

Kobaylarda Amitraz Zehirlenmesinin Methemoglobin ve Hemolitik Anemi Oluşumu Üzerine Etkisi

Meltem ŞİRELİ, Vedat SAĞMANLIGIL, İlksin PIŞKIN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara-TÜRKİYE

Ayhan FİLAZİ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.03.1999

Özet: Araştırma amitraz zehirlenmesinin kanda methemoglobin oluşumu üzerine etkisinin incelenmesinin yanısıra alyuvarların ozmotik dirençlerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Bu çalışmada 250-300 gr ağırlıklarında toplam 12 adet kobay kullanıldı. Kobayların yarısı kontrol, diğer yarısı da deney grubu olarak ayrıldı. Deney grubundaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda amitraz periton içi uygulandı. Bir saatlik bekleme sonrasında kontrol grubu ve deney grubundaki hayvanların kalplerinden alınan kan örneklerinde, alyuvar sayıları, hematokrit, hemoglobin ve methemoglobin değerleri ile alyuvarların yüzde hemoliz oranlarına bakıldı. Deney grubundaki hayvanların hemoglobin miktarının kontrol grubununkinden düşük, methemoglobin değerinin ise yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$). Yine amitraz verilen hayvanların alyuvar sayılarında ve hematokrit değerlerinde gözlenen hafif düşüş istatistiksel yönden önemsiz bulunurken, alyuvarların ozmotik dirençlerinin azaldığı gözlemlendi ($p<0.01$).

Anahtar Sözcükler: Amitraz, methemoglobin, hemolitik anemi, kobay

The Effect of Amitraz Poisoning on Formation of Methemoglobin and Hemolytic Anemia in Guinea-pigs

Abstract: This investigation was carried out to determine the effect of amitraz poisoning on the the formation of methemoglobin and osmotic fragility of erythrocytes.

In this study, 12 guinea-pigs, weighing 250-300 gr were used. They were equally divided into two groups, control and experimental. The animals in the experimental group were intraperitoneally injected with amitraz at a dose of 1 mg/kg body weight. One hour after amitraz injections, erythrocyte, hematocrit, hemoglobin levels and also percent hemolysis of erythrocytes were measured in the blood samples taken from the control and experimental groups.

In the experimental group, the value of hemoglobin was lower while the value of methemoglobin was higher than those of the control group ($p<0.01$). In this group it was also observed that the osmotic fragility of erythrocytes were decreased ($p<0.01$) though the small decreases in the values of erythrocytes and hematocrit were not statistically significant.

Key Words: Amitraz, methemoglobin, hemolytic anemia, guinea-pig

Giriş

Amitraz[N-di-(2,4-ksiliminometil)metilamin] suda çok az, organik çözücülerde iyi çözünen kristalize bir toz olup dimetilformamidin türevi bir bileşiktir (1,2). Amitrazın hidrolize ürünleri arasında 2,4-dimetilformanilid, 2,4-dimetilanilin, 4-formamido-3-metilbenzoik asit yer almaktadır (3,4).

Dünyada 25 ülkede 1977 yılında insektisit, akarisit ve mitisit olarak kabul edilen amitraz (5), günümüzde yaygın olarak tarımda sebze ve meyvelerin korunması ile veteriner hekimlikte hayvanların dış parazitlerine karşı

kullanılmaktadır (6,7,8). Amitrazın, geniş çapta kullanım alanının bulunması nedeniyle, her geçen gün toprak ve suda birikmesi çevre kirliliği sorununu gündeme getirmektedir (9). Nitekim insanlara ait amitrazla zehirlenme vakaları da bulunmaktadır (10,11).

Hem insanlara ait zehirlenme bildirimlerinde (10,11), hem de hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda bradikardi, midriasis, sedasyon, hipotansiyon, hipotermi, poliuri ve kusma gibi klinik belirtiler dikkati çekmektedir (1,11,12,13). Köpeklerde deneysel olarak oluşturulan zehirlenme çalışmalarında amitrazın plazma glikoz

düzeyini arttırdığı ve insülin bırakılığını kısıtladığı bildirilmiştir (14). Amitraz hidrolize ürünlerinden 2,4-dimetilanilin haff bir methemoglobin oluşturucu özelliğinden bahsedilmiş (15), anilin ise yüksek dozlarda alınmasıyla organizmada hemoliz şekillendiği, ancak bu durumun genelde alyuvarlarda bulunan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin genetiksel olarak yetersizliğinde söz konusu olabileceği bildirilmiştir (16). Bununla birlikte anilin neden olduğu methemoglobinin oksihemoglobine dönüşümünde NADH-metHb azaltıcı sistem, NADPH-dehidrojenaz sistemi, glutathion, askorbik asit ve metilen mavisi gibi faktörler etkin rol oynamaktadır (17). Bu faktörlerden karaciğerde sentezlenen glutathion oluşumunun ise alfa 2 adreno reseptörlerin etkinleşmesiyle azaldığı belirtilmiştir (18). Bu konuda hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda ise formamidin içerikli amitrazın esas olarak alfa 2 adreno reseptörleri etkilediği bildirilmiştir (19,20). Amitrazın insan ve hayvanlarda oluşturduğu zehirlenmelerle ilgili bildirimlere rastlanılmakta (10,11), ancak pre-klinik önem taşıyan hematolojik değerlere ait deneysel çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Yine amitraz toksitesisi ile ilişkili olarak metabolitlerinin methemoglobin ve hemolitik anemi oluşturması konusunda bildirimler de yetersiz bulunmaktadır. Bu araştırmada akut amitraz zehirlenmesinin methemoglobin oluşumu ile alyuvarların sayı ve dirençleri, hematokrit ve hemoglobin değerleri ile ilişkili olarak hemolitik anemi oluşumu üzerine olası etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırmada 250-300 gr ağırlıklarında her iki cinsten toplam 12 adet kobay kullanıldı. Kobayların ortama alışmaları için bir hafta beklendi.

İlaç olarak 122 mg/ml yoğunluğunda amitraz içeren Kenecid % 12.5 EC (Tay İlaç) kullanıldı. Formülasyonun amitraz yoğunluğu kapillar kolon gaz kromatografisi ile belirlendi (A.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı).

Amitrazla ilgili yeterli çalışmaya rastlanılmadığından çalışma öncesinde kobaylarda toksik dozun belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar yapıldı. Ön çalışmalarda 1 mg/kg amitrazın periton içi uygulanmasında ölüm olayına rastlanılmadan, aşırı duyarlılık ve konstipasyon gibi belirtilerin oluşması nedeniyle bu doz çalışmada toksik doz olarak kabul edildi. Her grupta 6 adet olacak şekilde iki gruba ayrılan kobaylardan bir grup kontrol grubu, diğer grup deney grubu olarak kabul edildi. Deney grubundaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda amitraz periton içi uygulandı.

İlaç uygulamasından bir saat sonra kontrol ve deney grubundaki hayvanların kalplerinden EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinde, alyuvar sayısı, hematokrit değeri (21), hemoglobin (22) ve methemoglobin (16) miktarı ile alyuvarların ozmotik dirençleri (23) belirlendi.

Methemoglobin miktarının tayini için EDTA' lı tüplere alınan kandan 75 µl alınarak, hemen hemoliz edilebilmesi amacıyla içinde 5 ml fosfat buffer bulunan tüplere aktarıldı (16,23). Daha sonra bu hemolize solüsyon dört eşit parçaya ayrılarak 1,2,3,4 olmak üzere numaralandırıldı. % 10'luk KCN' den birer damla 2 ve 4 nolu tüplere, % 20'lik $K_3Fe(CN)_6$ ' dan birer damla ise 3 ve 4 nolu tüplere konuldu. Vortekste karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 635 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

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

mülüne göre hesaplandı (16).

Alyuvarların ozmotik dirençlerinin dolayısıyla hemoliz oranlarının belirlenmesi için % 10'luk tamponlu NaCl solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon 180 gr 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 tamponlu 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 µl kan ilave edildikten sonra vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 30 dakika beklendikten sonra 2000 rpm' de santrifüj edildi.

Her bir tüpten üstteki sıvıdan 3.5 ml alınarak spektrofotometre tüplerine aktarıldı ve 540 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu. Son tüpteki (16. tüp) değeri % 100' lük hemoliz olarak kabul edildi ve sonuçlar aşağıdaki formüle göre değerlendirilerek yüzde hemoliz oranları belirlendi (23).

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

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

Tablo 1. Alyuvarların yüzde hemoliz oranlarının belirlenmesinde kullanılan distile su ve % 1'lik tamponlu NaCl solüsyonunun miktarları ve hazırlanan ortamların yoğunlukları oranları.

Gruplar (n=6)	Hb (gr/100 ml)	MHb (%)	Alyuvar (mm ³ te)	Htc (%)
Kontrol	18.7± 1.1	3.7± 0.6	6.060.000±187.060	43.5± 0.6
Deney	13.4± 0.4*	31.4± 5.2*	5.850.000±142.700	42.5± 0.5

Tablo 2. Kontrol grubu ile deney grubuna (1 mg/kg amitraz) ait hematolojik değerler. Değerler ± standart hata olarak gösterilmiştir.

* p<0.01

Kontrol ve deney grubu arası değer farklılıkları student " t " testi kullanılarak belirlendi (MS Windows için SPSS 5.0 paket programı).

Bulgular

Kontrol grubu ile amitraz verilerek oluşturulan deney grubuna ait hematolojik değerler Tablo 2' de verilmiştir.

Çalışmada deney grubunda belirlenen ortalama hemoglobin miktarı (13.4±0.4 gr/100 ml) kontrol grubununkinden (18.7±1.1 gr/100 ml) düşük (p<0.01), methemoglobin değeri ise (sırasıyla % 31.4± 5.2, % 3.7± 0.6) yüksek bulundu (p<0.01) . Yine her iki grubun karşılaştırılmasında, kontrol grubunun ortalama alyuvar sayısı mm³'te 6.060.000±187.060' den deney grubunda mm³'te 5.850.000±142.700' e, ayrıca ortalama hematokrit değeri % 43.5± 0.6' den, deney grubunda %

42.5± 0.5' a hafif bir düşüş gösterdi, ancak bu değer farklılıkları istatistiksel yönden önemsiz bulundu (Tablo 2).

Her iki grubun son tüplerine (% 100 distile su) ait hemoliz değerleri % 100 olarak kabul edilerek değerlendirildiğinde, kontrol ve deney grubunun ortalama % hemoliz değerleri 1. - 8. tüpler arasında (% 0.85 - 0.50 NaCl) benzer seyrettiği belirlendi. Hemoliz değerlerinde gruplar arasında 9. tüpten (% 0.45 NaCl) itibaren başlayan farklılık (p<0.01) bulundu. Kontrol grubuna ait 9. tüpte hemoliz oranı % 18.9 ± 2.4 iken, deney grubuna ait aynı numaralı tüpte hemoliz oranı % 61.3 ± 14.6 olarak gözlemlendi ve 10. - 11. tüplerde de gruplar arası bu farklılık devam etti (p<0.01). Deney grubuna ait hemoliz değeri 12. tüpte (% 30 NaCl) % 100 olurken, kontrol grubuna ait tüplerin hiçbirinde % 100'lük hemolizin oluşmadığı belirlendi (Tablo 3).

Tüp No	% NaCl Solüsyonu	Kontrol Grubu (n=6)	Deney Grubu (n=6)
1	0.85	5.9 ± 0.9	8.5 ± 1.2
2	0.80	7.5 ± 1.9	11.9 ± 4.0
3	0.75	10.5 ± 2.6	10.5 ± 3.9
4	0.70	9.5 ± 0.6	14.4 ± 6.4
5	0.65	8.3 ± 1.5	12.1 ± 5.4
6	0.60	9.7 ± 2.2	12.7 ± 5.4
7	0.55	10.5 ± 2.8	21.8 ± 8.4
8	0.50	12.4 ± 2.4	20.3 ± 6.6
9	0.45	18.9 ± 2.4	61.3 ± 14.6**
10	0.40	30.9 ± 4.2	78.3 ± 12.9**
11	0.35	51.7 ± 14.0	97.1 ± 1.8**
12	0.30	69.8 ± 12.0	100.0 ± 0*
13	0.25	74.0 ± 11.9	100.0 ± 0
14	0.20	98.3 ± 1.6	100.0 ± 0
15	0.10	98.7 ± 1.3	100.0 ± 0

Tablo 3. Kontrol ve deney grubuna (1 mg/kg amitraz) ait ortalama % hemoliz değerleri. Değerler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir.

* p<0.05 ** p<0.01

Tartışma

Araştırmada akut amitraz zehirlenmesinin methemoglobin ve hemolitik anemi oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla araştırmada deney grubundaki hayvanlara verilen amitraz dozu, ön denemelerde 1 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Amitraz uygulanan hayvanlardan alınan kan örneklerinde normal kobaylara oranla hemoglobin miktarındaki düşüşle (p<0.01) ilişkili olarak methemoglobin miktarında yükselme (p<0.01) gözlemlenmiştir. Bu bulgu, amitraz uygulamasını takiben methemoglobinemi oluşumunu gösterirken, Randy (15)'nin yaptığı derlemede köpeklerde amitrazın hidrolize ürünlerinden 2,4-dimetilanilin'in hafif methemoglobinemi tablosu şekillendirdiği bildiriyle uygunluk göstermektedir. Organizmada methemoglobinden oksihemoglobine geri dönüşümde etkin rol oynayanların arasında glutationun da yer aldığı birçok koruyucu faktörün bulunduğu bilinmektedir (17). Costa ve ark. (18), bu koruyucu faktörlerden biri olan glutation denetiminin karaciğerde bulunan alfa 2 adreno reseptörler tarafından sağlandığını, bunun yanında alfa 2 adreno reseptör antagonisti amitraz varlığında karaciğer

glutation düzeyinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada ise methemoglobinemi tablosunun oluşması, amitrazın alfa 2 adreno reseptörleri etkileyerek bahsi geçen glutationun yetersiz kılınmasıyla açıklanabilir. Nitekim böyle bir koruyucu faktör yetersizliği ile amitraz karşısında organizma methemoglobin oluşumuna karşı duyarlı hale gelebilmektedir.

Alyuvarların yüzey ve hacim değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ozmotik direnç kontrolünün, normal ve amitraz verilmiş hayvanlara ait sonuçlarına bakıldığında alyuvar direnç farklılığının NaCl'nin % 0.45'lik konsantrasyonunda tespit edildiği görülmüştür (p<0.01). Hemolizin NaCl'nin % 0.40 ve % 0.35'lik konsantrasyonlarında devam etmesi (p<0.01), NaCl'nin % 0.30 konsantrasyonunda % 100'lük hemolize ulaşması, buna karşın normal kobayların kanında aynı konsantrasyonlarda en fazla % 69.8 oranında hemoliz görülmesi, zehirlenme ile ilişkili olarak bir hemolitik anemi tablosunu düşündürmüştür. Ancak normal hayvanlara oranla amitraz uygulanan kobayların alyuvar sayılarında ve hematokrit oranlarında istatistiksel yönden önemli olmayan hafif bir düşüşün bulunması hemolitik anemi tablosunun hafif şekilde oluştuğunu

göstermektedir. Anilinın organizmaya yüksek dozlarda alınmasıyla alyuvarlarda hemoliz şekillendiğine ait bildirim bulunmasına karşın, bu durumun alyuvarlarda bulunan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin genetiksel olarak yetersizliğinde söz konusu olabileceği araştırmada bildirilmektedir (16).

Sonuç olarak, araştırmada akut amitraz zehirlenmesi sonrasında kobaylarda methemoglobinemi tablosu ile hafif bir hemolitik anemi tablosunun şekillendiği belirlenmiştir. Araştırma sonucuna göre elde edilen bu bulguların, organizmada methemoglobin oluşumuna karşı koruyucu sistem ve faktörlerle amitrazın ilişkisine yönelik yapılacak diğer çalışmalara yön göstereceği kanısındayız.

Kaynaklar

1. Burnsell, J.L., Turnbull, G.J.: Extrapolation from safety data to management of poisoning with reference to amitraz. *Hum. Toxicol.*, 1983; 2(4): 587-589.
2. Hugnet, C., Buronrose, F., Pineau, X., Cadore, J.L., Lorgue, G., Berny, P.J.: Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1996; 57(10): 1506-1510.
3. Rickett, F.E.: Use of high-performance liquid chromatography to separate very small quantities of radio-labelled metabolites from biological tissue. *J. Chromatogr.*, 1977; 11(142): 705-713.
4. Knowles, C.O., Benezet, H.J.: Excretion balance, metabolic fate and tissue residues following treatment of rats with amitraz and N - (2,4-dimethylphenyl) - N - methylformamide. *J. Environ. Sci. Health*, 1981; 16(5): 547-555.
5. EPA: Amitraz (BAAM): Position Document I, NTIS 0504, 0606. US. Environmental Protection Agency. Arlington V.A., 1977.
6. Gilbert, M.E.: Formamide pesticides enhance susceptibility to kindled seizures in amygdala and hippocampus of the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 1988; 10: 221-227.
7. Kiyoshi, A., Chiaki, F., Setsuko, A., Takahiro, K., Toyohiko, S., Iwao, I.: A rapid and sensitive quantitation of amitraz in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and its application for pharmacokinetics. *J. Analytical Toxicol.*, 1991; 15.
8. Lucio, G.C., Jonathan, G., Sheldon, D.M.: The formamide pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione in mice through an interaction with alpha 2-adrenoceptors. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1991; 33:349-358.
9. Amin, A.E., Abdalla, G.A.: Effects of endosulfan and amitraz on feedlot performance, carcass yield and meat quality characteristics of Nubian goats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1995; 37(2):113-116.
10. Kennel, O., Prince, C., Garnier, R.: Four cases of amitraz poisoning in humans. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1996; 38(1): 28-30.
11. Aydın, K., Kurtoglu, S., Poyrazoglu, M.H., Uzum, K., Ustunbas, H.B., Hallac, I.K.: Amitraz poisoning in children: clinical and laboratory findings of eight cases. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1997; 16(11):680-682.
12. Auer, D.E., Seawright, A.A., Politt, C.C., Williams, G.: Illness in horses following spraying with amitraz. *Australian Vet. J.*, 1984;61(8):257-259.
13. Doherty, T.J.: Physiologic effects of alpha2-adrenergic receptors. *JAVMA*, 1988; 192(11): 1612-1614.
14. Hsu, W.H., Schaffer, D.D.: Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1988; 49:130-131.
15. Randy, D.J.: Xylene/amitraz: a pharmacologic review and profile. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1990; 32(5):446-448.
16. Harrison, J.H., Jollow, D.J.: Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 1986; 238:1045-1054.
17. Yagi, S., Obara, J.: Reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in circulating blood in rabbits and goats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1983; 45(5):627-635.
18. Costa, L.G., Gastel, J., Murphy, S.D.: The formamide pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione in mice through an interaction with alpha2-adrenoceptors. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1991; 33: 349-358.
19. Walter, H.H., Zheng-Xing, L.: Amitraz induced delay of gastrointestinal transit in mice: mediated by alpha2-adrenergic receptors. *Drug Dev. Res.*, 1984; 4: 655-660.
20. Costa, L.G., Olibet, G., Murphy, S.D.: Alpha 2-adrenoceptors as a target for formamide pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1988; 93(2):319-328.
21. Yılmaz, B.: Fizioloji. Hacettepe Taş Kitapçılık. Ankara, 1984.
22. Merck, E.: Clinical Laboratory Merck, 11 th Edition of Medico-Chemical Investigation Methods. Germany, 1974.
23. Schalm, O.W., Join, N.C., Carrol, E.J.: Veterinary Hematology. 3 th. Edition, Lea and Febiger. Philadelphia, 1975.