin karaciğer, böbrek ve ince bağırsak AP enziminin özgül

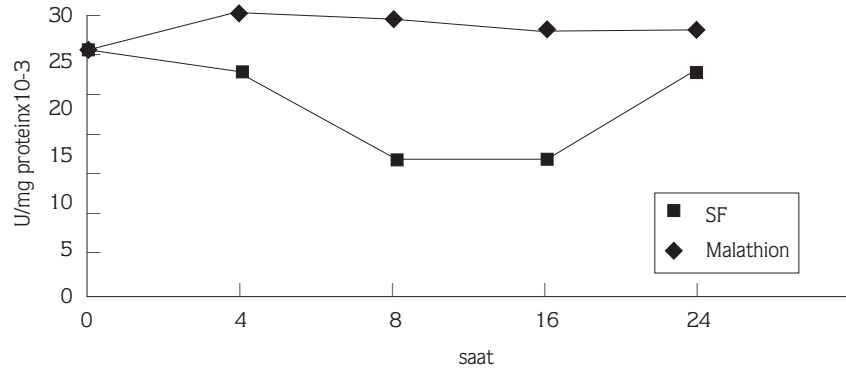
aktivite değerlerinin zamana göre değişimleri Tablo 1 de gösterilmiştir. Malathion, karaciğer AP aktivitesini ilk saatlerden itibaren artırmaya başlamıştır. 4. saatteki aktivasyon maksimum seviyede olup kontrol grubunun 2 katı kadar olmuştur. Bu aktivasyon 8. saatte azalma göstererek 11. saatten itibaren de inhibisyona dönüşmüştür. 16. saatte %41 olan inhibisyon, 24. saatte artarak devam etmiş ve %70 olmuştur (Şekil 1). Böbrek AP aktivitesi ilk saatlerden itibaren artmaya başlamıştır. 16. saatte aktivite artışında bir düşme olmakla beraber 24. saatte 1.5 katı ile en yüksek değere ulaşmıştır (Şekil 2). İnce bağırsak AP aktivitesi ise oldukça yüksek seviyede bir inhibisyon göstermiştir. 8. ve 16. saatte %48 ile en yüksek değere ulaşan inhibisyon, 24. saatte, %14 olarak tayin edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 1. Malathion'un karaciğer alkalin fosfataz aktivitesine etkisinin zamana bağlı değişimi



Şekil 2. Malathion'un böbrek alkalin fosfataz aktivitesine etkisinin zamana bağlı değişimi



Şekil 3. Malathion'un incebağırsak alkalin fosfataz aktivitesine etkisinin zamana bağlı değişimi

Tablo1. Serum Fizyolojik ve malathion uygulanmış farelerin karaciğer böbrek ve ince bağırsak alkalen fosfataz enziminin özgül aktivite (Unite mg⁻¹ protein) değerlerinin zamana göre değişimi

Enjeksiyondan sonra zaman (saat)	KARACİĞER		BÖBREK		İNCE BAĞIRSAK	
	Serum fizyolojik uygulanmış grup x10 ⁻⁴ ORT±SH	Malathion uygulanmış grup x10 ⁻⁴ ORT±SH	Serum fizyolojik uygulanmış grup x10 ⁻³ ORT±SH	Malathion uygulanmış grup x10 ⁻³ ORT±SH	Serum fizyolojik uygulanmış grup x10 ⁻³ ORT±SH	Malathion uygulanmış grup x10 ⁻³ ORT±SH
0	3.01±0.20	3.10±0.08	4.28±0.27	4.29±0.19	26.0±0.10	26.0±0.19
4	3.20±0.21	6.00±0.18	4.00±0.35	5.00±0.27	30.0±0.28	24.0±0.22
8	3.21±0.18	4.00±0.20	4.17±0.21	5.90±0.26	29.3±0.17	15.0±0.30
16	3.40±0.09	2.00±0.20	4.45±0.30	5.50±0.10	28.1±0.20	14.6±0.28
24	3.40±0.18	1.00±0.19	4.45±0.20	6.95±0.17	28.4±0.13	24.0±0.11

ORT= Ortalama SH= Standart Hata

Tartışma

Çalışmamızda, halkımızın kendi hayvanları için yaygın olarak kullandığı, malathion olarak bildiği %57 saflıktaki veterinerik preparatın etkilerini araştırmak ve memeli enzim sistemleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla hücre membranına yerleşmiş ve transport mekanizmasında önemli rolü olan AP enziminin karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularındaki aktivite değişimlerini inceledik. Bu araştırmamızda serum AP aktivitesine bakılmamıştır.

Kullanılan insektisidlerin toksik etkileri LD₅₀ değerlerinden anlaşılmaktadır. Toksik etkisi kuvvetli maddelerin LD₅₀ değeri düşük, toksik etkisi zayıf maddelerin ise LD₅₀ değerleri yüksektir. Toksik etkisi yüksek olan malathion'un bu etkisinin en aza indirilip IP enjeksiyondan sonra fare ölümlerinin önüne geçebilmek için malathion'un 40 mg kg⁻¹ dozu seçilerek deneyler tamamlanmıştır.

Deneylerimizde malathion enjeksiyonu, fare ince bağırsağında AP enziminin inhibisyonuna neden olurken, Karaciğer AP'nin önce aktivasyonuna daha sonra ise inhibisyonuna neden olmuştur. Bu durum bize malathion ve onun yıkım ürünlerinin enzim aktivitesi üzerine inhibe edici bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Malathion kan dolaşımı ile karaciğere gelmekte orada granülsüz endoplazmik retikulumda zara bağlı olarak bulunan karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından metabolize edilerek yıkım ürünlerine dönüşmektedir. Yıkım ürünlerinin de bazı enzimlerin inhibisyonuna neden olabildiği değişik araştırmalarla gösterilmiştir (20,21). Yapılan bir çalışmada karaciğer glutatyon-S-

alkiltransferaz aktivitesinin farklı dozlarda malathion uygulanmasıyla azaldığı gösterilmiştir (22). Sıçanlara malathion'un değişik dozlarının oral yolla verilmesiyle, hepatik AP aktivitesinin düştüğü, hücrelerde meydana gelebilecek bir hasarın bu enzimin sentez ve sekresyonunu azalttığı hayvanların besinlerine katılan proteinlerin ise oluşan inhibisyonları giderici etki yaptığı gösterilmiştir (23). Bu çalışmalar bizim bulgularımıza paralellik göstermektedir.

Deneylerimizde böbrek AP aktivitesi, malathion uygulanmasıyla kontrolümüze göre belirgin bir artış göstermiştir. Bu artışın, böbreğin fonksiyonları ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Böbrek proksimal tübülüslerinden glomerular filtrasyonu ile süzülen glukoz, amino asitler gibi bazı moleküller tamamen geri emilerek tekrar kana karışmaktadır. Bu geri emilimde de AP enziminin rolü olduğu bildirilmektedir (24). Glukoz emilimindeki artış AP enziminin sentezine uyarıcı bir etki yapabilir. Sıçanlarda malathion'un, kan glukoz seviyesini yükselttiği ve karaciğer glikojenini azalttığı bildirilmektedir (2). Kanda derişimi yükselen glukoz, glomerul filtrasyonu ile böbrek proksimal tübülüslerine geçer, tübülüslerde yüksek glukoz derişimi geri emilim için epitel hücrelerindeki AP enziminin sentezini uyarabilir.

Malathion'un etkisiyle AP enziminde görülen aktivite değişiklikleri ve kan glukozunun arttığının gösterilmiş olması (2), dokularda glukoz metabolizması ile ilgili enzimlerin aktivitelerinin değişmesine de neden olabilir. Yapılan bir çalışmada glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, heksokinaz ve laktat dehidrogenaz enzim aktivitelerinde

artış, malat dehidrogenaz aktivitesinde ise bir azalmanın olduğunun gösterilmiş olması (16) bu düşüncemizi bir noktada destekler niteliktedir.

Birim alandan elde edilebilecek ürün miktarını artırabilmek için bugün zararlılarla mücadelede kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu ilaçlar içerisinde önemli bir yeri olan malathion'un besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilecek olmasını unutmamak gerekir. Değişik deney hayvanlarının enzim sistemleri üzerinde oluşturdukları inhibisyon ve aktivasyonların benzerlerinin

insanlarda da olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerektiği düşüncesindeyiz. Fareler ile yaptığımız çalışmamız sonucunda, yurdumuzda yaygın bir şekilde kullanılan malathion'un fare karaciğer, böbrek ve ince bağırsak AP aktivitelerini etkilediği saptanmıştır. Bununla beraber malathion'un çeşitli enzimler üzerindeki etki mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşabilmesi için moleküler düzeyde yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Rodgers, K.E., Grayson, M.H., Imamura, T. and Devens, B.H., *In vitro* Effects of malathion and O,O,S-Trimethyl phosphorothioate on cytotoxic T. lymphocyte responses. *Biochem. and Physiol.* 24: 260-266, 1985.
2. Husain, K. and Ansari, R.A., Effectiveness of certain drugs in acute malathion intoxication in rats. *Exotoxicol. and Environ. Safety* 19: 271-275, 1990.
3. Khan, S. and Khan, N.N., The mobility of some organophosphorus pesticides in soils as affected by some soil parameters. *Soil Sci. October* 142 (4): 214-222, 1986.
4. Reuber, M.D., Carcinomas and other lesions of the liver in mice ingesting organochlorine pesticides. *Clinical Toxicol.* 13 (2): 231-256, 1978.
5. Öztürk, S., *Tarım İlaçları* İstanbul 1990. Hasad yayıncılık Soğan ağa mah. sümbül sinan sk. No 2/1 s 333 523 sayfa.
6. Öden, T., *Zirai Mücadele İlaçları* Ankara 1962. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele İlaç ve Aletleri Ens. Yayını No 2 368 sayfa.
7. Worthing C., *Pesticide Manuel England* 1983. A world Company 694 pp.
8. Vural, N., *Toksikoloji* No 56 Ankara 1984 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayınları 416 sayfa
9. Kaplan, M.M., Alkaline phosphatase (progress in hepatology) *Gastroenterology*, 62: 462-469, 1971.
10. Borges, M., The cytochemical application of new patent inhibitors of phosphatases. *Histochemical. Cytochem.* 21 (9): 812, 1973.
11. Inson, M., *İnsan Biyokimyası. İst. Ün. Tıp. Fak. Çeliker Matbaacılık* 703: İST. 1988
12. Özata, A. ve Atalay, A., Endosülfanın fare incebağırsak ve böbrek hücrelerinde fosfataz aktivitesine etkisi üzerine elektron mikroskopik çalışma. *Biyokimya Derg. Cilt IV* (1): 53-63, 1989.
13. Emecen, G. ve Ünlü, H., Memelilerde pestisitlerin sitogenetik etkilerinin "Mikronükleus Testi" ile araştırılması. *Tr. J. of Biology* 19: 1-9 1995.
14. Salvadori, D.M.F., Riberio, L.R., Pereiro, L.A.B. and Beçok, W., Cytogenetics effects of malathion insecticide on somatic and germ cells mice. *Mutat. Res.* 204: 283-287, 1988.
15. Grover, I.S. and Malhi, P.K., Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. *Mutat Res.* 155: 131-144, 1985.
16. Dere, E., Bakır, S. ve Atalay, A., Malathionun fare (*Mus musculus*) karaciğer heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz aktivitelerine etkisi. *Tr. J. of Biology* 19 . 19-27, 1995.
17. Anonim, *Zirai mücadele programı ve ihtiyaç cetvelleri A - insektisitler* 1997. Tarım İl Müdürlüğü Bursa.
18. Boehringer Mannheim, *Biochemical information alkaline phosphatase* 148 1973.
19. Garen, A., Levinthal, C., A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli* I - purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* 38 470-483 1960
20. Gerdy, G.F., Rose, H.A. and N.H. Starey, N.H., Effect of length of exposure to malathion on xenobiotic biotransformation in male rat liver. *Toxicol. Lett.* 38: 193-19, 1987.
21. Kettarman, A.J., Pond, S.M. and Becker, C.E., The effect of differential induction of cytochrome P-450 carboxylesterase and glutathion S-transferase activities on malathion toxicity in mice. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 87: 389-392, 1987.
22. Lechner, D.W. and Rahman, M.S.A., The effect carbonyl and malathion in combination on glutamyl transpeptidaz and glutathion-S-alkyltransferase activity in vitro. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 647-651, 1986.
23. Bulusu, S. and Ichakravarty., Effect of subacute administration of three organophosphorus pesticides on the hepatic phosphatases under various nutritional conditions. *Environ. Research* 44: 126-135, 1987.
24. Faulkner, W.N. and King, J.M., Renal function. *Tietz, N.W. Fundamental of clinical chemistry.* 976-978, 1976.