

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ENDOSULFANIN *MUS MUSCULUS* KAN, KARACİĞER VE
MEME DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ergül B. KURUTAŞ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Güneş T. YÜREGİR

88317

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBE 96-7 ve TF 98-6 nolu projelerle desteklenmiştir.

Tez No:

ADANA-1999

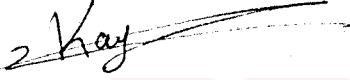
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KABUL VE ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

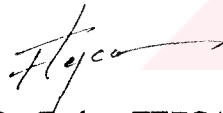
Ergül BELGE KURUTAŞ'ın Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "Endosulfanın *Mus Musculus* Kan, Karaciğer ve Meme Dokusu Üzerine Etkisi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/ 07/1999


Prof. Dr. Levent KAYRIN


Çukurova Üniversitesi

Jüri Başkanı


Prof. Dr. Ferhan TEZCAN

Hacettepe Üniversitesi

Raportör


Prof. Dr. Kıymet AKSOY

Çukurova Üniversitesi

Raportör

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 7.9.99 tarih ve 18/3 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Kadir ÖZCAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, bilimsel düşüncüyü aşlayan, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen, tez danışmanım, çok değerli Sayın hocam Prof. Dr. Güneş T.YÜREGİR'e sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve yetişmemdeki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve ikinci danışmanım Sayın hocam Prof. Dr. Levent KAYRIN'a ve diğer öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Işık mikroskopik düzeyinde histopatolojik incelemeleriyle tezime büyük katkılarda bulunan Sayın hocam Doç. Dr. Figen DORAN'a ve elektron mikroskopik düzeyinde histopatolojik incelemeleriyle tezime katkılarda bulunan Sayın hocam Doç. Dr. Handan ZEREN'e ve istatistiksel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Refik BURGUT'a ve Biyoistatistik Bilim Uzmanı Sayın Meryem YILDIZLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez örneklerimin temininde gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı Veteriner Hekim Kenan Dağlıoğlu'na ve çok değerli TIBDAM çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim. Tez çalışmamı SBE.96-7 nolu ve TF.98-6 nolu projelerle destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğüne ve Araştırma Fonuna ayrıca teşekkür ederim.

Sevgili eşime ve aileme de desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Arş. Gör. Ergül BELGE KURUTAŞ

ADANA/1999

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pestisitler.....	3
2.1.1. Pestisitlerin Tarihçesi.....	3
2.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Pestisitlerin Çevreye Etkileri.....	4
2.1.4. Pestisitlerin İnsanlara Etkileri.....	5
2.1.5. Pestisitlerin Biyotransformasyonu.....	7
2.1.6. Sentetik Organik Maddeler.....	9
2.1.6.1. Organik Fosforlu Maddeler.....	9
2.1.6.2. Organik Klorlu Maddeler.....	10
2.1.6.2.1. Endosulfan.....	12
2.1.6.2.1.1. Endosulfanın Biyolojik Birikimi.....	14
2.1.6.2.1.2. Endosulfanın Toksisitesi.....	14
2.1.6.2.1.3. Mortalite.....	16
2.2. Serbest Radikaller (Reaktif Oksijen Türleri).....	17
2.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması.....	17
2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	19
2.2.3. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit.....	20
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	21
2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistemler.....	21

2.3.1.1. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (E.C.1.1.1.49.).....	21
2.3.1.2. Glutasyon Redüktaz (E.C.1.6.4.2.).....	24
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (E.C.1.11.1.9).....	24
2.3.1.4. Katalaz (E.C.1.11.1.16).....	25
2.3.1.5. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1).....	26
2.3.1.6. Glutasyon-S-Transferaz.....	27
2.3.2. Non-enzimatik Antioksidan Sistemler.....	29
2.3.2.1. Vitamin E ve C.....	29
2.3.2.2. Transferrin.....	29
2.3.2.3. Seruloplasmin.....	29
2.3.2.4. Albumin.....	30
2.3.2.5. Bilirubin.....	30
2.3.2.6. Redükte Glutasyon.....	30
2.5. Laktik Dehidrogenaz.....	30
2.6. Meme Kanseri.....	32
2.6.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	33
2.6.2. Meme Kanserinin İnsidansı.....	33
2.6.2.1. Ülkeler Arası İnsidansı.....	33
2.6.2.2. Türkiye Genelinde İnsidansı.....	33
2.6.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisindeki Risk Faktörleri.....	34
2.6.3.1. Genetiksel Faktörler.....	34
2.6.3.2. Çevresel Faktörler.....	34
2.6.4. Organik Klorlu Pestisitlerin Meme Kanseri ile İlişkisi.....	35
2.7. Fareler.....	36
2.7.1. Fare Kanı.....	36
2.7.2. Fare Karaciğeri.....	36
2.7.3. Fare Memesi.....	37
3. MATERYAL VE METOD.....	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Aygıtlar.....	38
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	38

3.2. Örnek Seçimi ve Temini.....	39
3.2.1. Fareler.....	39
3.2.2. Pestisitli Yem Hazırlanması ve Uygulanması.....	39
3.2.3. Fare Kanı.....	40
3.2.4. Fare Karaciğer ve Meme Dokusu	40
3.3. Vücut, Karaciğer ve Meme Ağırlıklarının Saptanması.....	42
3.4. Karaciğer ve Meme Dokularının Histopatolojik incelenmesi.....	42
3.4.1. Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi.....	42
3.4.2. Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi.....	42
3.5. Analiz Yöntemleri.....	43
3.5.1. Hematolojik Analizler.....	43
3.5.1.1. Lökosit Sayımı.....	43
3.5.1.2. Eritrosit Sayımı.....	44
3.5.1.3. Hemoglobin Tayini.....	44
3.5.1.4. Hematokrit Tayini.....	45
3.5.1.5. Periferik Yayma.....	45
3.5.1.6. Hematolojik Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	46
3.5.1.6.1. Referans Değerler.....	46
3.5.2. Biyokimyasal Analizler.....	47
3.5.2.1. Eritrositte Antioksidan Sistemler, LDH Aktivitesi ve MDA Düzeylerinin İncelenmesi.....	47
3.5.2.1.1. Hemolizat Hazırlama.....	47
3.5.2.1.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini.....	47
3.5.2.1.3. Katalaz Aktivite Tayini.....	49
3.5.2.1.4. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini.....	51
3.5.2.1.5. Glutasyon-S- Transferaz Aktivite Tayini.....	54
3.5.2.1.6. Redükte Glutasyon Düzeyinin Tayini.....	56
3.5.2.1.7. Laktik Dehidrogenaz Aktivite Tayini.....	57
3.5.2.1.8. Malondialdehit Düzeyinin Tayini.....	59
3.5.2.1.9. Hemoglobin Düzeyinin Tayini.....	61

3.5.2.1.10. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleriyle İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	62
3.5.2.1.10.1. Referans Değerler.....	62
3.5.2.1.10.2. Analitik Varyasyon.....	63
3.5.2.1.10.3. Intra-individual ve Inter-individual Varyasyon.....	63
3.5.2.2. Karaciğer ve Meme Dokularında Antioksidan Sistemler, LDH Aktivitesi ve MDA Düzeylerinin İncelenmesi.....	63
3.5.2.2.1 Homojenat Hazırlama.....	63
3.5.2.2.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini.....	63
3.5.2.2.3.Katalaz Aktivite Tayini.....	64
3.5.2.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini.....	65
3.5.2.2.5. Glutasyon-S-Transferaz Aktivite Tayini.....	65
3.5.2.2.6. Redükte Glutasyon Düzeyinin Tayini.....	66
3.5.2.2.7. Laktik Dehidrogenaz Aktivite Tayini.....	67
3.5.2.2.8. Malondialdehit Düzeyinin Tayini.....	68
3.5.2.2.9. Protein Düzeyinin Tayini.....	68
3.5.2.2.10. Karaciğer ve Meme Dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	70
3.5.2.2.10.1. Referans Değerler.....	71
3.5.3. İstatistiksel Analiz.....	71
4. BULGULAR	72
4.1. Vücut Ağırlıklarıyla İlgili Bulgular.....	73
4.2. Karaciğer Ağırlıklarıyla İlgili Bulgular.....	74
4.3. Hepato/Somato İndeksle İlgili Bulgular.....	74
4.4. Total Meme Ağırlıklarıyla İlgili Bulgular.....	75
4.5. Karaciğer ve Meme Dokularıyla İlgili Histopatolojik Bulgular.....	76
4.5.1. Işık Mikroskopik Düzeyde.....	76
4.5.1.1. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi.....	76

4.5.1.1.1. Üç ve Altı Ay Süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar.....	76
4.5.1.1.2. Üç Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup.....	76
4.5.1.1.3. Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup.....	77
4.5.1.2. Meme Dokularının Histopatolojik İncelenmesi.....	78
4.5.1.2.1. Üç ve Altı Ay Süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar.....	78
4.5.1.2.2. Üç ve Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Gruplar.....	79
4.5.2. Elektron Mikroskopik Düzeyde.....	79
4.5.2.1. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi.....	79
4.5.2.1.1. Üç ve Altı Ay Süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar.....	79
4.5.2.1.2. Üç Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup.....	80
4.5.2.1.3. Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup.....	81
4.5.2.2. Meme Dokularının Histopatolojik İncelenmesi.....	83
4.6. Hematolojik Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	83
4.6.1. Hematolojik Veriler ile İlgili Deneysel Bulgular.....	84
4.7. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	89
4.7.1. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktivitelerinin, GSH ve MDA Düzeylerinin Intra-inter Individual Varyasyonlar ile İlgili Bulgular.....	91
4.7.1.1. Analitik Varyasyonlar.....	91
4.7.1.2. Intra-inter Individual Varyasyonlar.....	92
4.7.2. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Deneysel Bulgular.....	97
4.8. Karaciğer ve Meme Dokularında Ölçülen Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi.....	118
4.8.1. Karaciğer Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (mg protein olarak).....	118
4.8.2. Karaciğer Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (g karaciğer olarak).....	120

4.8.3. Meme Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (mg protein olarak).....	123
4.8.4. Karaciğer ve Meme Dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Deneysel Bulgular.....	125
5. TARTIŞMA.....	141
6. SONUÇLAR.....	157
7. KAYNAKLAR.....	160
ÖZGEÇMİŞ.....	171



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pestisitlerin biyotransformasyonu ve biyotransformasyonda yer alan enzimler	8
Şekil 2. Bazı organik fosforlu ve karbamatlı pestisitlerin toksisite düzeyleri	10
Şekil 3. Bazı organik klorlu pestisitlerin toksisite düzeyleri	12
Şekil 4. Endosulfan ve metabolitleri	13
Şekil 5. Oksidatif strese G6PDH enziminin rolü	22
Şekil 6. Dişi albino bir farenin (<i>Mus musculus</i>) sahip olduğu meme çiftleri	37
Şekil 7. Pestisitli yemin hazırlanışı	40
Şekil 8. Karaciğer dokusunun çıkarılışı	41
Şekil 9. Meme dokusunun çıkarılışı	41
Şekil 10. Süperoksit dismutaz standart eğrisi	53
Şekil 11. Malondialdehit standart eğrisi	60
Şekil 12. Protein standart eğrisi	70
Şekil 13. Normal yem uygulanan gruplarda karaciğer histopatolojisi	76
Şekil 14. Üç ay süreyle pestisit uygulanan grupların karaciğer histopatolojisi	77
Şekil 15. Altı ay süreyle pestisit uygulanan grupların karaciğer histopatolojisi	78
Şekil 16. Normal yem uygulanan gruplarda meme histopatolojisi	78
Şekil 17. Üç ve altı ay süreyle pestisit uygulanan gruplarda meme histopatolojisi	79
Şekil 18. Normal yem uygulanan gruplarda karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü	80
Şekil 19. Üç ay süreyle pestisit uygulanan gruba ait karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü	81
Şekil 20. Altı ay süreyle pestisit uygulanan gruba ait karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü	82
Şekil 21. Hematolojik verilerinde normal dağılım eğrileri	85
Şekil 22. Kontrol ve pestisitli gruplarda hematolojik verilerin değişimi	87
Şekil 23. Normal yem uygulanan farelerin kan hücreleri	88
Şekil 24. Pestisit uygulanan farelerin kan hücreleri	88

Şekil 25. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin normal dağılım eğrileri	90
Şekil 26. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen G6PDH aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	94
Şekil 27. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen CAT aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	94
Şekil 28. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen SOD aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	95
Şekil 29. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen GST aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	95
Şekil 30. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen LDH aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	96
Şekil 31. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen GSH aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	96
Şekil 32. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen MDA aktivitesinin (x; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar	97
Şekil 33. Grup I ve II'de eritrosit G6PDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	107
Şekil 34. Grup III ve IV'te eritrosit G6PDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	107
Şekil 35. Grup I ve II'de eritrosit CAT enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	108
Şekil 36. Grup III ve IV'te eritrosit CAT enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	108
Şekil 37. Grup I ve II'de eritrosit SOD enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	109
Şekil 38. Grup III ve IV'te eritrosit SOD enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	109
Şekil 39. Grup I ve II'de eritrosit GST enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	110
Şekil 40. Grup III ve IV'te eritrosit GST enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	110
Şekil 41. Grup I ve II'de eritrosit LDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	111
Şekil 42. Grup III ve IV'te eritrosit LDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	111
Şekil 43. Grup I ve II'de eritrosit GSH düzeyinin aylara göre değişimi	112
Şekil 44. Grup III ve IV'te eritrosit GSH düzeyinin aylara göre değişimi	112
Şekil 45. Grup I ve II'de MDA düzeyinin aylara göre değişimi	113

Şekil 46. Grup III ve IV'te MDA düzeyinin aylara göre değişimi	113
Şekil 47. Grup II ve IV'te G6PDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	114
Şekil 48. Grup II ve IV'te CAT enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	115
Şekil 49. Grup II ve IV'te SOD enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	115
Şekil 50. Grup II ve IV'te GST enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	116
Şekil 51. Grup II ve IV'te LDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi	116
Şekil 52. Grup II ve IV'te GSH düzeyinin aylara göre değişimi	117
Şekil 53. Grup II ve IV'te MDA düzeyinin aylara göre değişimi	117
Şekil 54. Karaciğer antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyinin (mg protein) normal dağılım eğrileri	119
Şekil 55. Karaciğer antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeylerinin (g karaciğer) normal dağılım eğrileri	122
Şekil 56. Meme antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeylerinin (mg protein) normal dağılım eğrileri	125
Şekil 57. Karaciğer G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	127
Şekil 58. Karaciğer CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	127
Şekil 59. Karaciğer SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	128
Şekil 60. Karaciğer GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	128
Şekil 61. Karaciğer LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	129
Şekil 62. Karaciğer GSH düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	129
Şekil 63. Karaciğer MDA düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	130
Şekil 64. Karaciğer G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	132
Şekil 65. Karaciğer CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	132
Şekil 66. Karaciğer SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	133

Şekil 67. Karaciğer GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	133
Şekil 68. Karaciğer LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	134
Şekil 69. Karaciğer GSH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	134
Şekil 70. Karaciğer MDA aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)	135
Şekil 71. Meme G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	137
Şekil 72. Meme CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	137
Şekil 73. Meme SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	138
Şekil 74. Meme GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	138
Şekil 75. Meme LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	139
Şekil 76. Meme GSH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	139
Şekil 77. Meme MDA aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)	140

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Pestisitlerin kronik etkileri	7
Çizelge 2. Bazı pestisitlerin sıçanlardaki LD ₅₀ değerleri	11
Çizelge 3. Reaktif oksijen türleri ve sınıflandırılması	18
Çizelge 4. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları	19
Çizelge 5. Eritrositte G6PDH aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı	48
Çizelge 6. Eritrositte CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı	50
Çizelge 7. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	52
Çizelge 8. SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı	53
Çizelge 9. Eritrositte SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	54
Çizelge 10. Eritrositte GST aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	55
Çizelge 11. Eritrositte GSH düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	57
Çizelge 12. Eritrositte LDH aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	58
Çizelge 13. MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	60
Çizelge 14. Eritrositte MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	61
Çizelge 15. Hemogloblin standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	62
Çizelge 16. Hemolizatta hemogloblin tayini için tüplerin hazırlanışı	62
Çizelge 17. Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	70
Çizelge 18. Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı	71
Çizelge 19. Dört grupta incelenen farelerin çeşitli zaman periyodundaki vücut (g.) istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart Sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%CV))	73
Çizelge 20. Vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması (Mann-Whitney-U) ile elde edilen p değerleri	73
Çizelge 21. Dört grubun karaciğer ağırlıklarına ait istatistiksel sonuçlar (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)	74
Çizelge 22. Hepato/Somato indekslerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)	75

Çizelge 23. Total meme ağırlıklarının istatistiksel sonuçları(ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)	75
Çizelge 24. Dört grubun deney öncesi (Başlangıç) kanlardaki hematolojik verilerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	83
Çizelge 25. Hematolojik parametrelerde referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları	84
Çizelge 26. Dört grubun deney sonrası alınan kanlarda hematolojik verilerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	86
Çizelge 27. Dört grubun deney öncesi ve sonrası her bir hematolojik verinin grup içinde karşılaştırılması (Wilcoxon-test) ile elde edilen p değerleri	86
Çizelge 28. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel sonuçlar	89
Çizelge 29. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin aynı örnekte ve aynı zamanda yapılan ölçüm (intra-assay) sonuçları	92
Çizelge 30. 15 sağlıklı bireyde (Grup III) . Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin aylar içinde gösterdikleri varyasyonlar	93
Çizelge 31. Grup I'de (kontrol grubu) antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	98
Çizelge 32. Grup I'in (kontrol grubu) grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon-test) ile elde edilen p değerleri	99
Çizelge 33. Grup II'de antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	100
Çizelge 34. Grup II'nin grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon-test) ile elde edilen p değerleri	101
Çizelge 35. Grup III'te (kontrol grubu) antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	102
Çizelge 36. Grup III'ün (kontrol grubu) grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon-test) ile elde edilen p değerleri	103
Çizelge 37. Grup IV'te antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV))	104
Çizelge 38. Grup IV'ün grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon-test) ile elde edilen p değerleri	105

Çizelge 39. Karaciğer dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleriyle ilgili değerlerin belirlenmesi ile ilgili istatistiksel analiz sonuçları (mg protein olarak)	118
Çizelge 40. Karaciğer dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleriyle ilgili referans değerlerin belirlenmesi ile ilgili istatistiksel analiz sonuçları (g karaciğer olarak)	121
Çizelge 41. Meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleriyle ilgili referans değerlerin belirlenmesi ile ilgili istatistiksel analiz sonuçları	123
Çizelge 42. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların karaciğerlerinde antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (mg protein olarak)	126
Çizelge 43. Grupların karaciğer dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri (mg protein olarak)	126
Çizelge 44. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların karaciğerlerinde antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (g karaciğer olarak)	130
Çizelge 45. Grupların karaciğer dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri (g karaciğer olarak)	131
Çizelge 46. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların meme antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (mg protein olarak)	135
Çizelge 47. Grupların meme dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri	136

ÖZET

Endosulfanın *Mus musculus* Kan, Karaciğer ve Meme Dokusu Üzerine Etkisi

Son yıllarda Türkiye'de ve özellikle Çukurova bölgesinde meme kanseri insidansının artışı ile bölgemizde çok yaygın olarak kullanılan endosulfan arasında bir bağlantı olabileceği düşünüldüğünden, anaç *Mus musculus*'un kan, karaciğer ve meme dokularında endosulfanın hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik etkileri araştırılmıştır. Araştırmamızda Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) alınan 23-40 g ağırlığında 60 adet (30 kontrol, 30 deneysel) anaç *M. musculus* kullanılmıştır. Endosulfanın *M. musculus*'un kan, karaciğer ve meme dokusu üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi için hematolojik verilerin, eritrosit, karaciğer ve meme antioksidan sistemlerin, laktik dehidrogenaz (LDH) ve malondialdehit (MDA) düzeylerin referans değerleri saptanmıştır. Deneysel gruba endosulfan (0.24 mg/100g vücut ağırlığı/gün) 90 gün (kısa dönem) ve 180 gün (uzun dönem) oral yolla uygulanmıştır. Endosulfanın hem kısa hem de uzun dönemde vücut ve meme ağırlıklarını etkilemediği, karaciğer ağırlığını ve hepato/somato indeksini arttırdığı, lökositöz ve anemiye neden olduğu saptanmıştır. Endosulfan eritrosit ve karaciğer dokusundaki antioksidan sistemlerini, LDH aktivitelerini ve MDA düzeylerinin belirgin şekilde etkilerken, meme dokusu verilerini etkilemediği görülmüştür. Karaciğer dokularının histopatolojik açıdan incelenmesinde, kısa dönemde ağır tahribat bulguları, uzun dönemde ise ağır tahribat bulgularının yanısıra hafif-orta derecede rejenerasyon bulguları saptanmıştır. Meme dokularının histopatolojik açıdan incelenmesinde ise hem kısa hem de uzun dönemde stroma'da infiltrasyon bulguları saptanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda endosulfanın kan, karaciğer ve meme dokusu üzerinde non-karsinojenik etkileri görülmüş, kısa dönemde doku düzeyinde oluşan hasarın geri dönüşümlü olduğu ve organizmanın uzun dönem toksisitesine uyum sağladığı saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Anaç *Mus musculus*, endosulfan, kan, karaciğer, meme dokusu

ABSTRACT

The Effect of Endosulfan on Blood, Liver and Breast Tissues of *Mus musculus*

In recent years in Turkey, especially in Çukurova Region, it has been suggested that there would be a relation between the increased incidence of breast cancer and widely use of endosulfan. For this purpose, the hematological, biochemical and histopathological effects of endosulfan on blood, liver, and breast tissues of mature *Mus musculus* are investigated. Sixty mature (30 control, 30 experimental) *M. musculus*, weighing between 23 and 40 g, were obtained from the Medical Experimental Surgery Research Center (MESRC) of Çukurova University. In the first part of our study, the reference ranges of malondialdehyde (MDA) levels, lactic dehydrogenase (LDH) activities, antioxidant systems and hematological parameters are established to interpret the effects of pesticides on these tissues. In the second part, the effects of oral administration of endosulfan (0.24 mg Per 100 g body weight) daily for 90 days (short term) and for 180 days (long term) are investigated. As a results, no effect on body and breast weights whereas leucocytosis, and anemia as well as a increase on liver weight and hepato/somato index are observed in neither short nor long terms. Although the antioxidant systems of erythrocyte and liver tissue, LDH activities and MDA levels were affected by endosulfan; breast tissue levels showed no significant changes. In the histopathological investigation of the liver tissues, the findings of severely damaged tissue in the short term and mild to moderate regeneration signs are observed in the long term. Infiltration to stroma is observed in the histopathological investigation of breast tissues in both short and long terms.

In conclusion, non-carcinogenic effects on blood, liver and breast tissues, reversible tissue damage in the short term and an adaptation to long term toxicity are observed.

Key words: Blood, breast tissue, endosulfan, liver, mature *Mus musculus*

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kimya endüstrisinin hızlı gelişimi sonucunda gerek günlük yaşantımızda, gerekse tarımda ve endüstride birçok kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler çağdaş yaşamın vazgeçilmez gereksinimleridir. Özellikle, tarımda kullanılan kimyasal maddeler (pestisitler) çok yaygın ve önemli çevresel kontaminantlar olarak dikkati çekmektedir^{1,2}.

Pestisitler, kullanılmaları ile gerek halk sağlığı ve gerekse açlıkta, savaşta besinlerin korunması bakımından ekonomik faydalar sağlamaktadır. Diğer yandan, pestisitlerin çeşitli nedenlerle gerek doğrudan maruz kalma veya kullanımları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosisteme zararları söz konusudur³. Ülkemizde besinlerin ne ölçüde pestisitlerce kirlendiği gereği kadar araştırılmamıştır. Pestisitlerin bitkisel ve hayvansal besinlerle insan dokularındaki kalıntı (rezüdü) yoğunluğunun belirlenmesi alınacak önlemler açısından zorunlu duruma geçmiştir.

Son günlerde çok güçlü çevresel kirlilik olarak nitelendirilen organik klorlu pestisitlerin lipofilik karaktere, yüksek biyolojik birikime ve östrojenik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle meme kanseri için "risk faktörü" teşkil ettiği düşünülmektedir^{2,4,5}. Organik klorlu pestisitler tümörejenik etkilerini dioksinlere benzer bir mekanizma ile gerçekleştirebilmektedir. Tümörejenik etkide pestisitler arilhidrokarbon (Ah) benzeri bir reseptöre bağlanmasıyla sinyal iletimin kompleks işlevleri hızlanmakta ve hücre farklılaşması ve büyümesi üzerine pleiotropik etkiler oluşmaktadır. Bu şekilde meydana gelen hücresel sinyal iletimindeki düzensizlikler dokularda pestisit rezüdülerinin birikimine neden olmaktadır⁶. Pestisitler herhangi bir yolla (oral, deri ve inhalasyon) vücuda alındıktan sonra sistemik sirkülasyona geçmeden önce hepatik sitokrom P₄₅₀ (Cyt P₄₅₀) monooksijenaz sistemi ile metabolize olmaktadır. Metabolitler glutatyon-S-transferaz (GST) ya da glukuronidasyon sistemleri ile detoksifike edilir. Alternatif olarak, reaktif metabolit protein, DNA gibi önemli doku makromolekülleri ile "adductları" oluşturabilir. Bu şekilde kovalent bağlanma toksisite, karsinojenite, mutajenite ve teratojeniteye neden olmaktadır⁷.

Pestisit metabolizması esnasında oluşan serbest radikaller hücre içerisinde bulunan antioksidan sistemlerle yok edilerek hücredeki oksidatif hasarın önlenmesi sağlanmaktadır. Hücre içerisinde bulunan antioksidan sistemler glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), GST ve redükte glutatyon (GSH)'dur⁸.

Organik klorlu maddelerin siklodien grubunda yer alan endosulfan, 60 türlü yiyecek ve yiyecek olmayan ürünlere zarar veren 100'den fazla zararlı tarım böceğinin kontrolünde kullanıldığından önemli bir çevresel kontaminant olarak dikkati çekmektedir. Endosulfan özellikle tütün, pamuk gibi yiyecek olmayan ürünlerde ve sebze, meyva, mısır, tahıl, kahve, patates, çay gibi yiyeceklerde; lepidoptera, homoptera, heteroptera, thysanoptera, diptera ve bazı akarisitler gibi zararlı tarım böceklerine karşı kullanılmaktadır⁹.

Bugün Çukurova yöresinde toksisite delilleri, yaygın kullanımı ve kullanılma kriterleri en fazla pestisit olan endosulfanın (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) birinci aşamada; *Mus musculus* vücut, karaciğer, meme ağırlıklarına etkilerini, ikinci aşamada; hematolojik verilere etkilerini, üçüncü aşamada; kan, karaciğer ve meme dokusu antioksidan sistemlere, LDH ve GST aktivitelerine etkilerini, dördüncü aşamada; karaciğer ve meme dokusundaki histopatolojik değişimleri ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

Dünya nüfusu, çok hızlı ve kontrolsüz bir şekilde artmaktadır. Buna rağmen bu artışı karşılayacak oranda ürün sağlanamamakta ve gıda ihtiyacı giderek artmaktadır. Bu sorunun giderilmesi, birim alanda verimi ve kalitesi yüksek ürünler elde edilebilecek, maliyeti oldukça düşük, en önemlisi de çevre kirliliğine neden olmayacak önlemlerin alınması ile mümkündür. Bugün yurdumuzda ve dünyada ürün artışını sağlayabilmek için çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" adı verilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanılmasıyla gerçekten de ürün miktarında artışlar gözlenmektedir. Ancak bu tarım ilaçları suda, toprakta, meyva ve sebzeler üzerinde uzun süre bozulmadan kalarak çevre kirliliğine neden olmakta ve dolayısıyla besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilen çeşitli zararlar oluşturmaktadır¹⁰.

2.1.1. Pestisitlerin Tarihçesi

Bugün kullanılan pestisitlerden bazılarının ilk kullanılışı yüzyıllar öncesine kadar dayanmaktadır. Örneğin kükürtün, fungusit ve insektisit özelliğine sahip olması 3000 yıl öncesinde bilinmekteydi. DDT [2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane] Amerikada ilk kez 1943'de antimalaryal kampanya sırasında pestisit olarak insanlığın hizmetine girmiştir^{2,4,5,6}. Bu tarihten itibaren diğer pestisitler peşpeşe bulunmuş ve pestisit sanayindeki yerlerini almışlardır. DDT ile ilgili ilk yayınlar 1945 de DDT'nin hayvan sütünde saptandığı, 1948 ve 1951'de insan adipoz dokusunda ve meme sütünde saptandığı bildirilmiştir^{11,12}. Sıçanlarda ve farelerde DDT'nin karaciğer, lenf ve akciğer kanserine neden olduğu gösterilmiştir¹³. 1993-1995 yıllarında yapılan çalışmalar DDT'nin meme kanser riskini arttırdığı yönündedir^{2,4,5,6,14}. DDT ve izomerleri östrojenik aktiviteye sahip olduklarından insan östrojen reseptörüne bağlanma yeteneğine sahiptir^{2,4,5,6,13,14}. Görülüyor ki, pestisit sanayi dünyaya kapısını DDT ile açmıştır.

2.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitlerin sınıflandırılması çok farklı şekillerde yapılmaktadır³. Bunlar;

I. Hedef alınan organizmaya göre gruplandırma

- a. Akarisitler (akarları öldüren pestisitler)
- b. İnsektisitler (böcekleri öldüren pestisitler)
- c. Nematisitler (nematotları öldüren pestisitler)
- d. Rodentisitler (fare gibi kemirgenleri öldüren pestisitler)
- e. Fungusitler (bitki üzerindeki mantarları öldüren pestisitler)
- f. Herbisitler (yabancı otları öldüren pestisitler)

II. Kullanma şekillerine göre gruplandırma

- a. Gaz
- b. Toz
- c. Püskürtme

III. Etkili maddelerine göre gruplandırma

- a. İnorganik maddeler
- b. Doğal organik maddeler
 - Bitkisel maddeler
 - Petrol yağları
- c. Sentetik organik maddeler
 - Organik fosforlu maddeler
 - Organik klorlu maddeler
 - Diğer sentetik organik maddeler

2.1.3. Pestisitlerin Çevreye Etkileri

Pestisitler çevreye; atmosfer, su, toprak ve pestisitlerin yapımı ya da geniş sahada kullanımı sonucunda bulaşmaktadır¹⁵. Miles ve Harris'e göre su içerisinde istenmeyen bazı aquatik bitkilere ya da böceklere karşı pestisitlerin doğrudan suya uygulanması, pestisitli bitkilerden toprağa, toprak altı sularına, dolayısıyla su ekosistemine karışması yada pestisitle bulaşmış atmosfer içindeki partiküllerin yağmur suları ile taşınması sonucu suların pestisitle bulaşmasına neden olmaktadır¹⁶. Pestisitler doğrudan toprak yüzeyine ve

içine, bitki üzerine veya tohum ilaçlaması şeklinde tohumluk üzerine uygulanmaktadır. Bitki yüzeyine atılan pestisitlerin önemli bir kısmı toprağa düşmekte ve toprağa düşen pestisitler toprak tipine, çözünürlüğüne, kalıcılık ve iklim faktörlerine bağlı olarak toprak içinde zamanla hareket edebilmektedir¹⁷. Yapılan araştırmalar sonucu bazı organik klorlu pestisitlerin toprağa tatbik edilmesi halinde %50'den fazlasının 15-16 yıl toprakta kalabileceği tesbit edilmiştir¹⁷. Hayvansal kaynaklı besinler, özellikle organik klorlu pestisitlerin birer rezüdü kaynağıdır. Yapılan araştırmalar hayvansal besinlerin daha yüksek oranda pestisit rezüdü taşıdığını göstermektedir. Pestisitler hayvanların dokularında pestisit cinsine ve konsantrasyonuna bağlı olarak birikmektedir¹⁸. Son zamanlarda pestisitlerin ev içi ve civarı çevrede el altında bulundurulması yaygınlaştığında (hamamböceği ve karınca ve farelere karşı) bulaşma söz konusu olmaktadır¹⁵.

2.1.4. Pestisitlerin İnsanlara Etkileri

Bir takım canlı organizmaları hedef olarak geliştirilen tarımsal savaş ilaçları insanları da etkisi altında bırakmaktadır. İnsanlarda zehirlenmeler, ilaçların vücutta deri, solunum veya sindirim organı yolu ile girmesi sonucu meydana gelmektedir. Özellikle DDT, BHC, Endrin, Aldrin ve Heptaklor gibi uzun süre kalıcılığı ve vücutta birikme özelliği olan organik klorlular düşük dozda da olsa kronik zehirlenmelere de neden olmaktadır¹⁹.

Pestisitlerin kullanımı ile kanser insidansı arasında bir korelasyon saptanmıştır^{20,21}. Tarım işçilerinde kanser insidansı genellikle düşüktür. Bununla birlikte son yıllarda tarım işçilerinde spesifik kanser tiplerinin riski artmaktadır. Bu spesifik kanser tipleri lösemi, Hodkin's hastalığı, non-Hodkin's lenfoma, multiple myeloma ve dudak, mide, prostat, beyin ve meme kanserleridir. Pestisitlerin karsinojenik etkilerini araştırmak için sıçan diyetine karışım halinde 19 organik fosforlu pestisit ve 1 organik klorlu pestisit karıştırılarak 8 hafta verilmiştir. Bu şekilde oluşturulmak istenen karaciğer modelinde pestisitlerin, daha önceden dietilnitrozamin tarafından oluşturulan preneoplastik lezyonların alanını ve sayısını arttırdığı bildirilmiştir²². Bazı pestisitlerin lökosit örneklerinde "DNA adduct'ları"nın oluşumunu arttırdığı saptanmıştır²³. Yaygın olarak kullanılan 15 pestisit (ditiyokarbamat, methidation, paration-metil, paration, vinklozolin, fenarimol v.b) karaciğer ksenobiyotik enzim sistemine ve oksidatif hasarın bir indeksi olan karaciğer DNA' sında 8-hidroksi-2-guanozin (8-OH-2-guanozin)

seviyesine etkileri araştırılmıştır²⁴. Söz konusu pestisitler 10 gün sıçana verildikten sonra düşük dozlarda pestisit karışımı serbest DNA hasarına neden olurken yüksek dozlarda oksidatif hasarın detaylı ekspresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.

PCB'ler, klorlu dibenzo-p-dioksinler, endosulfan, aldikarb, karbaril, karbofuran, malation, atrazin ve 2,4-D gibi pestisitler ve ağır metaller güçlü immunotoksik etki göstermektedir. Söz konusu maddeler otoimmün reaksiyon riskini artırarak allerjik reaksiyonlarda artışa neden olmaktadır^{13,25}.

Benomyl, DDT, endosulfan, karbin, dinoseb, lindan, malation ve zineb gibi pestisitler tarım işçilerinde rastlanan kontakt allerjik dermatitine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra kontakt foto-allerjik dermatit foto-toksik pestisitlerle oluşmaktadır. Bu pestisitler anilin, ditiyokarbamatlar, triazinler, organik klorlular ve üre bileşikleri foto-kontakt dermatite neden olmaktadır. Dermal etkide, hidrofilik ve lipofilik pestisitler farklı moleküller mekanizma ile stratum korneum'dan diffüz olmaktadır. Lipofilik moleküller lipit matriksin protein filamentleri arasında geçerken hidrofilik moleküller intraselüler alanların sulu kısmına geçmektedir. Lipofilik maddelerin stratum korneum'a diffüz olması için gerekli aktivasyon enerjisi düşüktür¹³.

Pestisitlerin teratojenik ve mutajenik etkilere sahip oldukları saptanmıştır¹³. Teratojenik etkinin oluşmasında doz ve stresin varlığı önemli etkindir. Teratojenik etkiye sahip pestisitler 2,4,5-T ve 2,4-D herbisitler, organik fosforlular, kaptan, folpat, difolatan'dır. Mutajenik etkiye sahip pestisitler (diazinon, ziram v.b) kromozomal bozukluk sıklığının artmasına neden olmuştur. Ayrıca pestisitler K vitamin eksikliğine, protrombin konsantrasyonunun düşmesine ve protrombin zamanında uzamaya neden olmaktadır¹³. Çizelge 1'de pestisitlerin kronik etkilerinin özeti verilmiştir.

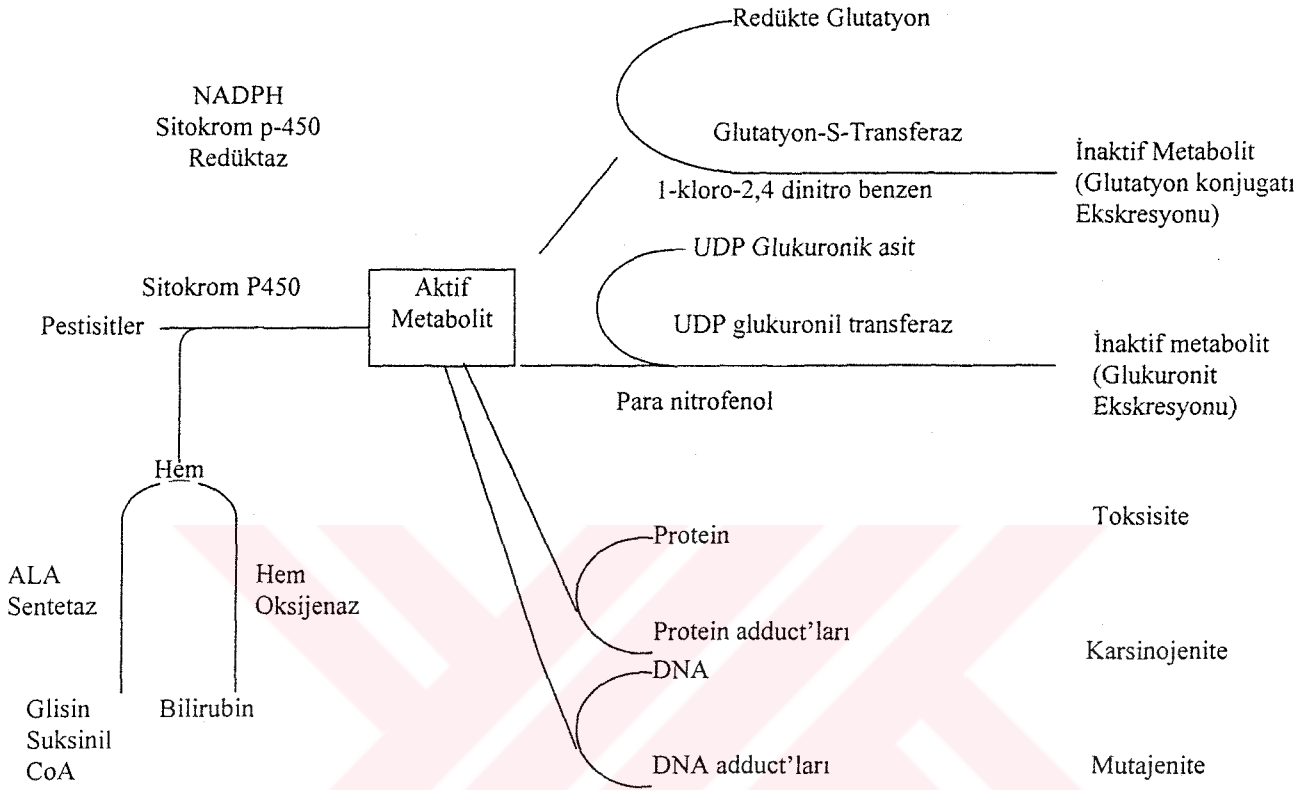
Çizelge 1. Pestisitlerin kronik etkileri¹³

Organ/ sistem	Etki
Sinir sistem	Vejetatif sendrom, polinöropati, radikülopati, ensefalopati, retrobulbernevrit, distoni ve retinal anjiyopati
Solunum sistem	Kronik trakeit, pneumofibroz başlangıcı, akciğer anfiyem, bronşial astım
Kardiyovasküler sistem	Kronik toksik miyokard, kronik koroner yetmezlik, hipertoni ve hipotoni
Karaciğer	Kronik hepatit, kolesistit, hepatokolesistit, detoksifikasyon ve diğer fonksiyonlarda bozulma
Böbrekler	Albuminüri, noktüri, üre ve kreatinin artışı, salgı fonksiyonunda azalma ve düşük klerens
Gastrointestinal sistem	Kronik gastrit, duodinit, ülser, kronik kolit (hemorajik, spastik ve polipoit oluşumlar), hipersekresyon ve hipoasitide
Dolaşım sistemi ve kan	Lökopeni, retikülositlerde artma, lenfositler, eosinopeni, lenfopeni, monositoz ve hemoglobinde değişimler
Deri	Dermatit, egzama
Gözler	Konjuktivit, blefarit

2.1.5. Pestisitlerin Biyotransformasyonu

Pestisitler de diğer ksenobiyotikler gibi vücutta bir takım enzimatik olaylara katılmaktadır⁷. Enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre 4 ana grupta toplanırlar. Bunlar; oksidasyon, redüksiyon, kopma ve konjugasyondur. Bunlardan ilk üçü faz I aşaması iken, konjugasyon faz II aşaması'dır. Pestisitler, faz I aşamasında karaciğerde Cyt P₄₅₀ monooksijenazlar tarafından oksidasyona uğrayarak biyolojik yarı ömrü kısa olan polar bileşiklere dönüşmektedir. Faz II aşamasında ise değişime uğrayan pestisitler sudaki polariteleri yüksek olan glukuronik asitle yada GSH ile konjuge edilmektedir. Pestisit biyotransformasyonu sonucunda biyoaktivasyona uğrayan pestisit metabolitleri doku makromoleküllerine (DNA, protein) kovalent olarak bağlanarak biyolojik yarı ömürlerini artırırlar. Pestisit metabolitlerinin DNA gibi önemli hücrel makromoleküle ya da nörolojik

önemi olan esterazlara bağlanmasıyla onkojenik ya da nörotoksik anormallikleri hızlandırmaktadır. Şekil 1'de pestisitlerin biyotransformasyonu ve biyotransformasyonda yer alan enzimler gösterilmiştir.



Şekil 1. Pestisitlerin biyotransformasyonu ve biyotransformasyonda yer alan enzimler⁷

Pestisit toksikolojisinde biyotransformasyonun önemini artıran üç önemli enzim yer almaktadır⁷ (Şekil 1). Bunlar;

1. Sitokrom P₄₅₀ : Birçok memelilerde ve böceklerde bulunan hemaprotein ailesidir. Hepatositlerde özellikle santrlobüler bölgedeki hücrelerde yoğun bulunmaktadır. Cyt P₄₅₀ enzimi ilaç ve kimyasal maddelerin (pestisit, PAH v.b.) biyotransformasyonunda rol oynamakta ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde önemli bir kaynak oluşturması ile dikkat çekmektedir. Bir çok pestisit sınıfları PCB'ler ve siklodienler (DDT, aldrin/dieldrin, klordan, toksafen, heptaklor, lindan, endosulfan ve mireks) Cyt P₄₅₀'yi indüklemektedir.

2. Glutasyon-S-transferaz: Sitotoksik ve karsinojenik ajanlara karşı hücreyi korumada önemli rol oynayan izoenzimlerin bir ailesidir. Pestisit metabolitleri, GSH ile konjuge

edilerek inaktif hale getirilmektedir. Pestisitler GST enziminin üç izoenzimine bağlanma yeteneğinde olup daha çok μ (mü) izoenzimine affiniteleri yüksektir.

3. UDP-glukuronil transferaz: Glukuronik asitle konjugasyonda, glukoranat dönörü üridindifosfat (UDP) glukuronik asittir. Reaksiyon UDP-glukuronil transferaz enzimi tarafından kataliz edilir. Enzim ilaçlar, bilirubin, steroid hormonlar, v.b. gibi maddelerin glukuronik asitle konjugasyonunda rol almaktadır.

2.1.6. Sentetik Organik Maddeler

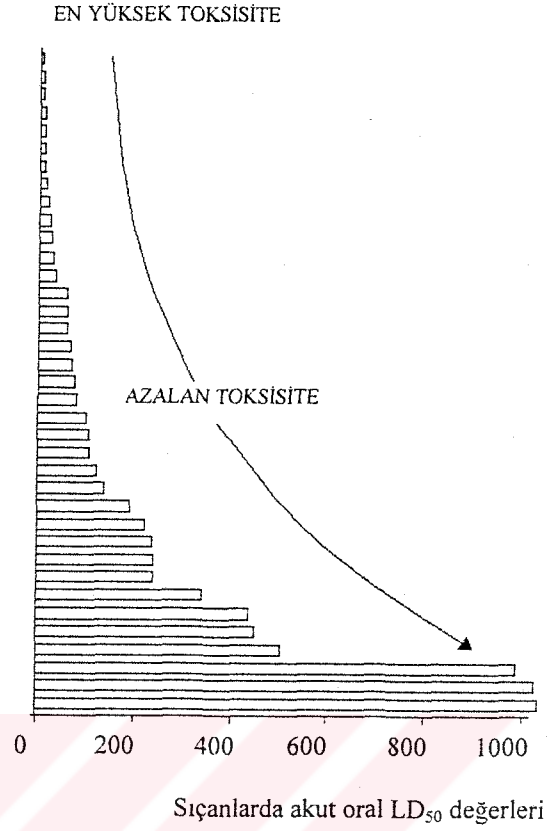
Bu grup maddeler biyolojik sistem içerisinde oldukça toksik etkilere sahiptir¹³. Özellikle geniş kullanım alanlarına sahip olan organik fosforlu ve organik klorlu maddeler insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır.

2.1.6.1. Organik Fosforlu Maddeler

Fosfor içeren pestisitler olup, II. Dünya savaşının sonundan beri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sınıf pestisitler insektisit, fungusit ve herbisit aktiviteleri göstermekte fakat daha çok insektisit olarak kullanılmaktadır. Organik fosforlu pestisitler vücuda alındığında primer olarak kolinesteraz ve pseudokolinesteraz aktivitelerini inhibe eder. Bu nedenle, bu sınıf pestisitler kolinesteraz inhibitörleri olarak bilinir¹³. Bu sınıf pestisitler içinde azinfos-etil, azinfos-metil, bromofos, diazinon, fenthion, malation, paration, metil-paration, mefosfolan, methidation, evinfos, foksım, pirimifos-metil, fenitrotrion, diptereks, delnav, fosdrin, gusation, dimetoat, abat, gusation, TEPP (tetraetil pirofosfat) ve klortion gibi pestisitler bulunmaktadır¹. Son çalışmalarda malationun genotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir²⁶. Organik fosforlu pestisitler diğer pestisitlere nazaran daha öldürücü etkilere sahiptir¹. Şekil 2'de bazı organik fosforlu ve karbamath pestisitlerin sıçanlardaki toksisite düzeyleri gösterilmiştir.

Karbamatlar Organik Fosforlular

TEMİK	TİMET, FORAT
FURADAN	TEPP VE DASANİT
LANAT	SİSTOKS, DEMETON
KARZOL	DİSYTON
BAYGON	E. PARATION
VAMAP	FOSDRİN
SEVIN	GUTION
	KO-RAL
	KO-RAL
	AZODRİN
	BİDRİN
	FOSFAMİDON
	TRİTİON
	EPN
	DELNAV
	VAPON, DDVP
	ETİON
	META SİSTOKS R
	DİAZİNON
	DURSBAN
	BAYTEKS, ENTEKS
	DEF
	SİGON, DİMETOAT
	İMİDAN
	DİBROM, NALED
	DİLOKS, DİFREKS
	MALATION
	RONEL, KORLAN
	GARDAN



Şekil 2. Bazı organik fosforlu ve karbamatlı pestisitlerin toksisite düzeyleri¹³.

2.1.6.2. Organik Klorlu Maddeler

Bu sınıf pestisitler halk sağlığında ve ziraatte yaygın olarak kullanılmaktadır. Organik klorlu pestisitler fungusit, insektisit, akarisit ve rodentisit olarak kullanılır. Ayrıca, malarya gibi halk sağlığını tehdit eden parazitik hastalıkları yok etmek için de kullanılır^{13,27}. Bu tip pestisitlerin çevrede devamlı kullanılması bugün gelişmiş olan ülkelerde sınırlandırılmıştır²⁸. Toksafen, heptaklor, endosulfan, γ -HCH (heksaklorohekzan), DDT, PCB (Poliklorinlibifeniller), metoksiklor, kelthan, mireks, diflubenzuran, lindan, endrin, dieldrin, aldrin ve klordan gibi pestisitler organik klorlu maddelerdir¹. Çizelge 2'de bazı organik klorlu pestisitlerin sıçanlardaki letal dozları (LD₅₀) gösterilmiştir¹³.

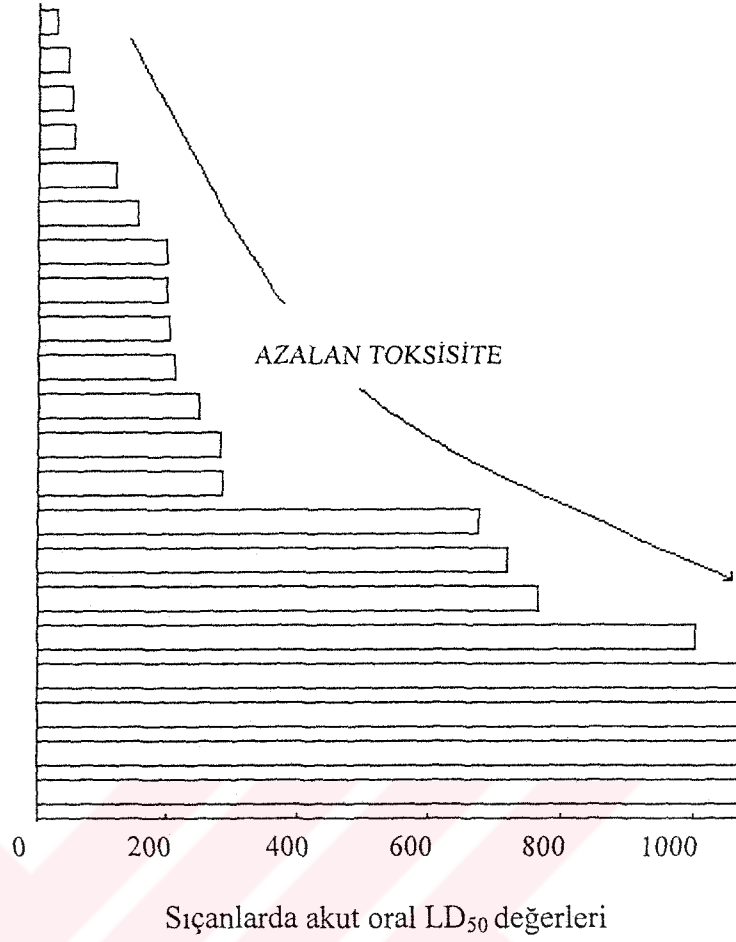
Çizelge 2. Bazı pestisitlerin sıçanlardaki LD₅₀ değerleri¹³

Pestisit	LD ₅₀ mg/kg	LD ₅₀ mg/kg
	oral	dermal
Aldrin	38-67	98-200
Endrin	7-18	15-18
Klordan	335-430	690-840
Endosulfan	30	359
Heptaklor	50-150	120-320
DDT	250	250-500
Kelthan	809	
Metoksiklor	600-809	
Klorobenzilat	960	
Lindan	88-225	900-1000
Klorlanmış Terpenler	225	
Toksafen	45-400	

Bu sınıf pestisitler lipofilik karakter göstermekte ve rezüdüleri vücutta lipitce zengin bölgelerde depolanmaktadır^{2,4,5,12,13,14}. Organik klorlu pestisitler karaciğer ve böbrek hasarına neden olmakta, alkalen fosfataz ve aldolaz aktivitesini arttırmakta ve karaciğerde detoksifikasyon, lipit ve protein sentezini etkilemektedir¹³. Endosulfan ve metaboliti endosulfan sulfat'ın farelerde LDH, G6PDH ve alkalen fosfataz aktivitelerini etkilediği bildirilmiştir²⁹. DDT, HCB (heksaklorobenzen), endosulfan, toksafen, lindan gibi pestisitler karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminin güçlü indükleyicileridir⁷. Bu indükleyiciler spesifik genleri aktive ederek enzim seviyelerini arttırabilmektedir. Bu sınıf pestisitler direk Cyt P₄₅₀ sistemini etkilemekte ve meme kanserinin sitümülasyonunda önemli rol oynamaktadır^{2,4,5,6}. Bu sınıf pestisitlerin teratojenik ve karsinojenik etkileri olduğu bildirilmiştir¹³. Şekil 3'te bazı organik klorlu pestisitlerin sıçanlardaki toksisite düzeyleri gösterilmiştir.

Organik Klorlüler :

ENDRİN
ALDRİN
ENDOSULFAN
DİELDRİN
TOKSAFEN
LİNDAN
HEPTAKLOR
D - D
ETİLEN DİBRAMİD
NEMAGON
SİTROBAN
KLORDAN
TELON
KELTHAN
ETİLENDİKLORİD
AKARABEN
PARADİKLOROBENZEN
PCNB
PERTHAN
METOKSİKLOR
TEDİON



Şekil 3. Bazı organik klorlu pestisitlerin toksisite düzeyleri¹³

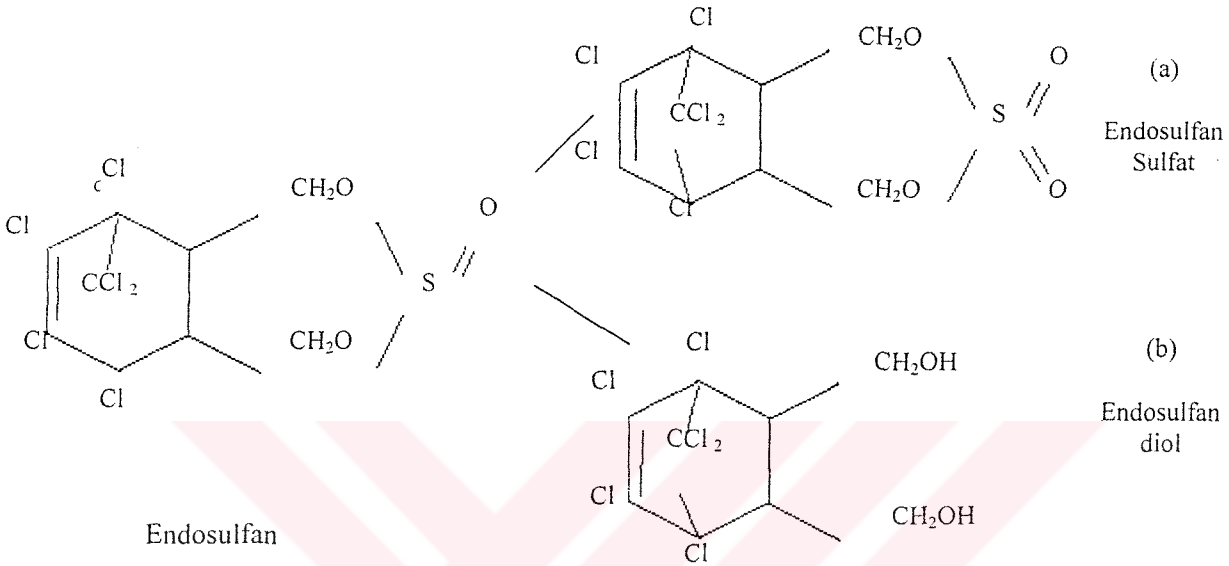
2.1.6.2.1 Endosulfan

Organik klorlu siklodien grubunda geniş yer tutan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) endosulfan Merkezi Sinir Sistem (MSS) zehiridir. 1986'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından "orta derecede tehlikeli" teknik ürünler kategorisinde sınıflandırılmıştır. Endosulfan aslında siklodien olmayıp siklik sülfittir. Krem renginde ve kristal halinde bulunan endosulfan suda erimez (50-150 ppb) fakat birçok organik çözücülerde erimektedir. Suda erimediği için sistemik özellikleri yoktur. Asit ve bazlarla hidroliz edilir, etkilenme internal esterde başlamaktadır. Solüsyon halinde yanıcı değildir. Saf endosulfan α (endosulfan I) ve β (endosulfan II) olmak üzere iki farklı konfigürasyonda bulunmaktadır. %94-96 saflıktaki endosulfan, yaklaşık 7:3 oranında α ve β izomerlerinden oluşmuştur. Endosulfan I ve II'nin 20°C'de sudaki çözünürlüğü 260 ve 100 ppb (milyarda bir)'dir^{9,27}.

1-Endosulfan sulfat: Bu metabolit, bitki üzerine bırakılan endosulfanın oksidasyonu ile oluşur. Bu madde yüksek organizmalı canlılar için çok toksiktir.

2-Endosulfan diol: Bu metabolit ise fungusların endosulfanı hidroliz etmesiyle oluşur.

Endosulfan ve metabolitlerinin kimyasal yapıları Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Endosulfan ve metabolitleri²⁷

Endosulfanın %35 formülasyonda, "Thiodan^R" marka ismiyle kaydı, insektisit olarak tanımlanması ve geliştirilmesi 1954'te Almanya'da Farbwerke Hoechst tarafından yapılmıştır. Teknik cinsteki endosulfanın dünyadaki mevcut üretimi her yıl 10.000 ton civarındadır. Çevrede endosulfanın doğal oluşumu mevcut değildir. Su yüzeyinde 1 ppb ve toprakta 1 ppm'den az olduğu bildirilmiştir. Çevresel kontaminasyon spray yada imalat ile olmaktadır. Endosulfanın çevreye ana yayılımı, buharlaşma ve endosulfan sulfata oksidasyon yollarıyla olmaktadır. Endosulfanın yarılanma süresi toprakta birkaç ay ile 2 yıl arasında suda 1-6 ay arasında değişmektedir; Yarılanma süresini iklimsel, pH ve anaerobik şartlar etkilemektedir. Endosulfan suda endosulfan diol'a, toprakta endosulfan sulfat'a yıkılmaktadır^{9,27}.

2.1.6.2.1.1. Endosulfanın Biyolojik Birikimi

Endosulfan hem insanlarda hem de hayvanlarda inhalasyon, oral ve deri yoluyla alındıktan sonra absorbe olmaktadır. Ely et al. 1973'te yapmış oldukları 9 bildiride de endosulfana maruz kalındığı zaman nörolojik etkilerin ortaya çıktığını tartışmışlardır³⁰. Endosulfanın hemen hepsi oral yolla vücuda alındıktan hemen sonra hızla metabolize edilerek birkaç gün veya birkaç hafta içinde idrarla ya da feçesle atılmaktadır. Endosulfanın solunum ve deri yoluyla vücuda girdikten sonra eliminasyon kinetiği konusundaki bilgiler azdır. Vücutta kaldığı kısa sürede birkaç toksik etkileri gözlenmiştir. Endosulfanın biyolojik birikimi kolay kolay olmamasına rağmen tüm deniz hayvanlarında ve tatlı su hayvanından sadece kerevisde biyolojik birikimine rastlanılmıştır⁹.

2.1.6.2.1.2. Endosulfanın Toksisitesi

Birkaç çalışma endosulfanın akut etkisinden ziyade kronik etkisi olduğu yönündedir. Bu nedenle endosulfanın birçok ülkelerde dikkatli bir şekilde kullanılması sağlanmıştır²⁸. Çünkü çiftlik hayvanlarına ve balıklara çok toksik etkisi vardır. Endosulfanın laboratuvar şartları altında kuşlara toksitesi yüksek iken doğal çevrede toksitesi yüksek değildir. Endosulfanın toksik etkisi aquatik omurgasızlarda balıklara nazaran daha azdır. Endosulfan toksik etkisi ortam ısısının artmasıyla artar. Deniz organizmaları endosulfana tatlı su organizmalarından daha hassastır. Tatlı su balığı subletal dozda endosulfana maruz bırakıldığında karaciğer, kas, böbrek ve beyinde alkalik fosfataz aktivitesinin arttığı, letal dozda ise enzim aktivitesinde azalmalar olduğu gözlenmiştir. Oksijen tüketim oranındaki değişimler nörotoksiteyi göstermektedir. Endosulfan lipofilik metabolitlerin mitokondri membranındaki lipid tabakasına bağlanmasıyla mitokondrial fonksiyonların bozulduğu bu nedenle, endosulfanın böceklerde vücut ısısını ve solunumu arttırdığı düşünülmektedir. Endosulfan toksisitesi memelilerde daha azdır. Köpeklerde kronik toksisitede ciddi bir problem olmamakla birlikte, endosulfanla akut etkilenme söz konusudur⁹.

Endosulfanın toksik etkileri ;

Nörotoksosite: Endosulfanın uzun süreli inhalasyon ya da oral alınımında primer etki nörotoksitedir. Endosulfana maruz kalan işçilerde epilepsi, hiperaktivite, aşırı

uyarılma, titreme, katılma ve felç görülmüştür. Bununla birlikte, MSS' deki etkiler deney hayvanlarında akut dozlarda ortaya çıkmaktadır. Erkek sıçanların dişi sıçanlara nazaran endosulfana hassas olduğu, beyin ve plazma asetilkolin esteraz aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir⁹.

Renal toksisite: Sıçanlarda endosulfanın kronik enjeksiyonu renal histopatolojik değişimlere, nefrotoksiteye ve çok hassas erkek sıçanlarda ölüm oranının artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Endosulfan sıçan böbreğinde proksimal tübülde ve tübüler epitelyumda değişimlere ve karışık fonksiyonlu oksidaz enzim sisteminin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir⁹.

Hepatoksisite: Akut dozda oral alınan endosulfan karaciğer ağırlığını arttırmaktadır. Bir çok karaciğer çalışmalarında mikrozomal enzimlerin indüksiyonu ve histopatolojik değişimler gözlenmiştir. 100 mg oral alımdan sonra sıçan karaciğer histopatolojisinde eosonofilik sitoplazmalı hidrofobik hücreler görülmüştür. Sıçanlarda diyetsel endosulfanın 13 hafta alınımından sonra hepatik etkilerin 4 haftalık periyottan sonra reversible olduğu bildirilmiştir. Sıçan karaciğerinde glikojen seviyesinde düşmeler gözlenmiştir⁹.

Hematolojik toksisite: İnsanlarda endosulfanın oral alınımının hematolojik etkisi olduğuna dair literatür mevcut değildir. Endosulfan eritrosit sayısında, hemoglobin miktarında, ortalama eritrosit hacminde ve eritrosit GR aktivitesinde önemli derecede azalmalara neden olduğu bildirilmiştir⁹.

Solunum sistem toksisitesi: Endosulfanın genel toksitesinin sonucu akciğer enfeksiyonudur. Sıçan akciğerinde akut anfiyem, yanma, ve nefes darlığı gözlenmiş olup, bu nedenlerden dolayı bazı farelerin öldüğü bildirilmiştir⁹.

Biyokimyasal : Sıçanlarda endosulfan'ın G6PDH aktivitesini, kan glukozunu ve mikrozomal ve surfaktan sistemin fosfolipid içeriğini arttırdığı, alkol dehidrogenaz ve sitozolik GST aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, intestinal epitelyumda Na-K ATPaz ve Mg ATPaz, plazma kalsiyum, alkalin fosfataz aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir^{9,31}.

İmmünolojik toksisite: İnsanlarda endosulfanın oral, inhalasyon yada dermal alınımında immünolojik etkisi olduğuna dair hiç bir çalışma yoktur. Bununla birlikte, hayvanlarda hümmoral ve hüccresel immün yanıtta bozulmalar gözlenmiş olup, Tetanus

toksin, IgG, IgM ve gama globulin seviyelerinde önemli derecede düşüşler olduğu bildirilmiştir⁹.

Üreme sistemine toksisitesi: Endosulfanın inhalasyon, oral yada dermal endosulfan alımlarının insan üreme sistemine etkisi olduğuna dair literatür mevcut değildir. Testosteron üretiminde hız kısıtlayıcı enzimlerin (3 β ve 17 β hidroksisteroid transferaz) indüksiyonuna, üreme organlarında histolojik değişimlere, testiküller atrofi ve yumurtalık kisti oluşumuna neden olmaktadır. Sekonder seks organlarının ağırlığında azalmalar olduğu bildirilmiştir⁹.

Karsinojenik etkileri: Endosulfan herhangi bir yolla vücuda alındığında insanda ve laboratuvar hayvanlarında karsinojenik toksisitesi olduğuna dair bilgi mevcut değildir. Endosulfanın hem dişi farelerde hem dişi sıçanlarda non-karsinojenik olduğu, her iki türün erkeklerinde yüksek mortalite olduğu bildirilmiştir. Test hayvanlarındaki mortalitenin yüksekliğinin endosulfanın güçlü karsinojenik olduğu yorumunu yapmak çok zordur. %96'lık saf endosulfanı (α ve β izomeri karışık) dişi sıçan ve dişi farelere 18 ay süreyle verildiğinde farelerde hepatoselüler tümör geliştiği, dişi sıçanlarda ise gelişmediği bildirilmiştir^{9,13}.

Genotoksik ve mutajenik etkileri: İnsanlarda endosulfanın herhangi bir maruziyetinde genotoksik etkisi olduğuna dair literatür mevcut değildir. Hem pozitif hem negatif sonuçlar hayvan çalışmalarında elde edilmiştir. Bir çalışmada farelere 5 günde 6.4 mg/kg endosulfan dozunu 60 gün verdiklerinde kromozomal bozukluklarda artış olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, endosulfan spermatozoa hücrelerinde hasara neden olmaktadır. Farelerde dominant letal mutasyonlar ve anormal spermlerde artışlar olduğu bildirilmiştir. Farelerin endosulfana duyarlılığı sıçanlardan fazladır⁹.

Kardiovasküler toksisite: Gönüllü kontrol olmayı kabul eden 20 yaşında bir erkeğe %30'luk endosulfan enjekte edildiğinde pneumonia, taşikardi atakları ve hipertansiyon geliştiği bildirilmiştir⁹.

2.1.6.2.1.3. Mortalite

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1984'te teknik endosulfanın letal dozunu (LD₅₀) hayvanların beslenme, cinsiyet, tür vb. durumlarına göre 7 ile 121 mg/kg olarak

belirlemiştir. Endosulfan toksitesi türler arasında ve genellikle MSS etkileri benzerdir. Erkek albino farelerde endosulfan (α ve β izomerleri 2:1 oranında) fındık yağı içinde LD₅₀ dozu 7.36 mg/kg'dır. Gupta ve ark. 7.36 mg/kg dozda hipoksi, titreme, v.b. septomları takiben ölüm gözlemiştir³². Endosulfanın BALB/c farelerde maksimum tolerans dozu 15 mg/kg olduğu, 20 mg/kg tek dozluk enjeksiyondan sonra hayvanların hepsinin öldüğü bildirilmiştir. Yumurta üretim süresi 6-14 gün boyunca günlük 5-10 mg endosulfan/kg verildiğinde maternal ölümlerde doza bağlı olarak artış olduğu bildirilmiştir. En yüksek mortalite oranı, 2 yıllık endosulfanla beslemede erkeklerde gözlenilmiş olup, dişi sıçan ve farelerde gözlenmemiştir⁹.

2.2. Serbest Radikaller (Reaktif Oksijen Türleri)

Radikal kelimesi Latince kök anlamına gelen "radix" den türetilmiştir. Modern terminolojide serbest radikal, bir yada çok sayıda eşleşmemiş elektronlar içeren moleküllerdir. Başka moleküllerle çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "reaktif oksijen türleri (ROT)" de denilmektedir. ROT'lar, eşleşmemiş elektron nedeniyle kararsız yapıda olan moleküller oksijenin redüklenmesi ile oluşmaktadır^{8,33}.

2.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması

Organizmada pek çok türde ROT oluşabilmektedir. Ancak en sık olarak lipid yapılarda oluşmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıktığında lipid radikali meydana gelmektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini meydana getirmektedir. Lipit peroksit radikali diğer lipitlerle zincir reaksiyonunu başlatarak lipid peroksitleri oluşturmaktadır. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonlar lipid peroksidasyonlarını hızlandırır. Lipit radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilmektedir. ROT'lar, radikal olanlar, radikal olmayanlar ve singlet oksijen olmak üzere üç sınıfta incelenmektedir³³. Çizelge 3'te ROT'lar ve sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 3. Reaktif oksijen türleri ve sınıflandırılması³³

1- Radikaller:

Süperoksit radikal (O_2^-)

Hidroksil radikal (OH)

Alkoksil radikal (LO)

Peroksil radikal (LOO)

2- Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Lipit hidroperoksit (LOO)

Hipoklorik asit (HOCl)

3- Singlet oksijen

Hidrojen peroksit, membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahiptir fakat eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmamaktadır. Bu nedenle ROT, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir. Oksijen molekülü, orbitalinde çiftleşmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Genellikle süperoksit radikali, demir-sülfür merkezleri içeren proteinlerin enzimatik tepkimelerinde, bazı oksidaz ve hidroksilaz tepkimelerinde, çeşitli biyolojik moleküllerin otooksidasyonunda ve önemli ölçüde fagositoz sırasında üretilmektedir. ROT'un en aktifi radikal grubunda yer alan hidroksil radikalidir. İn vivo olarak hidroksil radikali, fenton tepkimesi ve iyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisiyle oluşmaktadır. Hidroksi radikalının triptofan, sistein, histidin ve triozin gibi amino asitlere daha çok bağlanma yeteneğinde olduğu bildirilmiştir³³. Diğer ROT grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet eşleşmemiş elektron taşımaktadır. Singlet oksijen hücre membranlarındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipit peroksidasyonların oluşumuna yol açmaktadır^{33,34}. Singlet oksijen genellikle süperoksit radikalının kendiliğinden dismutasyonu, Haber-Weiss tepkimesi ve süperoksit radikalının diaçil peroksit tepkimelerinde oluşmaktadır^{33,35}.

2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasında ROT'lar oluşabilmektedir. Çizelge 4'de ROT'ların in vivo ortamdaki kaynakları görülmektedir .

Çizelge 4. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları³³

I - Normal biyolojik işlemler

- 1-Oksijenli solunum
- 2- Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1- İskemi-hemoraji-travma-iyonize radyasyon- intoksikasyon (zehirlenme)
- 2- Ksenobiyotik maddelerin etkisi

- a-) İn hale edilenler
- b-) Alışkanlık yapan maddeler
- c-) İlaçlar (pestisitler, poliaromatik hidrokarbon (PAH)'lar)

3- Oksidan enzimler

- a-) Ksantin oksidaz
- b-) Indolamin dioksijenaz
- c-) Triptofan dioksijenaz
- d-) Galaktoz oksidaz
- e-) Siklooksijenaz
- f-) Lipooksijenaz
- g-) Monoamino oksidaz

4- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj,

eosinofil, endotelial hücreler)

6- Uzun süreli metabolik hastalıklar

7- Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

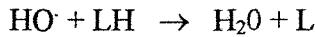
Nitrik oksit (NO) bir adet eşleşmemiş elektrona sahiptir ve bu nedenle ROT olarak kabul edilebilmektedir³³.

Oksidatif stres, ROT'ların varlığında gerçekleşmektedir. Yaşayan organizmada oksidatif stresin en önemli nedenleri iyonize radyasyon, 37°C'de normal metabolizma ve yabancı kimyasalların (pestisitler v.b.) metabolizmasıdır. Normal endojen bileşiklerin metabolizmasında her birim hücrede her gün 10^4 - 10^5 civarında oksidatif stres meydana gelmektedir³⁶.

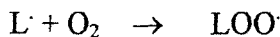
Organik klorlular (dieldrin), barbitüratlar ve metaller ROT'ların üretimini artırarak hedef organlarda oksidatif stresin indüksiyonunu sağlayarak non-genotoksik karsinojeniz oluşturabilmektedirler³⁷. Söz konusu pestisitler ve diğerleri doza bağlı olarak karaciğerde DNA sentezini artırarak oksidatif DNA hasarın göstergesi olan 8-OH-2-guanozinde ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitte (MDA) artma ve hücrel antioksidanlarda azalmaya neden olmuşlardır.

2.2.3. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonun göstergesi olup lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve karsinojen bir maddedir³⁸. Membranlardaki doymamış lipidlerin peroksidasyonu hücrelerin çok çeşitli fizyolojik ve toksikolojik olaylarını göstermektedir. Oksidatif streste SOD ve CAT enzimleri yetersiz kaldıklarında OH[•] radikalleri hücre ve organel membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatarak etkilerini göstermektedir³⁴. OH[•] radikalinin membranlardaki bir fosfolipit molekülünün poliansatüre yağ asit zincirinden bir hidrojen atomunu koparmasıyla lipid radikali oluşumu başlatır³⁴.



Lipit radikali moleküller oksijenle reaksiyona girerek lipid dioksil radikalini oluşturur.



Lipit dioksil radikali diğer poliansatüre yağ asit zincirinden bir hidrojen kopararak başka bir L radikalini oluşturur.



In vivo'da zincir tek bir OH[•] radikali ile başlayıp 10-15 zincir siklüs oluştuktan

sonra sonlanır. Bu zincir reaksiyonlarının etkisi ile 10-15 hidroperoksit molekülü birikir. Bu şekilde oluşan zincir reaksiyonu daha ileri peroksidasyonu başlatan ROT'lar için devamlı bir kaynak sağlar. Lipit peroksidasyonunu önlemek için oksidan etkiye sahip olan vitamin E, C, selenyum ve GSH canlıya diyetel olarak verilebilmektedir³⁸. Oksidatif stresin spesifik bir indeksi olarak kabul edilen MDA plazma, hemolizat, homojenat ve idrar örneklerinde kolaylıkla ölçülebilmektedir^{38,39,40}.

2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT'lar, aeroblar tarafından oksijen kullanımının bir sonucu olarak üretilirler ve hücrede makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonuna, lipit peroksidasyonuna, DNA hasarına ve sonunda hücrenin ölümüne neden olabilirler⁴¹. İyonize radyasyon ve ksenobiyotik metabolizması sonucu da oksidatif hasar oluşabilir. Fakat, hücre bu hasara karşı antioksidan sistemlerle korunur. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma sistemleri denilmektedir³³. Antioksidan sistemler tür, organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenmektedirler⁴². Antioksidan savunma sistemleri hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır³³. Ayrıca antioksidan savunma sistemleri hem enzimatik hemde non-enzimatiktir⁸. Son çalışmalar antioksidan savunma sistemlerinin iki şekilde de sınıflandırılabileceği yönündedir³³. Aşağıda antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılmaktadır.

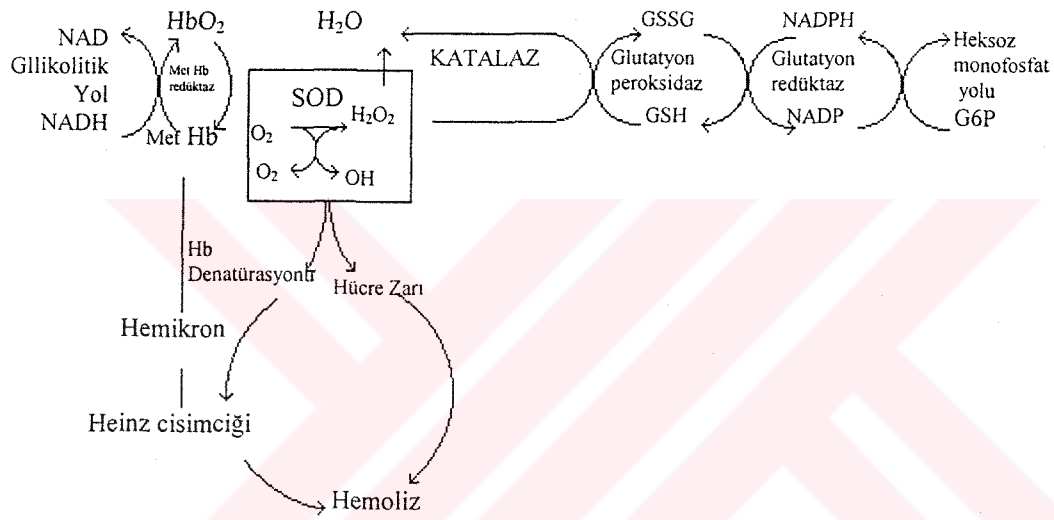
Memelilerde, balıklarda, vertebralarda enzimatik antioksidan sistemler G6PDH, GPX, GR, CAT, SOD ve GST enzimlerdir⁸.

2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistemler

2.3.1.1. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (E.C.1.1.1.49)

G6PDH enzimi, pentoz fosfat yolunun anahtar enzimidir. Enzim tarafından oluşturulan NADPH vasıtasıyla hücrelerde antioksidan sistemler, oksidatif strese karşı koruyucu etki yapmaktadır^{43,44,45}. G6PDH enzim eksikliği olan eritrositlerde ROT

arttığında hemoglobin methemoglobine dönüşür. Methemoglobinin oluşumu O_2 ve H_2O_2 oluşması için önemli bir kaynaktır. Eritrositlerdeki oksidan ajanlar GSH'ı okside eder, bu oluşan kompleks hemoglobinin disülfid bağlarıyla reaksiyona girdiğinde, globin zincirinin konfigürasyonu değişir ve disülfid formasyonu bozulur. Heinz cisimciği olarak çöker. membran sitoskeleton proteinlerine bağlanır. Hücre içindeki Heinz cisimciği, eritrosit deformabilitesini azaltır, membran bozulur ve hemoliz meydana gelir. G6PDH eksikliğinde hemolizin oluşması, eritrositteki enzim aktivitesine ve oksidatif strese bağlıdır^{43,45}. Şekil 5'de oksidatif streste G6PDH enziminin hücresel rolü gösterilmiştir.



Şekil 5. Oksidatif streste G6PDH enziminin hücresel rolü⁴⁵

G6PDH enzim aktivitesi spesifik dokularda hormonal, besinsel ve oksidatif strese bağlı olarak değişmektedir. Hepatik G6PDH enzimi besinsel ve hormonal faktörlerle regüle edilmektedir⁴³. G6PDH enzim aktivitesi diurnal varyasyonlar göstermektedir⁴⁵. Bu günlük değişimler enzimin yarı ömrü ve mRNA ile ilişkilidir. İnsan hepatic G6PDH enziminin yarı ömrü beslenme durumlarında 2-3 gündür. Bununla birlikte mRNA'lar 4-24 saatlik periyotta çok yüksektir.

İnsan eritrosit G6PDH enziminin monomerlerinin molekül ağırlığının 60.000 dalton olduğu ve 524 amino asit içerdiği ve katalitik aktivite gösterebilmesi için dimerik yapıda olması gerektiği bildirilmiştir^{44,45}. Fare G6PDH enzimi tetramer yapıda ve 240.000

dalton ağırlığındadır⁴⁵. Hitherto ve arkadaşları *Mus musculus* G6PDH enziminin dimerik olmadığını ve *Mus caroli* fare oositlerinde G6PDH enziminin dimerik ve heterodimer olduğunu göstermişlerdir⁴⁶. Araştırmacılar insan ve fare G6PDH enziminin 5' bölgesindeki nükleotit dizilimlerini incelemişler ve -900' lerden ilk introna kadar olan bölgenin %80'dan fazlasının aynı olduğunu göstermişlerdir^{47,48}. Fare eritrosit G6PDH enzim aktivitesinin seviyesinde Gdr-1 ve Gdr-2 olarak bilinen 2 otozomal regülatör genin etkili olduğu bildirilmiştir⁴⁹.

Sıçan karaciğerinde G6PDH enziminin en az 8 farklı formuna rastlanmıştır^{50,51}. Bunlardan üçünün elektroforetik mobilitesi hızlı ve dimerik yapıda, diğerlerinin yavaş elektroforetik mobiliteye ve tetramerik yapıya sahip oldukları bildirilmiştir.

G6PDH enzimi meme bezinin fonksiyonunda önemli rol oynar. Meme bezinin farklı laktasyon aşamalarında G6PDH aktivitesi sürekli artar. Bu artış lipit biyosentezi için NADPH gerektiren yol ile korelasyon gösterir. Meme bezinden saflaştırılan G6PDH enziminin NADP ve NAD ile interaksiyonu, steroidlerle enzim aktivitesinin inhibisyonu araştırılmıştır. İnsan meme bezinde G6PDH enzimi 2 subuniteden oluşmuş olup, aktivite monomerlerin bileştirilmesiyle (dimerik yapıda) sağlanmaktadır. Her bir monomer 130.000 dalton ağırlığında olup, eşit hızda mobiliteye sahiptir^{52,53}.

İnsan meme dokusunda elektroforetik mobilitelerine göre G6PDH enziminin 3 formu bulunmaktadır⁵²:

G6PDH-I: En hızlı elektroforetik mobiliteye sahiptir. Hamilelikte total aktivitenin %15'i kadar aktivite gösterirken, laktasyonda yok denecek kadar azdır (%5).

G6PDH-II: Orta hızda elektroforetik mobiliteye sahiptir. Enzimin molekül ağırlığı 118.000 daltondur. Hamilelikte total aktivitenin %85'i kadar aktivite gösterirken, laktasyonda %55 kadar aktivite göstermektedir.

G6PDH-III: En yavaş mobiliteye sahiptir. Enzimin molekül ağırlığı 260.000 dalton olup, hem monomerik hemde dimerik yapıda aktiftir. Laktasyonda total aktivitenin %40'ı kadar aktivite göstermektedir.

İnsan kanserli meme dokusunda G6PDH-I aktivitesi artmakta iken, fare de G6PDH-II artmaktadır. Son çalışmalarda G6PDH enzimi biyokimyasal tümör tanımlayıcısı (marker) olarak gösterilmektedir. G6PDH enzim eksikliğinde kansere karşı koruyucu faktör yok olmaktadır⁵⁴.

2.3.1.2. Glutasyon Redüktaz (E.C.1.6.4.2)

GR enzimi, 2 FAD molekülünden ve birbirinin aynısı olan iki polipeptid zincirinden oluşmakta ve 4 yapısal domaini bulunmaktadır. Holoenzimin molekül ağırlığı 105 kD'dur. Enzimin NADH Km'i NADPH Km'inden 20 kat daha büyüktür. Nişasta jel elektroforezinde üç izoenzimi tanımlanmıştır. Bunlar GR-A, GR-B ve GR-AB olup gen sıklıkları sırasıyla %98.1, %1.9 ve %0.009'dur. GR'nin kalıtım şekli otozomal dominant olup 8. kromozom üzerinde bulunmaktadır⁵⁵.

Fare GR enzimi yüksek moleküler ağırlıklı, aynı subünitelerden oluşan tetramerik enzimdir. İnsan ve fare GR enziminin amino asit dizisi homoloji göstermektedir. Fare GR enziminin kinetik özellikleri insan eritrosit GR ile aynı olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda G6PDH eksikliği eritrosit GR' nin %24 oranında arttığı gözlenmiştir⁵⁶.

2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (E.C.1.11.1.9)

Selenosistein rezidüsü içeren glutasyon peroksidaz (GPX) bütün hücrelerde bol miktarda bulunmaktadır⁴¹. Enzim peroksidatif hasara karşı hücreyi korumakta ve lökotrienlerin oluşumunda rol oynamaktadır. Enzim tetramerik yapıda ve molekül ağırlığı 96 kD'dur. Enzim geni 3.kromozom üzerinde lokalizedir. Fare GPX geninin yapısı araştırıldığında, enzimin aktif yeri olan selenosistein bölgesinin terminasyon kodonu, TGA ile kodlandığı saptanmıştır^{41,57}.

İnsan hücrelerinde GPX familyasının 5 üyesi tanımlanmıştır^{58,59,60,61}. Bunlar;

1. Klasik hücresel enzim (GPX-1)
2. Plazma GPX (GPX-P)
3. Fosfolipid hidroperoksit enzim (GPX-PH)
4. 24 kD fare epididimal sekretör protein

GPX-PH enzimi ilk defa 1982'de Ursini ve ark. tarafından tarif edilmiş olup, selenyum içeren peroksidazdır. Enzim fosfolipidlerden türeyen hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlar. Son zamanlarda GPX-PH'inin membranlarda kolesterol ve kolesterol esterlerinin, düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Bu selenoenzim GPX-1'den molekül ağırlığı, amino asit kompozisyonu ve substrat spesifikliğı ile ayrılır. GPX-PH membranlardaki

hidroperoksitlerin detoksifikasyonu için özelleşmiş olup, farklı dokuların sitozolünde bulunmaktadır^{58,59}.

GPX-PH enzimi 18 kD ağırlığında ve monomerik yapıda olup kanserli meme dokusunda aktivitesi düşük iken, GPX-1 enzim aktivitesi kanserli meme dokusunda yüksek olduğu bildirilmiştir⁶⁰.

GPX-P enzimi, GPX-1'den immünolojik, fiziksel ve kinetik özellikler yönünden farklılık göstermektedir. Sıçan serumunda GPX-P enzimi homotetramer ve 90 kD ağırlığında olduğu bildirilmiştir. GPX-P'in amino asit dizisi GPX-1 ile %57 oranında homoloji göstermektedir. İnsan GPX-P enzimi 24 kD'luk epidimal sekretör proteini ile %67 oranında homoloji göstermektedir. GPX-P geninin ekspresyonu normal hücrelerde görünürken tümörlü hücrelerde gözlenmediği bildirilmiştir. İnsan GPX-P enzimi ile sıçan GPX-P enzimi arasında %90 oranında homoloji olduğu bildirilmiştir⁶¹.

GPX-1 geninin ekspresyonu normal dokulara oranla kanserli meme dokusunda 3-4 kez yüksek bulunmuştur⁶⁰.

2.3.1.4. Katalaz (E.C.1.11.1.16)

Katalaz (CAT) tetramerik enzim olup ferriprotoporfirin IX'dur. Molekül ağırlığı yaklaşık 240.000'dir. CAT aktivitesi türler arasında, tür içinde, dokular arasında ve gelişim aşamalarında değişkenlik göstermektedir⁶². Enzimin primer yapısının kodundan sorumlu yapısal gen (*Cs*) olup 2. kromozom üzerinde lokalizedir. Enzimin N ve E olmak üzere iki ayrı subunitlerin kombinasyonu oluşan epigenetik modifikasyonla 5 tetramerik izoenzimi meydana gelmektedir. CAT yapısal lokusunda birçok allel tanımlanmıştır. Lokusta normal aktiviteyi kodlayan *Cs^a*, bir akatalasemik allel (*Cs^b*) ve birkaç hipoakatalasemik allel bulunmaktadır. Bu multiple allelik serisi primer olarak kan ve böbrek CAT aktivitesini etkilemektedir. Bunun yanı sıra, 17. kromozom üzerinde karaciğer CAT'ın yıkım oranını kontrol eden ikinci lokus *Ce-1* ve H-2 kompleksiyle bağlantılı üçüncü lokus *Ce-2* olup böbrek katalazın posttranlasyonel işlevini regüle etmektedir. CAT, moleküler aktivitesi çok yüksek (5×10^6) bir enzimdir. Bundan dolayı H_2O_2 'in hızlı yıkımını sağlayarak, organizmada birikmesini ve sitotoksik tesirini önlemektedir^{62,63,64}.

Tümörde CAT aktivitesinin düşmesine belirli humoral faktörler yada faktörlerin

karaciğerde CAT genine uyguladığı down regülasyonu neden olduğu bildirilmiştir⁶². Son çalışmalar katalaz enziminin indüklenebilirliği üzerinedir⁶⁵. CAT enziminin her domainin bir NADPH bağlandığı bildirilmiştir. Dolayısıyla G6PDH enzimi indüklendiğinde CAT enzimi de indüklenmektedir^{62,65}.

Salmon balıklarında CAT aktivitesi memelilerinkinden 50 kat daha düşük olduğu saptanmıştır⁶⁶. Fare eritrosit CAT aktivitesi insana nazaran oldukça düşük olduğu bildirilmiştir⁶³.

2.3.1.5. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1.)

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde mevcut iken anaerobik hücrelerde çok az bulunmaktadır. Enzim aerobik metabolik reaksiyonlarda üretilen süperoksit radikalının güçlü hasarına karşı hücreyi korur. SOD enziminin 4 farklı formu bulunmaktadır⁶⁷:

1. Ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve mitokondrinin iç membranında bulunan Cu-Zn SOD enzimi,
2. Ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde bulunan Mn SOD enzimi,
3. E.coli ve Streptococcus mutantları gibi bakterilerin matriksinde bulunan MnSOD enzimi,
4. E coli'nin periplazmik kısmında bulunan FeSOD enzimi.

O₂ hem spontan hemde enzimle katalizlenmiş oksidasyon reaksiyonlarında oluşmaktadır. Süperoksit oksijen radikali hücrede mevcut olan SOD enzimi ile yok edilmektedir. SOD enzimi, süperoksit anyonunun dismutasyonunu katalizler. SOD eksikliğinde süperoksit anyonu düşük moleküler ağırlıklı redüktanların serbest radikal zincir oksidasyonlarını, enzimlerin inaktivasyonunu ve çok reaktif hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle O₂ radikali çeşitli patolojik ve fizyolojik işlevlere katılmaktadır. SOD enzimi, reperfüzyon hasarı, beyin travması, inflamasyon gibi durumlarda iyileştirici etkiye sahiptir⁶⁶. Kanserli meme dokusunda düşük miktarlarda MnSOD aktivitesi saptanırken Cu-Zn SOD aktivitesinin hiç olmadığı bildirilmiştir⁶⁵. Yapılan bir araştırmada karasal hayvanların (sıçan, tavuk, kertenkele) karaciğerlerinde SOD aktivitelerinin seviyesi balık karaciğerlerinden yüksek olduğu saptanmıştır⁶⁷. Bu farklılık, farklı oksijen

konsantrasyonlu çevrelerde hayvan dokularında üretilen farklı miktarlardaki süperoksit radikalından kaynaklandığı düşünülmektedir. SOD aktivitesinin organlar arası farklılık gösterdiği ve bu farklılığın dokuların içerdiği farklı protein miktarlarından kaynaklandığı düşünülmektedir⁶⁸. Fare karaciğerinde yaşla SOD aktivitesinin arttığı sıçan karaciğer ve kalp kasında ise yaşla azaldığı, glutatyonla ilgili enzimlerin arttığı gözlenmiştir^{68,69}. Vertebra sisteminde oksijen maruziyeti ile SOD aktivitesi arasında mevcut bir ilişkiye rastlanılmıştır⁷⁰. Nitekim tatlı su balıkları SOD aktivitesinin memeli SOD aktivitesinden oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Tatlı su balığı sürekli oksijene maruz kaldığından dolayı SOD aktivitesi azaldığı bildirilmiştir.

Son çalışmalarda SOD aktivitesi pestisitlerin toksik davranışının bir indeksi olarak gösterilirken⁷¹ diğer bir çalışma çeşitli biyolojik sistemlerde genel oksidasyon-redüksiyon davranışlarını saptamada SOD enziminin spesifik bir indeks olamayacağı yönündedir⁷².

Sıçan karaciğer genomik kütüphanesinden saflaştırılan 13kb'lık CuZnSOD geni 5 ekson ve 4 introndan oluştuğu ve ilk intronun 5'GC dizisinin sıçan, fare ve insanda benzer olduğu bildirilmiştir⁷³.

2.3.1.6. Glutatyon-S-Transferaz (E.C.2.5.1.18)

İlaç metabolize eden enzimler içinde çok geniş bir familyayı teşkil eden Glutatyon-S-transferazlar (GST'lar) soluble, çok fonksiyonlu, geniş bir elektrofilik substrat spesifikliğı (karboksilat, epoksitler, organik nitratlar, tiyosiyanatlar, hidroperoksitler, alkil ve aril bileşikler) olan enzimlerdir⁷⁴. GST'ler hem sitozolik (çoğu enzimler) hemde mikrozomal formlarda bulunur. Sitozolik GST'ler 2 subüniteden meydana gelen dimerik kombinasyonlar halinde (homodimer yada heterodimer) bulunur ve her bir subünitenin molekül ağırlığı 25-28 kdaldondur. Mikrozomal GST'ler ise herbir subünite 17 kdaltın olup enzim homotrimer yapıdadır ve 154 amino asitten oluşmaktadır. Mikrozomal ve sitozolik GST'ler benzer substratlarla konjuge olur, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) gibi. Mikrozomal GST'ler 4-hidroksinon-2-enal ve fosfolipit hidroperoksitlerine peroksidaz aktivitesi gösterirler ve lipit peroksidasyon inhibisyonunda güçlü bir fonksiyonel role sahiptir. Sıçan, fare ve insanda GST'ler 4 multigen familyadan oluşan bir süpergen familyasının ürünleridir. Bu multigen familyalar alfa (α), mü (μ), pi (π), teta (θ) dır. Bunlar

substrat spesifikliğine ve çeşitli inhibitörlere duyarlılığına göre sınıflara ayrılmaktadır. θ sınıf enzimler hariç tüm GST'ler CDNB yapısına benzer substrat ile konjuge olur. Familya üyeleri arasında ve içinde büyük homoloji vardır^{74,75}. 1.kromozomun M1 lokusunda insanda μ sınıf GST eksikliğinde karsinogeneze karşı duyarlık gelişmektedir⁷⁶. İnsanda 4 homodimerik μ -sınıf GST tanımlanmıştır. Enzim genleri 1, 11 ve 12. kromozomlarda bulunmaktadır⁷⁷. 12. kromozomda ise GST- π benzeri gen bulunmaktadır. GST prokaryotlar'da, mayada, yüksek organizasyonlu bitkilerde, böceklerde, balıklarda, kurbaçalarda ve memelilerde çok miktarlarda bulunur. Sığıçanda en az 13 subünit tipi gösterilmiştir. Sığıçanda sitozolik proteinlerinin %10'nu oluştururlar. Her bir enzimin geniş bir substrat spesifikliğı vardır. Non-vertebralarda GST'lerin molekül ağırlıkları 36000-50000 dalton arasındadır ve tıpkı memelilerinki gibi dimeriktir⁷⁵. GST'lerin majör rolleri^{74,75},

1. a) Lökotrienlerin ve prostogladinlerin biyosentezinde

b) Steroidlerin izomerasyonunda ($\Delta 5$ -androsterone 1,4 dione)

2. Lipit, steroid ve DNA hidroperoksitleri gibi organik peroksitlere karşı GPX benzeri bir aktivite göstermesi (Antioksidan rol).

3. Endojen maddelerin hücreler arası transportunda görev alması (hem, bilirubin ve steroid hormonlar).

4. Reaktif elektrofilik ksenobiyotiklerin irreversible bağlamasında (PAH gibi karsinojenler)

5. Ksenobiyotiklerin elektrofilik merkezlerinin GSH ile konjugasyonunu katalizlemesinde (epoksitler v.b.)

Glutatyon konjugatları, glutatyon peptid bağlarının hidrolizi ile molekülden glisin ve glutamatın kopması sonucu sistein konjugatı haline geçmektedir. Sisteininin amino grubunun asetillenmesi sonucu son metabolit olan merkaptürik asit türevine dönüşmektedir⁷⁴.

Bu nedenle GST'ler organizmayı peroksidatif hasara karşı korumada, hücrenel transportta ve hem endojen maddelerin hem de reaktif ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynarlar. GST akciğer, böbrek, eritrosit, kalp, iskelet kası, testiküler doku, bağırsak, beyin, karaciğerde bulunur. En yüksek konsantrasyon karaciğerdedir^{74,75,78}.

GST- π 'nin meme tümöral dokuda peritümöral dokuya oranla daha yüksek olduğu

bildirilmiştir⁷⁹. GST- α 'a insan meme kanserinde hiç rastlanmamıştır. Nedeninin ise, GST- α 'nin tümoral ve peritümoral dokularda organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda baskın rol oynamadığından dolayıdır, denilmektedir. Bugün GST preneoplastik tanımlayıcı (marker) enzim olarak dikkati çekmektedir⁷⁹.

2.3.2. Non-enzimatik Antioksidan Sistemler

2.3.2.1. Vitamin E ve C

LDL peroksidasyonu aterosklerozun progresyonuna neden olduğu için peroksidasyonu engelleyen E vitamini hücre dışı ortamda önemli bir role sahiptir. E ve C vitaminin düşük plazma konsantrasyonları ile birlikte olan artmış miyokardial infarktüs sıklığı bunu kanıtlamaktadır. Bununla birlikte C vitamini hidrojen peroksit varlığında demir veya bakır iyonlarıyla birlikte reaksiyona girerek oksidan özellik gösterebilmektedir³³.

2.3.2.2. Transferrin

Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit özellikle serbest demir ve bakır iyonu varlığında hidroksil grubu gibi daha tehlikeli radikallere dönüşebilir. O halde organizmanın hücre dışı ortamda antioksidan savunma aracı demir ve bakır iyonlarının bağlı duruma getirilmesi gerekmektedir. Demirin transportundan sorumlu transferrin sağlıklı insanlarda %20-30 oranında demir ile yüklüdür. Böylece plazmadaki serbest iyonik demirin etkinliği sıfıra düşer ve transferrine bağlı demir lipit peroksidasyon işlemini yapamaz³³.

2.3.2.3. Seruloplasmin

Plazmada bakır taşıyan seruloplasmin, demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Ayrıca antioksidan özelliği vardır. Seruloplasmin ferooksidaz aktivitesine sahiptir. İki değerlikli ferro demiri, üç değerlikli ferri demire okside eder. Seruloplasminin ferro-oksidad aktivitesi demir iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu inhibe eder³³.

2.3.2.4. Albumin

Albuminin vücutta birçok fonksiyona ek olarak bakır iyonunu bağlama yeteneğine de sahiptir ve böylece bakır iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder³³.

2.3.2.5. Bilirubin

İn vivo ortamda bilirubin albumine bağlı yağ asitlerinin peroksidasyonunu önleyerek antioksidan olarak rol oynar³³.

2.3.2.6. Redükte Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH), deRey-Pailhede tarafından 1888'de keşfedildikten sonra 1921'de ilk kez Hopkins tarafından yapısı aydınlatılmıştır⁸⁰. GSH (γ -glutamilsisteinilglisin) memeli hücrelerinde çok önemli düşük moleküler ağırlıklı non-enzimatik antioksidandır. GPX ve GST enzimleri için substrat vazifesini görmekte ve ROT'ların detoksifikasyonunu sağlamaktadır. GSH konsantrasyonu memeli eritrositlerinde yaklaşık 2 mM, tam kanda 0.7-0.8 mM arasındadır⁸¹. GSH karaciğerde %30, böbrekte %34, kalpte %20 ve beyinde %30 oranında bulunmaktadır⁸¹. Yaşlı farelerin eritrositinde en az GSH seviyesi bulunmaktadır⁸². GSH fonksiyonu yaşa bağlı olarak kan, karaciğer ve bağırsakta düşmektedir⁸². Tümör hücrelerinde GPX ve GST enzimleri sadece GSH'ı kullandığından aktiviteleri 7-14 günde artmakta öte yandan GR enzim aktivitesinin azalmasıyla redükte GSH'da azalma olduğu düşünülmüştür⁸³.

Yukarda sözü edilen non-enzimatik antioksidanlara ek olarak ürik asit, α 1-antitripsin, sistein ve β -karoten non-enzimatik antioksidan olarak sayılabilmektedir³³.

2.4. Laktik Dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27)

Laktik Dehidrogenaz (LDH) glikolitik bir enzim olup çeşitli dokularda (eritrosit, lökosit, kas, karaciğer, kalp, böbrek ve meme v.b) multiple formlarda bulunmaktadır. Aktif LDH molekülü (molekül ağırlığı130.000) iki tipte, H ve M (molekül ağırlığı

34.000) 4 monomerden oluşur ve sadece tetramerik molekül katalitik aktiviteye sahiptir. Bu monomerler 5 şekilde birleşerek LDH izoenzimlerini meydana getirir. LDH izoenzimleri, kuarterner yapı düzeyinde birbirinden farklılık göstermektedir⁸⁴. Somatik hücre hibridizasyon çalışmaları, kalp laktat dehidrogenaz (LDH-H) gen lokusunun 12. kromozomda ve kas laktat dehidrogenaz (LDH-M) gen lokusunun 11. kromozomda lokalize olduğunu göstermiştir⁷⁷. LDH enziminin primer fonksiyonu gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz reaksiyonu ile oluşturulan NADH'ı reokside etmektir. Ancak bu şekilde intraselüler NAD⁺/NADH oranı artırılarak glikolizin devamının sağlanması mümkün olabilmektedir⁸⁵.

LDH enziminin iki subunit formlarında eksiklikler gösterilmiştir⁸⁵. Özellikle kas LDH enzim eksikliğine dünyada 1 milyondan fazla kişide rastlanmıştır ve otozomal resesif geçiş gösteren M subunitinin yokluğu ile karakterizedir. Bu kişilerin kaslarında patofizyolojik septomlar görülmekte, eritrosit LDH aktivitesi normalin %10'undan az olduğu gözlenmiştir. Son çalışmalarda LDH enzim eksikliğinin hemolitik anemiye neden olduğu gösterilmiştir⁸⁵.

LDH enzim eksikliği sonucunda NADH'ın birikimi ve NAD'nin de rölatif eksikliği sonucunda glikoliz indirek inhibe olmaktadır. Pirüvat hücre içinde zararlı etkilerini göstermeden birikmeyip hücre dışına difüz olmaktadır. M subunit yokluğu ile karakterize olan LDH eksikliğinde kasta ATP üretimi azalmakta ve glikoliz bozulmaktadır. Pirüvatın laktata dönüşümünde primer bir bloklanma sonucunda hücre içersinde pirüvatın birikmesine ve eritrositlerden pirüvatın anormal salınımı sonucunda plazmada laktat/pirüvat oranı azalmasına neden olmaktadır. Pirüvatın laktata dönüşümünün azalmasıyla ATP üretimi azalmakta dolayısıyla enerji metabolizmasında bu bozulma eritrositlerin ölümüne neden olmaktadır^{84,85}.

LDH aktivitesi türler arasında ve tür içinde farklılık gösterdiği gibi organlar arasında da farklılık göstermektedir. Son yıllarda kanser ile LDH arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır⁵². Bilindiği gibi, malign hücreler normal hücrelerden biyokimyasal olarak farklılık göstermektedir. Bütün kanserlerde olduğu gibi kanserli meme dokusunda da glikolitik aktivite artmaktadır⁵⁴. Glikolitik aktivite malign hücrelerin enerji gereksinimini sağlamak için artmaktadır. Glikolitik aktivitenin artması, glikolizde rol oynayan heksokinaz, fosfofruktokinaz, piruvat kinaz gibi anahtar enzimlerinde

aktivitelerinde artışın olmasına neden olmuştur. LDH aktiviteside tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de artmaktadır. İnsan meme kanserinde LDH izoenzimlerinden kas tipi LDH aktivitesi artmıştır⁵².

2.5. Meme Kanseri

Memeler yardımcı üreme organlarıdır. Meme bezleri alveoller yapıda ekzokrin bezlerdir. Memenin üst dış kısmında bez dokusu en fazla olup, tümörler en çok bu kısımda oluşmaktadır. Meme lenfinin %75'den fazlasını aksiller lenf nodları oluşturur. Meme kanserinin en fazla metastaz yaptıkları nodlar aksiller lenf nodlarıdır. Meme gelişiminin tam olması için birçok hormonun etkinliği gerekmektedir⁸⁴.

Doğurganlık çağındaki kadınlarda görülen meme karsinomalarının %35'i östrojene bağımlı olup, bunların sürekli artması dolaşımında bulunan östrojenlere bağlıdır. Östrojen sekresyonunun azaltılmasıyla meme tümörleri tedavi edilmemekte, fakat belirtiler önemli ölçüde giderilerek tümör gerilemekte ve aylar-yıllar ile ifade edilen bir süre boyunca tekrarlanması önlenmektedir. Büyüme hormonu ve prolaktinin meme karsinomalarındaki gelişmeyi uyardığını gösteren bulgular mevcut olup, hipofizektomiyle, bu uyarılar ortadan kalkmaktadır⁸⁴. İnsan meme kanserinde çalışılan biyokimyasal parametreler hastalığın klinik aşamasını saptamada önemli rol oynamaktadır⁵⁴. Bu nedenle, meme kanserinin ilk aşamasının tanımlanmasındaki tümör markerlar araştırılmıştır. Kanser oluştuğunda; dokuda mevcut enzim aktivitelerinde değişme gözlemlendiği gibi, tümör oluşumuyla enzim aktiviteleri arasında, östrojen reseptörleri arasında ve kemoterapiye cevap arasında bazı korelasyonlar gözlenmiştir⁵⁴.

2.5.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından meme tümörlerinin histolojik tipine göre sınıflandırılmış ve aşamalandırılmıştır. Tümörün farklılaşma derecelerine göre⁵⁴;

I. aşama : Çekirdek pleomorfizm

II. aşama : Hiperkromatik çekirdek sayısı

III. aşama: Mitotik şekiller 'dir.

2.5.2. Meme Kanseri İnsidansı

Meme kanseri yavaş büyüyen tümörler grubundan olup, kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türleri arasında birinci sırayı almaktadır⁸⁶. Meme kanserinin etiyolojisinde genetiksel ve çevresel faktörler önemli yer tutmaktadır. Meme kanserini belirleyen genler 17 ve 21. kromozomlarda yer almaktadır⁷⁷.

2.5.2.1. Ülkeler Arası İnsidansı

Amerika'da kadınlar arasında en çok görülen kanser türü meme kanseridir. 1993 yılında Amerikan kanser birliğinin yapmış olduğu bildiriye Amerika'da sıklıkla görülen kanser türü arasında meme kanserinin 4. sırada yer aldığı ve tüm kanserler arasında sıklığı %16 olduğu bildirilmiştir. Amerika'da her yıl 183.000 kadından 46.300'ü meme kanserinden ölmekte, kanserden ölüm sıklığı %9'dur. Dünyada yaygın görülen kanser türleri arasında meme kanserine en fazla Hawaii ve İsrail'de rastlanmakta ve ülkelerin insidansı sırayla yüzbinde 94 ve 14.0'dur⁸⁶.

2.5.2.2. Türkiye Genelinde İnsidansı

1992 yılında Türkiye'de 16 merkezde yapılan çalışmaların Kanser Savaş Dairesine bildirilmesiyle Türkiye genelinde yapılan değerlendirmede kadınlarda meme kanseri sıklığı %27'dir. Erkeklerde bu oran %1'dir. Kadınlar arasında görülen kanser türleri arasında ise meme kanseri birinci sırada yer almakta ve yüzbinde insidansı 1.74'dür⁸⁶.

2.5.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisindeki Risk Faktörleri

1-Jeoğrafik Faktörler

2-Reprodüktif Faktörler

a)Çocuk Doğurmak

b)Menstrüal Aktivite

c)Emzirme

3-Virüsler

4-Hormonal Faktörler

5-Genetiksel Faktörler

6-Çevresel Faktörler

7-Diğer Faktörler

a)Sosyoekonomik Durum

b)Diyet ve Şişmanlık

c)Reserpine

d)Radyasyon

e)Çevresel Kirleticiler : Pestisitler, PAH'lar,

Bütün bunlar meme kanserinin etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. Genetiksel ve çevresel faktörlere kısaca değinilecek olursa;

2.5.3.1.Genetiksel Faktörler

Meme kanserini belirleyen multiple genler vardır. Bu genler farklı kromozomlarda bulunmaktadır⁷⁷. İlginç olan ise SOD enzim geninin meme kanseri geniyle aynı kromozomlarda ve birbirine yakın bölgelerde yer almasıdır⁷⁷.

2.5.3.2. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörler meme kanserinin etiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Amerikada meme kanser insidansının artış nedeni çevresel faktörlere bağlanmaktadır. Meme kanserinin artışında DDT ve metaboliti DDE, diğer pestisitler (PCB, PBB gibi organik klorlüler) v.s neden olduğu gözlenmiştir. Hem DDT hem de PCB östrojenik

aktiviteye sahip olduklarından tümör oluşturabilmektedir^{2,6}.

İnsan meme kanserlerinin yaklaşık %67'sinde aromataz aktivitesinin ölçülebilir miktarları rastlanmıştır. Meme kanserinde tümörler androjeni östrojene ve mitojenik faktörlere çevirebilirler ve kanser hücrelerinin büyümeleri için eksojen östrojene bağımlılık göstermezler⁵⁴.

2.5.4. Organik Klorlu Pestisitlerin Meme Kanseri ile İlişkisi

Son yıllarda artan çevresel kirlilikler insan meme kanser riskini arttırmaktadır². Organik klorlu pestisitler ve diğer çevresel kontaminantlar kadınlarda meme kanser insidansını arttırmakta, erkeklerde sperm konsantrasyonlarını düşürmektedir⁸⁷. Meme kanser insidansının artmasıyla araştırmacılar kimyasal kirliliklerin östrojenik aktivitelerini saptamaya yönelmiştir. Bu amaçla alkil fenoller, ftalatlar, hidroksillenmiş PCB'ler, dieldrin, endosulfan, toksafen gibi pestisitler E-screen teste tabi tutulmuş ve test sonucunda östrojenik oldukları saptanmıştır. Teste tabi tutulan maddelerin, DDT ve klordan gibi güçlü östrojenik aktiviteye sahip olan pestisitlerle mukayesesinde düşük östrojenik aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Bu maddeler östrojen mimikleri olup meme hücrelerinde progesteron seviyesini arttırmakta ve östrojen reseptörüne bağlanmak için östradiol ile yarışmaktadır⁸⁸.

Organik klorlu pestisitler (tıpkı PAH'lar gibi) meme hücrelerinde kendilerine özgü Ah benzeri reseptörler aracılığıyla belirli enzimlerle ilgili genleri aktive ederek o enzimle ilgili mRNA transkripsiyonu artırmaktadır⁸⁹. 1994 yılında Amerika'da normal ve meme kanseri kişilerin adipoz dokularında pestisit rezüdüleri araştırılmıştır¹¹. Buna göre, meme kanseri olan hastalarda doku %73.4 endrin, %115 α , β ve γ HCH ve dieldrin rezüdülerinin çok yüksek miktarlarda olduğu saptanmıştır. Meme kanser mortalite oranları ile pestisitler arasındaki direkt ilişkiyi gösteren bir çalışmada, 1993 yılında İsrail süthanesinde sütte lindan, DDT ve γ -BHC'nin çok yüksek konsantrasyonlarında olduğu ve Amerikadaki süthanedeki pestisit konsantrasyonlarından 800 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır⁹⁰.

2.6. Fareler

Fare ekonomik, uysal ve ufak olması nedeniyle çalışılması kolay ve genetik olarak insana yakın hayvan grubu olması nedeniyle toksikolojik ve diğer çalışmalarda model hayvan olarak kullanılmaktadır. Farelerin yaşam süresi 3-5 yıl'dır⁹¹.

2.6.1. Fare Kanı

Kan genellikle kuyruk veninden, kalpten ve gözden alınmaktadır. Fare kanı cinsiyet, genetik, tür gibi faktörlerden etkilenmektedir. Fare eritrositi kedi eritrositinin büyüklüğündedir. Çeşitli türlerdeki "inbred" farelerde MCV 41.4-51.5, eritrosit sayısı 9-11 milyon/cm³, hemoglobin konsantrasyonu 12 g/dl ve hematokrit %36-45 ve retikülosit sayısı %2.4-3.1'dir. Eritrositlerin yaşam süresi oldukça kısa olup 40-50 gündür. Total lökosit sayısı gün içinde önemli değişiklikler göstermektedir. DeKock kuyruk kanındaki lökosit sayısının dolaşımdaki kana nazaran 1.5 ila 5 kat yüksek olduğunu saptamıştır. Brown ve Doughery kuyruk kanında belirgin günlük değişimler saptamışlar ve total sayının en az ya da en fazla olduğu günün belirli aralıklarında ölçerek saptamışlardır. Total sayı sabah saat 6.00'da 14000, öğleden sonra saat 15.00'de 21150 ve saat 21.00'da 7000 olarak bulmuşlardır. Bu değişimler farenin aktivitesi ile korelasyon gösterdiği ve uzun bir periyot hareketsiz kaldığında kuyruk kanında en yüksek lökosit sayısı olduğu saptanmıştır. Lökositler morfolojik olarak diğer memelilerinkine benzemektedir. Hamestan ve Bittner benzer günlük değişimleri eozonofil sayısında bulmuşlardır. Plateletlerin periferal kanda yaşam ömrü 4-5 gündür. Platelet sayısı yetişkin bir farede 100-1000x10⁹/L arasındadır⁹².

2.6.2. Fare Karaciğeri

Karaciğer çeşitli diyet, ilaç ve çevresel kaynaklı oksidan ajanlara sürekli maruz kalmaktadır. Normal yetişkin farede karaciğer ağırlığı, total vücudun %4-5'i kadardır. Karaciğer dört lobdan oluşmaktadır. Büyük orta lob (median lobe), sağ lob (right lobe) ve sol lob (left lobe) ve mideye doğru uzanan küçük kuyruk biçiminde olan kuyruk lob (caudate lobe)' tur. Karaciğer loblarının sayısı farelerin farklı türlerinde değişmektedir⁹¹.

Hepatik hücrelerde yaşlılık değişimlerinin çalışılması açısından fare mükemmel bir modeldir. Yaşlı farelerin hepatic hücrelerdeki değişimler 65 yaşın üzerindeki insanlardaki değişimlere benzer olup çoğunlukla çok büyük bir çekirdek ile çekirdekte göze çarpan bariz bulgulara rastlanmıştır. Fizyolojik olarak fare karaciğerinde, yağ asitlerinin oksidasyonu insan karaciğerine göre oldukça yüksektir. Fare karaciğer galaktokinaz aktivitesi tür içinde çok az farklılık gösterirken, eritrosit galaktokinaz aktivitesi türler arasında belirgin bir farklılık göstermektedir. Fare karaciğerinde kan akım miktarı 0.35 ml/dak/g karaciğer'dir⁹¹.

2.6.3. Fare Memesi

Dişi bir farede 4-6 çift meme bulunmaktadır. Meme sayısı fareler arasında farklılık göstermektedir. Altı çift memenin, üç çifti torasik, bir çifti abdominal ve iki çifti inguinal (kasık) bölgede bulunmaktadır. Şekil 6'da dişi albino bir farenin sahip olduğu meme çiftleri gösterilmiştir. Hamile ve laktasyonu olmayan farelerde memeler sıklıkla tüyler tarafından kapatılmıştır. Memeler üç epidermal tabakadan oluşmaktadır. Bunlar stratum germanitimum, stratum granulosum ve stratum korneum'dur⁹¹.



Şekil 6. Dişi albino bir farenin (*Mus musculus*) sahip olduğu meme çiftleri⁹¹

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Aygıtlar

- Santrifüj (Soğutmalı) (Sorvall RC-2BB, 20.000xrpm)
- UV Spektrofotometre (Shimadzu-UV260)
- UV Spektrofotometre (Shimadzu-UV120-02)
- Spektrofotometre (Bausch and Lomb. Spectronic 20)
- Manyetik karıştırıcı (Ika-Cambimag RCD)
- Çalkalayıcı (Kotterman)
- Homojenizatör (Heidolph 50110 R2RO)
- Su banyosu (Kotterman)
- pH metre (Beckman Century SS-1)
- Elektrikli hassas terazi (Mettler H10, Mettler P1210)
- 0-20 microlitre otomatik pipet (Gilson p-20)
- 0-200 microlitre otomatik pipet (Gilson p-200)
- 0-1000 microlitre otomatik pipet (Gilson p-1000)
- Buz Makinesi (Scotsman AF-10)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Nikotinamid adenin dinükleotid (β NAD)
- Redükte nikotinamid adenin dinükleotid (β NADH)
- Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β NADP)
- Glukoz-6-fosfat, Na
- 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)
- Redükte glutatyon (GSH)
- Ksantin oksidaz
- Ksantin

-CAPS Tampon

-Endosulfan

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma veya BDH Chemical Ltd. firmasından temin edilmiştir.

3.2. Örnek Seçimi ve Temini

3.2.1. Fareler

Araştırma materyali olarak kullanılan 23-40 g ağırlığındaki anaç, *M.musculus* Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezi (TIBDAM)'dan alınmıştır. Denekler 22-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlatma periyodunda tutularak ve standart laboratuvar yemi ile beslenmişlerdir. Çalışmamız dört gruptan oluşmaktadır. 15 adet üç ay süreyle normal yem ile beslenen (Grup I) ve 15 adet üç ay süreyle pestisitli yem ile beslenen (Grup II) ile 15 adet altı ay süreyle normal yem ile beslenen (Grup III) ve 15 adet altı ay süreyle pestisitli yem ile beslenen (Grup IV) olmak üzere toplam 60 adet fare kullanıldı.

3.2.2. Pestisitli Yem Hazırlanması ve Uygulanması

TIBDAM'dan alınan hazır fare pellet yemi Ziraat Fakültesi Zooteknik Bölümü'nün değirmeninde öğütüldü. Biyokimya kürsüsünde 50 g toz yem maske kullanarak tartıldı ve eldiven kullanarak suyla bulamaç hale getirildi ve içine 0.24 mg/100 g vücut ağırlığı/gün/ fare dozunda endosulfan kondu, yoğuruldu ve ufak parçalar haline getirildikten sonra oda ısısında kurutulmaya bırakıldı. Pestisit uygulanacak olan farelere hazırlanan pestisitli yemi vermeden önce kuyruktan kanlar alındı ve her kafese bir fare konarak pestisitli yem verildi. Her kafesin üzerine etiket yapıştırılarak farelerin numarası ve yeme bağlı olarak aldığı doz miktarı yazıldı. Kontrol grubu olarak seçilen farelerin kulaklarına işaret konarak gruplar halinde birkaç kafese alındı. Şekil 7'de pestisitli yemin hazırlanışı gösterilmiştir.



Şekil 7. Pestisitli yemin hazırlanışı

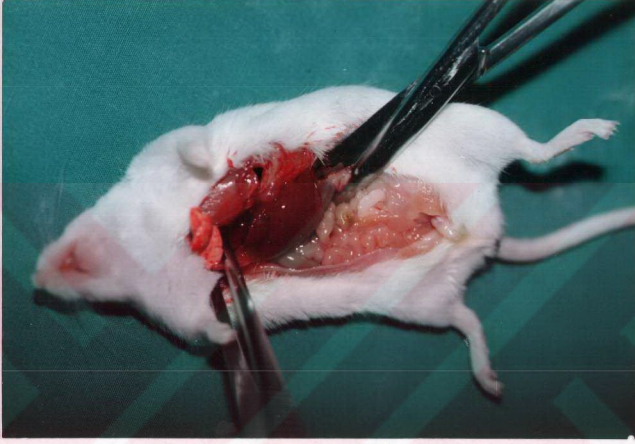
3.2.3. Fare Kanı

Kan deney öncesi ve çeşitli zaman aralıklarında kuyruktan, deney sonunda kalpten alınmıştır. Kanlar EDTA'lı tüpe alınmış, üzeri etiketlenmiş ve analiz için laboratuvara getirilmiştir.

3.2.4. Fare Karaciğer ve Meme Dokusu

Fareler servikal dislokasyon tekniği ile (fareyi boyun kısmından tutup diğer elle kuyruk hızla çekilerek) öldürülmüştür. Daha sonra süratle bir pens ve makas yardımıyla memeler tek tek çıkarılmıştır. Ardından da karaciğer dokuları çıkarılmıştır. Taze dokulardan alınan belirli parçalardan biri ışık mikroskopik düzeyde incelenmesi için %10'luk formaldehit solüsyonuna ve diğeri elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi

için %5'lik glutaraldehit solüsyonuna konularak patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Geri kalan doku parçalarında biyokimyasal analizlerin yapılabilmesi için doku parçaları -70°C'de muhafaza edilmiştir. Analiz zamanı geldiğinde karaciğer ve meme dokularının tartımını yapmadan önce kurutma kağıdı ile kurutulmuş, total dokular tartılıp, ağırlıkları kaydedilmiştir. Şekil 8'de karaciğer dokusunun ve Şekil 9'da meme dokusu çıkarılışı gösterilmiştir.



Şekil 8. Karaciğer dokusunun çıkarılışı



Şekil 9. Meme dokusunun çıkarılışı

3.3. Vücut, Karaciğer ve Meme Ağırlıklarının Saptanması

Dört grupta incelenen farelerin vücut ağırlıkları deney öncesinde ve deney süresince her ay düzenli şekilde TIBDAM'da terazide ölçülmüştür. Deney sonunda son vücut ağırlığı ölçüldükten sonra fareler servikal dislokasyon tekniği ile öldürülmüş ve süratle meme ile karaciğer dokuları çıkarılmıştır. Dokular buz kabı içinde Biyokimya laboratuvarına getirilerek dokuların küçük ölçekli hassas terazide ölçülmesi sağlanmıştır.

3.4. Karaciğer ve Meme Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

3.4.1. Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Taze alınan doku parçaları %10'luk formaldehidde fikse edilmiş ve rutin işlemlerden sonra 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri Harris hematoksil-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir⁹³.

3.4.2. Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Taze alınan karaciğer dokularının bir parçası süratle Milloning fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik glutaraldehit solüsyonu (pH 7.3) bulunan küçük şişelere konuldu. Alınan kaba doku parçaları 2 saat kadar bu solüsyonda bekletildikten sonra dişçi mumu ile kaplanmış petri kutularına alınıp 1mm³ büyüklükte parçalara ayrıldı ve tekrar 2 saat süreyle %5'lik glutaraldehit solüsyonuna konuldu. Böylece +4°C'de toplam 4 saat bu solüsyonda bekletilerek birinci tespit işleminin tamamlanması sağlandı. Milloning fosfat tamponunda 1 gece bekletildi. Ertesi gün, Milloning fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik Osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonunda 2-2.5 saat kadar ikinci tespit işlemi yapıldı. İkinci tespitten sonra doku parçaları iki defa 10'ar dakika süreyle Milloning fosfat tamponu ile yıkanarak dehidratasyon (sudan kurtarma) işlemi yapıldı. Bunun için birkez %50, 70, 86 ve 96'lık etil alkol serilerinden, üç kez %100 etil alkol serilerinden ve iki kez propilen oksit serilerinden geçirildi. Son %100'lük etil alkol safhasına kadar olan işlemler +4°C'de yapıldı. Sudan kurtarılan doku parçaları 30 dakika propilen oksit (1/2) +Gömme materyali (1/2) solüsyonları içerisine alınarak immerse edildi. Dokular içerisinde gömme materyali bulunan tüplere alınarak rotatorda bir gece süreyle döndürüldü.

Ertesi gün doku parçaları taze parçalanmış gömme materyali kullanılarak polietilen blok kapsüllerine gömüldü ve 60 derecelik etüvde 48 saat bırakılarak polimerize edildikten sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı.

Bloklardan Reichert OMU 3 ultramikrotomuyla 500 A° kalınlığında alınan kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine toplandı. Kesitler %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat (Lead sitrat) solüsyonlarıyla boyandı. Boyanan kesitler ZEISS E.M. 10 B elektron mikroskopuyla incelendi²⁴. Mikrograflar Dupont filmleri ile çekildi. Resimler Fohar ve Fortezo kağıtlarına basıldı.

3. 5. Analiz Yöntemleri

3.5.1. Hematolojik Analizler

Steril şartlarda kan pestisit öncesi kuyruktan pestisit sonrası kalpten alınmıştır.

3.5.1.1. Lökosit Sayımı²⁵

Lökosit sayımı, periferik kandaki lökositlerin milimetreküpteki miktarını vermektedir.

Ayırıcılar

Türk çözeltisi

Glasial asetik asit 3 ml

Gention violet %1 1 ml

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

Yöntem

Antikoagülanlı kan lökosit pipetinin 0.5 işaretine kadar çekilir ve pipetin dışına bulaşan kan silinir. Pipetin 11 işaretine kadar Türk çözeltisi çekilir ve pipet otomatik pipet sallayıcıda 3 dakika sallanır. Thoma camı üzerine damlatarak tek büyük karedeki lökositlerler sayılır. Sayım yukarı sıralardaki küçük karelerde soldan sağa, alt sıraya geçince sağdan sola olmak üzere devam edilir.

Değerlendirme

Bir büyük karedeki hacim $1 \text{ mm.} \times 0.1 \text{ mm.} = 0.1 \text{ mm}^3$ 'dir. 1 mm^3 'teki miktarın bulunması için 10 ile çarpılır. Sulandırma oranı 1:20'dir.

$$1 \text{ mm}^3 \text{ 'teki lökosit sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times 10 \times 20$$

3.5.1.2. Eritrosit Sayımı⁹⁵

Eritrosit sayımı, periferik kandaki eritrositlerin bir milimetre küpteki miktarıdır.

Ayırıcılar

Hayem çözeltisi

Sodyum sülfat	2.50 g
Sodyum klorür	0.50 g
Civa klorür	0.25 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Yöntem

Kan eritrosit pipetin 0.5 işaretine kadar çekilir. Pipetin dışındaki kan temizlendikten sonra eritrosit pipetin 101 işaretine kadar Hayem çözeltisi çekilir. Pipet baş parmak ve işaret parmağı arasına alınarak yarım dakika sallanır. Pipet otomatik sallayıcıda 3 dakika sallanır. Thoma camının lameli kapatılır. Kan örneği bulunan pipetin ucundan thoma camının ucuna kan doldurulur. Eritrositler thoma camında 16 küçük kare bulunan 5 adet kare sayılır.

Değerlendirme

80 küçük karedeki hacim 0.02 mm^3 'tür. Bir mm^3 'teki hacim için 50 ile çarpılır, kan 200 defa dilue edildiğinden 200 ile çarpılır.

$$1 \text{ mm}^3 \text{ 'teki eritrosit sayısı} = \text{Sayılan eritrosit sayısı} \times 50 \times 200 \text{ 'dir.}$$

3.5.1.3. Hemogloblin Tayini⁹⁵

Kan, potasyum siyanid ve potasyum ferri siyanid çözeltileriyle karıştırılır. Ferri siyanid hemoglobindeki demiri iki değerden üç değerlikli demire (ferrik) çevirerek methemoglobine dönüştürür. Sonra potasyum siyanid ile stabil pigment olan

siyanomethemoglobin meydana gelir. Bunun rengi fotometrede sarı-yeşil filtre kullanarak 540 nm dalga boyunda okunur. Optik dansite hemoglobin konsantrasyonu ile orantılı olarak değişmektedir.

Ayırıcılar

Drabkin çözeltisi

Sodyum bikarbonat	1 g
Potasyum siyanid	0.05 g
Potasyum ferrisiyanid	0.2 g
Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

Yöntem

İki deney tüpü alınır, kör tüpüne 5 ml drabkin, numune tüpüne hemoglobin pipetine çekilmiş 20 µl kan ve 5 ml drabkin konur. Oda ısısında 15 dakika inkübe edilip, spektrofotometrede 540 nm'deki transmittans okunarak standart eğriden Hb miktarı saptanır.

3.5.1.4. Hematokrit Tayini⁹⁵

Mikrohematokrit tüpüne alınan antikoagülanlı kan, santrifüj edildiğinde eritrositler dibe çöker. Eritrositlerin işgal ettiği hacmin, total hacime oranı hematokriti verir.

Yöntem

Kan kapiller tüpün 2/3'ünü doldurana kadar alınmıştır. Kapiller tüpün diğer ucu macun ile kapatılarak mikrosantrifüj cihazına yerleştirilmiştir. Santrifüjün kapağı iyice kapatıldıktan sonra 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında mikrokapiller tüp mikrohematokrit okuma kartına yerleştirilmiştir. Ayrılan eritrosit ve plazma sınırına göre değerlendirme yapılmıştır.

3.5.1.5. Periferik Yayma⁹⁵

Periferik kandan alınan kan örneklerinde şekilli elemanların morfolojik olarak incelenmesi birçok hastalıkların tanısında son derece önemlidir.

Ayıracılar

1. Gimsa boyası
2. May Grünwald

Yöntem

Antikoagülansız alınan kan lamın sağ uç kısmına küçük bir damla halinde damlatılır. Lam sol elin iki parmağı ile tutulurken ikinci bir lam sağ el ile tutulur, 30 derece açı yapacak şekilde bu damlanın ön kısmında lama dokundurulur, biraz geriye çekilir. Kan bu lamın kenarı boyunca yayılır. Bundan sonra ikinci lam öne doğru itilirken kan birinci lama yayılmış olur. Yaymalar oda sıcaklığında bir kaç dakika kurutulmaya bırakılır ve sonra May Grünwald-Gimsa karışık boyama tekniği ile boyanır. Gimsa'da olduğu gibi önceden ana çözeltiden gimsa hazırlanır. Havada kurutulmuş lamın üst yüzü yukarı gelecek biçimde boya kabının üzerine dizilir. Üzerine 5 ml May Grünwald boyası dökülerek 3-5 dakika beklenir. Lamın bir ucundan (diğer taraftan boya akacak biçimde) aynı miktar saf su konur, 1 dakika beklenir. Saf su dökülür, yıkanmadan üzerine önceden hazırlanan Gimsa boyası konarak 20 dakika bekletilir. Boya dökülür saf su ile yıkanır. Havada kurutulur ve mikroskopta incelenir.

3.5.1.6. Hematolojik Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi

TIBDAM'da üretimi ve bakımı yapılan sağlıklı 60 anaç *M. musculus* dört grupta (Grup I, II, III ve IV) incelendi. Bu gruplardan deneysel çalışma öncesinde kuyruktan kan alındı. Bu bireylerden alınan kanın bir kısmı ile TIBDAM'da periferik yayma için direk lam üzerine alındı, diğer kısmı ile diğer hematolojik analizleri çalışmak için kan EDTA'lı tüpe alındı ve buzkabı içerisinde laboratuvara getirildi. Biyokimya laboratuvarında WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerine çalışıldı ve periferik yaymaların boyaları yapıldı.

3.5.1.6.1. Referans Değerler

Referans bireyler olarak seçilen sağlıklı *M. musculus* tam kanında WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerine ait değerler bir çok istatistiksel analizlere tabii tutulmuş,

normal dağılım eğrileri çizilmiştir. Bu şekilde referans değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır.

3.5.2. Biyokimyasal Analizler

3.5.2.1. Eritrositte Antioksidan Sistemler, LDH Aktivitesi ve MDA

Düzeylerinin İncelenmesi.

3.5.2.1.1. Hemolizat Hazırlama

Laboratuvara getirilen fare kanları santrifüj tüplerine aktarılmış, santrifüjde 1000rpm'de 15-20 dakika süre ile santrifüj edilip plazmaları ayrılmıştır.

Eritrosit pelletleri üzerine 3-4x hacim soğuk serum fizyolojik eklenmiş ve tüpler alt üst edilerek dikkatle karıştırılmış ve tekrar santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Süpernatant aspire edilirken eritrosit pelletleri üst kısmında tabaka oluşturan lökosit-trombosit içeriği de uzaklaştırılmıştır. İşlem en az üç kez (tamamen berrak süpernatant oluşuna dek) tekrarlanmış ve analiz çeşidine göre hemolizat hazırlanmıştır⁹⁶.

3.5.2.1.2. Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

G6PDH'nın glukoz-6-fosfattan 6-fosfoglukonat oluşturması sırasında indirgenen NADP'nin 340 nm'deki artan absorbansının ölçülmesine dayanır⁹⁷.

Ayırıcılar

1. 1 M Tris Tampon (pH 8.0)

Tris baz 5.30 g

Tris HCl 8.84 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 0.1 M MgCl₂

MgCl₂ 0.95 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. 2 mM G6P, Na (Günlük hazırlanır)

G6P 0.0169 g

Saf su ile 10 ml'ye tamamlanır.

4. 6 mM NADP (Günlük hazırlanır)

NADP 0.0153 g

Saf su ile 10 ml'ye tamamlanır

5. % 0.02 Digitonin

Digitonin 0.02 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

6. 5 mM Na-P tamponunun (pH 7.0) hazırlanması

A- Stok tampon : 0.05 M Na-P tamponu

NaH₂PO₄.2H₂O 3.12 g

Na₂HPO₄ 4.26 g

Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

B-Seyreltik Tampon: 5 mM Na-P tamponu

Stok tampon 100 ml

Na₂ EDTA 392 mg

NADP 15.3 mg

β-Merkaptoetanol 0.07 ml

Bir miktar saf su konduktan sonra pH'ı kontrol edilir ve 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.

Yöntem

1 hacim eritrosit pelleti üzerine 1 hacim fosfat tamponu ve 2 hacim digitonin konularak hemolizat hazırlanır. Hazırlanan hemolizatta hemoglobin ve enzim aktivite tayini yapılır. G6PDH tayini için iki tüp alınır ve Çizelge 5'de belirtilen işlemler uygulanır.

Çizelge 5. Eritrositte G6PDH aktivite tayini için kıvrars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (ml)	Numune (ml)
NADP, 2Mm	0.3	0.3
G6P, 6 mM	0.3	0.3
Tris tampon, 1 M pH 8.0.	0.3	0.3
MgCl ₂	0.3	0.3
Saf su	1.80	1.75
37°C'de 10 dak. Inkübe edilir		
Hemolizat	-	0.05

Hazırlanan örnek tüplerindeki tepkime 37°C'de 1cm ışık yolu olan kuvars kuvvetlerde 10 dak. süreyle spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda izlenir. 0., 5. ve 10. dakikalardaki absorbanslar ölçülür ve doğrusal artış gösteren zaman sürecindeki optik dansite (OD) değerlerinden yararlanılarak aşağıdaki formül yardımıyla G6PDH enzim aktivitesi hesaplanır.

Hesaplama

$$\text{G6PDH (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (3.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0.05 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Hemolizat hacmi

V_T : Toplam hacim

6.22 : 1 μmol NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

Ü/ml biriminden ölçülen G6PDH aktivitesi daha sonra hemolizatta saptanan hemoglobin değerine bölünerek enzim spesifik aktivite sonucu Ü/g Hb biriminden verilir.

$$\text{G6PDH Spesifik Aktivitesi (Ü/g Hb)} = \frac{\text{G6PDH Değeri (Ü/ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.3. Katalaz Aktivite Tayini

CAT, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin CAT tarafında yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir⁹⁷.

Ayırıcılar

I. 1 M Tris-HCl, 5 mM Na_2 EDTA tamponu, pH 8.0

Tris- Baz 5.358 g

Tris-HCl 8.787 g

Na_2 EDTA 0.1461 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

K_2HPO_4 6.723 g

KH_2PO_4 8.344 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. 10 mM H₂O₂

%30'luk peroksit'den 10 µl alınır ve 9.990 µl saf suya tamamlanır.

4. Stabilize edici çözelti

β-merkaptoetanol 0.05 ml

%10'luk Na₂EDTA ile 10 ml'ye tamamlanır.

5. Etanol (%95'lik)

Yöntem

CAT aktivite tayini için, eritrosit pelleti 1:20 oranında stabilize edici çözelti ile hemoliz edilir ve bu hemolizattan hemogloblin tayini yapılır. Bu şekilde hazırlanan hemolizat daha sonra 1:100 oranında saf su ile sulandırılır ve 1 ml'sine 20 µl saf etanol gelecek şekilde ilave edilir, karıştırılır ve aktivite tayini yapılır. Deneye başlamadan önce, günlük olarak hazırlanan 10 mM H₂O₂ konsantrasyonunun doğru ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponu ile kontrol edilir. Bunun için fosfat tamponu 1:10 oranında saf su ile sulandırılır, 1 ml'lik küvete 900 µl konur ve havaya karşı 230 nm dalga boyunda okunarak absorbansı kaydedilir (OD₁). Ölçülen fosfat tamponun içine hazırlanan 10 mM'lık peroksitten konur ve havaya karşı aynı dalga boyunda okunarak absorbansı kaydedilir (OD₂). Sonuç OD₂-OD₁=0.071 olduğunda, hazırlanan peroksitin konsantrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterilen prosedürde başlanır.

Çizelge 6. Eritrositte CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1 M Tris HCl, 5 mM Na ₂ EDTA, pH 8.0	50	50
10 mM H ₂ O ₂	-	900
Saf Su	930	30
37°C'de 10 dakika inkübe edilir		
Hemolizat	20	20

Oluşan tepkime 1 cm ışık yolu kuvars küvetlerde, 37°C'de 230 nm'de 0., 2.5., 5. dakikalardaki absorbans değerleri ölçülerek izlenir. Doğrusal artış gösteren zaman aralığındaki optik dansite (OD) değerleri kullanılarak CAT enzim aktivitesi ölçülür.

Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (}\ddot{U}/\text{ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0\text{ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Hemolizat hacmi

V_T : Toplam hacim

0.071 : 10 mM H_2O_2 yıkım hızının verdiği OD değeridir.

\ddot{U}/ml biriminden ölçülen CAT aktivitesi hemolizatta saptanan hemoglobin değerine bölünerek enzim spesifik aktivite sonucu \ddot{U}/g Hb biriminden verilir.

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (} \times 10^4 \ddot{U}/\text{g Hb)} = \frac{\text{CAT Değeri (}\ddot{U}/\text{ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.4. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküller oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyolet: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür⁹⁸.

Ayıracılar

1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu pH 10.2

50.00 mM CAPS 1.1065 g

0.94 mM EDTA 0.035 g

Doymuş NaOH 11.1 μl

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. Substrat karışımı

0.05 mM Ksantin 0.00152 g

0.025 mM INT 0.00253 g

CAPS Tamponuyla 10 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz 3.04 µl

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

4. 0.01 M Fosfat tamponu pH 7.0

Na₂PO₄ 54.91 mg

NaH₂PO₄ 3.58 mg

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5. Standart (S6): 5.6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standartıdır.

Standart Eğrinin Çizimi

Lyofilize olarak hazırlanmış SOD standartı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlanır. 2-8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Çizelge 7. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	0.01 M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD Derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	6 ml	0.23

S1: Kır (fosfat tamponu)

Yöntem

SOD aktivite tayini için, eritrosit pelleti 1: 3 oranında soğuk su ile hemoliz edilir ve bu hemolizatta hemoglobini tayini yapılır. Daha sonra, bu hemolizat 1:25 oranında 0.01 M fosfat tamponu ile sulandırılır ve aktivite tayini yapılır. Ayıraçlar aşağıdaki gibi konur.

Çizelge 8. SOD standart eğri çizimi için kıvırs küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart (µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır		
Ksantin oksidaz	25	25

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün ve standartın 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbanları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbanları (A₂) tekrar okunur.

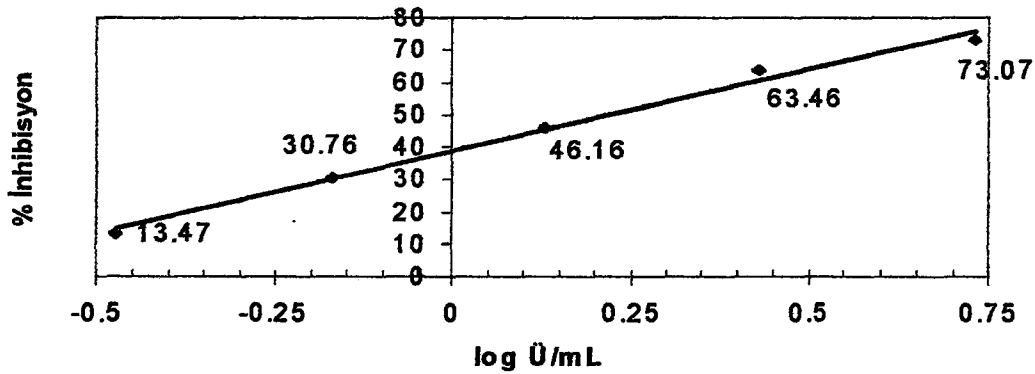
Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak standart} \times 100}{A \text{ çalışma körü}}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir. Şekil 10'da SOD standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 10. Süperoksit dismutaz standart eğrisi

Örnek Çalışması

Çizelge 9. Eritrositte SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
Hemolizat	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır		
Ksantin oksidaz	25	25

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A_1) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A_2) tekrar okunur.

Hesaplama

$$\Delta A/\text{dak örnek} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon örnek} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak örnek} \times 100}{A \text{ çalışma körü}}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur.

$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (Ü/g Hb)} = \frac{\text{SOD Değeri (Ü/ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.5. Glutasyon-S-Transferaz Aktivite Tayini

GST'nin S-2,4-dinitrofenil glutasyon oluşturması sırasında GSH ile konjüge olan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin 340nm'de artan absorbansının ölçümüne dayanır⁹⁹.

Ayıracılar

1. 20 mM GSH

GSH 0.00614 g

Saf suyla 1 ml'ye tamamlanır.

2. 20 mM CDNB

CDNB 0.0040 g

Saf alkolde 1 ml'ye tamamlanır.

3. 0.2 M Na-P Tamponu (pH 6.5)

Na₂PO₄ 2.31 g

NaH₂PO₄ 13.0 g

EDTA, Na₂ 0.18 g

Bir miktar saf suda eritilir, pH'ı ayarlanır ve saf su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Yöntem

Yukarıda bahsedildiği gibi, hazırlanan eritrosit pelleti 1: 20 oranında saf su ile hemoliz edilir ve bu hemolizattan hemogloblin ve enzim aktivite tayini yapılır. GST aktivite tayini için iki tüp alınır ve aşağıda belirtildiği gibi ayraçlar konur.

Çizelge 10. Eritrositte GST aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
Na-P Tamponu, pH 6.5	50	50
20 mM GSH	50	50
Hemolizat	-	20
Saf su	450	380
30°C'de 10 dakika inkübe edilir		
20 mM CDNB	-	50

konur ve reaksiyon başlatılır

Hesaplama

$$\text{GST (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{10 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Hemolizat hacmi

V_T : Toplam hacim

10: 1µmol CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

Ü/ml biriminden ölçülen GST aktivitesi hemolizatta saptanan hemogloblin değerine bölünerek enzim spesifik aktivitesi Ü/g Hb biriminden verilir.

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi (Ü/g Hb)} = \frac{\text{GST Değeri (Ü/ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.6. Redükte Glutasyon Düzeyinin Tayini

Hemen hemen eritrositlerin bütün nonprotein sülfidril grupları, indirgenmiş GSH şeklinde bulunur. 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit] (DTNB), sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilmiş bir disülfid bileşigidir. Oldukça sarı renkli anyon oluşturur. Örnek ile DTNB'nin oluşturduğu sarı renkli kompleksin renk şiddeti ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 412 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir⁹⁷.

Ayırıklar

1. Çöktürücü Çözelti

Glasiyel metafosforik asit 1.67 g

Disodyum EDTA 0.20 g

NaCl 30.0 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 0.3 M Na₂HPO₄

Na₂HPO₄ 42.59 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. %0.02 DTNB Çözeltisi

DTNB 20 mg

%1'lik Sodyum sitrat ile 100 ml'ye tamamlanır.

Yöntem:

200 µl tam kan üzerine 2 ml saf su ilave edilerek hemolizat hazırlanır ve 200 µl'si hemoglobin tayini için kullanılır. GSH tayini için iki tüp alınır ve aşağıda belirtilen ayırıklar konur.

Çizelge 11. Eritrositte GSH düzeyininin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Hemolizat	-	2
Saf su	2	-
Çöktürücü	3	3
5 dakika bekletilir, örnek filtre kağıdından süzülür		
Süzüntü	2	2
0.3 M Na ₂ PO ₄	8	8
412 nm'de köre karşı okunur (OD ₁). Tüplere:		
%0.02 DTNB	1	1

ilave edilir ve 412 nm'de köre karşı okunur (OD₂).

Hesaplama

Kanda GSH miktarı $\mu\text{mol/g}$ Hb biriminden hesaplanır.

$$\frac{C}{1000} = \frac{(OD_2 - OD_1) \times 11 \times 5 \times 100}{13600 \times 2 \times 2 \times \text{Hb}}$$

$$C(\mu\text{mol/g Hb}) = \frac{(OD_2 - OD_1) \times 101}{\text{Hb (g/dl)}}$$

13600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyonu katsayısı

Hb: Hemoglobin (g/dl)

1000: μmol 'e dönüşüm katsayısı

C: μmol glutatyon

OD₁: DTNB ilave edilmeden önce 412 nm dalga boyunda ölçülen optik dansite

OD₂: DTNB ilave edildikten sonra 412 nm dalga boyunda ölçülen optik dansite

11/2 ve 5/2 : dilüsyon katsayısı

3.5.2.1.7. Laktik Dehidrogenaz Aktivite Tayini

LDH'ın laktattan pirüvatı oluşturması esnasında oksitlenen NADH'ın 340 nm'de azalan absorbansının ölçülmesine dayanır⁹⁷.

Ayır a lar

1. 1M Tris-HCl, 5 mM Na₂ EDTA tamponu (pH 8.0)

Tris baz	5.358 g
Tris-HCl	8.787 g
Na ₂ EDTA	0.1461 g
Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.	

2. 2 mM NADH

NADH	0.0028 g
Saf suyla 2 ml'ye tamamlanır.	

3. 10 mM Sodyum pirüvat

Sodyum pirüvat	0.011 g
Saf suyla 10 ml'ye tamamlanır.	

Yöntem

Eritrosit pelleti 1:20 oranında saf su ile sulandırılır. Bu şekilde hazırlanan hemolizatta hemoglobin ve enzim aktivite tayini yapılır. LDH aktivite tayini için iki tüp alınır ve aşağıda belirtildiği gibi ayır a lar konur.

Çizelge 12. Eritrositte LDH aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (�l)	Numune (�l)
1 M Tris-HCl	100	100
2 mM NADH	100	100
Hemolizat	20	20
Su	780	680
37°C'de 10 dakika inkübe edilir		
10 mM Sodyum Pirüvat	-	100

37°C'de 340 nm'de köre karşı okunan örneğin absorbans düşüşüne dayanır.

Hesaplama

$$\text{LDH Aktivitesi ( /ml)} = \frac{\Delta \text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Hemolizat hacmi

V_T : Toplam hacim

6.22: $1\mu\text{mol NADH'nin } 1\text{ cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri}$

$$\text{LDH Spesifik Aktivitesi (Ü/g Hb)} = \frac{\text{LDH Değeri (Ü/ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.8. Malondialdehit Düzeyinin Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95°C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır, 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir¹⁰⁰.

Ayırıcılar

1. %8.1'lik SDS

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 8.1 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. %20'lik Asetik Asit (HAc)

Asetik asit 20 ml

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. %0.8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)

Tiyobarbitürik asit 0.8 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Doymuş NaOH ile pH: 3.5'e ayarlanır.

4. n-Butanol/Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (14/1)

n-Butanol 14 ml

Piridin 1 ml

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/ml)

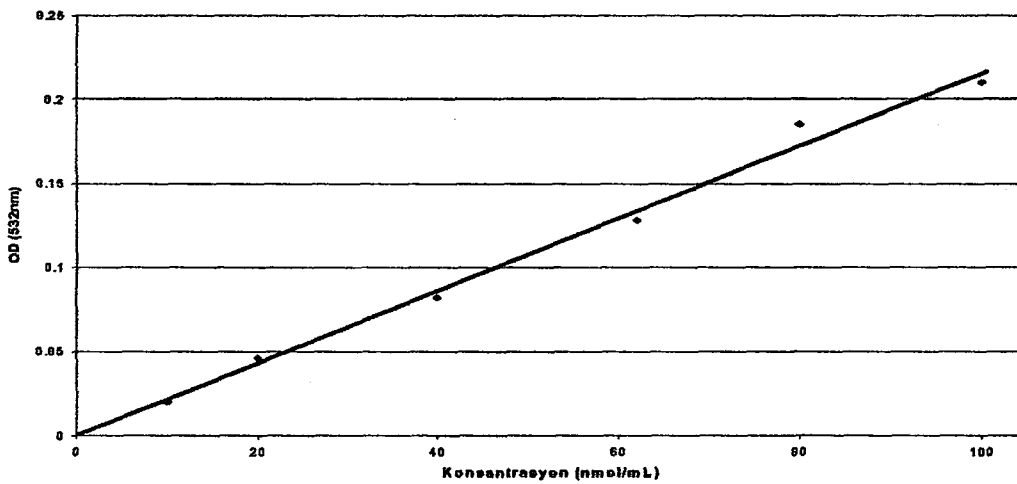
Standart Eğri Çizimi

Stok standarttan 6.6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayıraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilir.

Çizelge 13. MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	80	60	40	20	10
Standart (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur							
Saf su (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

n-butanol/pridin ilavesinden sonra vorteks edilir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üsteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbans okunur. Standart eğri grafiği çizilir. Şekil 11'de MDA standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 11. Malondialdehit standart eğrisi

Yöntem

Örnek çalışması için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan belirli hacimde eritrosit pelleti alınır ve bu pellette hemoglobin tayini yapıldığı gibi MDA tayini de yapılır. Eritrosit pelletinde MDA tayini için aşağıda çizelge'de belirtildiği gibi tüplere ayrılar konur.

Çizelge 14. Eritrositte MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Std (60 nmol/ml)	-	0.1	-
Eritrosit pelleti	-	-	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
HAc	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur			
Saf su	1.0	1.0	1.0
nBu/Pi	5.0	5.0	5.0

Çözeltiler vortekslenir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans okunur. Sonuç standart eğrisinden veya günlük standarttan değerlendirilir.

Hesaplama

$$\text{MDA (nmol/g Hb)} = \frac{\text{MDA Değeri (nmol/ml)}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

3.5.2.1.9. Hemoglobin Düzeyinin Tayini :

Hemolizat potasyum siyanür ve potasyum ferrisiyanür ile muamele edildiğinde, ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitler ve hemoglobini methemoglobine çevirir. Siyanür ise 540 nm'de absorpsiyon piki veren stabil siyanomethemoglobine dönüştürür. Siyanomethemoglobin metoduyla bütün methemoglobin türevleri ölçülür⁹⁷.

Standart Eğri Çizimi

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konur.

Çizelge 15. Hemogloblin standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon (g/dl)	0.2	0.4	0.8	1.2	1.8	2.0
Standart (µl)	-	100	100	100	100	100
Drabkin (ml)	5	5	5	5	5	5

15 dakika oda ısısında bekletilir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda optik dansite okunarak standart eğri çizilir.

Örnek Çalışması

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konulur.

Çizelge 16. Hemolizatta hemogloblin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör	Örnek
Hemolizat (µl)	-	100
Drabkin (ml)	5	5

15 dakika oda ısısında bekletilir ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda optik dansite okunarak standart eğriden değerlendirilir.

3.5.2.1.10. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve

MDA Düzeyleri İle İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi

3.5.2.1.10.1. Referans Değerler

TIBDAM'da üretimi ve bakımı yapılan sağlıklı 60 anaç *M. musculus* dört grupta incelendi. Bu gruplardan (Grup I, II, III IV) deney öncesi kan kuyruktan alındı ve EDTA'lı tüpe aktarıldı, buzkabı içerisinde laboratuvara getirildi ve eritrosit antioksidan sistemlere, LDH aktivitesine ve MDA düzeylerine bakıldı.

3.5.2.1.10.2. Analitik Varyasyon

10 sağlıklı fare bireyinden 0.5 ml kan EDTA'lı tüpe alındı, her bir deney için hemolizat hazırlandı ve örneklerde G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili analizler aynı gün içerisinde 10 kez çalışıldı. Bu şekildeki çalışma sonucu intra-assay varyasyonu (CV_A) vermektedir.

3.5.2.1.10.3. Intra-individual ve Inter-individual Varyasyon

Sağlıklı 15 *M. musculus* fareden (Grup III) her ayın 15'inde aynı zaman (sabah, 9.00-11.00) aralığında kan alındı. Bu şekilde alınan kanlarda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili çalışma sonuçları intra-individual varyasyonu (CV_I) vermektedir. İnter-individual (CV_I) ve inter-individual varyasyonlar (CV_G) varyans analizi (ANOVA) ile hesaplanmıştır.

3.5.2.2. Karaciğer ve Meme Dokularında Antioksidan Sistemler, LDH Aktivitesi ve MDA Düzeylerinin İncelenmesi.

3.5.2.2.1. Homojenat Hazırlama

Fare karaciğeri ve total meme dokuları çıkarılır çıkarılmaz buza konulmuştur. Kurutma kağıdı ile kurutulmuş, tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. 1 g doku 5 hacim (hacim/ağırlık) soğuk %1.15 KCl ile bir buz kabı içinde homojenizatörde (Heidolph 50110 R2RO) 15-20 dakika homojenize edilmiştir. Homojenat daha sonra +4 C'de 14000xrpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki süpernatant'da enzim aktiviteleri, GSH, MDA ve protein düzeyleri saptanmıştır¹⁰¹.

3.5.2.2.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

Karaciğer ve meme dokularından homojenat hazırlanır ve süpernatant enzim aktivite tayininde kullanılır. Enzim aktivite tayini 3.5.2.1.2.'de açıklanmıştır.

Hesaplama

$$G6PDH (\text{Ü/ml}) = \frac{\Delta OD \times V_T (3.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0.01 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Süpernatant hacmi

V_T : Toplam hacim

6.22 : 1 μmol NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

Ü/ml biriminden ölçülen G6PDH spesifik aktivitesi Ü/mg protein, ayrıca Ü/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$G6PDH \text{ Spesifik Aktivitesi } (\text{Ü/mg protein}) = \frac{G6PDH \text{ Değeri } (\text{Ü/ml})}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$G6PDH \text{ Spesifik Aktivitesi } (\text{Ü/g doku}) = \frac{G6PDH \text{ Değeri } (\text{Ü/ml}) \times \text{homojenat (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.3. Katalaz Aktivite Tayini

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatant 1:50 oranında sulandırılır, her 1 ml'sine 20 μl gelecek şekilde %95'lik etanol koyulur ve enzim aktivite tayini yapılır. Enzim aktivite tayini 3.5.2.1.3.'de açıklanmıştır.

Hesaplama

$$CAT \text{ Aktivitesi } (\text{Ü/ml}) = \frac{\Delta OD \times V_T (1 \text{ ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Optik dansite değişimi

V_H : Süpernatant hacmi

V_T : Toplam hacim

0.071 : 10 mM H_2O_2 yıkım hızının verdiği OD değeri

Ü/ml biriminden ölçülen CAT spesifik aktivitesi Ü/mg protein, ayrıca Ü/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{CAT Değeri (Ü/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (Ü/g doku)} = \frac{\text{CAT Değeri (Ü/ml)} \times \text{homojenat hacmi (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD aktivite tayini için, karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatant %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu 1:65 oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır. SOD tayini 3.5.2.1.4.'de anlatılmıştır.

Hesaplama

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak standart} \times 100}{A \text{ çalışma körü}}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD spesifik aktivitesi Ü/mg protein, ayrıca Ü/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{SOD Değeri (Ü/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (Ü/g doku)} = \frac{\text{SOD Değeri (Ü/ml)} \times \text{homojenat hacmi (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.5. Glutatyon-S-Transferaz Aktivite Tayini

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatantlar 1:50 oranında sulandırılır, bu şekilde hazırlanan dilüsyonlarda enzim aktivite tayini yapılır. GST aktivite tayini 3.5.2.1.5.'de anlatılmıştır.

Hesaplama

$$\text{GST } (\ddot{U}/\text{ml}) = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{10 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Süpernatant hacmi

V_T : Toplam hacim

10 : 1 μmol CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği O.D değeri

\ddot{U}/ml biriminden ölçülen GST spesifik aktivitesi \ddot{U}/mg protein, ayrıca \ddot{U}/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi } (\ddot{U}/\text{mg protein}) = \frac{\text{GST Değeri } (\ddot{U}/\text{ml})}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi } (\ddot{U}/\text{g doku}) = \frac{\text{GST Değeri } (\ddot{U}/\text{ml}) \times \text{homojenat hacmi (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.6. Redükte Glutasyon Düzeyinin Tayini

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatant direk sulandırılmadan kullanılır. GSH düzeyi tayini 3.5.2.1.6.'da açıklanmıştır.

Hesaplama

Dokuda GSH miktarı $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, ayrıca $\mu\text{mol}/\text{g}$ doku birimlerinden verilmiştir. (Hemolizattan farklı olarak süpernatant sulandırılmadan kullanıldığından 11/2 gibi dilüsyon katsayısı yoktur.)

$$\frac{C}{1000} = \frac{(\text{OD}_2 - \text{OD}_1)}{13600} \times \frac{5}{2}$$

$$C(\mu\text{mol}/\text{mg protein}) = \frac{(\text{OD}_2 - \text{OD}_1)/13600 \times 5/2 \times 1000}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$C(\mu\text{mol/g doku}) = \frac{(OD_2 - OD_1) / 13600 \times 5/2 \times \text{homojenat hacmi (hacim/ağırlık)} \times 1000}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

13600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyonu katsayısı

1000: μmol 'e dönüşüm katsayısı

C: μmol glutatyon

OD₁: DTNB ilave edilmeden önce 412 nm dalga boyunda ölçülen optik dansite

OD₂: DTNB ilave edildikten sonra 412 nm dalga boyunda ölçülen optik dansite

5/2 : dilüsyon katsayısı

3.5.2.2.7. Laktik Dehidrogenaz Aktivite Tayini

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatantlar 1:50 oranında sulandırılır, Bu şekilde hazırlanan dilüsyonlarda enzim aktivite tayini yapılır. LDH aktivite tayini 3.5.2.1.7.'de açıklanmıştır.

$$\text{LDH Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Süpernatant hacmi

V_T : Toplam hacim

6.22: 1 μmol NADH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

Ü/ml biriminden ölçülen LDH spesifik aktivitesi Ü/mg protein, ayrıca Ü/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$\text{LDH Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{LDH Değeri (Ü/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{LDH Spesifik Aktivitesi (Ü/g doku)} = \frac{\text{LDH Değeri (Ü/ml)} \times \text{homojenat (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.8. Malondialdehit Düzeyinin Tayini

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatantlar direk sulandırılmadan kullanılır. MDA düzeyi tayini 3.5.2.1.8.'de anlatılmıştır.

Hesaplama

nmol/ml biriminden ölçülen MDA düzeyi hem nmol/mg protein hem de nmol/g doku birimlerinden verilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{\text{MDA Değeri (nmol/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/g doku)} = \frac{\text{MDA Değeri (nmol/ml)} \times \text{homojenat (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

3.5.2.2.9. Protein Düzeyinin Tayini

Bu metotta proteinlerin içerdiği tirozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır¹⁰².

Ayırıklar

1. A Çözeltisi :

%2 Na₂CO₃ 2 g

0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi

a) B₁ Çözeltisi:

%1 CuSO₄.5H₂O 1 g

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B₂ Çözeltisi

%2 Na-K tartarat 2 g

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır. :

3. C Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

50 ml A+1 ml B (0.5 ml B₁+ 0.5 ml B₂) karıştırılır.

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

Folin Cioacaltea 1: 1.5 oranında saf su ile sulandırılır.

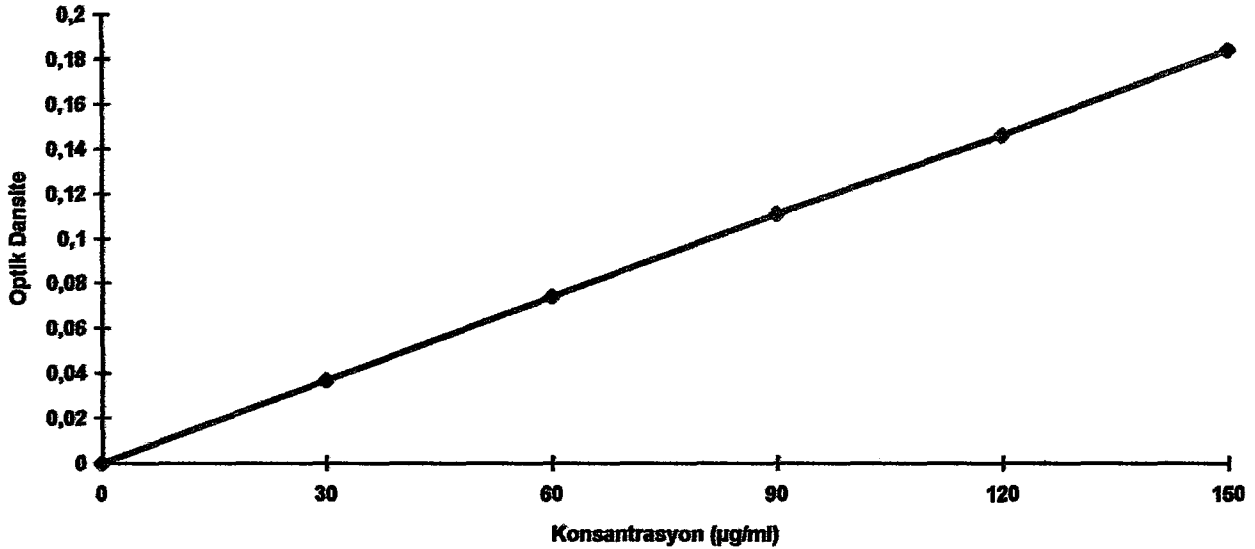
Standart Eğri Çizimi

Stok standart için 0.3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamalandığında 150 µg'lık konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanslar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır. Şekil 12'de protein standart eğrisi verilmiştir.

Çizelge 17. Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon (µg/ml)	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (ml)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Serum fizyolojik (ml)	0.3	-	-	-	-	-
C çözeltisi (ml)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir						
D çözeltisi (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm'de köre karşı okunur.



Şekil 12. Protein standart eğrisi.

Örnek Çalışması

Karaciğer ve meme dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayini için, süpernatant 1:50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde konulur.

Çizelge 18. Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C çözeltisi	3	3	3
Oda ısısında 15 dakika bekletilir			
D çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir, absorbans 750 nm'de okunur.

Hesaplama

Örneğin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğriden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.5.2.2.10. Karaciğer ve Meme Dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi

2.1.10.1. Referans Değerler

TIBDAM'da üretimi ve bakımı yapılan sağlıklı 30 anaç *M. musculus* fare (Grup I ve III) referans bireyler olarak seçildi. TIBDAM'da kesilen farelerden çıkarılan karaciğer ve meme dokuları buz kabı içerisinde laboratuvara getirildi. Her iki doku örneğinde enzim aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri çalışıldı.

3.5.3. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen tüm verilerin istatiksel analizlerinde SPSS (Version 6.0 ve 8.0) istatistik programları ve SAS istatistik programları (Version 6.12)'dan yararlanılmıştır.



4. BULGULAR

Çalışmamızda, TIBDAM'da üretimi ve bakımı yapılan albino anaç *M.Musculus* fareler kullanılmıştır. Kontrol grubu 30, pestisitli grup 30 olmak üzere toplam 60 fareden yararlanılmıştır. Çalışma kapsamına 4 grup katılmıştır. Bunlar;

Grup I: Üç ay süreyle normal yem uygulanan grup

Grup II: Üç ay süreyle pestisitli yem uygulanan grup

Grup III: Altı ay süreyle normal yem uygulanan grup

Grup IV: Altı ay süreyle pestisitli yem uygulanan grup

Bir fare günde yaklaşık 3-5 g pellet yemi tüketmektedir. Çalışmamızda kontrol grubu (Grup I ve III) hayvanların vücut ağırlığı ortalaması 31.4 ± 4.2 g'dır (n (Grup I+III): 30, $X \pm SD$). Vücut ağırlığı ortalaması 31.4 g olan hayvanlar, bir günde ortalama 4 g yem tükettiğinden 100 g vücut ağırlığına düşen yem miktarı 12.7 g'dır. 100 g vücut ağırlığına günde 12.7 g yem miktarı düştüğünden dolayı hayvanlar, 90 günde (üç ay) aldıkları yem miktarı 1143 g yem ve 180 günde (altı ay) 2286 g yemdir. Kısaca, 12.7 g yem/100 g vücut ağırlığı/gün , 1143 g yem/100 g vücut ağırlığı/ 90 gün ve 2286 g yem/100 g vücut ağırlığı/ 180 gün gösterilebilir.

Çalışmamızda pestisitli gruplarda (Grup II ve IV) yer alan hayvanların vücut ağırlığı ortalaması 32.9 ± 3.7 g'dır (n (Grup II+IV): 30, $X \pm SD$). Vücut ağırlığı ortalama 32.9 g olan hayvanlara günde 1 mg endosulfan uygulanmıştır. Bu durumda, 100 g vücut ağırlığında endosulfan dozu 3.03 mg'dır. Bu doz farelere 50 g standart pellet yemi içinde verilmiştir. Fareler 50 g yemi yaklaşık 13 günde tüketmektedir. Bu durumda 3.03 mg endosulfan 100 g vücut ağırlığına yaklaşık 13 günde uygulanmıştır. Bir günde uygulanan doz, 100 g vücut ağırlığında 0.24 mg'dır. Kısaca, 0.24 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/gün/fare şeklinde gösterilebilir. Buna göre bir fare düzenli şekilde yemini alması durumunda yaklaşık üç ayda 21.6 mg endosulfan/100g vücut ağırlığı/90 gün ve altı ayda 43.2 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu almış olacaktı. Fakat çalışmamızda pestisitli gruplarda (Grup II ve IV) iştahsızlık veya diğer sebeplerden dolayı yemin az yenmesinden dolayı alınan doz miktarı alması gereken dozdan biraz daha düşük olduğu saptanmış olup, fareler Grup II'de ortalama üç ayda 19.75 mg endosulfan/100 g

vücut ağırlığı ve Grup IV'te altı ayda 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı dozlarında endosulfan almışlardır.

4.1. Vücut Ağırlıkları ile İlgili Bulgular

Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan her bir farenin vücut ağırlıkları her ayın birinde ölçülmüş ve vücut ağırlıklarının değişimi Çizelge 19 ve 20'de verilmiştir.

Çizelge 19. Dört grupta incelenen farelerin çeşitli zaman periyodundaki vücut ağırlıklarının (g) istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%C.V.))

		Zaman (ay)						
		Başlangıç (0)	1.	2.	3.	4.	5.	6
Grup I (n:15)	X	31.1	31.6	32.2	32.6			
	SD	4.0	4.0	3.6	3.6			
	%C.V.	13.1	12.8	10.7	11.3			
Grup II (n:15)	X	32.6	33.1	33.3	33.1			
	SD	4.5	4.5	4.5	4.8			
	%C.V.	13.7	13.8	13.5	14.7			
Grup III (n:15)	X	31.8	32.1	32.4	33.0	33.2	33.8	34.0
	SD	4.4	4.4	4.5	4.4	4.6	4.4	4.6
	%C.V.	13.9	13.8	13.9	13.4	13.9	13.0	13.7
Grup IV (n:15)	X	33.1	33.2	33.6	33.4	33.1	33.1	32.8
	SD	3.0	3.1	2.9	3.0	2.8	2.6	3.0
	%C.V.	9.3	9.4	8.6	9.1	8.4	7.8	9.2

Çizelge 20. Vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri

Gruplar	p değerleri						
	P0 (başlangıç)	P1 (1.ay)	P2 (2.ay)	P3 (3.ay)	P4 (4.ay)	P5 (5.ay)	P6 (6.ay)
* I-II	0.161	0.152	0.537	0.768			
* III-IV	0.584	0.770	0.660	0.967	0.835	0.505	0.337
* II- IV	0.389	0.769	0.585	0.801			
* I- III	0.056	0.217	0.217	0.305			

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Vücut ağırlıklarının gruplar arasında başlangıç ayında ve diğer aylarda anlamlı farklılıklar göstermediği saptanmıştır.

4.2. Karaciğer Ağırlıkları ile İlgili Bulgular

Üç ve altı ay süreyle pestisit uygulanan hayvanlar süre sonunda kontrol gruplarıyla birlikte kesilmiş ve karaciğerleri çıkartılmıştır. Karaciğer ağırlıkları tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Çizelge 21'de her bir grupta yer alan hayvanların karaciğer ağırlıklarının istatistiksel sonuçları verilmiştir.

Çizelge 21. Dört grubun karaciğer ağırlıklarına ait istatistiksel sonuçlar (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%C.V.) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)

Gruplar	n	Karaciğer Ağırlıkları (g)		p değerleri
		X±SD	%C.V.	
I	15	0.621±0.206 ¹	33.1	p _{1,2} : 0.000*
II	15	1.144±0.296 ²	25.8	p _{2,4} : 0.756
III	15	0.864±0.210 ³	24.3	p _{3,4} : 0.001*
IV	15	1.179±0.270 ⁴	22.9	p _{1,3} : 0.840

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Üç ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup II) ile üç ay süreyle normal yem uygulanan grup (Grup I) karşılaştırıldığında, Grup II'nin karaciğer ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar saptanmıştır. Altı ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup IV) ile altı ay süreyle normal yem uygulanan grup (Grup III) karşılaştırıldığında, Grup IV'in karaciğer ağırlığında anlamlı artışlar saptanmıştır.

4.3. Hepato/Somato İndeks ile İlgili Bulgular

Pestisit uygulanan gruplarda karaciğer ağırlığının artması (Çizelge 21) nedeniyle hepato/somato indeks çalışmaları yapılmıştır. Karaciğer ağırlığının vücut ağırlığı oranına hepato/somato indeks denilmektedir. Çizelge 22'de dört grupta incelenen farelerin hepato/somato indekslerin istatistiksel sonuçları verilmiştir.

Çizelge 22. Hepato/Somato indekslerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%C.V.) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)

Gruplar	n	Hepato/Somato İndeksleri		
		X±SD	% C.V.	p değerleri
I	15	0.018±0.007 ¹	38.8	p _{1,2} : 0.000*
II	15	0.034±0.010 ²	29.4	p _{2,4} : 0.983
III	15	0.025±0.008 ³	32.0	p _{3,4} : 0.009*
IV	15	0.035±0.010 ⁴	28.5	p _{1,3} : 0.055

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Üç ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup II) ile üç ay normal yem uygulanan grup (Grup I) karşılaştırıldığında, Grup II'in hepato/somato indekslerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Altı ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup IV) ile altı ay normal yem uygulanan grup (Grup III) karşılaştırıldığında, Grup III'in hepato/somato indekslerinde anlamlı artışlar saptanmıştır.

4.4. Total Meme Ağırlıkları ile İlgili Bulgular

Pestisit ve normal yem uygulanan gruplardaki hayvanlar servikal dislokasyon tekniği ile öldürülerek memeleri tek tek çıkartılmıştır. Bu hayvanların herbirinde total meme ağırlıkları ölçülmüş ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Çizelge 23'de her bir grupta yer alan hayvanların total meme ağırlıklarının istatistiksel sonuçları verilmiştir.

Çizelge 23. Total meme ağırlıklarının istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%C.V.) ve gruplar arası karşılaştırma (Mann-Whitney-U testi) ile elde edilen p değerleri)

Gruplar	n	Total Meme Ağırlıkları (g)		
		X±SD	% C.V.	p değerleri
* I	15	0.211±0.057 ¹	27.0	p _{1,2} : 0.054
* II	15	0.172±0.052 ²	30.2	p _{2,4} : 0.093
* III	15	0.204±0.062 ³	30.3	p _{3,4} : 0.950
* IV	15	0.203±0.045 ⁴	22.1	p _{1,3} : 0.936

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Pestisitli ve normal yem uygulanan gruplar arasında total meme ağırlıklarının anlamlı farklılıklar göstermediği Mann-Whitney-U testi ile saptanmıştır.

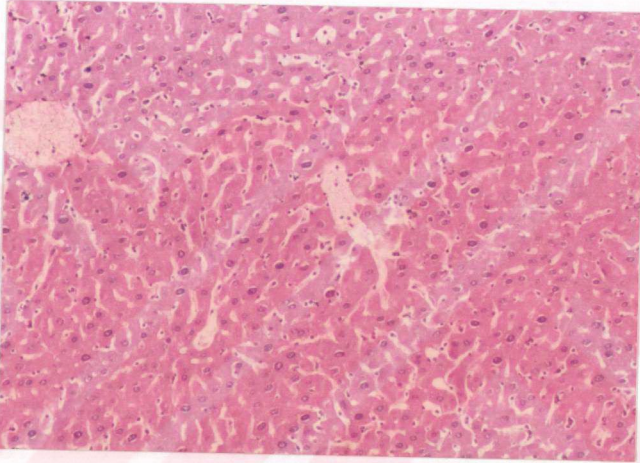
4.5. Karaciğer ve Meme Dokuları ile İlgili Histopatolojik Bulgular

4.5.1. Işık Mikroskopik Düzeyde

4.5.1.1. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

4.5.1.1.1. Üç ve Altı Ay Süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar

Bu gruplarda (Grup I ve III) normal görünümlü olgular ve bazı non-spesifik değişiklikler gözlenen olgulara rastlanmıştır. Bu gruba ait normal karaciğer olgusu Şekil 13'te gösterilmiştir.

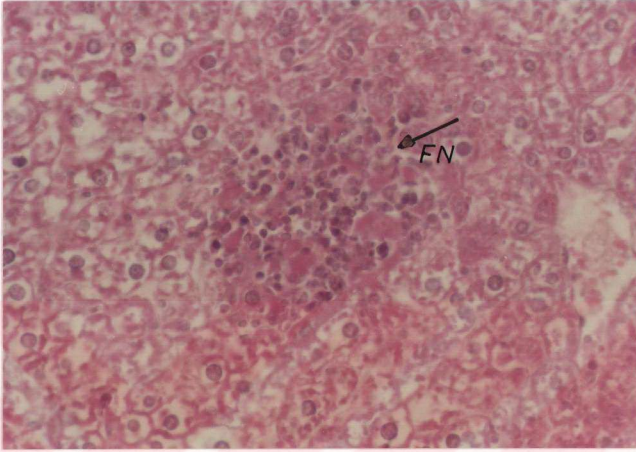


Şekil 13. Normal yem uygulanan gruplarda karaciğer histopatolojisi

4.5.1.1.2. Üç Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup

Hemen hemen tüm olgularda (Grup II) nonspesifik reaktif hepatit ve 4 olguda kolanjit izlenmiştir. Bu olgularda izlenen morfolojik bulgulara ek olarak portal alanlarda yoğun mikst tipte iltihabi hücre infiltrasyonu, safra kanalikülleri içerisinde safra gölcükleri görülmüştür. Portal alanlarda izlenen iltihap hücrelerinin yer yer safra duktus epitellerine ilerlediği dikkati çekmiştir. Parakimde belirgin inflamatuvar değişiklikler (confluent nekroz dejenerasyon) farkedilmiş olup bu olgularda ayrıca intrasitoplazmik glikojen

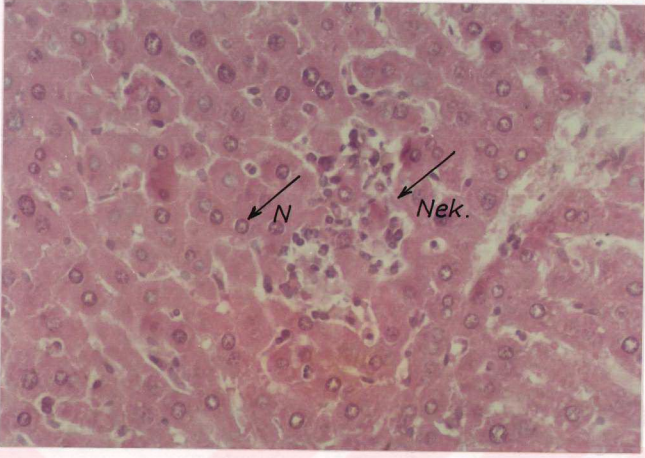
partiküllerinde kabalaşma ve glikojen kaybı gözlenmiştir. Bu gruba ait olgu Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. Üç ay süreyle pestisit uygulanan grupların karaciğer histopatolojisi. Olguların karaciğer dokusunda fokal nekroz (FN). Hematoksilen-eosin x200

4.5.1.1.3. Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup

Hemen hemen tüm olgularda (Grup IV) nonspesifik reaktif hepatit şeklinde yorumlanabilecek değişiklikler görülmüştür. Bu olgularda portal alanlarda mononükleer hücrelerin hakim olduğu mikst tipte iltihabi hücre infiltrasyonu, parakimde tek hücre nekrozları, asidofil cisimcikler, hafif-orta derecede rejenerasyon bulguları, santurlobüler kolestozis dikkati çekmiştir. Bu gruba ait olgu Şekil 15'de gösterilmiştir.

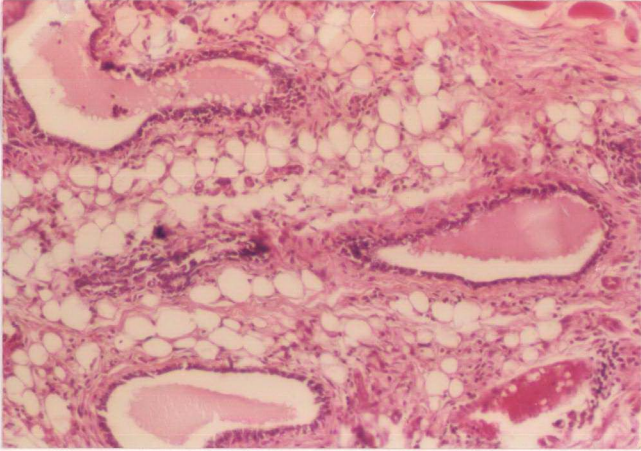


Şekil 15. Altı ay süreyle pestisit uygulanan grupların karaciğer histopatolojisi. Olguların karaciğer dokusunda tek hücre nekrozu (Nek) ve hepatosit nükleuslarında veziküler görünüm (N). Hematoksilen-eosin x200

4.5.1.2. Meme Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

4.5.1.2.1. Üç ve Altı Ay Süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar

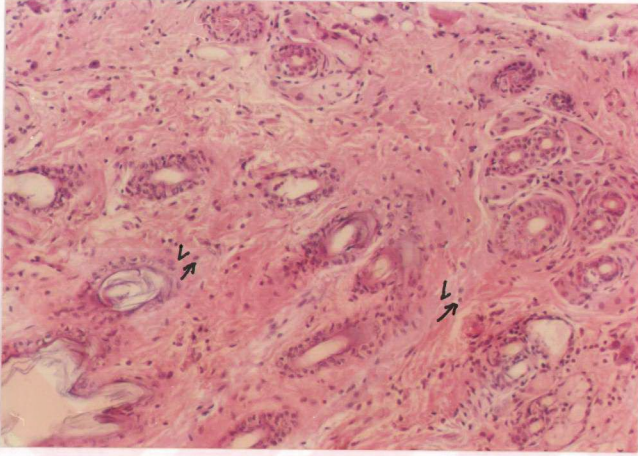
Bu gruplarda (Grup I ve III) normal görümlü olgulara rastlanmıştır. Bu gruba ait normal meme olgusu Şekil 16 'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Normal yem uygulanan gruplarda meme histopatolojisi.

4.5.1.2.2. Üç ve Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Gruplar

Hemen hemen tüm olguların (Grup II ve IV) meme dokusu stromasında dağınık lenfoplazmositer iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekmiştir. Bu gruba ait olgu Şekil 17'de verilmiştir.



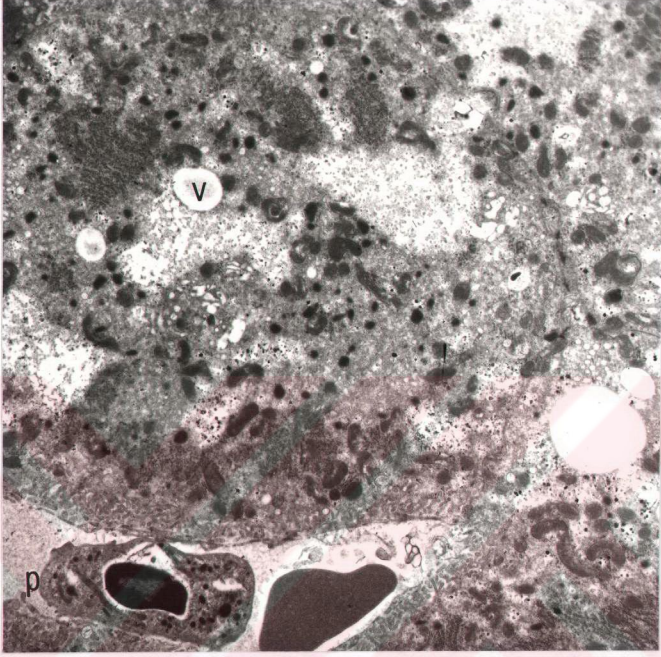
Şekil 17. Üç ve altı ay süreyle pestisit uygulanan gruplarda meme histopatolojisi. Lenfosit infiltrasyon (L). Hematoksilen-eosin x200

4.5.2. Elektron Mikroskopik Düzeyde

4.5.2.1. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

4.5.2.1.1. Üç ve Altı Ay süreyle Normal Yem Uygulanan Gruplar

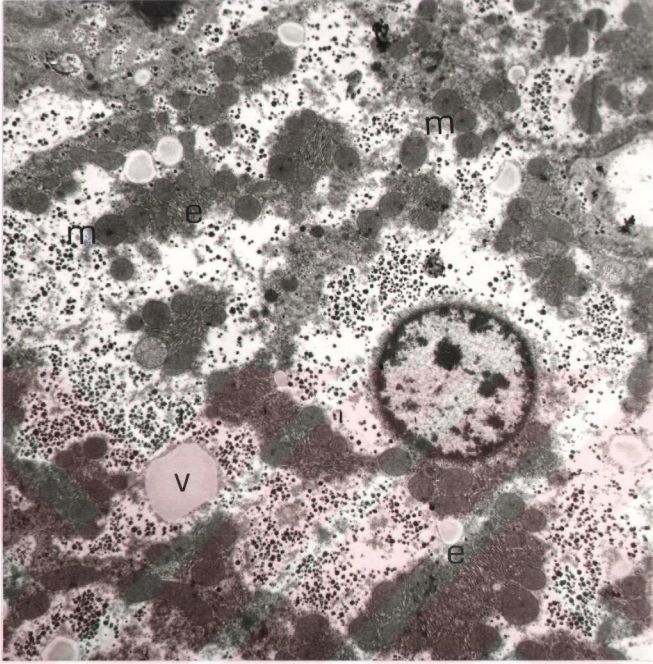
Gruplarda (Grup I ve III) hepatositlerin normal ince yapıları korunmuş olup mitokondriümları doğal görünümündedir. Seyrek intrasitoplazmik yağ vakuolleri mevcuttur. Endoplazmik retikulum normal görünümündedir. Bu gruba ait normal karaciğer olgusu Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Normal yem uygulanan gruplara ait karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü. Polimorfnüveli lökosit (p), Yağ vakuolü (v). uramil-asetat/kurşun sitrat x6000

4.5.2.1.2. Üç Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup

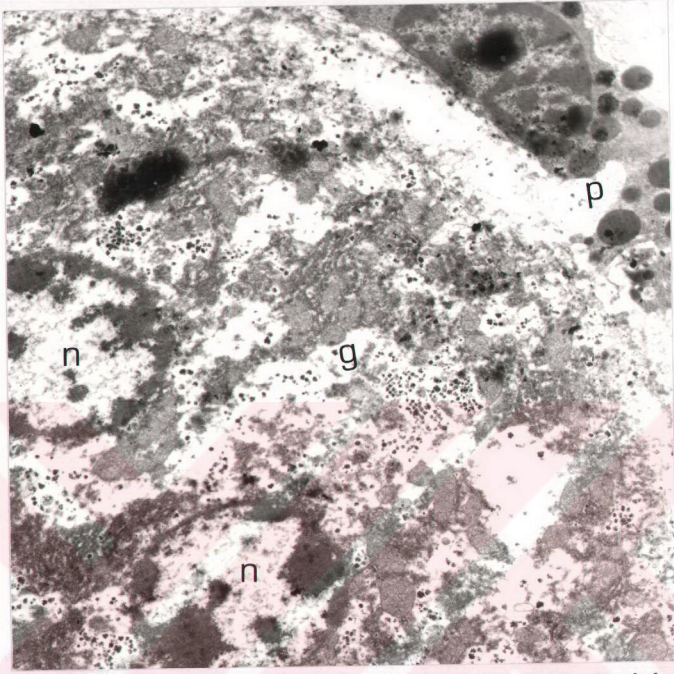
Olguların (Grup II) elektron mikroskopik incelenmesinde, hepatositlerde sitoplazmik membranların intakt olduğu görüldü. Hücrelerde şişme izlenirken çeşitli çaplarda lipit vakuelleri dikkati çekti. Mitokondrial hasar izlenmedi. Bazı mitokondriumlarda küçük amorf madde birikimi mevcuttu. Endoplazmik retikulumda artış, bazı hepatositlerde safra pigmenti ile uyumlu madde izlendi. Bu bulgular ciddi hepatosit zedelenmesini temsil etmektedir. Yağlı dejenerasyon, şişme ve mitokondrial küçük amorf materyaller hafifi şiddette bir zedelenmenin mevcudiyetini temsil etmektedir. Bu gruba ait normal karaciğer olgusu Şekil 19' da gösterilmiştir.



Şekil 19. Üç ay süreyle pestisit uygulanan gruba ait karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü. Lipit vakuolü (v), Endoplazmik retikulum (e), Mitokondrium (m). uramil-asetat/kurşun sitrat x6000

4.5.2.1.3. Altı Ay Süreyle Pestisitli Yem Uygulanan Grup

Olguların (Grup IV) elektron mikroskopik incelenmesinde, sinüzoidlerde polimorfnüveli lökositler, hepatosit membranında düzensizlik, hepatositte şişme ve yağ vakuolleri izlenmiştir. Glikojen partikülleri azalmıştır. Bazı hepatositlerde mitokondriumlarda şişme ve yapısal bozukluklar izlenmektedir. Hepatositlerin bazıları çift nükleus içermektedir. Bazı hepatositler nekrotiktir. Bu gruba ait normal karaciğer olgusu Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. Altı ay süreyle pestisit uygulanan gruba ait karaciğer doku örneğinin ince yapı düzeyinde görünümü. Glikojen partikülü (g), Nükleus (n), polimorfnüveli lökosit (p). uramil-asetat/kurşun-sitrat x8800

Sonuç olarak, elektron mikroskopik düzeyde normal yem uygulanan gruplarda (Grup I ve III) sinüzoidlerde seyrek polimorfnüveli lökositler (PMNL) izlenmiştir. İzlenen az sayıda yağ vakuolleri beslenmeye bağlı olabilir. Seyrek PMNL'lerin mevcudiyeti non-spesifik olarak değerlendirilmiştir. Hepatositlerde ileri dejenerasyon bulgusu bu olgularda izlenmemektedir. Altı ay pestisit uygulanan gruptaki (Grup IV) endoplazmik retikulum hiperplazisi, üç ay pestisit uygulanan gruba (Grup II) kıyasla belirgin değil fakat altı ay pestisit uygulanan grupta, hepatosit dejenerasyonu daha ileri olduğu gözlenmiştir.

4.5.2.2. Meme Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

Meme dokularının ışık mikroskopik düzeyde özellikle pestisit uygulanan gruplarda ağır patolojik görünüm çıkmaması sebebiyle elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi yapılmamıştır.

4.6. Hematolojik Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi

Çalışmamızda, anaç *M. musculus* tam kanında WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeyleri ile ilgili referans değerleri belirlemek için dört grubun (Grup I, II, III ve IV) toplamından oluşan 60 bireyin başlangıç kanlarından ölçülen hematolojik veriler değerlendirmeye alınmıştır. Çizelge 24'de her bir grubun hematolojik verilerinin istatistiksel analiz sonuçları gösterilmiştir. Referans değerlerinin belirlenmesi için dört grubun başlangıç kanlarından ölçülen her bir hematolojik parametrenin toplam verileri alınmış ve istatistiksel analizleri yapılmıştır. Çizelge 25'de hematolojik verilerde referans değerlerin belirlenmesi ile ilgili istatistiksel analiz sonuçları gösterilmiştir. Bunun yanısıra, ölçülen her bir parametre değerinin normal dağılım gösterip göstermediğini test etmek için Shapiro-Wilkens istatistiksel test uygulanmıştır. Bu teste göre, p değerinin 0.05'den büyük olduğunda normal dağılım gösterdiği kabul edilmektedir. Normal dağılım eğrileri değerlerin -logaritmasını almadan yada -logaritmasını alarak çizilebilmektedir. Şekil 21'de her bir hematolojik verinin normal dağılım eğrisi görülmektedir.

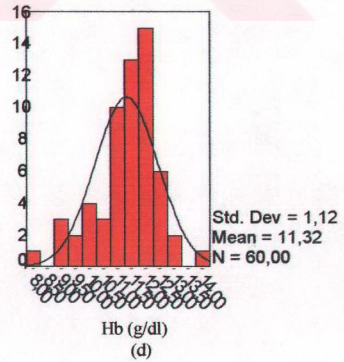
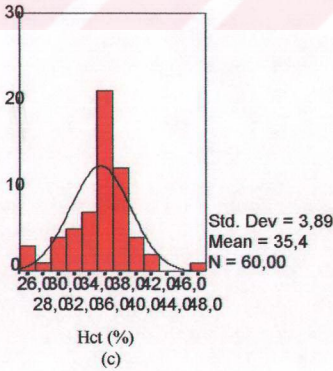
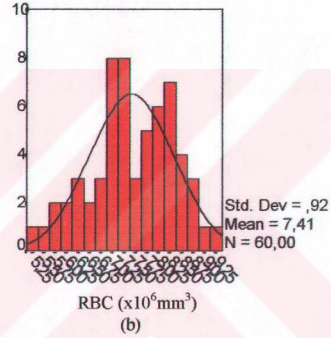
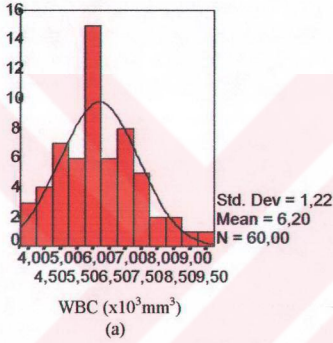
Çizelge 24. Dört grubun deney öncesi (Başlangıç) alınan kanlardaki hematolojik verilerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X) ve standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%C.V.))

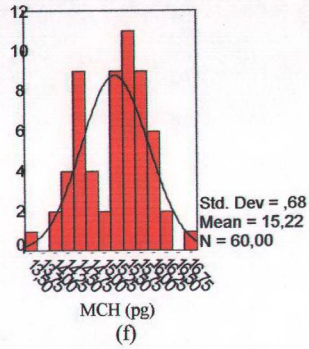
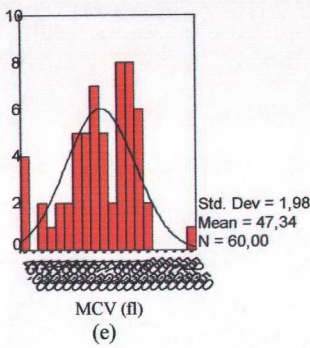
		WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
Grup I	X±SD	6.0±1.1	7.30±0.90	11.0±1.1	34.7±4.3	47.5±1.8	15.1±0.5
	% C.V.	18.3	12.3	10.0	12.3	3.7	3.3
Grup II	X±SD	6.3±1.1	7.22±1.13	11.1±1.5	34.9±4.6	48.1±1.1	15.3±0.5
	%C.V.	17.4	15.6	13.5	13.1	2.2	3.2
Grup III	X±SD	6.2±1.2	7.78±0.73	11.7±0.7	35.9±2.3	46.2±1.8	15.1±0.7
	%C.V.	19.3	9.3	5.9	6.4	3.8	4.6
Grup IV	X±SD	6.2±1.4	7.46±0.70	11.4±0.6	35.2±2.2	47.2±2.2	15.2±0.8
	%C.V.	22.5	9.3	5.2	6.2	4.6	5.2

Her bir grup 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 25. Hematolojik verilerde referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları

	n	X	SD	SE	Medyan	min-max	range	%95 güvenirlilik aralığı
WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	60	6.20	1.21	0.15	6.00	4.0-9.6	5.6	3.78-8.62
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	60	7.41	0.91	0.11	7.38	5.17-9.16	3.99	5.59-9.23
Hb (g/dl)	60	11.31	1.12	0.14	11.45	8.2-14.2	6.0	9.07-13.55
Hct (%)	60	35.44	3.88	0.50	35.60	25.7-48.4	22.7	27.68-43.20
MCV (fl)	60	47.33	1.97	0.25	47.45	43.0-52.3	9.30	43.39-51.27
MCH (pg)	60	15.22	0.68	0.08	15.30	13.4-16.8	3.4	13.86-16.58





Şekil 21. Hematolojik verilerinde normal dağılım eğrileri. WBC (a), RBC (b), Hct (c), Hb (d), MCV (e) ve MCH (f) değerlerinin -logaritmasını almaya gerek olmaksızın normal dağılım gösterdiği ($p>0,05$) Shapiro-Wilkens test ile saptanmıştır.

4.6.1. Hematolojik Verileri ile İlgili Deneysel Bulgular

Farelerden deney öncesi kanlar kuyruktan, deney sonrası kalpten alınmıştır. Dört grupta incelenen farelerin deney sonrası kanlardaki hematolojik verilerin istatistiksel sonuçları Çizelge 26 ve 27'de gösterilmiştir. Çizelge 25'de gösterildiği gibi, dört grubun (60 fare bireyi) deney öncesi alınan kanlarda ölçülen hematolojik verilerinden tek bir kontrol grubu oluşturulmuş, aynı zamanda deneysel grupların her biri ile karşılaştırılmıştır. Bu şekilde oluşturulan kontrol grubu ile pestisitli gruplar arasındaki hematolojik verilerindeki değişimler Şekil 22'de gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, üç ve altı ay sürelerle pestisit uygulanan farelerin periferik yaymalarında normal yem uygulanan gruplara kıyasla lenfosit ve nötrofil sayılarında artış olduğu saptanmıştır. Pestisit uygulanan gruplarda eritrosit morfolojisi normal görünümde izlenmiştir. Pestisit ve normal yem uygulanan farelerde kan hücreleri Şekil 23 ve 24'te gösterilmiştir.

Çizelge 26. Dört grubun deney sonrası alınan kanlarda hematolojik verilerin istatistiksel sonuçları (ortalama (X) ve standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%C.V.))

		WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
Grup I	X \pm SD	6.0 \pm 1.2	7.00 \pm 1.16	10.5 \pm 1.8	33.8 \pm 5.7	48.2 \pm 1.1	14.9 \pm 0.4
	%C.V.	20.0	16.5	17.1	16.8	2.2	2.6
Grup II	X \pm SD	18.5 \pm 2.9	4.86 \pm 0.9	5.7 \pm 1.1	15.3 \pm 3.9	31.1 \pm 3.9	11.8 \pm 1.1
	%C.V.	15.6	18.5	19.2	25.4	12.5	9.3
Grup III	X \pm SD	5.3 \pm 0.7	7.87 \pm 0.93	11.8 \pm 0.8	35.7 \pm 3.6	45.4 \pm 2.0	15.0 \pm 1.1
	%C.V.	13.2	11.8	6.7	10.0	4.4	7.3
Grup IV	X \pm SD	8.5 \pm 1.8	6.63 \pm 1.20	9.4 \pm 2.2	26.2 \pm 8.5	38.7 \pm 8.5	14.0 \pm 1.4
	%C.V.	21.1	18.0	23.4	32.4	21.9	10.0

Her bir grup 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 27. Dört grubun deney öncesi ve sonrası her bir hematolojik verinin grup içinde karşılaştırılması (Wilcoxon test) ile elde edilen p değerleri

Gruplar	WBC P(ö.s.)	RBC P(ö.s.)	Hb P(ö.s.)	Hct P(ö.s.)	MCV P(ö.s.)	MCH P(ö.s.)
I	0.691	0.670	0.551	0.820	0.053	0.393
II	0.001*	0.001 ⁺	0.001 ⁺	0.001 ⁺	0.001 ⁺	0.001 ⁺
III	0.053	0.820	0.798	0.910	0.256	0.798
IV	0.003*	0.023 ⁺	0.004 ⁺	0.004 ⁺	0.017 ⁺	0.008 ⁺

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

* Pestisitli grupların deney sonrasında başlangıça kıyasla, WBC düzeylerinde anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır.

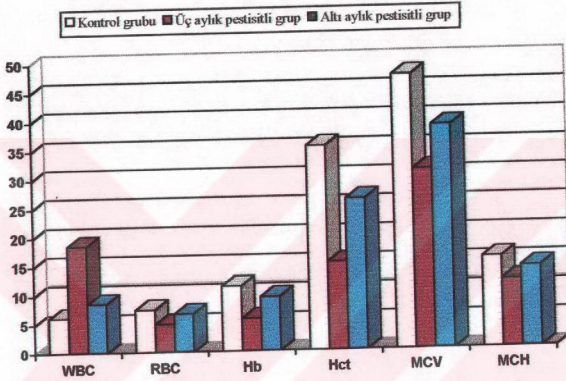
⁺Pestisitli grupların deney sonrasında başlangıça kıyasla, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı düşüşler gösterdiği saptanmıştır.

Deney öncesi ve sonrası hematolojik verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Deney öncesinde WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği (p>0.05) saptanmıştır. Deney sonrasında her bir parametre için gruplar karşılaştırıldığında;

Üç ay pestisitli yem uygulanan grupta (Grup II), üç ay normal yem uygulanan gruba (Grup I) kıyasla RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı düşüş, WBC düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır. Altı ay pestisitli yem uygulanan grupta (Grup IV), altı ay normal yem uygulanan gruba (Grup III) kıyasla RBC, Hb ve Hct düzeylerinde anlamlı düşüşler saptanırken MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı değişimler gözlenmemiştir. Bunun yanısıra WBC düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Üç aylık

pestisit uygulanan grupta (Grup II), altı ay yem uygulanan gruba kıyasla RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı derecede azalma ve WBC düzeyinde anlamlı derecede artış saptanmıştır. Kontrol grupları (Grup I ve III) birbirleri ile karşılaştırıldığında WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde anlamlı farklılıklar göstermediği ($p>0.05$) saptanmıştır.

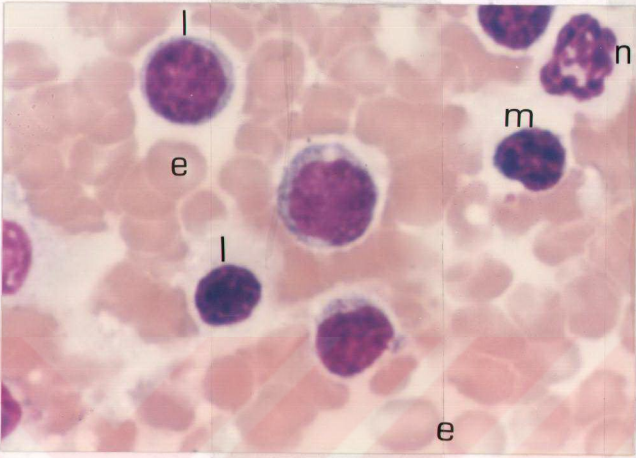


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

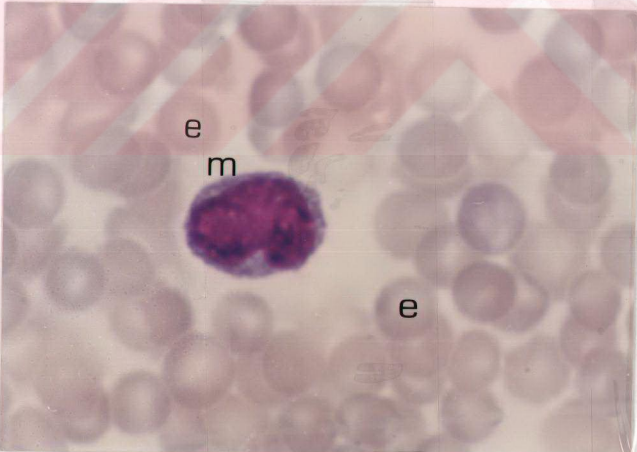
Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 22. Kontrol ve pestisitli gruplarda hematolojik verilerin değişimi.



Şekil 23. Normal yem uygulanan farelerin kan hücreleri. Lenfosit (l), eritrosit (e), monosit (m), nötrofil (n). Gimsa x100



Şekil 24. Pestisit uygulanan farelerin kan hücreleri. Monosit (m), eritrosit (e). Gimsa x100

4.7. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerinin Belirlenmesi

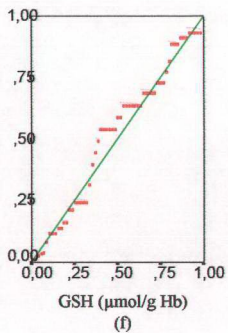
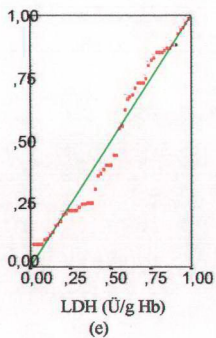
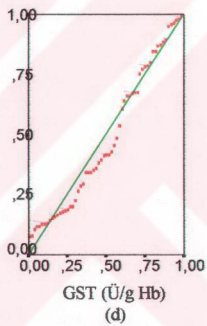
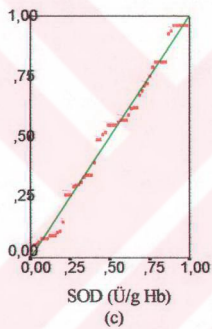
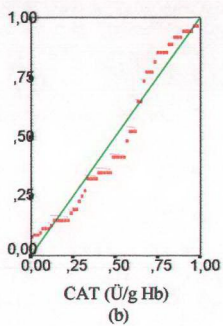
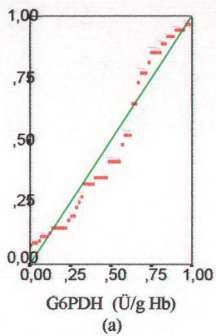
Dört grubun toplamından oluşan 60 fare bireyin başlangıç kanları EDTA'lı tüplere konuldu. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri için referans değerler belirlemek için istatistiksel çalışmalar yapıldı ve sonuçlar Çizelge 28'de verilmiştir.

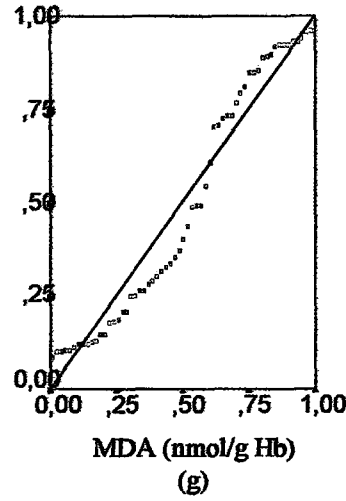
Ölçülen parametre değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilks test (normality test) kullanılmıştır. Değerlerin normal dağılım göstermesi için, test sonucu elde edilen p değerinin 0.05'den büyük olması gerekmektedir. Normal dağılım eğrileri, değerlerin -logaritması alınmadan ve -logaritması alınarak çizilebilmektedir. Şekil 25'de eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeylerinin normal dağılım eğrileri verilmiştir.

Çizelge 28. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ilgili referans değerlerinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel sonuçlar

	n	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	%95 güvenirlilik aralığı
G6PDH	60	19.31	4.92	0.63	18.0	20.1	10.4-30.5	9.47-29.15
CAT	60	2.31	1.04	0.13	2.30	3.40	0.8-4.2	0.23-4.39
SOD	60	1620.80	409.4	52.85	1520	1500	1000-2500	802.0-2439.6
GST	60	8054.31	1403.65	181.21	8255	5300	5000-10300	5247.12-10861.52
LDH	60	277.60	44.53	5.75	285	203	187-390	188.6-366.6
GSH	60	4.17	0.88	0.11	3.95	3.30	3.0-6.3	2.41-5.93
MDA	60	680.70	217.49	28.08	710	670	350-1020	245.72-1115.68

G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri \bar{U}/g Hb, GSH düzeyi $\mu\text{mol}/g$ Hb ve MDA düzeyi nmol/g Hb birimleri olarak verilmiştir.





Şekil 25. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin normal dağılım eğrileri. G6PDH (a), CAT (b), SOD (c), GST(d) ve LDH (e) aktivitelerinin, GSH (f) ve MDA (g) düzeylerinin değerlerinin -logaritması alınarak normal dağılım gösterdiği ($p>0.05$) Shapiro-Wilkens analizi ile saptanmıştır.

4.7.1. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktivitelerinin, GSH ve MDA Düzeylerinin Intra-inter Individual Varyasyonlar ile İlgili Bulgular

Grup I ve III arasında her bir parametre yönünden anlamlı farklılıklar olmadığı ($p>0.05$) Mann-Whitney-U testi ile saptanmıştır. Kontrol gruplarında (Grup I ve III) her bir parametrenin aylar içinde gösterdikleri varyasyonların araştırılmasında, uzun süre takip edilen Grup III değerlendirilmeye alınmıştır.

4.7.1.1. Analitik Varyasyonlar

EDTA'lı tüpe alınan 0.5 ml kan aynı zaman aralığında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeylerinin çalışılması için ayrıldı (intra-assay). Intra assay analizlerinden elde edilen %C.V., analitik varyasyonun $\%CV_A$ 'sını vermektedir. Çizelge 29'da intra-assay analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 29. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin aynı örnekte ve aynı zamanda yapılan ölçümü (intra-assay) sonuçları

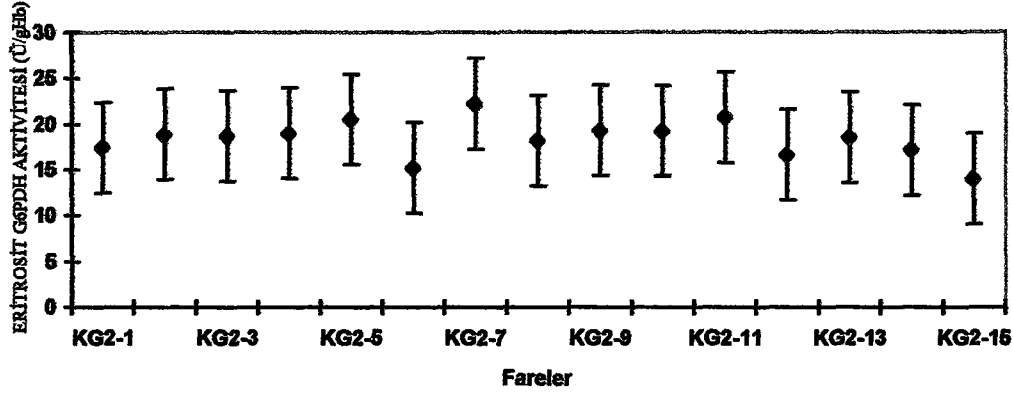
	G6PDH (\bar{U}/g Hb)	CAT ($\times 10^4 \bar{U}/g$ Hb)	SOD (\bar{U}/g Hb)	GST (\bar{U}/g Hb)	LDH (\bar{U}/g Hb)	GSH ($\mu\text{mol}/g$ Hb)	MDA (nmol/g Hb)
X	20.17	3.42	1857.9	5792.5	284.3	4.9	1021.3
SD	0.24	0.48	114.9	529.2	6.0	0.2	48.6
%C.V.	1.19	14.1	6.18	9.13	2.11	4.12	4.75

4.7.1.2. Intra-inter Individual Varyasyonlar

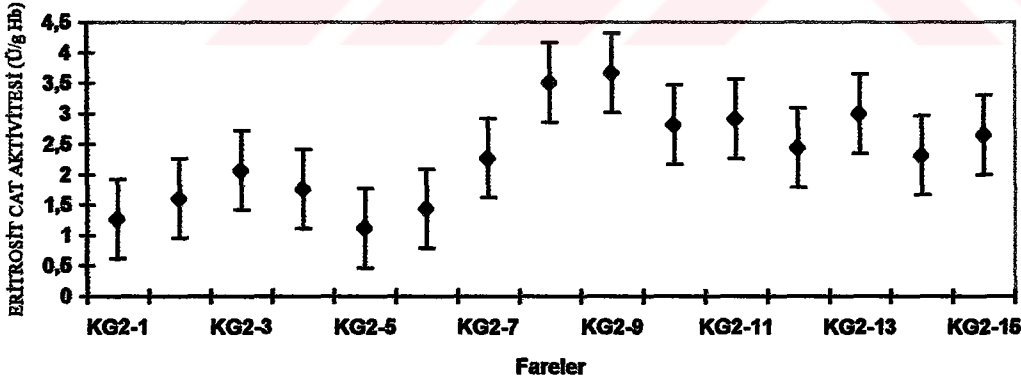
15 bireyin kuyruktan ve her ay belirli zaman aralığında alınan 7 kan örneğinde eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri çalışıldı. Intra ve inter individual varyasyonlar varyans analizi (ANOVA) ile saptanmıştır. Çizelge 30'da 15 sağlıklı bireyin varyasyonları gösterilmiştir. 15 bireyin intra-individual varyasyonlarında elde edilen %C.V., %CV_I'yi vermektedir. Şekil 26, 27, 28, 29, 30, 31 ve 32'de G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin aylar içinde (intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar verilmiştir.

Çizelge 30. Sağlıklı bireylerde eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitesinin, GSH ve MDA düzeylerinin aylar içinde gösterdikleri varyasyonlar

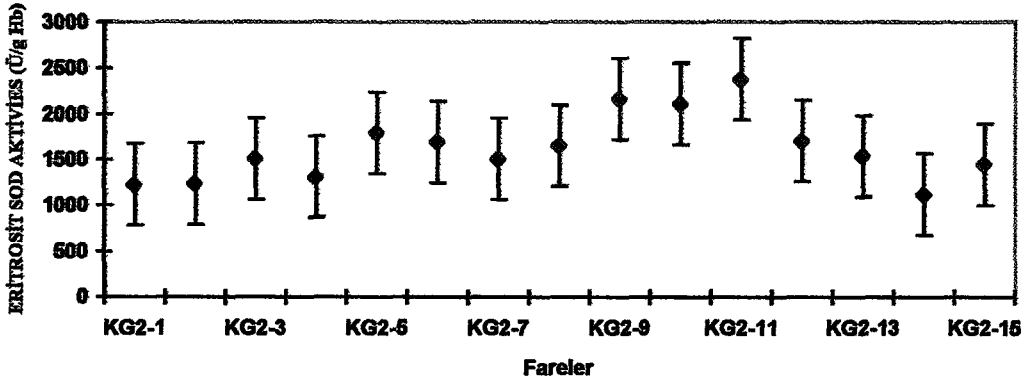
		G6PDH (Ü/g Hb)	CAT (x10 ⁴ Ü/g Hb)	SOD (Ü/g Hb)	GST (Ü/g Hb)	LDH (Ü/g Hb)	GSH (µmol/g Hb)	MDA (nmol/g Hb)
Analitik varyasyon	CV _A	1.19	14.09	6.18	9.13	2.11	4.12	4.75
Bireyin kendi içinde (Intra-individual) varyasyon	CV _I	22.51	23.03	11.12	12.00	16.45	23.40	9.03
Bireyler arasında (Inter-individual) varyasyon	CV _G	7.38	29.42	21.14	12.58	11.27	11.20	31.55
Tekrarlanabilirlik (Analitik goal)	1/2 CV _I	11.25	11.51	5.56	6.00	8.22	11.70	4.51
Kişisel indeks (Index of individuality)	CV _I /CV _G	3.05	0.78	0.52	0.95	1.45	2.08	0.28
Kritik farklılık (Critical difference)	2.77 (CV _A ² +CV _I ²) ^{1/2} %	62.43	74.78	35.23	41.76	45.93	65.81	28.26



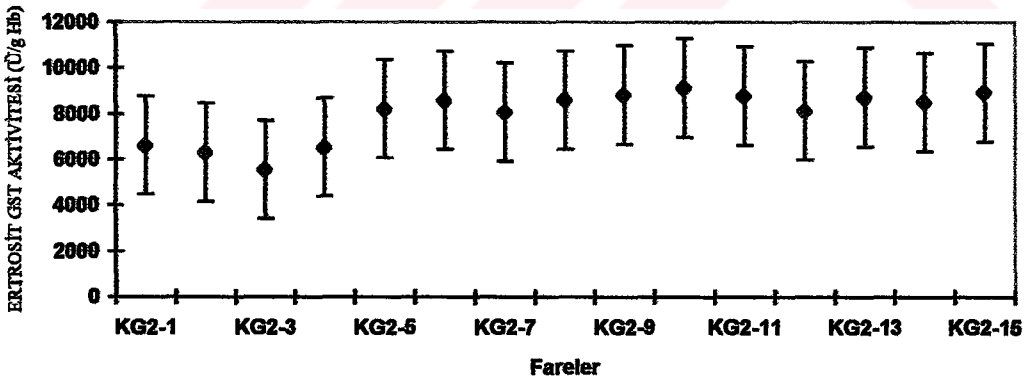
Şekil 26. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen G6PDH aktivitesinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



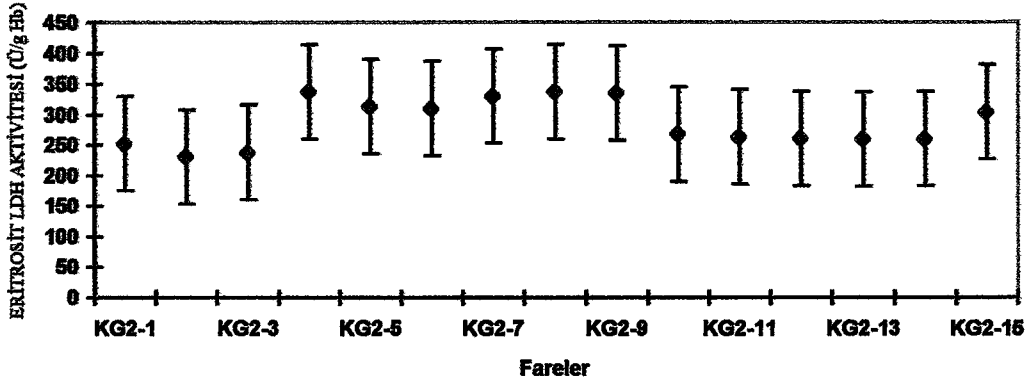
Şekil 27. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen CAT aktivitesinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



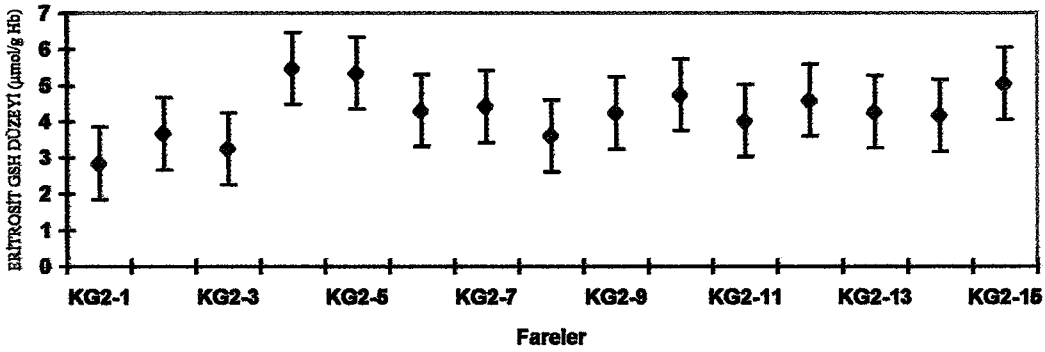
Şekil 28. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen SOD aktivitesinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



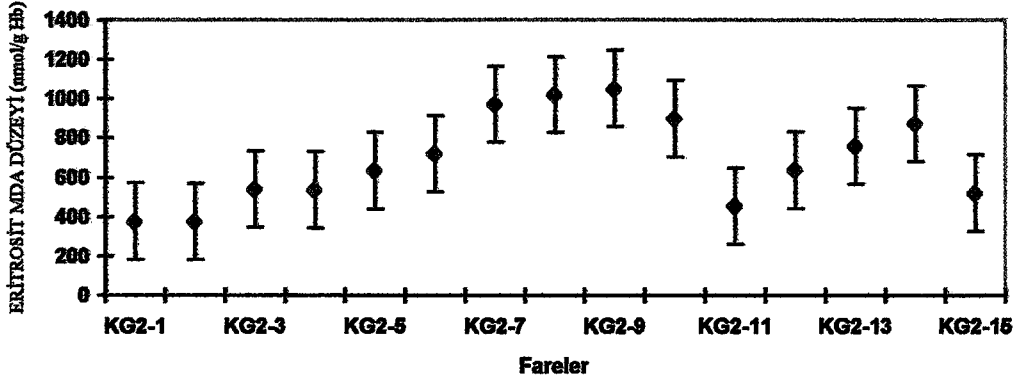
Şekil 29. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen GST aktivitesinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



Şekil 30. 15 kontrol bireyde (Grup III) başlanğıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen LDH aktivitesinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



Şekil 31. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlanğıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen GSH düzeyinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar



Şekil 32. Kontrol bireylerinde (Grup III) başlangıç (0), 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen MDA düzeyinin (X; ortalama) her bireyin kendi içinde (Intra-individual) gösterdikleri varyasyonlar

4.7.2. Eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Deneysel Bulgular

Pestisitli yem uygulanan gruplarda ve aynı sürelerde normal yem uygulanan gruplarda deney öncesi (başlangıç) ve uygulama süresince kanlar her ayın ilk gününde kuyruktan alınmıştır. Deney sonrası ise kalpten alınmıştır. Bu şekilde hayvanlardan alınan kanlarda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH enzim aktivitelerinde, GSH ve MDA seviyelerindeki değişimler Çizelge 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 ve 38’de gösterilmiştir.

Çizelge 31. Grup I'de (kontrol grubu) antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%C.V.))

		Zaman (ay)			
		Başlangıç (0)	1.	2.	3.
G6PDH (Ü/g Hb)	X	17.9	20.9	18.2	19.9
	SD	5.0	7.1	5.5	4.5
	%C.V.	27.9	33.9	30.2	22.6
CAT (x10 ⁴ Ü/g Hb)	X	2.3	2.1	2.4	2.5
	SD	1.0	0.9	0.8	0.9
	%C.V.	43.4	42.8	33.3	36.0
SOD (Ü/g Hb)	X	1669.3	1587.8	1631.6	1661.6
	SD	428.9	353.6	445.6	359.2
	%C.V.	25.6	22.2	27.3	21.6
GST (Ü/g Hb)	X	8135.0	7662.0	8361.3	7808.6
	SD	1359.8	1654.1	1173.8	2009.4
	%C.V.	16.7	21.5	14.0	25.7
LDH (Ü/g Hb)	X	262.6	268.2	265.0	257.2
	SD	43.0	74.9	44.9	50.0
	%C.V.	16.3	27.9	16.9	19.4
GSH (µmol/gHb)	X	4.2	3.4	4.4	4.0
	SD	0.9	1.8	0.9	1.3
	%C.V.	21.4	52.9	20.4	32.5
MDA (nmol/gHb)	X	660.7	646.6	695.2	500.6
	SD	243.4	238.6	218.8	242.9
	%C.V.	36.8	36.9	31.4	48.5

Grup I; 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 32. Grup I'in (kontrol grubu) grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon test) ile elde edilen p değerleri

	p değerleri		
	P ₀₋₁	P ₀₋₂	P ₀₋₃
^a G6PDH (Ü/g Hb)	0.105	0.932	0.293
^B cat (x10 ⁴ Ü/g Hb)	0.395	0.408	0.589
^c SOD (Ü/g Hb)	0.158	0.861	0.650
^d GST (Ü/g Hb)	0.096	0.191	0.570
^e LDH (Ü/g Hb)	0.820	0.701	0.901
^f GSH (µmol/g Hb)	0.088	0.114	0.443
^g MDA (nmol/g Hb)	0.054	0.802	0.053

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

P₀₋₁: başlangıç ay (0) ile 1. ay arasında p değeri

P₀₋₂: başlangıç ay (0) ile 2. ay arasında p değeri

P₀₋₃: başlangıç ay (0) ile 3. ay arasında p değeri

^{a,b,c,d,e,f,g} G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin başlangıç ay ile 1., 2. ve 3. ay'lar arasında anlamlı farklılıklar göstermediği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

Çizelge 33. Grup II'de antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%C.V.))

		Zaman (ay)			
		Başlangıç (0)	1.	2.	3.
G6PDH (Ü/g Hb)	X	21.5	11.5	34.6	48.4
	SD	4.7	2.7	4.7	6.5
	%C.V.	21.8	23.4	13.5	13.4
CAT ($\times 10^4$ Ü/gHb)	X	2.3	1.9	1.5	0.8
	SD	1.2	0.8	0.7	0.3
	%C.V.	52.1	42.1	46.6	37.5
SOD (Ü/g Hb)	X	1691.4	2236.3	3449.5	5796.6
	SD	443.5	355.8	612.8	1289.4
	%C.V.	26.2	15.9	17.7	22.2
GST (Ü/g Hb)	X	8085.0	14769.3	11360.6	5896.0
	SD	1556.7	3499.9	2877.3	1497.1
	%C.V.	19.2	23.3	25.3	25.3
LDH (Ü/g Hb)	X	285.0	538.5	812.0	868.0
	SD	43.9	90.9	96.7	101.4
	%C.V.	15.4	16.8	11.9	11.6
GSH (μ mol/gHb)	X	3.9	2.1	1.7	1.1
	SD	0.7	1.0	0.8	0.5
	%C.V.	17.9	47.6	47.0	45.4
MDA (nmol/gHb)	X	671.7	1195.1	1392.6	1877.0
	SD	206.6	356.8	354.0	532.8
	%C.V.	30.7	29.8	25.4	28.3

Grup II; 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 34. Grup II'in grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon test) ile elde edilen p değerleri

	p değerleri		
	P ₀₋₁	P ₀₋₂	P ₀₋₃
^a G6PDH (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001
^b CAT (x10 ⁴ Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001
^c SOD (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001
^d GST (Ü/g Hb)	0.001	0.011	0.005
^e LDH (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001
^f GSH (µmol/g Hb)	0.001	0.001	0.001
^g MDA (nmol/g Hb)	0.001	0.001	0.001

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

p₀₋₁: başlangıç ay (0) ile 1. ay arasında p değeri

p₀₋₂: başlangıç ay (0) ile 2. ay arasında p değeri

p₀₋₃: başlangıç ay (0) ile 3. ay arasında p değeri

^a Başlangıca kıyasla, G6PDH aktivitesi 1. ay'da anlamlı düşüş, 2. ve 3. ay'da anlamlı artış gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

^b Başlangıca kıyasla, CAT aktivitesi 1., 2. ve 3. ay'da anlamlı düşüşler gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

^c Başlangıca kıyasla, SOD aktivitesi 1., 2. ve 3. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

^d Başlangıca kıyasla, GST aktivitesi 1. ve 2. ay'da anlamlı artış ve 3. ay'da anlamlı düşüş gösterdiği Wilcoxon testi ile saptanmıştır.

^e Başlangıca kıyasla, LDH aktivitesi 1., 2. ve 3. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

^f Başlangıca kıyasla, GSH düzeyi 1., 2. ve 3. ay'da anlamlı düşüşler gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

^g Başlangıca kıyasla, MDA düzeyi 1., 2. ve 3. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

Çizelge 35. Grup III'te (kontrol grubu) antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%C.V.))

		Zaman (ay)						
		Başlangıç (0)	1.	2.	3.	4.	5.	6.
G6PDH (Ü/g Hb)	X	19.3	18.8	18.9	17.6	18.7	16.4	18.8
	SD	4.6	5.4	5.3	3.5	4.3	3.4	3.3
	%C.V.	23.8	28.7	28.0	19.8	22.9	20.7	17.5
CAT (x10 ⁴ Ü/gHb)	X	2.2	2.3	2.3	2.2	2.6	2.3	2.5
	SD	1.0	1.1	0.9	0.8	0.9	0.1	0.8
	%C.V.	45.4	47.8	39.1	36.3	34.6	43.4	32.0
SOD (Ü/g Hb)	X	1555.8	1641.6	1614.3	1563.3	1730.6	1621.3	1666.6
	SD	364.0	393.8	485.0	432.5	434.9	398.6	342.6
	%C.V.	23.3	23.9	30.0	27.6	25.1	24.5	20.5
GST (Ü/g Hb)	X	7701.8	8202.0	7779.3	8190.0	7859.8	7869.3	8200.0
	SD	1404.5	1553.1	1785.2	1557.6	1718.6	1573.5	1576.0
	%C.V.	18.2	18.9	22.9	19.0	21.8	19.9	19.2
LDH (Ü/g Hb)	X	278.6	300.0	280.3	284.2	278.6	276.2	306.3
	SD	45.6	69.0	52.1	44.8	53.7	59.7	55.2
	%C.V.	16.3	23.0	18.5	19.2	19.2	21.6	18.0
GSH (µmol/gHb)	X	4.3	4.0	4.0	4.4	3.8	4.3	4.5
	SD	0.8	1.7	1.5	0.8	1.4	0.7	1.1
	%C.V.	18.6	42.5	37.5	18.1	36.8	16.2	24.4
MDA (nmol/gHb)	X	681.4	695.3	674.1	683.0	676.4	682.6	759.4
	SD	217.9	230.9	229.3	231.1	214.2	219.0	285.7
	%C.V.	31.9	33.2	34.0	33.8	31.6	32.0	37.6

Grup III; 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 36. Grup III'in (kontrol grubu) grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon test) ile elde edilen p değerleri

	p değerleri					
	P ₀₋₁	P ₀₋₂	P ₀₋₃	P ₀₋₄	P ₀₋₅	P ₀₋₆
^a G6PDH (Ü/g Hb)	0.776	0.820	0.410	0.732	0.235	0.734
^b CAT (x10 ⁴ Ü/g Hb)	0.776	0.753	0.875	0.735	0.318	0.826
^c SOD (Ü/g Hb)	0.293	0.433	0.887	0.240	0.397	0.253
^d GST (Ü/g Hb)	0.118	0.551	0.321	0.513	0.495	0.096
^e LDH (Ü/g Hb)	0.079	0.315	0.182	0.561	0.535	0.087
^f GSH (µmol/g Hb)	0.690	0.432	0.330	0.095	0.197	0.123
^g MDA (nmol/g Hb)	0.826	0.421	0.593	0.417	0.557	0.176

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

P₀₋₁: başlangıç ay (0) ile 1. ay arasında p değeri

P₀₋₂: başlangıç ay (0) ile 2. ay arasında p değeri

P₀₋₃: başlangıç ay (0) ile 3. ay arasında p değeri

P₀₋₄: başlangıç ay (0) ile 4. ay arasında p değeri

P₀₋₅: başlangıç ay (0) ile 5. ay arasında p değeri

P₀₋₆: başlangıç ay (0) ile 6. ay arasında p değeri

^{a,b,c,d,e,f,g} G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeylerinin başlangıç ay ile 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. ay'lar arasında anlamlı farklılıklar göstermediği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

Çizelge 37. Grup IV'te antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeyinin aylara göre değişimlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama (X), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%C.V.))

		Zaman (ay)						
		Başlangıç (0)	1.	2.	3.	4.	5.	6.
G6PDH (Ü/g Hb)	X	18.4	12.0	30.0	46.4	39.1	38.3	28.8
	SD	4.9	3.0	3.5	5.7	6.0	7.2	6.0
	%C.V.	26.6	25.0	11.6	12.2	15.3	18.7	20.8
CAT (x10 ⁴ Ü/gHb)	X	2.3	1.6	1.3	1.1	1.7	2.1	4.0
	SD	0.9	0.6	0.7	0.6	0.8	0.8	1.1
	%C.V.	39.1	37.5	53.8	54.5	47.0	38.0	27.5
SOD (Ü/g Hb)	X	1566.6	2569.0	3400.0	6318.6	5118.0	3717.3	3063.6
	SD	421.3	571.7	713.5	1174.9	985.2	1091.3	923.3
	%C.V.	26.8	22.2	20.9	18.5	19.2	29.3	30.1
GST (Ü/g Hb)	X	8295.4	18423.6	14354.0	6322.4	11604.6	28146.3	35993.6
	SD	1361.7	3736.7	2224.7	1203.3	3024.5	6382.9	7805.5
	%C.V.	16.4	20.2	15.4	19.0	26.0	22.6	21.6
LDH (Ü/g Hb)	X	284.1	560.5	855.2	952.5	842.6	711.0	497.6
	SD	46.3	74.9	113.7	128.2	160.4	187.9	115.7
	%C.V.	16.2	13.3	13.2	13.4	19.0	26.4	23.2
GSH (µmol/gHb)	X	4.1	3.5	2.8	2.3	3.2	4.3	4.1
	SD	0.9	0.9	1.1	0.8	0.9	1.0	1.0
	%C.V.	21.9	25.7	39.2	34.7	28.1	23.2	24.3
MDA (nmol/gHb)	X	708.8	1164.6	1343.2	1669.6	1509.6	1409.6	1166.0
	SD	220.2	294.7	341.6	533.9	433.3	487.8	475.2
	%C.V.	31.0	25.3	25.4	31.9	28.7	34.6	40.7

Grup IV; 15 denekten oluşmaktadır.

Çizelge 38. Grup IV'in grup içinde her bir parametrenin başlangıç ay (0) ile diğer ayların karşılaştırılması (Wilcoxon test) ile elde edilen p değerleri

	p değerleri					
	p ₀₋₁	p ₀₋₂	p ₀₋₃	p ₀₋₄	p ₀₋₅	p ₀₋₆
^a G6PDH (Ü/g Hb)	0.005	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002
^b CAT (x10 ⁴ Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001	0.025	0.306	0.001
^c SOD (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
^d GST (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001
^e LDH (Ü/g Hb)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
^f GSH (µmol/g Hb)	0.026	0.001	0.001	0.006	0.712	0.937
^g MDA (nmol/g Hb)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

- p₀₋₁: başlangıç ay (0) ile 1. ay arasında p değeri
p₀₋₂: başlangıç ay (0) ile 2. ay arasında p değeri
p₀₋₃: başlangıç ay (0) ile 3. ay arasında p değeri
p₀₋₄: başlangıç ay (0) ile 4. ay arasında p değeri
p₀₋₅: başlangıç ay (0) ile 5. ay arasında p değeri
p₀₋₆: başlangıç ay (0) ile 6. ay arasında p değeri

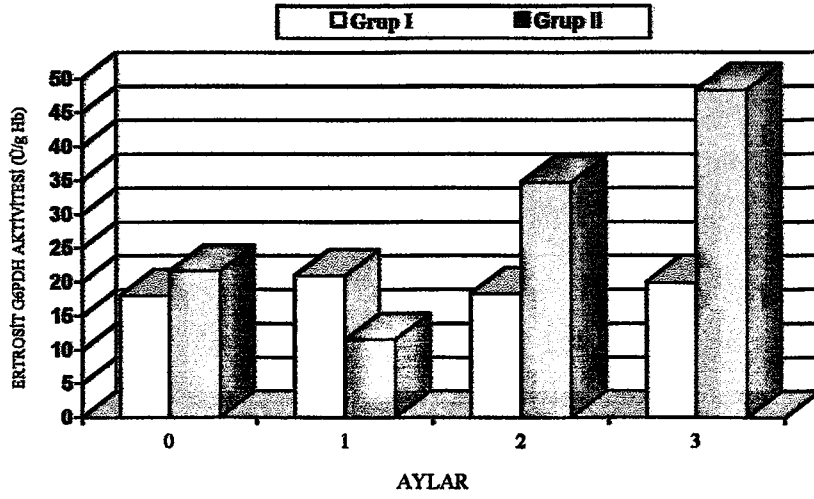
- ^a Başlangıca kıyasla, G6PDH aktivitesi 1. ay'da anlamlı düşüş ve 2., 3., 4., 5., ve 6.ay'larda anlamlı artış gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.
- ^b Başlangıca kıyasla, CAT aktivitesi 1., 2., 3 ve 4. ay'da anlamlı düşüş gösterdiği, 5. ay'da değişim göstermediği ve 6. ay'da artış gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.
- ^c Başlangıca kıyasla, SOD aktivitesi 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.
- ^d Başlangıca kıyasla, GST aktivitesi 1. ve 2. ay'da anlamlı artış, 3.ay'da anlamlı düşüş ve 4., 5. ve 6.ay'da anlamlı artış gösterdiği Wilcoxon testi ile saptanmıştır.
- ^e Başlangıca kıyasla, LDH aktivitesi 1., 2., 4., 5. ve 6. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.
- ^f Başlangıca kıyasla, GSH düzeyi 1., 2., 3. ve 4. ay'da anlamlı düşüşler gösterdiği, 5. ve 6. ay'da değişmediği Wilcoxon test ile saptanmıştır.
- ^g Başlangıca kıyasla, MDA düzeyi 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. ay'da anlamlı artışlar gösterdiği Wilcoxon test ile saptanmıştır.

Deney öncesi ölçülen G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeylerinin gruplar arasında (Grup I, II, III ve IV) anlamlı farklılıklar göstermediği varyans analizi ile (ANOVA) saptanmıştır ($p>0.05$). Aşağıda eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin Grup I-II ve Grup III-IV arasında karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) verilmiştir. Buna göre;

Üç ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup II), üç ay süreyle normal yem (Grup I) uygulanan gruba kıyasla birinci ayda SOD, GST ve LDH aktivitelerinde ve MDA düzeylerinde anlamlı artış, G6PDH aktivitesinde ve GSH düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır ($p<0.05$). Bu ayda CAT aktivitesinde anlamlı farklılıklar saptanmamıştır ($p>0.05$). İkinci ayda her iki grup arasında G6PDH, SOD, GST ve LDH aktivitelerinde, ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenirken CAT ve GSH düzeylerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir ($p<0.05$). Üçüncü ayda Grup II'de G6PDH, SOD, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar fakat CAT, GST ve GSH düzeylerinde anlamlı düşüşler olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Altı ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup IV), altı ay normal yem yem uygulanan gruba (Grup III) kıyasla birinci ayda SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar, G6PDH düzeyinde anlamlı düşüşler saptanmıştır ($p<0.05$). Bu ayda GSH düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p>0.05$). İkinci ayda Grup IV'de G6PDH, SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenirken, CAT düzeylerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu ayda her iki grup arasında G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı farklılıklar ($p<0.05$) gösterirken, GSH düzeylerinde anlamlı farklılıklar görülmemiştir ($p>0.05$). Üçüncü ve dördüncü aylarda Grup IV'te G6PDH, SOD, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanırken CAT, GST ve GSH düzeylerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır ($p<0.05$). GSH düzeyinde dördüncü, beşinci ve altıncı aylarda anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir ($p>0.05$). CAT düzeyi beşinci ayda değişmezken ($p>0.05$), altıncı ayda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Beşinci ve altıncı aylarda G6PDH, SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır ($p<0.05$).

Grup I-II ve Grup III-IV'in her bir parametre yönünden grafiksel olarak karşılaştırılması Şekil 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 ve 46'da gösterilmiştir.

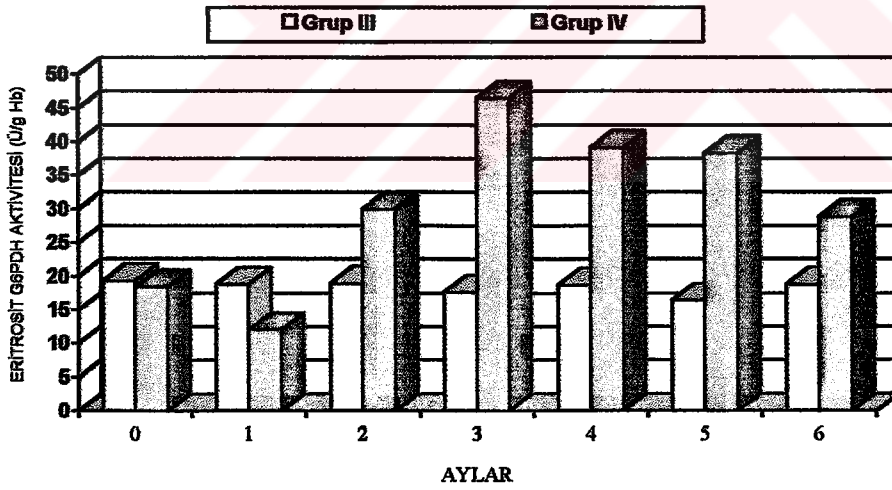


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 33. Grup I ve II'de eritrosit G6PDH enzim aktivitesinin aylara göre değişimi

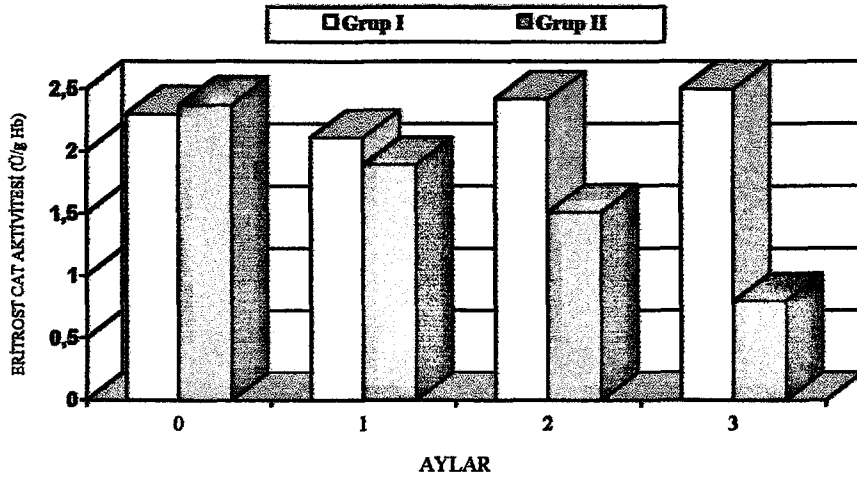


Başlangıç ay (0)

Grup III'de hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'de hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 34. Grup III ve IV'te eritrosit G6PDH aktivitesinin aylara göre değişimi

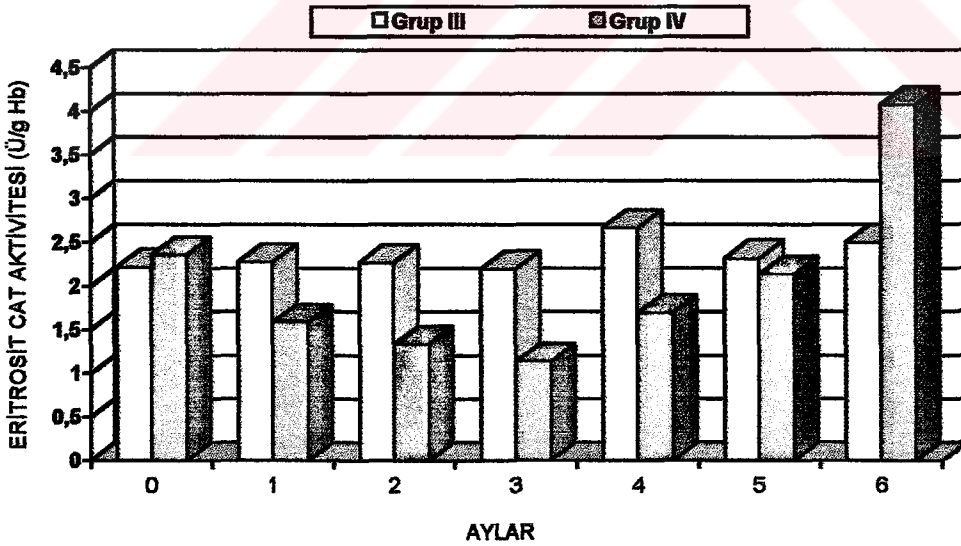


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 35. Grup I ve II'de eritrosit CAT aktivitesinin aylara göre değişimi

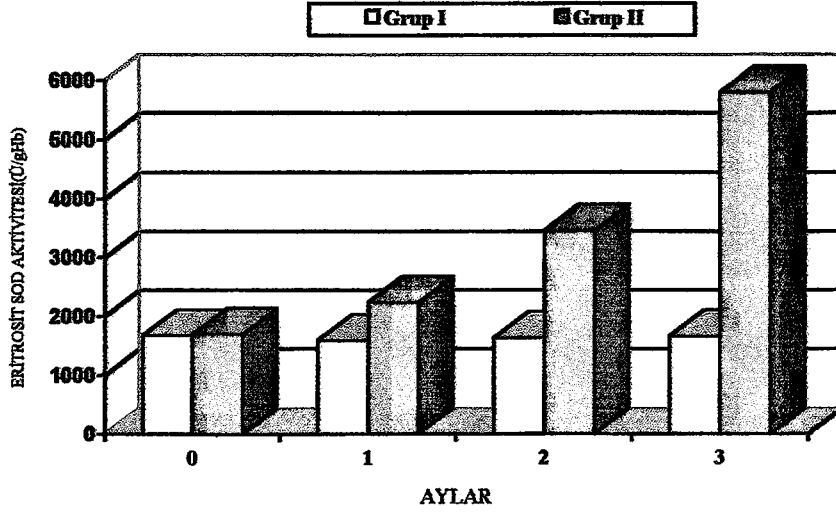


Başlangıç (0)

Grup III'de hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'de hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 36. Grup III ve IV'de eritrosit CAT aktivitesinin aylara göre değişimi

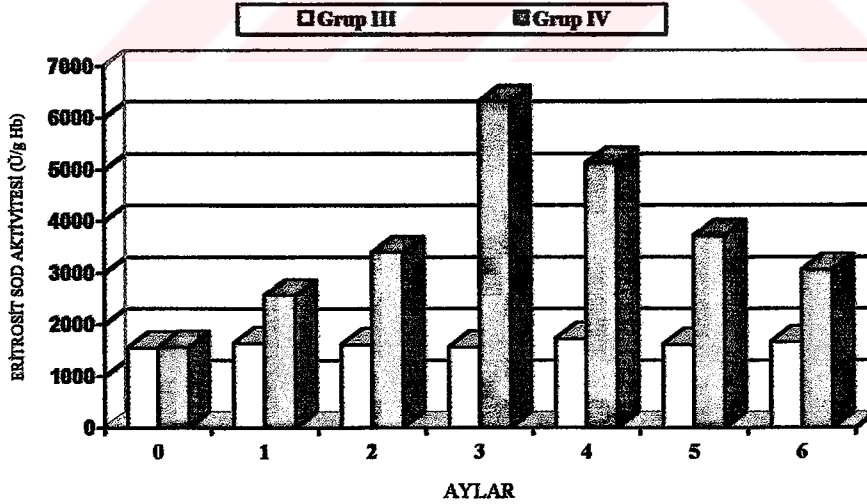


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 37. Grup I ve II'de eritrosit SOD aktivitesinin aylara göre değişimi

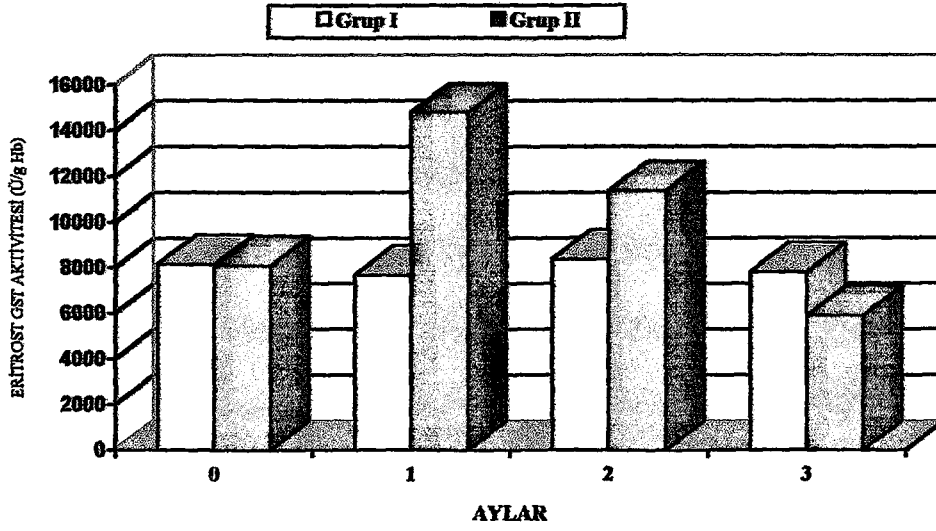


Başlangıç ay (0)

Grup III'te hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 38. Grup III ve IV'te eritrosit SOD aktivitesinin aylara göre değişimi

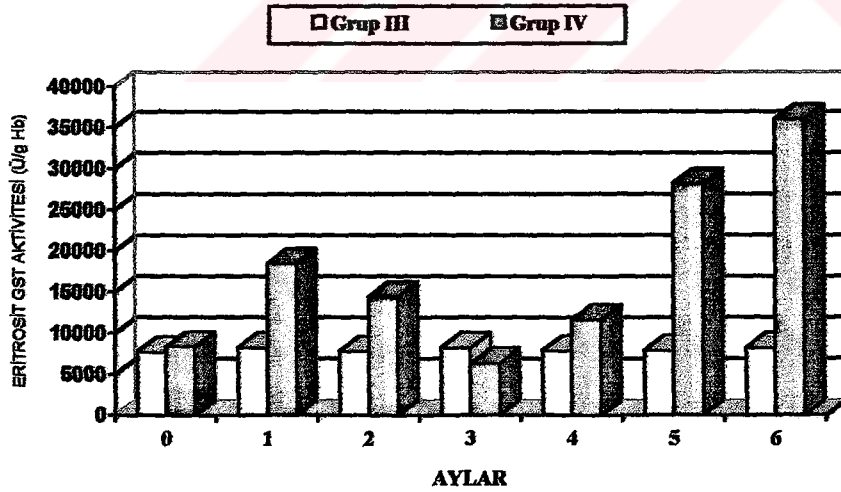


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 39. Grup I ve II'de eritrosit GST aktivitesinin aylara göre değişimi

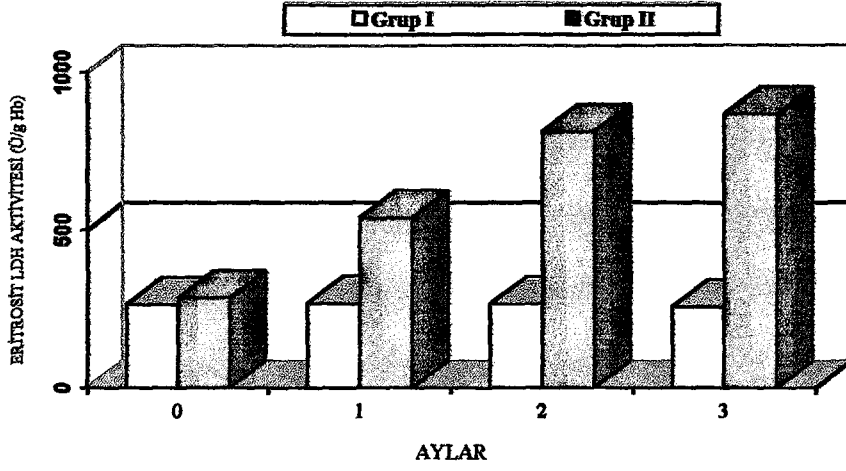


Başlangıç ay (0)

Grup III'de hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'de hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 40. Grup III ve IV'de eritrosit GST aktivitesinin aylara göre değişimi

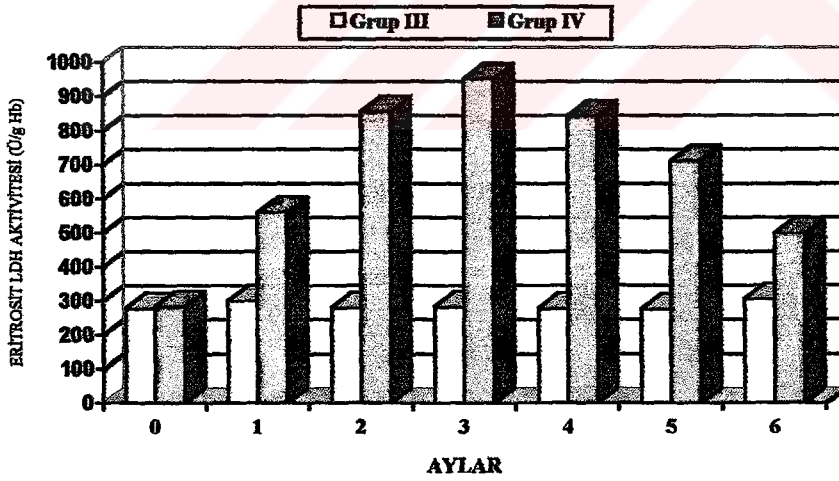


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 41. Grup I ve II'de eritrosit LDH aktivitesinin aylara göre değişimi

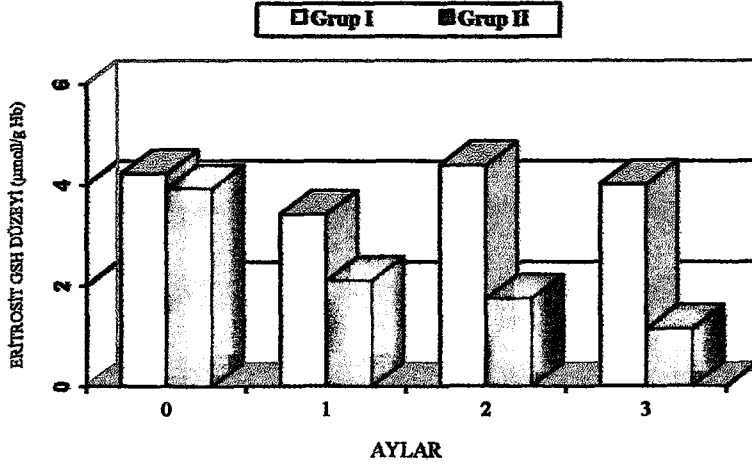


Başlangıç ay (0)

Grup III'te hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 42. Grup III ve IV'te eritrosit LDH aktivitesinin aylara göre değişimi

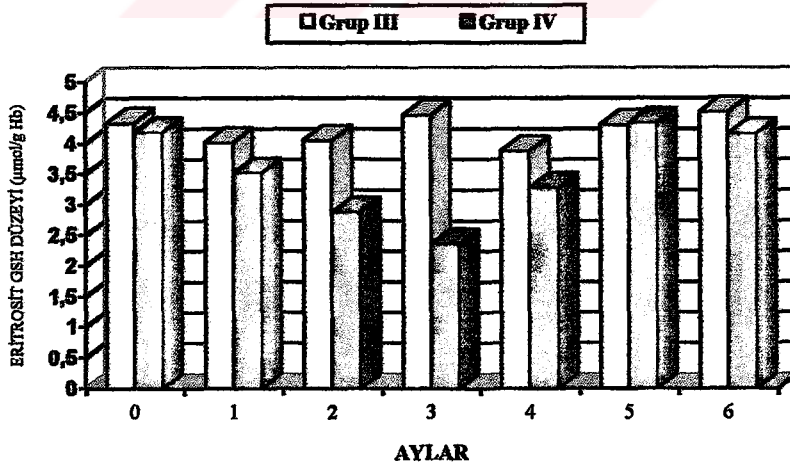


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 43. Grup I ve II'de GSH düzeyinin aylara göre değişimi

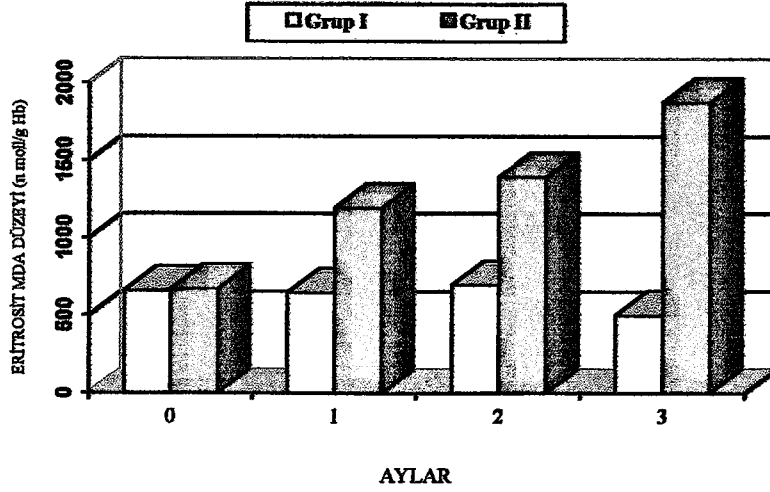


Başlangıç ay (0)

Grup III'te hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 44. Grup III ve IV'te eritrosit GSH düzeyinin aylara göre değişimi

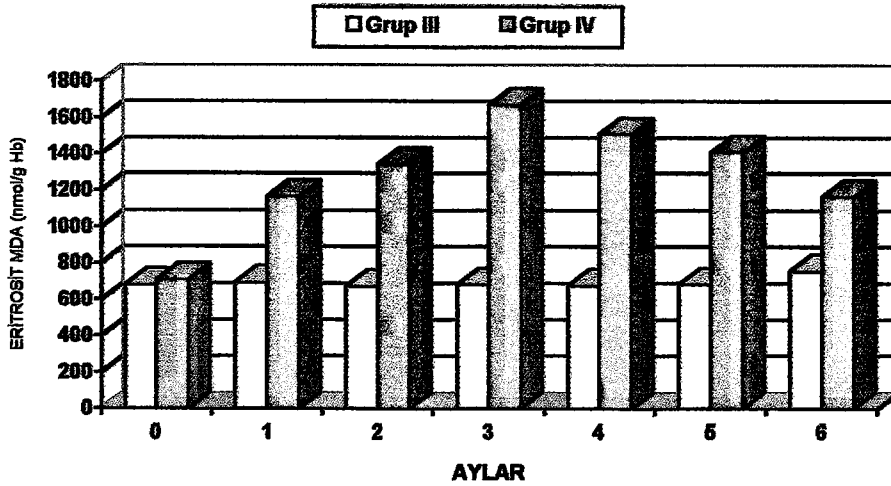


Başlangıç ay (0)

Grup I'de hayvanlara yaklaşık 1143 g/100 g vücut ağırlığı/90 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 45. Grup I ve II'de eritrosit MDA düzeyinin aylara göre değişimi



Başlangıç ay (0)

Grup III'te hayvanlara 2286 g/100 g vücut ağırlığı/180 gün normal pellet yemi uygulanmıştır.

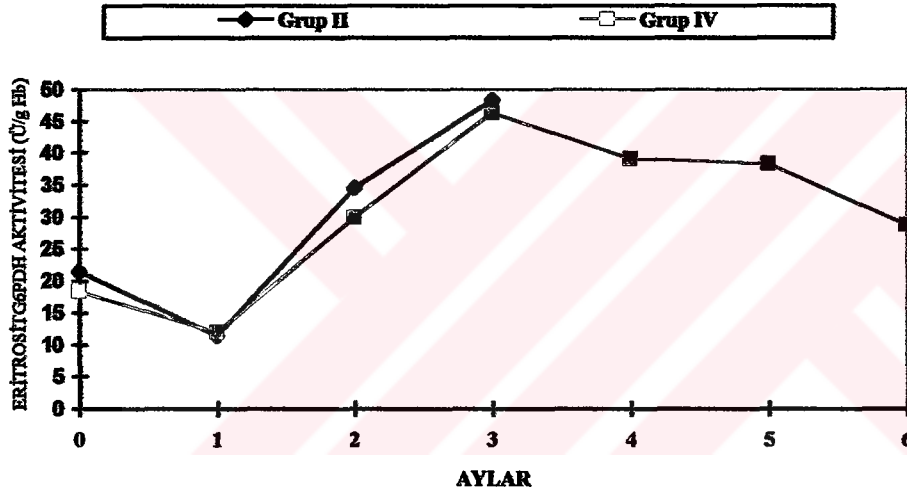
Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 46. Grup III ve IV'te eritrosit MDA düzeyinin aylara göre değişimi

Üç ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup II) ile altı ay süreyle pestisit uygulanan grup (Grup IV) arasında eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin aylara göre karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Grup IV'e kıyasla Grup II'de, G6PDH aktivitesinin ikinci ayda, GST aktivitesinin ise birinci ve ikinci ayda anlamlı derecede arttığı, GSH düzeyinin ise birinci, ikinci ve üçüncü aylarda anlamlı derecede düştüğü olduğu saptanmıştır.

Grup II-IV arasında her bir parametrenin grafiksel olarak karşılaştırılması Şekil 47, 48, 49, 50, 51, 52 ve 53'de gösterilmiştir.

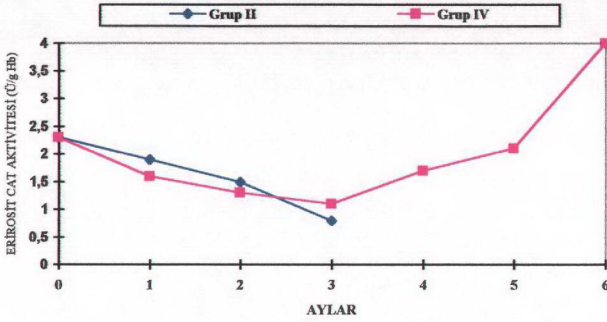


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 47. Grup II ve IV'te eritrosit G6PDH aktivitesinin aylara göre değişimi

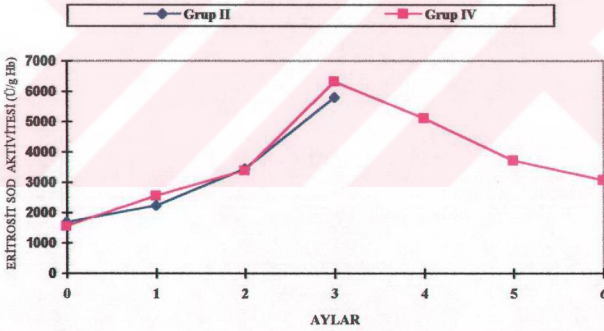


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 48. Grup II ve IV'te eritrosit CAT aktivitesinin aylara göre değişimi

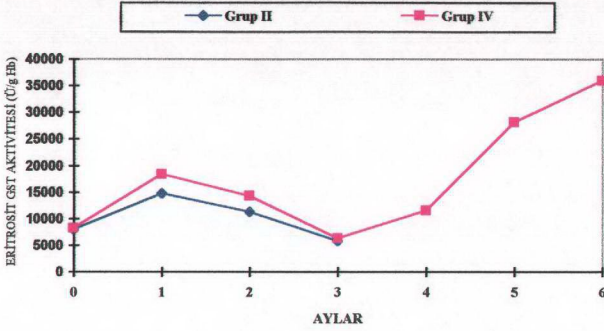


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 49. Grup II ve IV'te eritrosit SOD aktivitesinin aylara göre değişimi

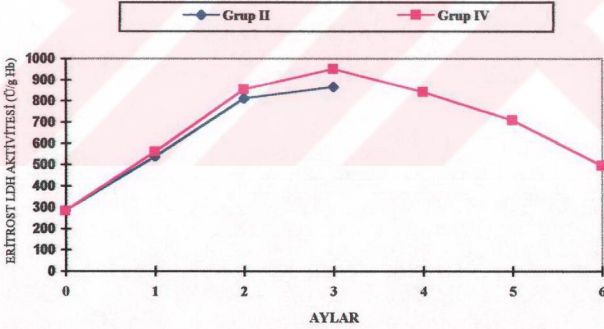


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 50. Grup II ve IV'te eritrosit GST aktivitesinin aylara göre değişimi

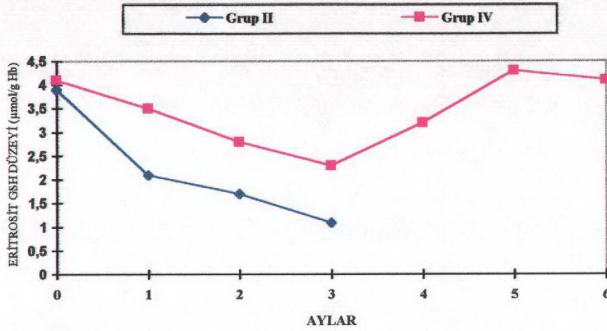


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 51. Grup II ve IV'te eritrosit LDH aktivitesinin aylara göre değişimi

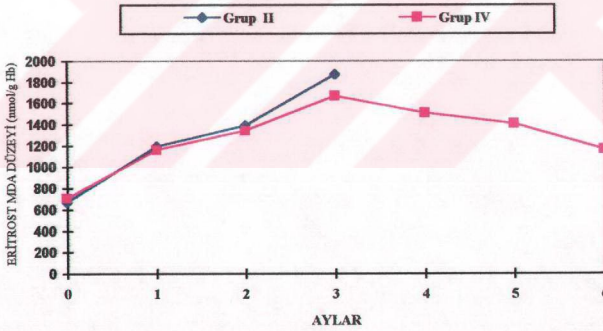


Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 52. Grup II ve IV'te eritrosit GSH düzeyinin aylara göre değişimi



Başlangıç ay (0)

Grup II'de hayvanlara ortalama 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozu uygulanmıştır

Grup IV'te hayvanlara ortalama 34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün endosulfan dozu uygulanmıştır.

Şekil 53. Grup II ve IV'te eritrosit MDA düzeyinin aylara göre değişimi

4.8. Karaciğer ve Meme Dokularında Ölçülen Parametrelerde Referans Değerlerin Belirlenmesi

4.8.1. Karaciğer Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (mg protein olarak)

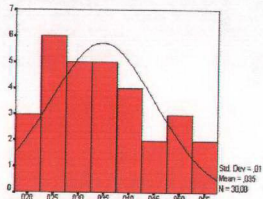
Referans bireyler TIBDAM'dan sağlıklı fare bireylerinden seçildi. İki grubun (Grup I ve III) toplamından oluşan 30 bireyin karaciğer dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri için referans değerler belirlemek için istatistiksel çalışmalar yapıldı ve sonuçlar Çizelge 39'da verilmiştir.

Ölçülen parametre değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilks test (normality test) kullanılmıştır. Bu teste göre, değerlerin normal dağılım göstermesi için p değerinin 0.05'den büyük olması gerekmektedir. Normal dağılım eğrileri, değerlerin -logaritması alınmadan ve -logaritması alınarak çizilmiştir. Karaciğer dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ilgili normal dağılım eğrileri Şekil 54'te verilmiştir.

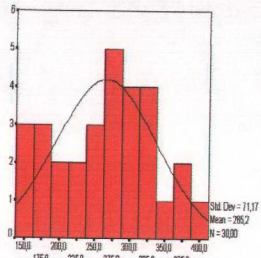
Çizelge 39. Karaciğer dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili (mg protein olarak) referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları

	n	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	%95güvenirlilik aralığı
G6PDH	30	0.0346	0.0104	0.0019	0.0340	0.036	0.019-0.055	0.0138-0.0554
CAT	30	265.20	71.17	12.99	272.50	249	145-394	122.86-407.54
SOD	30	4.370	1.380	0.252	4.650	4.8	2.8-7.6	1.61-7.13
GST	30	6840.7	1603.0	297.6	7070.0	6000	3000-9000	3634.7-10046.7
LDH	30	2.347	0.782	0.143	2.400	2.8	1.0-3.8	0.783-3.911
GSH	30	0.0116	0.0033	0.0006	0.0110	0.012	0.006-0.018	0.0050-0.0182
MDA	30	2.670	0.872	0.159	2.600	3.1	1.0-4.1	0.926-4.414

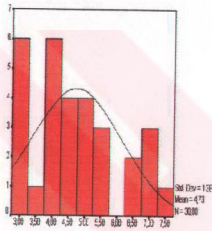
G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri \bar{U} /mg protein, GSH düzeyi μ mol/mg protein ve MDA düzeyi nmol/mg protein birimleri olarak verilmiştir.



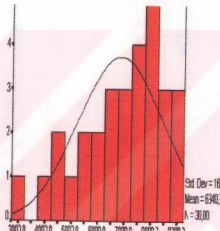
G6PDH (Ü/mg protein)
(a)



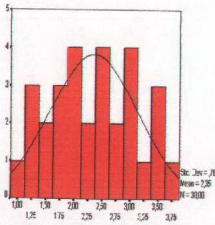
CAT (Ü/mg protein)
(b)



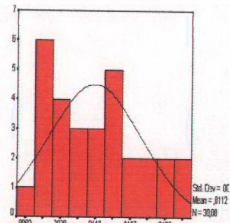
SOD (Ü/mg protein)
(c)



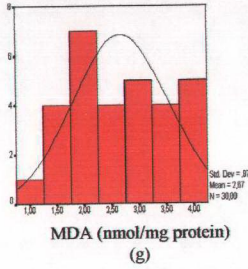
GST (Ü/mg protein)
(d)



LDH (Ü/mg protein)
(e)



GSH düzeyi (µmol/mg protein)
(f)



Şekil 54. Karaciğer antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyinin (mg protein) normal dağılım eğrileri. G6PDH (a), CAT (b), SOD (c), GST (d) ve LDH (e) aktivitelerinin, GSH (f) ve MDA (g) düzeylerinin değerlerinin -logaritmasını almaksızın normal dağılım gösterdiği ($p>0.05$) Shapiro-Wilkens analizi ile saptanmıştır.

4.8.2. Karaciğer Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (g karaciğer olarak)

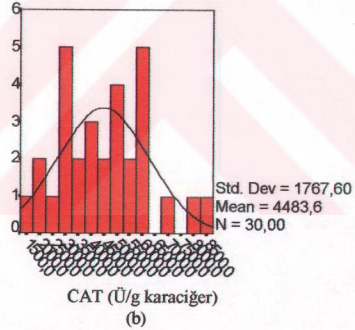
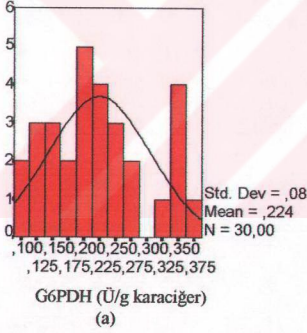
Referans bireyler TIBDAM'dan sağlıklı fare bireylerinden seçildi. İki grubun (Grup I ve III) toplamından oluşan 30 bireyin karaciğerinde G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerleri belirlemek için istatistiksel çalışmalar yapıldı ve sonuçlar Çizelge 40'ta verilmiştir.

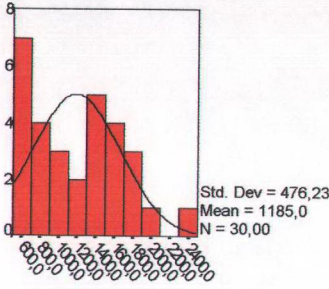
Ölçülen parametre değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilks test (normality test) kullanılmıştır. Bu teste göre, değerlerin normal dağılım göstermesi için p değerinin 0.05'den büyük olması gerekmektedir. Normal dağılım eğrileri, değerlerin -logaritması alınmadan ve -logaritması alınarak çizilebilmektedir. Karaciğer dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ilgili normal dağılım eğrileri Şekil 55'de verilmiştir.

Çizelge 40. Karaciğer dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili (g karaciğer olarak) referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları

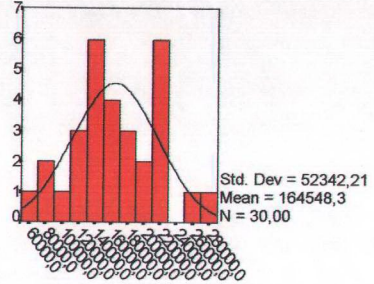
	n	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	%95 güvenirlilik aralığı
G6PDH	30	0.224	0.080	0.013	0.235	0.260	0.110-0.370	0.096-0.392
CAT	30	4483.6	1767.6	322.71	4415	6943	1557-8500	4483.6-8018.8
SOD	30	1184.9	476.2	86.9	1245	1789	511-2300	232.5-2137.3
GST	30	164548.3	52342.2	9556.3	158750	215500	66500-282000	59863.9-269232.7
LDH	30	27.83	13.26	2.42	26.15	52.70	10.50-63.20	13.1-543.5
GSH	30	1.990	0.727	0.133	2.00	2.430	0.75-3.18	0.53-3.44
MDA	30	37.22	14.61	2.66	36.95	555	12.80-68.30	79.87-664.59

G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri \bar{U}/g karaciğer, GSH düzeyi $\mu\text{mol}/g$ karaciğer ve MDA düzeyi nmol/g karaciğer birimleri olarak verilmiştir.

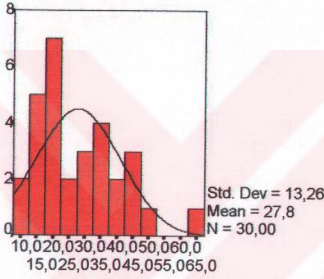




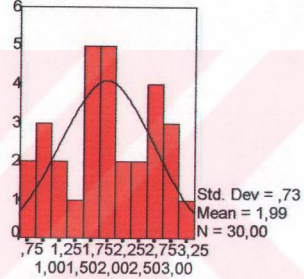
SOD (Ü/g karaciğer)
(c)



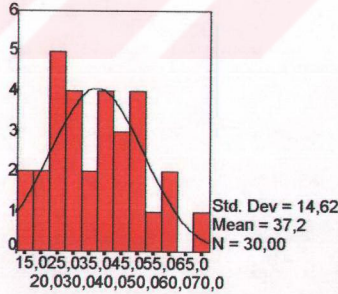
GST (Ü/g karaciğer)
(d)



LDH (Ü/g karaciğer)
(e)



GSH (µmol/g karaciğer)
(f)



MDA (nmol/g karaciğer)
(g)

Şekil 55. Karaciğer antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeylerinin (g karaciğer) normal dağılım eğrileri. G6PDH (a), CAT (b), SOD (c), GST (d) ve LDH (e) aktivitelerinin, GSH (f) ve MDA (g) düzeylerinin -logaritmasını alınmaksızın normal dağılım gösterdiği ($p > 0.05$) Shapiro-Wilkens analizi ile saptanmıştır.

4.8.3. Meme Dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Referans Değerlerin Belirlenmesi (mg protein olarak)

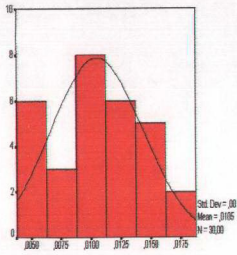
Referans bireyler TIBDAM'dan sağlıklı fare bireylerinden seçildi. İki grubun (Grup I ve III) toplamından oluşan 30 bireyin meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri için referans değerler belirlemek için istatistiksel çalışmalar yapıldı ve sonuçlar Çizelge 41'de verilmiştir.

Ölçülen parametre değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilks test (normality test) kullanılmıştır. Bu teste göre, değerlerin normal dağılım göstermesi için p değerinin 0.05'den büyük olması gerekmektedir. Normal dağılım eğrileri, değerlerin -logaritması alınmadan ve -logaritması alınarak çizilmiştir. Meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ilgili normal dağılım eğrileri Şekil 56'da verilmiştir.

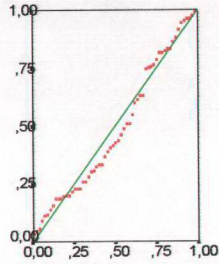
Çizelge 41. Meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları

	n	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	%95 güvenirlilik aralığı
G6PDH	30	0.0105	0.0037	0.0069	0.0105	0.013	0.004-0.017	0.0031-0.0179
CAT	30	23.223	5.753	1.050	22.600	17.9	14.9-32.8	11.717-34.729
SOD	30	4.350	1.650	0.301	4.300	5.9	1.8-7.7	1.05-7.65
GST	30	285.10	63.52	11.60	287.50	238	180-418	158.06-412.1
LDH	30	4.647	1.246	0.228	4.800	3.7	2.5-6.2	2.155-7.139
GSH	30	0.0065	0.0037	0.0006	0.0070	0.012	0.001-0.013	0-0.0139
MDA	30	4.477	1.551	0.283	4.400	5.2	1.8-7.0	1.375-7.579

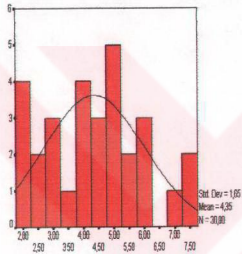
G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri Ü/mg protein, GSH düzeyi µmol/mg protein ve MDA düzeyi nmol/mg protein birimleri olarak verilmiştir.



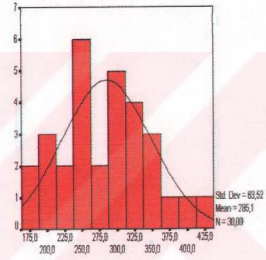
G6PDH (Ü/mg protein)
(a)



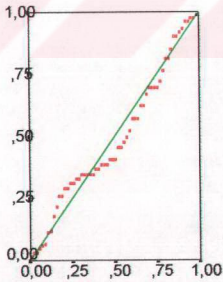
CAT (Ü/mg protein)
(b)



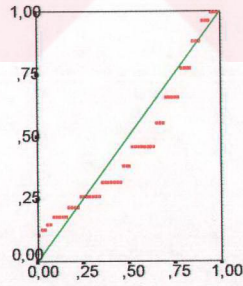
SOD (Ü/mg protein)
(c)



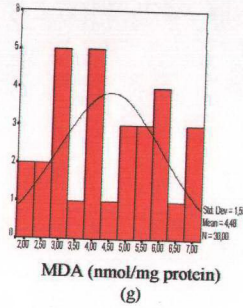
GST (Ü/mg protein)
(d)



LDH (Ü/mg protein)
(e)



GSH (µmol/mg protein)
(f)



Şekil 56. Meme antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyinin normal dağılım eğrileri. G6PDH (a), SOD (c) ve GST (d) aktivitesinin, MDA düzeylerinin (g) değerlerinin -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği ($p>0.05$) fakat CAT (b) ve LDH (e) aktivitesinin, GSH düzeyinin (f) değerlerinin -logaritması alınarak normal dağılım gösterdiği ($p>0.05$) Shapiro-Wilkens analizi ile saptanmıştır.

4.8.4. Karaciğer ve Meme Dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH Aktiviteleri, GSH ve MDA Düzeyleri ile İlgili Deneysel Bulgular

Pestisit ve normal yem uygulanan gruplarda yer alan her bir hayvanın karaciğer ve memeleri dokuları çıkartılarak %1.15 KCI ile homojenize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan her iki doku homojenatları 14000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant'ta antioksidan sistemler, LDH ve MDA düzeylerine bakılmıştır. Çizelge 42, 43, 44, 45, 46 ve 47'de karaciğer ve total meme süpernatantlarında G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH enzim aktiviteleri, GSH ve MDA düzeylerindeki değişimler verilmiştir.

Çizelge 42. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların karaciğerinde antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (mg protein olarak)

		G6PDH (Ü/mg protein)	CAT (Ü/mg protein)	SOD (Ü/mg protein)	GST (Ü/mg protein)	LDH (Ü/mg protein)	GSH (µmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Grup I (n:15)	X	0.038	267.5	4.8	6673.3	2.3	0.012	2.6
	SD	0.011	75.7	1.2	1699.2	0.8	0.004	0.9
	%C.V.	28.9	28.2	25.0	25.4	34.7	33.3	34.6
Grup II (n:15)	X	0.128	192.5	21.2	13453.3	9.4	0.027	13.8
	SD	0.027	75.7	3.6	3124.4	1.6	0.008	2.4
	%C.V.	21.0	39.3	16.9	23.4	17.0	29.6	17.3
Grup III (n:15)	X	0.032	262.8	4.6	7008.2	2.3	0.011	2.7
	SD	0.009	68.8	1.5	1541.2	0.7	0.003	0.8
	%C.V.	28.1	26.1	32.6	21.9	30.4	27.2	29.6
Grup IV (n:15)	X	0.077	675.2	12.1	27631.5	4.6	0.057	6.3
	SD	0.025	102.3	2.5	5609.2	1.0	0.015	1.5
	%C.V.	32.4	15.1	20.6	20.3	21.7	26.3	23.8

Çizelge 43. Grupların karaciğer dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri

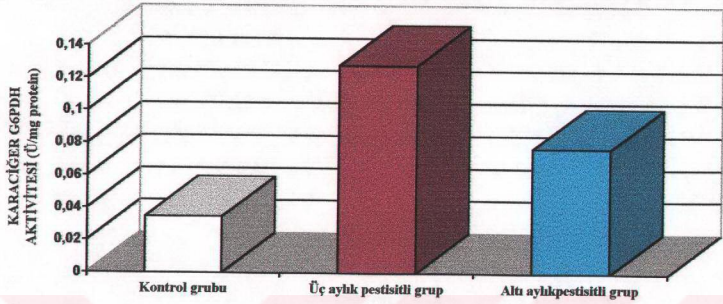
Gruplar		G6PDH (Ü/mg protein)	CAT (Ü/mg protein)	SOD (Ü/mg protein)	GST (Ü/mg protein)	LDH (Ü/mg protein)	GSH (µmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
I-II	p	0.000*	0.010*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
III-IV	p	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
II-IV	p	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
I-III	p	0.125	0.868	0.547	0.619	0.819	0.338	0.589

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Üç ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup II), üç ay süreyle normal yem uygulanan gruba (Grup I) kıyasla G6PDH, SOD, GST ve LDH aktivitelerinde, MDA ve GSH düzeylerinde anlamlı artışlar CAT aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Altı ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup IV), altı ay normal yem uygulanan gruba (Grup III) kıyasla G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinde, GSH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Üç ve altı ay süreyle pestisitli yem uygulanan gruplar (Grup II ve Grup IV) birbirleri ile karşılaştırıldığında, Grup II'de G6PDH, SOD, GST ve LDH ve MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı, CAT ve GSH düzeylerinde ise anlamlı derecede azalmalar olduğu saptanmıştır.

Grup I ve III'in toplamından oluşan 30 fare bireyi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubun, üç ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup II) ve altı ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup IV) karaciğer dokusunda (mg protein

olarak) G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi Şekil 57, 58, 59, 60, 61, 62 ve 63'te gösterilmiştir.

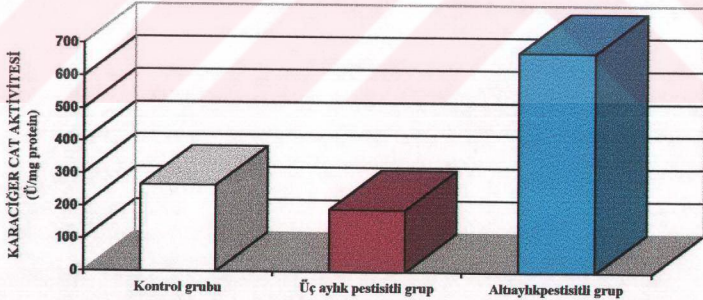


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 57. Karaciğer G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

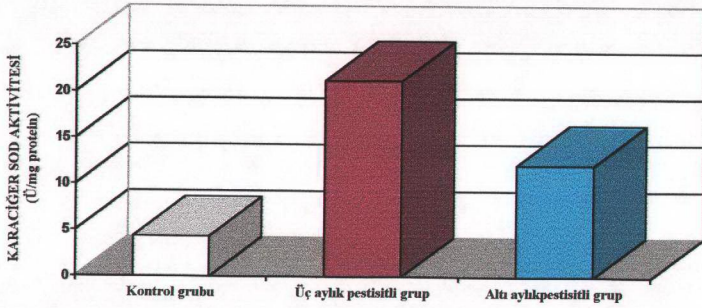


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 58. Karaciğer CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

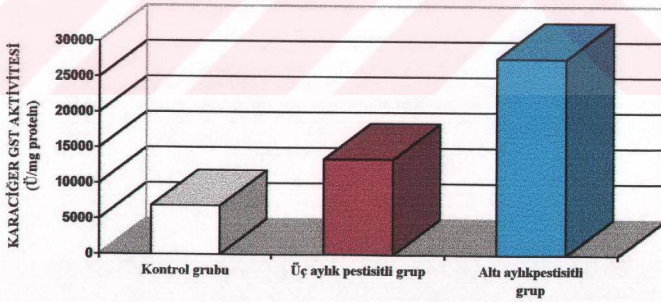


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 59. Karaciğer SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

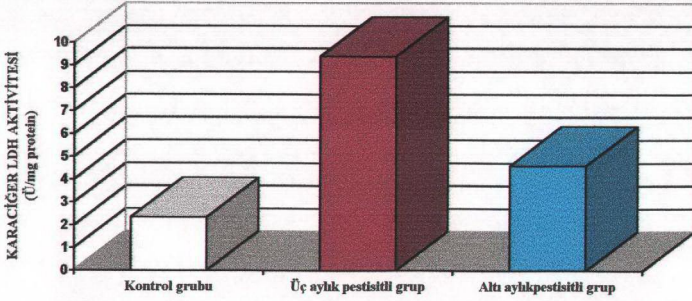


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 60. Karaciğer GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

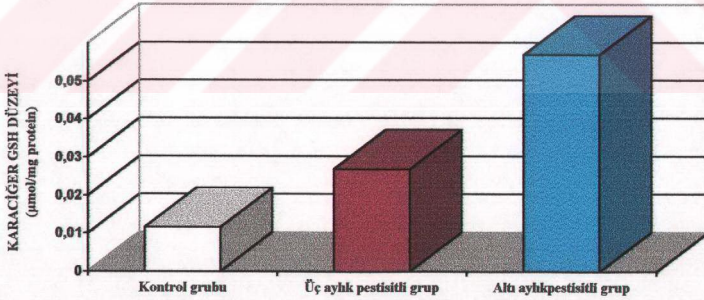


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 61. Karaciğer LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

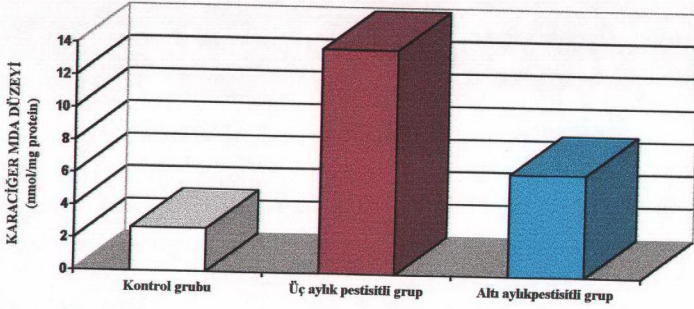


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 62. Karaciğer GSH düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)



Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 63. Karaciğer MDA düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

Çizelge 44. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların karaciğerinde antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (g karaciğer)

		G6PDH	CAT	SOD	GST	LDH	GSH	MDA
		(Ü/g karaciğer)	(Ü/g karaciğer)	(Ü/g karaciğer)	(Ü/g karaciğer)	(Ü/g karaciğer)	(µmol/g karaciğer)	(nmol/g karaciğer)
Grup I (n:15)	X	0.23	4439.0	1256.0	152613.3	27.5	1.9	37.5
	SD	0.08	1582.8	492.9	62986.5	14.7	0.7	15.3
	%C. V.	34.7	35.6	39.2	41.2	53.5	36.8	40.8
Grup II (n:15)	X	3.47	2344.5	3698.6	393250.0	380.7	4.1	317.1
	SD	1.90	1243.3	2043.7	224334.3	176.0	1.6	112.3
	%C. V.	54.8	53.0	55.2	57.0	46.2	40.8	35.4
Grup III (n:15)	X	0.26	4528.2	1113.8	159523.3	28.1	2.0	36.9
	SD	0.06	1990.5	464.7	43268.6	12.1	0.7	14.3
	%C. V.	23.0	43.9	41.7	27.1	43.0	35	38.9
Grup IV (n:15)	X	0.83	8613.3	1923.7	624777.3	136.2	5.7	125.9
	SD	0.58	2139.1	881.0	270383.5	53.3	1.8	18.5
	%C. V.	69.8	24.8	45.8	43.2	39.1	32.1	14.5

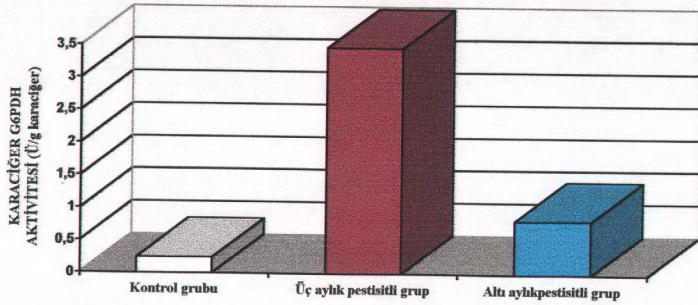
Çizelge 45. Grupların karaciğer dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (g karaciğer) (Mann-Whitney) ile elde edilen p değerleri

Gruplar	G6PDH (Ü/g karaciğer)	CAT (Ü/g karaciğer)	SOD (Ü/g karaciğer)	GST (Ü/g karaciğer)	LDH (Ü/g karaciğer)	GSH (µmol/g karaciğer)	MDA (nmol/g karaciğer)
I-II p	0.000*	0.010*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
III-I p	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
II-IV p	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
I-III p	0.237	0.764	0.437	0.513	0.618	0.267	0.623

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Üç ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup II), üç ay normal yem uygulanan gruba (Grup I) kıyasla G6PDH, SOD, GST ve LDH aktivitelerinde, MDA ve GSH düzeylerinde anlamlı artış, CAT aktivitesinde anlamlı düşüş gösterdiği saptanmıştır. Altı ay süreyle pestisit uygulanan grupta (Grup IV), altı ay normal yem uygulanan gruba (Grup III) kıyasla G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Üç ve altı ay pestisitli yem uygulanan gruplar (Grup II ve Grup IV) birbiri ile karşılaştırıldığında, Grup II'de G6PDH, SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı, CAT ve GSH düzeylerinde ise anlamlı derecede azalmalar olduğu saptanmıştır.

Grup I ve III'in toplamından oluşan 30 fare bireyi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubun, üç ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup II) ve altı ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup IV) karaciğer dokusunda (g karaciğer olarak) G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi Şekil 64, 65, 66, 67, 68, 69 ve 70'de gösterilmiştir.

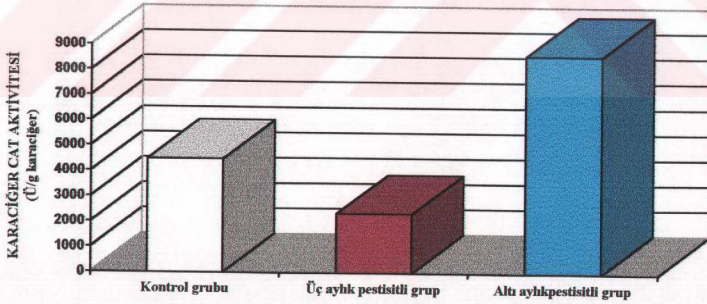


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 64. Karaciğer G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

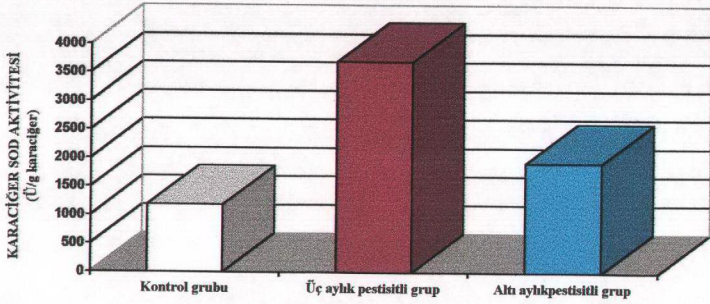


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 65. Karaciğer CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

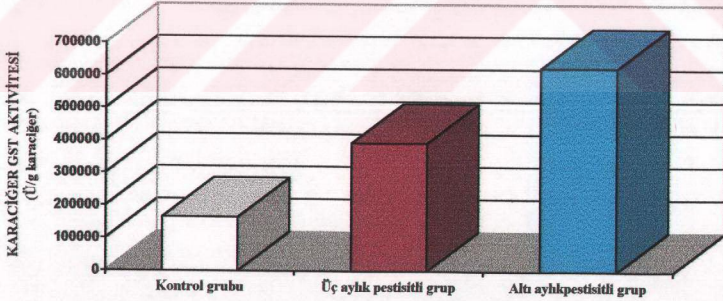


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 66. Karaciğer SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

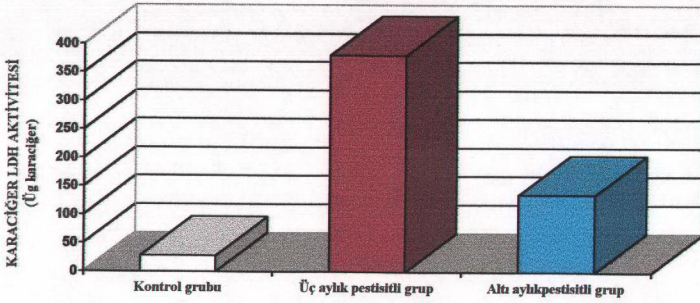


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 67. Karaciğer GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

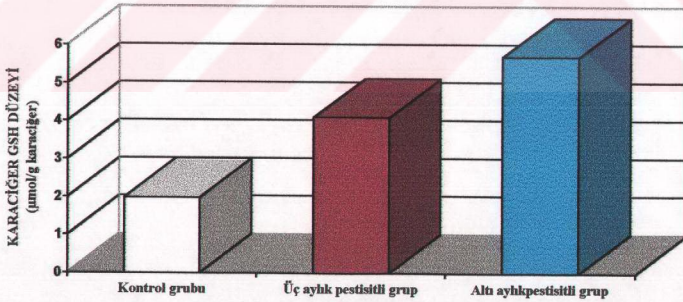


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 68. Karaciğer LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

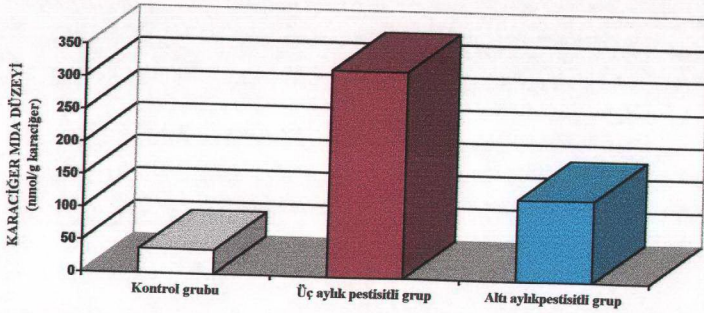


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 69. Karaciğer GSH düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)



Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 70. Karaciğer MDA düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (g karaciğer olarak)

Çizelge 46. Üç ve altı ay sürelerle pestisit ve normal yem uygulanan grupların meme dokularında antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri (mg protein olarak)

		G6PDH	CAT	SOD	GST	LDH	GSH	MDA
		(Ü/g protein)	(Ü/g protein)	(Ü/g protein)	(Ü/g protein)	(Ü/g protein)	(µmol/g protein)	(nmol/g protein)
Grup I (n:15)	X	0.010	22.5	4.6	288.0	4.6	0.007	4.8
	SD	0.003	5.5	1.8	67.5	1.2	0.004	1.5
	%C.V.	30.0	24.4	39.1	23.4	26.0	57.1	31.2
Grup II (n:15)	X	0.013	24.3	5.2	386.0	6.9	0.008	8.4
	SD	0.004	6.9	1.6	111.4	1.8	0.003	1.7
	%C.V.	30.7	28.3	30.7	28.8	26.0	37.5	20.2
Grup III (n:15)	X	0.011	23.8	4.0	282.1	4.5	0.006	4.0
	SD	0.004	6.0	1.3	61.4	1.0	0.003	1.4
	%C.V.	36.3	25.2	32.5	21.7	22.2	50.0	35.0
Grup IV (n:15)	X	0.015	30.1	4.7	397.8	6.0	0.010	6.0
	SD	0.003	5.1	1.5	102.6	1.3	0.003	1.5
	%C.V.	20.0	16.9	31.9	25.7	21.6	30.0	25.0

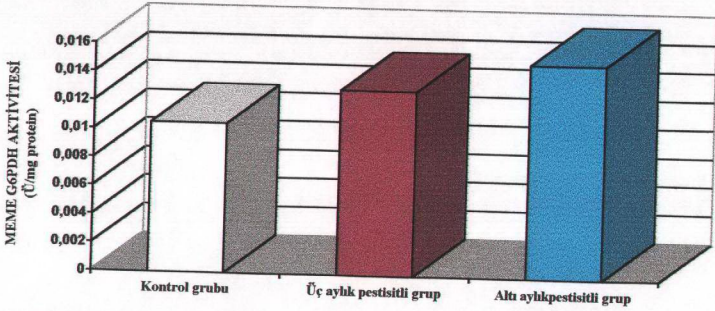
Çizelge 47. Grupların meme dokularında her bir parametre yönünden karşılaştırılması (Mann-Whitney-U test) ile elde edilen p değerleri

Gruplar	G6PDH (Ü/mg protein)	CAT (Ü/mg protein)	SOD (Ü/mg protein)	GST (Ü/mg protein)	LDH (Ü/mg protein)	GSH (µmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
I-II p	0.124	0.419	0.407	0.017*	0.002*	0.371	0.000*
III-I p	0.026*	0.010*	0.271	0.002*	0.019*	0.002*	0.012*
II-IV p	0.096	0.013*	0.361	0.693	0.237	0.252	0.001*
I-III p	0.349	0.590	0.407	0.934	0.852	0.603	0.158

p<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*Üç ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup II), üç ay süreyle normal yem uygulanan gruba (Grup I) kıyasla LDH aktivitesinde ve MDA düzeylerinde anlamlı derecede artışlar saptanmıştır. Altı ay süreyle pestisitli yem uygulanan grupta (Grup IV), altı ay süreyle normal yem uygulanan gruba (Grup III) kıyasla G6PDH, CAT, GST ve LDH aktivitelerinde, GSH ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Grup II ile Grup IV karşılaştırıldığında Grup II'ye kıyasla Grup IV'de, CAT aktivitesinde anlamlı artış ve MDA düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır.

Grup I ve III'in toplamından oluşan 30 fare bireyi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubun, üç ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup II) ve altı ay süreyle pestisit uygulanan grubun (Grup IV) meme dokusunda (mg protein olarak) G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi Şekil 71, 72, 73, 74, 75, 76 ve 77'de gösterilmiştir.

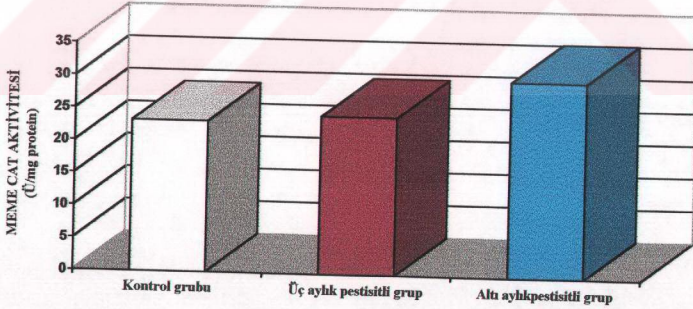


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 71. Meme G6PDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

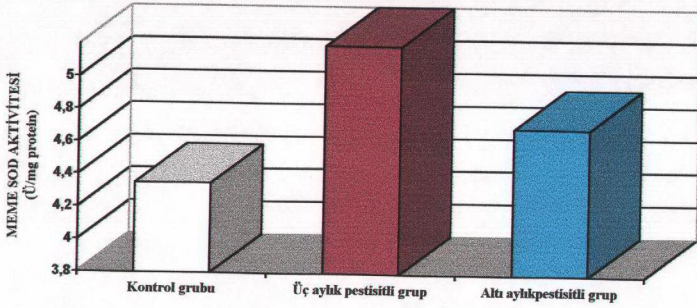


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 72. Meme CAT aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

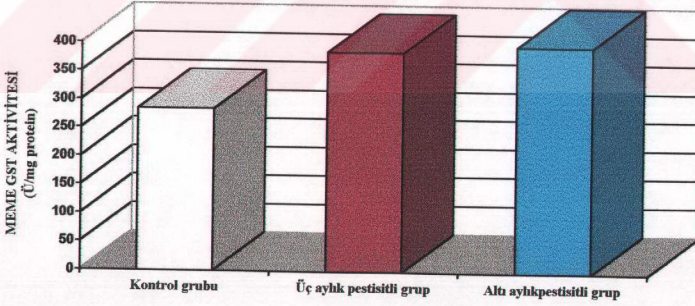


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 73. Meme SOD aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

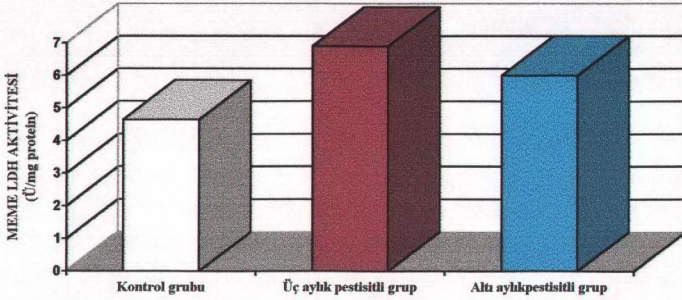


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 74. Meme GST aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

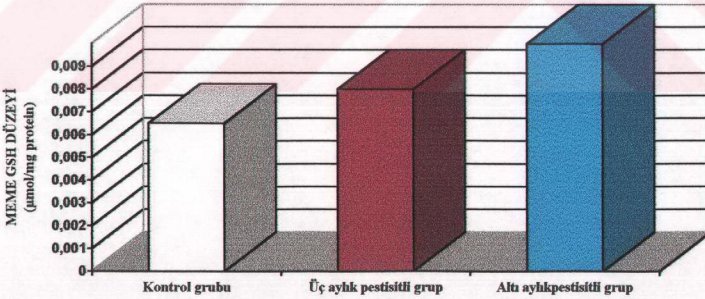


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 75. Meme LDH aktivitesinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

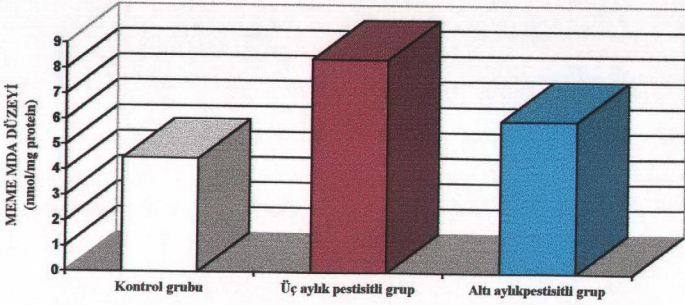


Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 76. Meme GSH düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)



Kontrol grupta her bir hayvana ortalama üç aylık dönemde 1243 g yem, altı aylık dönemde 2245 g yem uygulanmıştır.

Üç aylık pestisitli grupta (Grup II) her bir hayvana ortalama 19.75 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/90 gün doz uygulanmıştır.

Altı aylık pestisitli gruba (Grup IV) her bir hayvana ortalama 34.95 mg endosulfan/100 g vücut ağırlığı/180 gün doz uygulanmıştır.

Şekil 77. Meme MDA düzeyinin kontrol grubunda, üç ve altı aylık pestisitli gruplarda değişimi (mg protein olarak)

5. TARTIŞMA

Artan nüfusun besin ihtiyacının karşılanabilmesi için alınacak tedbirlerden en önemlisi, birim alanda alınan ürün miktarının artırılmasıdır. Bunun için çeşitli uygulamaların yanında, verimin kalitesini düşüren zararlılara karşı bir takım kimyasal maddeler (pestisitler) geliştirilmiştir. Ancak kimyasal savaşta kullanılan bu pestisitlerin gerek üretilmesi, gerekse kullanılması sırasında bilgisizlik veya dikkatsizlik ya da başka nedenlerden dolayı hava, toprak ve su kirlenmesi gerçekleşmektedir¹⁰³.

Pestisitlerin gelişi güzel kullanılışı herhangi bir toksik maddenin kullanılışı gibi potansiyel bir tehlike yaratmaktadır. Zira inorganik, sentetik-organik ve diğer özelliklerde imal edilen pestisitlerin hepsi de doğaya yabancı karakterde maddelerdir¹⁹. Pestisitlerin uzun yıllar ve bol kullanışı, bir takım olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Bunlardan en önemlisi pestisitlerin canlılarda çeşitli şekil ve derecelerde zehirlenmeler meydana getirmesidir. Bitkilerde bazı bozukluklar, üründe kalite düşmesi, topraktaki mikroorganizmaların zarar görmesi, asalak ve avcı böceklerin ölmesi, bal arılarının ve aynı şekilde tabiattaki hayvanların zehirlenmesi de önemli olmakla birlikte, bunlar bizzat insanların pestisitlerden zarar görmesi yanında bir bakıma ikinci planda tutulmaktadır. Organik-sentetik pestisitlerin kullanımından sonra insanlarda görülen zehirlenme olaylarının arttığı bir gerçektir¹⁰³.

Pestisitler insan vücuduna deri, solunum veya sindirim organı yolu ile geçerek karaciğerde Cyt P₄₅₀ bağımlı monoooksijenaz sistemi ile metabolize edilmektedir¹⁰⁴. Pestisitlerin hepatik mikrozomlarda lipit peroksidasyonunu stimüle ederek, Cyt P₄₅₀ ve "hem" miktarının azalmasına, glukoz 6-fosfataz ve pirofosfataz enzim aktivitelerinin önemli derecede azalmasına ve UDP-glukuronil transferaz enziminin stimülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir¹.

Endosulfan organik klorlu pestisitlerin siklodien grubunda yer alan pestisittir. Ürün korunmasında yaygın olarak kullanıldığından önemli çevresel kirlilik olarak önem kazanmaktadır. Çeşitli literatürdeki bilgilere göre endosulfanın majör hedefi böceklerde, insanlarda ve çeşitli hayvanlarda sinir sistemidir (nörotoksik etki). Endosulfanın

respiratuar enzimlerini, porfirin metabolizması enzimlerini ve ince bağırsak enzimlerini etkilediği bildirilmiştir³¹.

Biyolojik sistemlerde ROT'lar oksijenin suya redüksiyonu ile sürekli üretilmektedir. (O₂, OH⁻ v.b.). Bunlar nükleer materyalin (DNA) dejenerasyonuna, poliansatüre yağ asitlerin peroksidasyonuna, methemoglobinin oluşumuna ve hücrel redükthanların oksidasyonuna neden olmaktadır. Normalde hücrelerde ROT üretimi düşük olup hücre içerisinde G6PDH, GR, GPX, CAT, GSH, SOD ve GST gibi antioksidan sistemlerle yok edilerek oksidatif hasarın önlenmesi sağlanmaktadır. Bununla birlikte, ROT miktarları yaşlanma, enfeksiyon, radyasyon, ateroskleroz gibi çeşitli patofizyolojik durumlarda artmaktadır⁸.

Fare, insan genetiksel bozukluklarının çalışılmasında genetik model olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda fare, fizyolojik işlevleri insana oldukça yakın hayvan türü olması ve insan G6PDH, CAT, GPX, GR, Cu-ZnSOD ve GST enzimlerinin gen dizisi ile homoloji göstermesinden dolayı tercih edilmiştir^{47,48,49,56,57,64,73,74}. Bugün Çukurova yöresinde toksisite delilleri, yaygın kullanımı ve kullanılma kriterleri en fazla pestisit olan endosulfanın (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexachloro-1,5, 5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) farede oluşturacak biyolojik etkilerin (toksisite), insanda da görülebileceği düşünülmüştür.

Bu nedenle, birinci aşamada; endosulfanın *M. musculus* vücut, karaciğer, meme ağırlıklarına etkileri, ikinci aşamada; hematolojik verilerine etkileri, üçüncü aşamada; eritrosit, karaciğer ve meme dokusu antioksidan sistemlerine, LDH ve GST aktivitelerine etkileri incelendi. Yanısıra, hematolojik parametrelerde, eritrosit, karaciğer ve meme dokularında antioksidan sistemler, LDH aktivitesi, MDA düzeyleri için referans değerleri belirlenmiş olup, eritrosit antioksidan sistemlerinin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeylerinin bireyin kendi içinde (intra-individual varyasyon) ve bireyler arasında (inter-individual varyasyon) varyasyonlar gösterip göstermediğini incelendi. Hematolojik ve biyokimyasal verilerimizi doğrulamak için, karaciğer ve meme dokularında endosulfanın yarattığı histopatolojik değişimleri ışık ve elektron mikroskopik düzeyinde inceledik. Çalışmamızda, endosulfanın fareye sık aralıklarla tekrarlanan (0.24 mg/100 g vücut ağırlığı/gün/fare) dozlar şeklinde, kısa (19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün/fare) ve

uzun (34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün/fare) sürelerle uygulanması ile oluşan akut toksisite deneyi tercih edildi.

Araştırmamızın birinci aşamasında endosulfanın anaç *M.musculus* vücut, karaciğer ve meme ağırlıklarına etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla her dört grubun deney öncesi ve deney süresince her ay belirli zamanlarda vücut ağırlıkları ölçülmüş olup, üç ve altı ay sürelerle endosulfan uygulamasının vücut ağırlığını etkilemediği ($p>0.05$) saptanmıştır (Çizelge 19). Singh et al.¹⁰⁵ 7.5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı 7.5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı endosulfan dozunu (subkronik doz) 15 ve 30 gün süreyle sıçanlara uyguladıklarında vücut ve testis ağırlıklarının değişmediğini göstermişlerdir. Ladics et al.¹⁰⁶ metilkarbamat pestisitini erkek sıçanlara oral, deri ve solunum yollarıyla uyguladıklarında doza bağlı olarak timus ağırlığında azalmalara neden olduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan, endosulfan uygulanan gruplarda karaciğer ağırlığı oldukça artmıştır (Çizelge 21). Özellikle süre ve dozun yüksek olduğu grupta (Grup IV) karaciğer ağırlığı (%136.4) oldukça artmıştır. Bu olguların hepatosit sitoplazmasında yağ-su oranının artmasına bağlı olarak karaciğer ağırlığının arttığı düşünülmüştür. Organik klorlu insektisitlerin nekrozlu hücre içerisinde yağ içeriğini ve karaciğer ağırlığını arttırmasından kaynaklanabilecek bir karaciğer hasarına neden olduğu bildirilmiştir²⁹. Hepato/somato indeks, ksenobiyotiklerin toksikolojik etkisini göstermektedir. Çalışmamızda endosulfan uygulanan grupların karaciğer ağırlıklarında anlamlı artışlar saptanması nedeniyle buna bağlı olarak hepato/somato indeksin ne kadar değiştiği araştırılmıştır. Endosulfan uygulanan gruplarda (Grup II ve IV) hepato/somato indeks kontrollerinden (Grup I ve III) oldukça artmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 22). Özellikle Grup II'in karaciğer histopatolojik incelenmesinde ağır tahribat bulgularına rastlanılmıştır (Şekil 14, 29). Bunun yanısıra, Grup II'de Hepato/somato indeks Grup IV'e kıyasla daha çok artmıştır. Acaba karaciğer harabiyetinin hepato/somato indeksi arttırabileceği düşünülebilir mi? Gill et al.¹⁰⁷ tatlı su balığını (*Barbus conchoniis*) 2, 3 ve 4 hafta 6.72 mg endosulfana maruz bıraktıklarında hepato/somato indeks'in oldukça arttığını göstermişlerdir. Hasegawa et al.¹⁰⁸ folpet, propineb, kaptan, fosmet ve daminozot gibi pestisitlerin karsinojenik olup olmadığını araştırmak için, söz konusu pestisitleri erkek F344 türü sıçanlara uyguladıklarında, sadece kaptan ve propineb etkisinde (başlangıca kıyasla), vücut ağırlığının değişmediği, karaciğer ağırlığında artma ve hepato/somato

indekslerinde anlamlı artışlar olduğu, karaciğerde neoplastik lezyon sayısında artış olduğu bu nedenle söz konusu pestisitlerin kanserojenik olabileceğini bildirilmişlerdir. Örneklemelerden ve çalışmamızdan elde edilen verilerden hareket ederek, pestisitlerin toksikolojik ve karsinojenik etkisini ölçmede vücut ağırlığının yeterli kriter olmadığı, esas kriterin karaciğer ağırlığı ve hepato/somato indeks olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmalarımızın ikinci aşamasında endosulfanın hematolojik verilere etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle anaç *M. musculus*'ta WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Anaç *M. musculus* tam kanında WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi, ileri toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağı düşünülmüş ve yapılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda anaç *M. musculus*'a ait hematolojik parametrelerle ilgili temel bir veriye rastlanmamıştır. Bu nedenle, sonuçlarımız anaç *M. musculus*'da hematolojik parametrelerle ilgili referans değerlerin ilk kez belirlenmesi bakımından önemlidir. Referans değerlerin belirlenmesinde dört grubun (Grup I, II, III ve IV) deney öncesi verilerin toplamı alınmış, tüm istatistiksel analizleri yapılmış ve %95 güvenirlilik aralığındaki (GA) normal dağılım eğrileri çizilmiştir (Çizelge 25, Şekil 21).

Buna göre çalışmamızda, 60 anaç *M. musculus* tam kanında ortalama (\pm SD); WBC: $6.1 \pm 1.2 \times 10^3 / \text{mm}^3$, RBC: $7.41 \pm 0.91 \times 10^6 / \text{mm}^3$, Hb: $11.3 \pm 1.1 \text{ g/dl}$, Hct: $\% 35.4 \pm 3.8$, MCV: $47.5 \pm 2.4 \text{ fl}$ ve MCH: $15.2 \pm 0.6 \text{ pg}$ olarak saptanmıştır. Bunun yanı sıra, hematolojik parametrelerin tümünün -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.

Bu referans değerler ilgili fare türleri olan literatür verileri ile aşağıdaki şekilde karşılaştırılabilir.

C3H/Jax türü (E.D.) farelerin tam kanında ortalama (\pm SD); WBC: $7.34 \pm 0.80 \times 10^3 / \text{mm}^3$, RBC: $8.79 \pm 0.24 \times 10^6 / \text{mm}^3$, Hb: $12.2 \pm 0.4 \text{ g/dl}$, Hct: $\% 39.5 \pm 0.7$ ve MCV: $47.5 \pm 1.8 \text{ fl}$, *A/Jax* türü (E.D.) farelerin tam kanında ortalama (\pm SD); WBC: $8.71 \pm 1.37 \times 10^3 / \text{mm}^3$, RBC: $9.42 \pm 0.28 \times 10^6 / \text{mm}^3$, Hb: $12.9 \pm 0.2 \text{ g/dl}$, Hct: $\% 42.5 \pm 0.4$ ve MCV: $45.1 \pm 1.4 \text{ fl}$, *C57BL/6Jax* türü (E.D.) farelerin tam kanında ortalama (\pm SD); WBC: $11.43 \pm 1.01 \times 10^3 / \text{mm}^3$, RBC: $9.66 \pm 0.09 \times 10^6 / \text{mm}^3$, Hb: $13.3 \pm 0.2 \text{ g/dl}$, Hct: $\% 44.0 \pm 0.1$ ve MCV: $45.5 \pm 0.6 \text{ fl}$ 'dir⁹².

Çalışmamızda anaç *M. musculus* WBC, RBC, Hb, Hct düzeyleri için belirlenen referans değerlerin söz konusu literatürlerde bahsedilen fare türlerindeki referans değerlerden daha düşük olduğu sadece MCV düzeyinin *C3H/Jax* türü faredekine benzer düzeylerde olduğu görülmüştür. Örneklemelerden ve çalışmamızdan elde edilen verilerden hareket ederek, hematolojik verilerin türlere göre farklılık gösterdiği söylenebilir.

Dimetoat, metilparation, DDT, α , β ve χ -HCH, malation, paration ve PCB'ler gibi pestisitlerin immünotoksik ve hematopoitik etkisi olduğu bildirilmiştir^{109,110}. Literatür tarama çalışmalarında endosulfanın immünotoksik etkisinin olduğu fakat hematopoitik etkisi olduğuna dair bilgilere ya da doğrudan WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda üç ve altı ay sürelerde endosulfan uygulamasında hematolojik parametrelerde önemli farklılıklar kaydedilmiştir. Şekil 22 incelendiğinde endosulfan üç ay sürede WBC düzeyini arttırdığı, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH düzeyini düşürdüğü, lenfosit ve nötrofil sayılarını arttırdığı fakat altı aylık sürede bir adaptasyon olduğu ve neredeyse normal olgulara erişebildiği gözlenmiştir. Gupta et al.¹¹¹ nuvakron (0.8 mg/kg) ve furadan (0.25 mg/kg) gibi pestisitleri farelere intraperitoneal uyguladıklarında Hb, RBC ve Hct düzeylerinde, eritrosit sedimentasyon oranında ve platelet sayısında düşüş, WBC düzeyinde artış, nötrofil ve bazofil oranlarında artış olduğunu göstermişlerdir. Lembowicz et al.¹¹² organik klorlu pestisitlerin (DDT, α , β ve χ HCH) konsantrasyonuna bağlı olarak fare eritrositlerinde Heinz body cisimciklerinde ve lenfosit sayısında artma olduğunu göstermişlerdir. Lox et al.¹¹³ 1750 mg/ml dozunda diazinon ve malationu sıçanlara oral uyguladıklarında protrombin ve tromboplastin zamanının, fibrinojen, koagülasyon faktörlerinin (Faktör II, V, VII, ve X), hematokrit ve platelet sayısının etkilendiğini göstermişlerdir. Gromysz-Kalkowska et al.¹¹⁴ klorfenvinfos ve fosklor gibi pestisitlerin balıklarda (*Japanese quail*) RBC sayısını düşürdüğü, lökosit sisteminde nötrofilik lökositoz ve bazofil sayısında önemli bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Örneklemelerden ve deneysel sonuçlarımızdan hareket ederek, endosulfanın hematopoitik bir etkisinin olabileceği düşünülebilir.

Çalışmalarımızın üçüncü aşamasında endosulfanın yarattığı oksidatif streste eritrosit içi antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeylerinin değişip

değişmediği araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle anaç *M.musculus* eritrositlerinde G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Anaç *M. musculus* eritrositinde G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi, ileri toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağı düşünülerek yapılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda anaç *M.musculus*'a ait antioksidan sistemler, LDH aktivitesi ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlere rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma anaç *M. musculus*'da G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin ilk kez belirlenmesi bakımından önemlidir. Referans değerlerin belirlenmesinde dört grubun (Grup I, II, III ve IV) deney öncesi verilerin toplamı alınmış, tüm istatistiksel analizleri yapılmış ve %95 GA'daki normal dağılım eğrileri çizilmiştir (Çizelge 28, Şekil 25).

Buna göre çalışmamızda, 60 anaç *M.musculus* eritrositinde (Ü/g Hb olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 19.3 \pm 4.9, CAT: 2.3 \pm 1.0, SOD: 1620.8 \pm 409.4, GST: 8054.3 \pm 1403.6, LDH: 277.6 \pm 44.5, GSH: 4.1 \pm 0.8 μ mol/g Hb ve MDA: 680.7 \pm 217.4 nmol/g Hb olarak saptanmıştır. Bu referans değerler 60 anaç *M.musculus* bireyinde -logaritması alınarak normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.

Bu referans değerler, fare türlerine ait olan literatür değerleri ile aşağıdaki şekilde karşılaştırılabilir.

Schimuzue et al.¹¹⁵ erkek *BALB/c* türü fare eritrositinde G6PDH aktivitesini 14 Ü/g Hb, Belge ve ark.⁴⁵ 6-10 haftalık erkek *M. musculus* eritrositinde 32.4 \pm 7.7 Ü/g Hb olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Literatür tarama çalışmamızda, çeşitli fare türlerinde eritrosit CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyi ile ilgili literatür değerlerine rastlanılmamıştır.

Endosulfanın anaç *M.musculus* eritrosit antioksidan sistemlerine, LDH aktivitesine ve MDA düzeylerine etkilerinin aylara göre tek tek incelendiği ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada endosulfanın kısa ve uzun dönemdeki etkileri aylık olarak tek tek tartışılmıştır.

Kısa dönem (19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün/fare) endosulfan uygulamasından sonraki birinci ayda, GSH'ın azalması endosulfanın pentoz fosfat yolu aktivitesini etkilemesi ya da γ -glutamil sentaz enzimi üzerine repressör etkiyi yaparak

GSH düzeyinde azalmalara neden olduğu düşünülmektedir. GSH, canlıları ksenobiyotiklere karşı koruyan en önemli endojen maddelerden biridir. Bu bileşik, serbest sülfidril grubu içermesi nedeniyle, nükleofilik bileşiktir ve redükleyici özellik göstermektedir. Bu nedenle, GSH canlılarda reaktif bileşiklerin detoksifikasyonu mutajenezis, karsinogenezis ve doku nekrozu gibi kimyasal lezyonların önlenmesinde son derece önemlidir¹¹⁶. Örneklerde GSH'ın azalımı GST enziminin bir substratı olduğu için toksikolojik öneme sahiptir. Aynı kan örneklerinde GST ve SOD aktiviteleri artmıştır. Sitozolik GST reaktif elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu sağladığından, eritrositlerdeki varlığı ya da rölatif miktarları çeşitli ksenobiyotiklere karşı cevap verildiğini göstermektedir. SOD aktivitesinin artışı intraselüler O₂'in yüksek oranda oluştuğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte GPX enzimi katalitik siklus süresince redükte GSH kullanmaktadır. Ortamda redükte GSH'ın yeterince sentezlenemesinden dolayı okside GSSG arttığı düşünülmektedir. Redükte GSH aynı zamanda GST enziminin de bir substratıdır¹¹⁶. Bilindiği gibi, G6PDH enzimi yüksek miktarda NADPH oluşturmaktadır. Endosulfanın sebep olduğu oksidatif stres süresince G6PDH enziminin sentezlediği NADPH'lar redükte glutasyon oluşmasına katkıda bulunmaktadır. NADPH methemoglobinin oksihemoglobine redüksiyonunda ve CAT aktivitesinin yapımında gerekli bir nükleotittir⁴³. CAT aktivitesindeki düşüş süperoksit radikallerinin artmasıyla ilgili olabileceği gibi G6PDH aktivitesinin düşüşü ile de ilgili olabilir. Nitekim son çalışmalarda CAT enziminin tetramerik yapıda olduğu ve her bir monomerinin bir 1 molekül NADPH bağladığı gösterilmiştir⁶⁵. Aynı dönemlerde LDH aktivitesi ve MDA düzeyinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Eritrosit LDH aktivitesinin yükselmesi glikolitik aktivitenin artmasıyla ilgili olabilir. Bunun yanısıra, Grup II'in karaciğer histopatolojik incelemelerinde elde edilen bulgularda rastlanan hücre zedelenmesi ile eritrosit LDH aktivitesinin artışı arasında acaba pozitif bir korelasyon varmıdır? Ksenobiyotiklerin maruziyetiyle karaciğerde oluşan hücre zedelenmesine bağlı hipoksik ortamda hücrenin ilk zarara uğradığı yer aerobik solunumdur. Bunun sonucunda mitokondride oksidatif fosforilasyon engellenmekte ve ATP oluşumu yavaşlamaktadır. Hücresel ATP azlığı adenozin monofosfat artımı ile birlikte olmaktadır. Fosfofruktokinaz enzimi uyarılmakta, anaerobik glikoliz artmakta ve buna bağlı olarak eritrosit LDH aktivitesi artmaktadır⁸⁴. Çalışmamızda endosulfan uygulanan grupların karaciğer ışık ve elektron mikroskopik

düzydeki histopatolojik incelenmesinde intrasitoplazmik glikojen partiküllerinde kabalaşma ve glikojen kaybına rastlanmıştır. Endosulfanın glikojen seviyesinde azalmaya neden olduğu benzer şekilde bir çok çalışmada gösterilmiştir¹¹⁷. Özellikle kanserde glikolitik aktivitenin arttığı dolayısıyla çeşitli kanser tiplerinde LDH izoenzim düzeyinin değıştığını ve kas tipi LDH'ın arttığı bildirilmiştir⁵². Paraquat ve CuSO₄ gibi pestisitlerin eritrosit LDH aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir¹¹⁸. MDA kanserojen bir madde olup lipid peroksidasyonunun göstergesidir³⁵. Lipit peroksidasyonu, çeşitli ksenobiyotiklerin uygulanmasıyla ROT üretimi ve antioksidan kaynakların kullanımındaki dengeye bağılı olarak gelişmekte ve başta hücre membranı olmak üzere çeşitli hücrenel yapılara zarar vermektedir^{33,34,35}.

İkinci ayda, redükte GSH azlığında G6PDH enziminin endosulfan toksistesine fizyolojik bir cevap olarak arttığı düşünölmektedir. G6PDH enzimi, Christian ve Warburg tarafından ilk defa tarif edildiğı 1932 yılından beri üzerinde en çok çalışılan araştırma konularından biri olmuştur. Hücrenel G6PDH aktivitesinin modülasyonunda oksidatif stres, besinler, büyüme faktörleri ve hormonlar önemli rol oynamaktadır⁴³.

Üçüncü ayda, GSH'ın iyice azalması sitozolik GST aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. G6PDH aktivitesi ise GSH'ın tekrar tekrar rejenerasyonu için maksimum düzeyde indüklenmiştir.

Şu andaki çalışmamızda, 19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün endosulfan dozunda GST aktivitesinin indüklendiğı fakat üçüncü ayda GSH azlığından GST'nin inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Bunun yanısıra, G6PDH aktivitesinin ikinci ayda indüklenmeye başladığı ve üçüncü ayda maksimum indüksiyon gösterdiği saptanmıştır.

Uzun dönem (34.95 mg/100 g vücut ağırlığı/180 gün/fare) endosulfan uygulanmasında GST ve GSH düzeylerinde artışlar ve G6PDH, SOD, LDH aktivitelerinde ve MDA düzeylerinde normale yaklaşan hafif düşüşler gözlenmiştir. Beşinci ayda itibaren CAT aktivitesi artmıştır. Hücre içerisinde süperoksit radikallerin bir anlamda azalmaya başlamasından kaynaklanabilecek nedenlerden ötürü CAT aktivitesinde normale yaklaşabilecek artışlar olduğu düşünölmüştür. Altıncı ayda CAT ve GST düzeylerinde artışlar devam etmiş ve GSH düzeyi ise normale yaklaşmıştır. Bu dönemde organizmanın uzun süreli ve yüksek dozdaki endosulfan toksistesine adaptasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanısıra altıncı ayın sonunda G6PDH, CAT,

SOD, GST, LDH aktivitelerin ve MDA düzeylerinin başlangıç düzeylerinin çok üstünde olması, pestisitlerin maruziyeti ile oluşan ROT'ların stres genlerin ekspresyonunu artırarak stres enzimlerini üretmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir¹¹⁹.

Uzun dönemdeki çalışmamız, akut dozlardaki endosulfanın eritrosit GST enzimini maksimum düzeyde indüklediği ve glutasyonu yavaş yavaş arttırdığını göstermiştir.

Sitozolik konjugasyon aktivitesinin üçüncü aydaki inhibisyonu ve altıncı ayda ki indüksiyonu süre ve doza bağlı değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Endosulfanın değişik doz ve sürelerinde çeşitli antioksidan ve enzim sistemlerinin cevabı çeşitli literatürlerle karşılaştırıldığında, çalışmamızda elde edilen verilere benzer sonuçlar olduğu gözlenmiştir. 12.5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda endosulfan 4 gün sıçana oral verildiğinde eritrosit Na-K ATPaz ve Mg ATPaz'ın inhibe olduğu, GR aktivitesinde azalma ve G6PDH aktivitesinde artma olduğu bildirilmiştir³¹. Bir çalışmada sülfür içeren fenitrothin ve endosulfan gibi pestisitlerin GSH sistemine etkileri incelendiğinde, pestisitlerle muameleden 6 saat sonra GST aktivitesi 2-kat indüklendiği GSH seviyesinde maksimum artışın 24 saat sonra olduğu bildirilmiştir¹²⁰. Endosulfanın subletal dozda balık (*Premoult Field Crab*) karaciğerinde GST aktivitesini ilk 48. saatte arttığı 144. saatte maksimum düzeye çıktığı ve 192. saatte yavaş yavaş azaldığı, GSH düzeyinin ise 96. saatte artış gösterdiği 144. saatten itibaren azalmaya başladığı gösterilmiştir¹²¹. Sıçanlara 40 mg/kg endosulfan, subakut (tek doz, 40 mg/kg) ve akut (7 hafta boyunca, 40 mg/kg tekrarı) dozlarında kan glukoz, askorbik asit, kan ve karaciğer glutasyon düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı fakat beyin heksokinaz aktivitesinde değişim olmadığı, özellikle akut dozlarda plazma sodyum ve potasyumunu etkilemediği, Ca düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir¹²².

Demir eksikliğine bağlı anemilerde GR ve CAT aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir¹²³. Çalışmamızda kısa dönem (19.75 mg/100 g vücut ağırlığı/90 gün/fare) endosulfan toksisitesinde anemi (+++) ve lökositoz (+++) tablosu ile CAT enzim düşüklüğü saptanmıştır. Katalaz demir içeren porfirin olduğu için demir eksikliğine bağlı olarak CAT aktivitesinin düştüğü düşünülmektedir. Pestisitler oral yolla uygulandığında demir emilimini etkilemesi olasıdır. Bu durumda CAT aktivitesinin düşmesi beklenecektir. Ancak anaç *M. musculus*'da serum demir ve ferritin düzeylerine bakıldığı takdirde bu yorum açıklanabilir.

Çalışmamızın diğer bir aşamasında, eritrosit antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeylerinin bireyin kendi içinde (intra-individual) ve bireyler arasındaki (inter-individual) varyasyonlar gösterip göstermediği toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağı düşünülerek araştırılmıştır. Herhangi bir parametre değerlerinin populasyon referans aralığı olarak kullanılabilmesi için intra-individual varyasyonun inter individual varyasyondan büyük olması, indeks individuality'nin 1.4'den büyük olması ve 0.6'dan küçük olmaması gerekmektedir¹²⁴. Çalışmamızda bu bilgilerden hareket ederek eritrosit parametrelerde toksikolojik amaçlı intra-inter individual ve analitik varyasyonlar, indeks individuality değerlerinin belirlenmesine çalışıldı. Anaç *M. musculus*'ta indeks individuality G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri için sırasıyla 3.05, 0.78, 0.52, 0.95, 1.45, 2.08 ve 0.28 olarak bulunmuştur. Özellikle G6PDH enziminde ve GSH intra-individual varyasyonlar ve indeks individuality çok yüksek, SOD enziminde ve MDA düzeyinde indeks individuality çok düşük olarak bulunmuştur. Bundan dolayı, G6PDH, CAT, GST, LDH ve GSH toksikolojik bir değer olabilir. Bunun yanı sıra LDH, GSH düzeylerinde intra-individual varyasyonların inter-individual varyasyonlardan büyük olduğu gözlenmiştir. Intra-individual varyasyonlarda gözlenen farklılıkların nedeni stres, fiziksel aktivite, açlık, enfeksiyon ve genetik farklılıklar (varyant) olduğu düşünülebilir. Bu fare bireylerine varyant analizinin yapılması gerektiği düşünülmüştür. Stresin ve anestezinin eritrosit enzimlerine etkisi olduğu bildirilmiştir⁴⁴. Bu çalışmada G6PDH, LDH, GSH ve MDA düzeylerinde analitik goal ve analitik varyasyonun intra-individual varyasyonun yarısından daha az olduğu gösterilmiştir. İntra ve inter individual varyasyonlar anaç *M.musculus*'ta, G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinin heterojenite gösterdiği düşünülebilir.

Çalışmalarımızın üçüncü aşamasının diğer kısmında endosulfanın yarattığı oksidatif stresde karaciğer dokusunda antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeylerinin değişip değişmediği araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle anaç *M.musculus* fare karaciğerinde G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Anaç *M. musculus* karaciğer dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi, ileri toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağını düşünerek yapılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda anaç

M.musculus'a ait G6PDH, SOD ve LDH aktivitesi, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili temel bir veriye rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma *M.musculus*'da G6PDH, SOD ve LDH aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin hem Ü/mg protein ve hemde Ü/g karaciğer olarak ilk kez belirlenmesi bakımından önemlidir.

Referans değerlerin belirlenmesinde iki grubun (Grup I ve III) verilerinin toplamı alınmış, tüm istatistiksel analizleri yapılmış ve %95 GA'daki normal dağılım eğrileri çizilmiştir. Karaciğer dokusunda yapılan analiz sonuçları her iki birimde (mg protein ve g karaciğer) verilmiştir.

30 anaç *M.musculus* karaciğer dokusunda (Ü/mg protein olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.034 ± 0.010 , CAT: 265.2 ± 71.1 , SOD: 4.3 ± 1.3 GST: 6840.7 ± 1603.0 , LDH: 2.3 ± 0.7 , GSH: 0.011 ± 0.003 μ mol/mg protein ve MDA: 2.6 ± 0.8 nmol/mg protein olarak saptanmıştır (Çizelge 39). Yanısıra, karaciğer dokusunda ölçülen parametrelerin (mg protein) değerleri -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır (Şekil 25).

30 anaç *M.musculus* karaciğer dokusunda (Ü/g karaciğer olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.244 ± 0.074 CAT: 4483.6 ± 1767.6 , SOD: 1184.9 ± 476.2 , GST: 164548.3 ± 52342.2 , LDH: 27.83 ± 13.26 , GSH: 1.99 ± 0.727 μ mol/g karaciğer ve MDA: 37.22 ± 14.61 nmol/g karaciğer olarak saptanmıştır (Çizelge 40). Ayrıca, karaciğer dokusunda ölçülen parametrelerden (g karaciğer) hepsinin -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır (Şekil 55).

Karaciğer dokusunda elde edilen referans değerler, ilgili literatür değerleri ile aşağıdaki şekilde karşılaştırılabilir.

Van Caneghem et al.¹²⁵ erkek *C57BI* türü fare karaciğerinde G6PDH aktivitesini 0.0072 ± 0.0006 Ü/mg protein, Belge ve ark.⁴⁵ 6-10 haftalık erkek *M. musculus* türü fare karaciğerinde 0.036 ± 0.017 Ü/mg protein ve 1.756 ± 0.814 Ü/g karaciğer olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Van Caneghem et al.¹²⁵ erkek *C57BI* türü fare karaciğerinde CAT aktivitesini 0.366 ± 0.080 Ü/mg protein, Jones et al.⁶² dişi *M. musculus* fare karaciğerinde CAT aktivitesini 76000 Ü/g karaciğer olarak bulduklarını bildirmişlerdir .

Manno et al.⁴¹ 15 haftalık erkek *BALB/c* fare karaciğerinde SOD aktivitesini 14.34 ± 2.62 Ü/mg protein, Van Caneghem et al.¹²⁵ erkek *C57BI* türü fare karaciğerinde

SOD aktivitesini 4.31 ± 0.39 Ü/mg protein, Dahn et al.⁶⁸ yaşlı erkek *CD1* türü fare karaciğerinde Cu-ZnSOD aktivitesini 15.25 ± 1.10 Ü/mg protein ve MnSOD aktivitesini 7.46 ± 0.65 Ü/mg protein, Belge ve ark.³⁹ 4 aylık erkek *M.musculus* fare karaciğerinde SOD aktivitesini 553.7 ± 214.2 Ü/g karaciğer olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Prohaska et al.⁴² dişi *M.musculus* karaciğerinde GST 0.50 ± 0.06 Ü/mg protein, Ünsal ve ark.¹²⁶ koyun karaciğerinde GST aktivitesini 2550 Ü/mg protein, Sharma et al.¹²⁷ 7-8 haftalık dişi *CD1* türü fare karaciğerinde GST aktivitesini 85.71 ± 0.85 Ü/g karaciğer olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Hazelton et al.¹²⁸ erkek *C57BL/6J* türü fare karaciğerinde GSH düzeyini 5.47 ± 0.27 µmol/g karaciğer, Sharma et al.¹²⁷ 7-8 haftalık dişi *CD1* türü fare karaciğerinde GSH düzeyini 6.24 ± 0.67 µmol/g karaciğer, Belge ve ark.³⁹ 4 aylık erkek *M.musculus* fare karaciğerinde GSH düzeyini 0.946 ± 0.228 Ü/g karaciğer olarak bulmuşlardır.

Literatür tarama çalışmamızda, çeşitli fare türlerinin karaciğerinde LDH aktivitesi ve MDA düzeyi ile ilgili literatür değerlerine rastlanılmamıştır.

Pestisitlerin biyotransformasyona uğradığı başlıca yer karaciğerdir. Bu nedenle pestisitlerin aktivasyonu ile oluşan bir çok aktif metabolitler burada hepatotoksik maddelere dönüştürmektedir. Bu toksik etkiler kanserojenik veya nonkanserojenik tipte olabilmektedir. Endosulfanın çeşitli hayvan karaciğer dokularında antioksidan sistemlere, LDH ve MDA düzeylerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda karaciğer dokusunda her iki birimde (mg protein ve g karaciğer) verilen analiz sonuçlarından elde edilen bulgular benzer olduğu gözlenmiştir. Şekil 33-46 incelendiğinde, kısa dönem endosulfan toksisitesinde karaciğer dokusunda G6PDH, SOD, GST, LDH aktivitelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin arttığı, CAT aktivitesinin düştüğü saptanmıştır. Uzun dönem toksisitesinde adaptasyona bağlı olarak G6PDH, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri normal değerlerin biraz üstünde kalırken, CAT aktivitesi normal değerlerin çok üstüne çıkmıştır. Kısa dönem endosulfan toksisitesinde organizmanın oldukça fazla bir oksidatif stres altında kaldığı ve bu esnada stres genlerinin aktive olduğu, ortamda fazla miktarda oluşan ROT'ları yok etmek için stres antioksidan enzimlerin harekete geçtiği düşünülmektedir. Çizelge 37'de görüldüğü gibi pestisitli grupların karaciğerinde deney sonrası antioksidan enzim düzeyleri önceki

mevcudiyetlerinin çok üstünde olduğu dikkat çekicidir. Karaciğer dokusunda endosulfanın biyokimyasal olarak kısa ve uzun dönemde etkilerin, eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH aktivitelerinde, GSH ve MDA düzeylerinde elde edilen etkilere benzer olduğu saptanmıştır.

Ksenobiyotiklerin etkisinde canlı antioksidan sistemin cevabı çeşitlilik göstermektedir. Farklı çalışmalarda sunulan ksenobiyotiklerin etkisindeki antioksidan sistemin cevabı ile endosulfan ksenobiyotiğinin etkisinde antioksidan sistemin cevabı karşılaştırılmak istenmiştir. Van Caneghem et al.¹²⁵ fenilhidrazini fareye enjekte ettiklerinde karaciğer ve eritrosit enzim sistemlerinin iki safhada davranış gösterdiklerini bildirmişlerdir. İlk safhada hepatik glutatyonun ve pentoz fosfat şantı aktivitesinin düşmesinden dolayı karaciğer G6PDH aktivitesi düştüğü, eritrositlerde ise hemoglobin oksidasyonu ile eritrosit G6PDH enzim aktivitesi düştüğünü, ikinci safhada; indirek olarak GST ve G6PDH enzim aktivitesinin arttığını ve hücre popülasyonu yenilenerek normale geçtiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda da, kısa dönem endosulfan uygulanmasında eritrosit ve karaciğer G6PDH enzim aktivitesi düşmekte, uzun dönem endosulfan uygulanmasında eritrosit ve karaciğer G6PDH enzim aktivitesi yükselmekte ve karaciğer histopatolojik incelenmesinde hücre popülasyonunda ağır tahribat bulguların yanısıra hafif-orta derecede rejenerasyona bulgularına rastlanmıştır. Kedilere 1 ve 2 mg/kg vücut ağırlığı dozunda lindan uygulandıktan sonraki 30 dak., 1. saat, 2. saat, 4. saat ve 8. saat'te kan glukoz ve GSH düzeyi ölçülmüş ve lindan'ın hipoglisemiye neden olduğu, kan GSH'ı ilk 30 dakikada düşürürken karaciğer GSH'ı 4. saatte düşürdüğü bildirilmiştir¹²⁹. Oysa bizim çalışmamız, buna göre uzun süreli çalışma olduğundan endosulfan kan ve karaciğer GSH'ını aynı zamanda (birinci ayda) düşürmektedir. Fenolik antioksidan olan butilhidroksisiyanit asit (BHA) dişi ve erkek fareye uygulandığında karaciğerde GSH'ın 1.6 kat arttığı ve GST'nin 2 kat indüklendiği bildirilmiştir¹²⁷. Kirli suyun yarattığı oksidatif stresde (*Nile Tilapia*) balık eritrositinde CAT, GPX ve GSH düzeylerinde azalma, SOD ve G6PDH düzeylerinde artma olduğu; karaciğerlerinde ise SOD ve CAT düzeylerinde artma, G6PDH, GPX ve GSH düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir⁶⁵. Çalışmamızda endosulfanın eritrosit ve karaciğer G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerine, GSH ve MDA düzeylerine etkilerinin paralel olduğu saptanmıştır. Farelere 3 mg/kg aflatoxin (AFB₁) intraperitoneal uygulandığında karaciğer

G6PDH enziminin indüklendiği gösterilmiştir¹³⁰. Çalışmamızda da, eritrosit G6PDH'n üçüncü ayda maksimum indüksiyon gösterdiği, özellikle süre ve dozun yüksek olduğu grubun (Grup IV) karaciğerinde G6PDH'n maksimum derecede indüklendiği saptanmıştır. Balık (*Channa Puntatus*) ovaryumlarının endosulfan ve malationla (subletal dozlarda) muamelesinde, oositlerin II ve III aşamalarının kaybolduğu ve 3-β-hidroksisteroit dehidrogenaz ve G6PDH aktivitesinin inhibisyona uğradıklarını, malationun doza bağlı olarak beyin AchE aktivitesini inhibe ettiği, endosulfanın ise AchE aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir¹³¹. Çalışmamızda, kısa dönem endosulfan uygulanmasında eritrosit ve karaciğerde CAT aktivitesinin düştüğü ve MDA düzeyinde artma meydana geldiği ve lindan'a zıt olarak kısa dönem endosulfan uygulanmasıyla karaciğerde ağır harabiyet olduğu saptanmıştır. Bu da, karaciğerde reversible harabiyet oluşması antioksidan mekanizmaların oksidatif hasara karşı geçici bir süre yetersiz kaldıklarını işaret etmektedir. Farelere intraperitoneal olarak 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda Aroklor 1254 (PCB'ler) pestisit karışımı enjekte edildiğinde vücut ağırlığının değişmediği, karaciğer ağırlığının arttığı ve GST aktivitesinin 4.2 kat indüklendiği bildirilmiştir¹³². Çalışmamızda, endosulfanın uygulanmaya başladığı ilk birinci ayda eritrosit GST aktivitesinin indüksiyon gösterdiği fakat üçüncü ayda ortamdaki GSH azlığında inhibisyona uğradığı ve özellikle süre ve doz arttırıldığında (Grup IV) GST aktivitesinin maksimum indüksiyon gösterdiği saptanmıştır. Örneklere göre görüldüğü gibi, ksenobiyotiklerin etkisinde ROT üretiminde ve bu üretime bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde sürekli bir artıştan söz etmek veya enzim inhibisyonu olabileceği konusunda fikir yürütmek zordur. Canlı ksenobiyotiklere karşı antioksidan mekanizmalarını uygun derecelerde çalıştırarak kendisini savunma yolunu seçmekte veya ksenobiyotik bileşimine bağlı olarak antioksidan mekanizmaların çalışması, enzim sentezinin engellenmesi ya da enzim yapısının değiştirilmesi şeklinde baskılanmaktadır.

Çalışmamızın üçüncü aşamasının diğer bir kısmında endosulfanın meme dokusunda yarattığı oksidatif stresde antioksidan sistemlerin, LDH ve MDA düzeylerinin değişip değişmediği araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle anaç *M.musculus* fare meme dokularında G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Anaç *M.musculus* meme dokusunda G6PDH,

CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin belirlenmesi, ileri toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağı düşünülmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda anaç *M.musculus*'a ait antioksidan sistemler, LDH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlere rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma anaç *M.musculus* meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri ile ilgili referans değerlerin Ü/mg protein olarak ilk kez belirlenmesi bakımından önemlidir.

Referans değerlerin belirlenmesinde iki grubun (Grup I ve III) verilerin toplamı alınmış, tüm istatistiksel analizleri yapılmış ve %95 GA'daki normal dağılım eğrileri çizilmiştir (Çizelge 44, Şekil 56). Buna göre çalışmamızda, 30 anaç *M.musculus* meme dokusunda ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.010 ± 0.003 , CAT: 23.2 ± 5.7 , SOD: 4.3 ± 1.6 , GST: 285.1 ± 63.5 , LDH: 4.6 ± 1.2 , GSH: 0.006 ± 0.003 ve MDA: 4.4 ± 1.5 olarak bulunmuştur. Bu veriler ilgili literatür verileri ile aşağıdaki şekilde karşılaştırılabilir.

Hilf et al.⁵⁰ anaç BALB/c türü fare meme dokusunda G6PDH aktivitesini 0.134 ± 0.010 Ü/mg protein, Rzymowka et al.⁵⁴ insan normal meme dokusunda G6PDH aktivitesini 17.8 Ü/g meme dokusu olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Rzymowka et al.⁵⁴ insan normal meme dokusunda CAT aktivitesini 2.4 Ü/g meme dokusu olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Hilf et al.⁵¹ anaç BALB/c türü fare meme dokusunda LDH aktivitesini 0.859 ± 0.014 Ü/mg protein⁵¹, Rzymowka et al.⁵⁴ insan normal meme dokusunda LDH aktivitesini 97.4 Ü/g meme dokusu olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Perry et al.⁸³ insan normal meme dokusunda GSH düzeyini 0.0072 ± 0.0013 µmol/mg protein ve 0.136 ± 0.019 µmol/g meme dokusu olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Literatür tarama çalışmamızda, çeşitli canlı türlerinin meme dokularında SOD ve GST aktiviteleri ve MDA düzeyi ile ilgili literatür değerlerine rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda meme dokusunda elde edilen veriler, söz konusu literatür verileri karşılaştırıldığında anaç *M. musculus* GSH düzeyinin insaninkine yakın olduğu, diğer verilerin ise canlı türleri arasında farklılık gösterdiği söylenebilir.

Sayırsız kimyasal kontaminantlar (pestisitler, halojenli hidrokarbonlar, solventler ve diğer eser elementler v.b.) ve karsinojenler insan sütünde ve adipoz dokusunda

mevcuttur. Bu kontaminantlar birçok epidemiyolojik çalışmalarda meme kanseri için risk faktörü teşkil ettiği bildirilmiştir⁶. Organik klorlu pestisitler, diğer çevresel ve diyetel östrojenler kadınlarda meme kanser insidasında artışa ve erkeklerde sperm konsantrasyonunun düşmesine neden olduğu bildirilmiştir^{2,4}. Endosulfanın hayvan (fare, sıçan, domuz v.s.) meme dokularında antioksidan sistemlere, LDH aktivitesine ve MDA düzeylerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, kısa dönem endosulfan uygulaması GST, LDH, ve MDA düzeylerini arttırdığı ve G6PDH, CAT, SOD ve GSH düzeylerini değiştirmediği gözlenmiştir. Uzun dönem endosulfan uygulaması ise, G6PDH, CAT, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinde arttırdığı fakat SOD düzeyini değiştirmediği gözlenmemiştir. Endosulfan uygulanan meme dokularının histopatolojik incelemesinde "sitroma hücre infiltrasyonu" bulgulara rastlanmıştır (Şekil 7). Gerek biyokimyasal gerekse histopatolojik bulgulardan hareket ederek, düşük östrojenik aktiviteye sahip olan endosulfanın, meme dokusunda hasar oluşturabilmesi için çok daha uzun bir zaman periyodunun gerekebileceği söylenebilir.

Endosulfan toksik etkisinin fare bireyleri arasında hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerde farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bunun nedeninin "biyolojik varyasyon"la ilgili toksisite değişikliği, genetik, beslenme ve patolojik nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu nedenlerin çoğu biyotransformasyona etki eden faktörlerdeki mekanizmalara dayanmaktadır. Genel olarak, mikrozomal enzimlerle metabolik aktivasyon sonucu daha toksik olan ilaç ve kimyasal maddeler dışılerde daha etkili olmaktadır. Bununla cinsiyet hormonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir¹. *M. musculus* bireyleri arasındaki endosulfan toksisite farklılıkları, bireylerin karaciğer ya da meme dokularında rezüdü analizlerinin yapılmasıyla da açığa çıkacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, endosulfanın yarattığı oksidatif streste antioksidan enzim düzeylerinin eritrosit ve karaciğer dokularında paralel olarak değişim gösterdiği, buna karşılık meme dokusu verilerinde ise farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda endosulfanın non-karsinojenik etkileri görülmüş olup kısa dönemde doku düzeyinde oluşan hasarın reversible olduğu ve organizmanın uzun dönem toksisitesine uyum sağladığı gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR

1. Endosulfanın vücut ve meme ağırlığına etkisi olmadığı, kısa (90 gün) ve uzun (180 gün) dönemlerde karaciğer ağırlığında ve hepato/somato indekslerde artışa neden olduğu saptanmıştır.
2. Anaç *M.musculus* tam kan WBC, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerine ait referans değerler ilk olarak bu çalışmada belirlenmiştir Buna göre çalışmamızda, 60 anaç *M.musculus* tam kanında ortalama (\pm SD); WBC: $6.1\pm 1.2 \times 10^3/ \text{mm}^3$, RBC: $7.41\pm 0.91 \times 10^6/ \text{mm}^3$, Hb: $11.3\pm 1.1 \text{ g/dl}$, Hct: $\% 35.4\pm 3.8$, MCV: $47.5\pm 2.4 \text{ fl}$ ve MCH: $15.2\pm 0.6 \text{ pg}$ olarak saptanmıştır. Bunun yanısıra, hematolojik parametre değerlerinin -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.
3. Endosulfanın kısa dönemde tam kan RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerinde azalmaya, WBC düzeyinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Uzun dönemde ise RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH düzeylerindeki artış ile normal değerlere yaklaştığı, WBC düzeyindeki azalış ile normal değerlere yaklaştığı saptanmıştır.
4. Anaç *M.musculus* eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerine, GSH ve MDA düzeylerine ait referans değerler ilk olarak bu çalışmada belirlenmiştir. Buna göre çalışmamızda, 60 anaç *M.musculus* eritrositinde (Ü/g Hb olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 19.3 ± 4.9 , CAT: 2.3 ± 1.0 , SOD: 1620.8 ± 409.4 , GST: 8054.3 ± 1403.6 , LDH: 277.6 ± 44.5 , GSH: $4.1\pm 0.8 \mu\text{mol/g Hb}$ ve MDA: $680.7\pm 217.4 \text{ nmol/g Hb}$ olarak saptanmıştır. Bu referans değerler 60 anaç *M.musculus* bireyinde -logaritması alınarak normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.
5. Endosulfanın kısa dönemdeki eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST ve LDH aktivitelerine, GSH ve MDA düzeylerine toksik etkisi aylara göre değerlendirilmiştir. Endosulfan uygulamasının birinci ayında GSH, CAT ve G6PDH düzeylerinde düşüş, SOD, GST, LDH ve MDA düzeylerinde artış saptanmıştır. İkinci ayda G6PDH aktivitesi GSH'ı tekrar rejenere etmek için artmıştır. Bunun yanısıra bu ayda SOD, LDH ve MDA düzeylerinde artış, GSH, CAT ve GST düzeylerinde düşüş meydana gelmiştir. Üçüncü ayda ise GSH azlığına paralel olarak GST enziminin inhibisyonu ve G6PDH'ın maksimum indüksiyon gösterdiği, SOD, LDH ve MDA düzeylerinde

maksimum artışın olduğu dikkati çekmiştir. Uzun dönemde ise CAT, GSH ve GST düzeylerinde artış meydana gelmiştir. G6PDH, SOD, LDH, MDA düzeylerinde ise normale yaklaşık şekilde düşüşler gözlenmiştir. Bu dönemin sonunda GST enzimi maksimum düzeyde indüklenmiştir.

6. Eritrosit antioksidan sistemlerin, LDH aktivitesinin ve MDA düzeylerinin bireyin kendi içinde (intra-individual) ve bireyler arasındaki (inter-individual) varyasyonlar gösterip göstermediği toksikolojik çalışmalara basamak oluşturacağı düşünülerek araştırılmıştır. Anaç *M. musculus*'ta indeks individuality G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeyleri için sırasıyla 3.05, 0.78, 0.52, 0.95, 1.45, 2.08 ve 0.28 olarak bulunmuştur. Özellikle G6PDH enziminde intra-individual varyasyonlar ve indeks individuality çok yüksek fakat SOD ve MDA düzeylerinde indeks individuality düşük olarak bulunmuştur. Bunun yanısıra LDH, GSH düzeylerinde intra individual varyasyonlar inter individual varyasyonda büyük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada G6PDH, LDH, GSH ve MDA düzeylerinde analitik goal ve analitik varyasyonun intra-individual varyasyonun yarısından daha az olduğu gösterilmiştir.
7. Karaciğer G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerine ait referans değerler ilk olarak bu çalışmada belirlenmiştir. Karaciğer dokusunda yapılan analiz sonuçları, mg protein ve g karaciğer birimlerinden verilmiştir. Buna göre;
a) 30 anaç *M.musculus* karaciğer dokusunda (Ü/mg protein olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.034 ± 0.010 , CAT: 265.2 ± 71.1 , SOD: 4.3 ± 1.3 GST: 6840.7 ± 1603.0 , LDH: 2.3 ± 0.7 , GSH: 0.011 ± 0.003 μ mol/mg protein ve MDA: 2.6 ± 0.8 nmol/mg protein olarak saptanmıştır. Yanısıra, karaciğer dokusunda ölçülen parametrelerin (mg protein) değerleri -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.
b) 30 anaç *M.musculus* karaciğer dokusunda (Ü/g karaciğer olarak) ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.244 ± 0.074 CAT: 4483.6 ± 1767.6 , SOD: 1184.9 ± 476.2 , GST: 164548.3 ± 52342.2 , LDH: 27.83 ± 13.26 , GSH: 1.99 ± 0.727 μ mol/g karaciğer ve MDA: 37.22 ± 14.61 nmol/g karaciğer olarak saptanmıştır. Ayrıca, karaciğer dokusunda ölçülen parametrelerden (g karaciğer) hepsinin -logaritması alınmaksızın normal dağılım gösterdiği saptanmıştır.

8. Karaciğerde biyokimyasal olarak kısa ve uzun dönemde, eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinin verilerine paralel veriler elde edilmiştir. Karaciğerde biyokimyasal olarak kısa ve uzun dönemde, eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinin verilerine paralel veriler elde edilmiştir.
9. Meme dokusunda G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerine ait referans değerler ilk olarak bu çalışmada belirlenmiştir. Buna göre çalışmamızda, 30 anaç *M.musculus* meme dokusunda ortalama (\pm SD); G6PDH: 0.010 ± 0.003 , CAT: 23.2 ± 5.7 , SOD: 4.3 ± 1.6 , GST: 285.1 ± 63.5 , LDH: 4.6 ± 1.2 , GSH: 0.006 ± 0.003 ve MDA: 4.4 ± 1.5 olarak bulunmuştur.
10. Meme dokusunda biyokimyasal olarak kısa ve uzun dönemde karaciğer ve eritrosit G6PDH, CAT, SOD, GST, LDH, GSH ve MDA düzeylerinde elde edilen verilere zıt olarak biyokimyasal etkilerin hafif düzeyde olduğu saptanmıştır. Kısa dönemde GST düzeylerinde artış, uzun dönemde ise sadece CAT düzeyinde düşüşe rastlanmıştır.
11. Karaciğer dokularının ışık ve elektron mikroskopik düzeydeki histopatolojik incelenmesinde kısa dönemde çok ağır tahribat bulgularına rastlanmış fakat uzun dönemde ağır tahribat bulguların yanısıra hafif-orta derecede rejenerasyon bulguları saptanmıştır. Meme dokularının ışık mikroskopik düzeydeki histopatolojik incelenmesinde kısa ve uzun dönemde sadece meme sitromasında hücre infiltrasyon bulguları saptanmıştır. O yüzden meme dokuların elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi yapılmamıştır.
12. Endosulfanın hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik etkilerini incelemelerden elde edilen verilere göre kısa dönem akut toksisitesinde canlıda ağır tablo meydana gelirken uzun akut toksisitesinde canlının toksisiteye uyum sağladığı gözlenmiştir
13. Pestisit etkilerinin araştırılmasında biyokimyasal marker olarak GSH sisteminin ve G6PDH enziminin kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Vural N.** *Toksikoloji*. Ankara: A.Ü. Basımevi, 1984.
2. **MacMahon B.** Pesticide residues and breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1994; 86:572-573.
3. **Toros S, Maden S.** *Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları*. Ankara: A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 1985.
4. **Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N.** Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 648-652.
5. **Falck F, Ricci A, Wolff MS, Godbold J, Deckers P.** Pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health*, 1992; 47: 143-146.
6. **Hunter DJ, Kelsey KT.** Pesticide residues and breast cancer: the harvest of a silent spring. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 598-599.
7. **Kitchin KT.** An enzymatic approach to biotransformation. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol*, 1984; 6: 303-310.
8. **Chandra M, Chandra N, Agrawal R, Kumar A, Ghatak A, Pandey VC.** The free radical system in ischemic heart disease. *Int J Cardiol*, 1994; 43: 121-125.
9. **Maqvi SM, Vaishnavi C.** Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp Biochem Physiol*, 1993; 105: 347-361.
10. **Berkson N.** Tarım İlaçları ve Çevre. *Tarım İlaçlarının Kullanılması Semineri*. ÖDTÜ Gaziantep Kampüsü, 1976; 1: 1-17.
11. **Djordjevic MV, Hoffmann D, Fann J, Prokopczyk B, Citron ML, Stellman SD.** Assessment of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyl in adipose breast tissue using a fluid supercritical extraction method. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 2581-2585.
12. **Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N.** Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women. *J Natl Cancer Inst*, 1994; 86: 589-599.

13. **Kolayanova F, Tarkowski S.** *Toxicology of Pesticide.* Copenhagen: 1981: 41-123.
14. **Safe SH.** Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem. *Environ Health Perspect*, 1995; 103: 346-351.
15. **Anonymous E.** Report of the secretary's Commission on pesticides and Their Relationship to Environmental Health. *U.S. Depart Health*, London, 1969: 17-31.
16. **Miles JR, Harris CR.** Insecticide residues in a stream and a controlled drainage system in agriculture areas of southwestern ontario. *Pest monitor J*, 1971; 289-294.
17. **Chisholm D, Macphee AW.** Persistence and effects of some pesticides in soil. *Econ J Ent*, 1972; 65: 1010-1013.
18. **Claborn HV, Mann HD, Ivey MC, Radeleff RD and Woodard GT.** Extraction of toxaphene and strobane in the milk of dairy cows. *J Agr Food Chem*, 1973; 11: 286-289.
19. **Türkiyenin Çevre Sorunları.** *Türkiyenin Çevre Sorunları Vakfi Yayını.* Ankara, 1991.
20. **Pearce N, Reif JS.** Epidemiological studies of cancer in agriculture workers. *Am J Int Med*, 1990; 18:133-148.
21. **Blair A, Malker H, Cantor KP, Burmeister L, Wiklund K.** Cancer among farmers. *Scand J Environ Health*, 1985; 11: 397-407.
22. **Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Kurata Y, Hagiwara A, Shirai T.** Effect of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 1995; 33: 159-163.
23. **Peluso M, Merlo F, Munnia A, Bolognesi C, Puntoni R, Parodi S.** (32)P-postlabeling detection of DNA adducts in peripheral white blood cells of greenhouse floriculturist from western Liguria, Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996; 5: 361-369.
24. **Lodovici M, Aiolli S, Monserrat C, Dolara P, Medica A, Di-Simplicio P.** Effect of a mixture of common used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1994; 13: 163-168.
25. **Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M.** Approachesto the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environ Health Perspect*, 1995; 103: 17-22.
26. **Pluth J M, Nicklas J A, O'neill J P, Albertini R J.** Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res*, 1996; 56: 2393-2399.

27. **Hall K.** *The Biochemistry and Uses of Pesticide*. 2th. Ed, London: Academic Press, 1993. 57-79.
28. **Norman C.** EPA sets new policy on pesticide cancer risks. *Science*, 1988; 242: 366-367.
29. **Barlas NE.** The effects of commercial and microorganism-degraded solutions of endosulfan and carbaryl on albino mice. *Tr J of Zoology*, 1994; 18: 221-226.
30. **Ely TS, MacFarlane JW, Galen WP, Hine CH.** Convulsion in thiodan workers: a preliminary report. *J Occup Med*, 1967; 9: 35-37.
31. **Kiran R, Varma MN.** Age related toxic effect of endosulfan on certain enzymes of rat erythrocytes. *Ind J Exp Biol*, 1990; 694-696.
32. **Gupta PK, Murphy RC, Chandra SV.** Toxicity of endosulfan and manganese chloride: cumulative toxicity rating. *Toxic Lett*, 1981; 7: 221-228.
33. **Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Der*, 1997; 3-4: 92-95.
34. **McCord JM.** Iron free radicals and oxidative injury. *Semin Hematol*, 1998; 5-12.
35. **Thomas CE, morehouse LA, Aust SD.** Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem*, 1985; 260: 3275-3280.
36. **Liang HCL, Shertzer HG, Nebert DW.** "Oxidative stress" response in liver of an untreated newborn mouse having a 1.2-centimorgan deletion on chromosome 7. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 182: 1160-1164.
37. **Klaunig JE, Xu Y, Bachowski S, Ketcham CA, Isenberg JS, Kolaja KL, Baker TK, Walborg EF, Stevenson DE.** Oxidative stress in nongenotoxic carcinogenesis. *Toxicol Lett*, 1995; 82-83: 683-691.
38. **Çolak Ö, Alataş Ö, Çelik M, İnal M.** Hipertiroidizm olgularında serum lipid peroksit ve vitamin E düzeyleri. *Optimal Tıp Der*, 1994; 7: 61-63.
39. **Belge E, Oruç E, Yüregir GT, Üner N, Doran F ve Varinli S.** *Mus musculus* ve *Oreochromis niloticus*'da karaciğer dokusunda antioksidan sistemler ve farklılıkları. *Erciyes Üniversitesi Tıp Der*, 1998; 20: 239-243.
40. **Sumboonnanonda A, Malasit P, Tanphaichitr V.** Renal tubular function in β -thalassemia. *Pediatr Nephrol*, 1998; 12:280-283.

41. **Manno M, Bertazzon A, Burlina A, Galzigna L.** Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. *Enzyme*, 1985; 34: 107-112.
42. **Prohaska JR, Sunde RA.** Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp Biochem Physiol*, 1993; 105: 111-116.
43. **Kletzien RF, Harris PKW, Foellmi LA.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb J*, 1994; 8: 174-181.
44. **Kahraman E.** Ameliyatlarda kullanılan anestezik maddelerin eritrosit ve lökosit G6PD enaktivitesine etkisi. *Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1992.*
45. **Belge E.** Anestezik maddelerin fare karaciğer G6PD enzim aktivitesine etkisi. *Master Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1994.*
46. **Kratzer P, Chapman V.** X chromosome reactivation in oocytes of *Mus caroli*. *Proc Natl Acad Sci*, 1981; 78: 3093-3097.
47. **Rang K, Ginsberg L.** Isolation and sequence of a rat glucose-6-phosphate dehydrogenase promoter. *Biochim Biophys Acta*, 1994; 1217: 90-92.
48. **Toniolo D, Philips M, Lettieri T, Martini G.** The CpG island in the 5' region of the G6PD gene of man and mouse. *Gene*, 1991; 102: 197-203.
49. **Martin-De Leon P, Wolf S, Persico G.** Localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in mouse and man by in situ hybridization : Evidence for a single locus and transposition of homologous x-linked genes. *Cytogenet Cell Genet*, 1985; 39: 87-92.
50. **Hilf R, Rector W, Abraham S.** A glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme characteristic of preneoplastic and neoplastic mouse mammary tissue. *J Natl Cancer Inst*, 1973; 50: 1395-1398.
51. **Hilf R, Ickowicz R, Bartley JC, Abraham S.** Multiple molecular forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal, preneoplastic, and neoplastic mammary tissues of mice. *Cancer Res*, 1975; 35: 2109-2116.
52. **Hilf R, Rector WD, Orlando RA.** Multiple molecular forms of lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal and abnormal human breast tissues. *Cancer*, 1976; 37: 1825-1830.

53. **Nevaldine BH, Hyde CM, Le HR.** Mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 1974; 165: 398-406.
54. **Rzymowska J.** Enzyme activities in human breast tumours. *Acta Biochimica Polonica*, 1992; 39: 290-293.
55. **Miller D, Baehner R.** *Blood disease of infancy and childhood* 6th.Ed., London: CV Mosby, 1990. 506- 542.
56. **Lopez-Barea J, Lee C.** Mouse liver glutathione reductase. *Eur J Biochem*, 1979; 98: 487-499.
57. **Chambers I, Framton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR.** The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocystein in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J*, 1986; 5: 1221-1227.
58. **Maiorino M, Chus FF, Ursini F, Davies KJ, Doroshov j, Estwothy S.** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kD selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biochem*, 1991; 266: 7728- 7732.
59. **Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T.** Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem*, 1991; 109: 918- 923.
60. **Avissar N, Whitin JC, Allen ZP, Wagner DD, Liegey P, Cohen JH.** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biochem*, 1989; 264: 15850- 15855.
61. **Chu F, Esworthy SR, Doroshov HJ, Doan K, Liu X.** Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood*, 1992; 79: 3233- 3238.
62. **Jones GL, Masters CJ.** On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Comp Biochem Physiol*, 1976; 55: 511-518.
63. **Baird MB, Massie HR, Birnbaum LS.** Presence of a high-molecular-weight form of catalase in enzyme purified from mouse liver. *J Biochem*, 1977; 163: 449-453.
64. **Schisler NJ, Singh SM.** A quantitative genetic analysis of tissue-specific catalase activity in *Mus musculus*. *Biochemical Genetics*, 1991; 29: 65-85.
65. **Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC.** Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicol*, 1996; 34: 151-162.

66. **Scott EM, Harrington JM.** Comparative studies of catalase and superoxide dismutase activity within salmon fish erythrocytes. *Comp Biochem Physiol*, 1990; 95: 91-93.
67. **Oberley LW, Buettner GR.** Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*, 1979; 39: 1141-1149.
68. **Danh HC, Benedetti MS, Dostert P.** Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. *J Neurochem*, 1983; 40: 1003-1007.
69. **Imre S, Juhasz E.** The effect of oxidative stress on inbred mice of different ages. *Mech Ageing Develop*, 1987; 38: 259-266.
70. **Etiobbio BOI, Oraedu ACI, Ugochukwu EN.** A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp Biochem Physiol*, 1990; 95: 521-523.
71. **Karnaikhova TB, Korobova LN, Reikh EM.** Superoxide dismutase activity as an index of the toxic action of pesticides. *Biol Nauki*, 1990; 5: 146-149.
72. **Lemaire P, Matthews A, Forlin L, Livingstone DR.** Stimulation of oxyradical of production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1994;26:191-200.
73. **Delebar J, Nicole A, D'auriol L, Jacop Y, Meunier-Rotial M, Galibert F, Sinet P, Jerome H.** Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA. *Eur J Biochem*, 1987; 166: 181-187.
74. **Malins DC, Ostrander GK.** Molecular, Biochemical and Cellular. In: George GS Ed. *Aquatic Toxicology*, Florida: CRC Press, 1994: 37-85.
75. **Clark AG.** The comparative enzymology of the glutathione-S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp Biochem Physiol*, 1989; 3: 419-446.
76. **Hussey AJ, Hayes JD.** Human m̄-class glutathione-S-transferases present in liver, skeletal muscle and testicular tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1993; 1203: 131-141.
77. **Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D.** *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Inc New York: McGraw Hill Press, 1995: 4-45
78. **Stojs SJ, Al-Turk WA, Heinicke RJ.** Glutathione-S-transferase activity in liver, lung and intestinal mucose of aging female mice. *Gen Pharmacol*, 1982; 13: 519-522.

79. **Kelley MK, Engqvist-goldstein A, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE, Kauvar LM.** Variability of glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. *J Biochem*, 1994; 304: 843-848.
80. **Brittain T, Tottle B.** Glutathione in the red blood cells of embryonic mice. *Comp Biochem Physiol*, 1986; 83: 843-846.
81. **Ji LL, Katz A, Fu R, Griffiths M, Spencer M.** Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. *J Appl Physiol*, 1993; 74: 788-792.
82. **Stohs SJ, Lawson T, Al-Turk WA.** Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in erythrocytes and lymphocytes of mice as a function of age. *Gen Pharmacol*, 1984; 15: 267-270.
83. **Perry RR, Mazetta J, Levin M, Barranco SC.** Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer*, 1993; 72: 783-787.
84. **Murray KM, Granner DK, Mayes PA, Rodwel VW.** *Harper's Biochemistry*. 24th. Ed., Stamford: Appleton and Lange Company, 1996: 176-779.
85. **Pretsch W, Merkle S, Favor J, Werner T.** A mutation affecting the lactate dehydrogenase locus Ldh-1 in the mouse. II. mechanism of the LDH-A deficiency associated with hemolytic anemia. *Genetics*, 1993; 135: 161-170.
86. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ.** *Molecular Biology of The Cell*. 30th. Ed., New York: Garland Publish, 1994: 1266-1290.
87. **Safe SH.** Veterinary physiology and pharmacology. *Environ Health Perspect*, 1995; 103: 346-351.
88. **Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C.** The pesticide endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect*, 1994; 102: 380-383.
89. **Mussalo- Rauhamaa H, Hasanen E, Pyysalo H, Antervo K, Kauppila R, Pantzar P.** Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer*, 1990; 66: 2124-2128.
90. **Westin JB, Richter E.** The israeli breast-cancer anomaly. *Ann NY Acad Sci*, 1990; 609: 269-279.
91. **Foster HL, Small JD, Fox JG.** *The Mouse in Biomedical Research*. London: Academic Press Inc., 1982: 294- 325.

92. **Schalm OW.** Veterinary Hematoloji. 2th Ed., Philadelphia: Lea and Febiger Company, 1965: 396-398.
93. **Bancroft JD, Stevens A.** *Theory and Praticce of Histological Techniques.* Edinburg: Churchill Livingstone, 1977: 1-15.
94. **Kaya M.** Elektron mikroskobi teknikleri. *Ç.Ü.Tıp Fak Der,* 1984; 11-17.
95. **Tanyer G.** *Hematoloji ve Laboratuvar.* Ankara: Ayyıldız matbaa, 1985: 109-148.
96. **Hutton J.** Genetic regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the inbred mouse. *Biochem Genet,* 1971; 5: 315-331.
97. **Bentler E.** *Red Cell Metabolism.* 2nd Ed., Grune and Stratton Company, New York, 1975: 261-265.
98. **Fridovich I.** Superoxide Radical: An endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol,* 1983; 23: 239-257.
99. **Mannervik B, Guthenberg C.** Glutathione-S-transferase (human placenta). *Meth Enzymol,* 1981; 77: 231-235.
100. **Okawa H, Ohishi N, Tagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem,* 1979; 95: 351-358.
101. **Fukuda H, Iritoni N.** Diurnal variations of lipogenic enzyme mRNA quantities in rat liver. *Biochim Biophys Acta,* 1991; 1086: 261-264.
102. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem,* 1951; 193: 265- 275.
103. **Kansu A.** *Böcek Öldürücü İlaçların İnsanlara Etkileri.* Ankara: San Matbaası, 1971.
104. **Lemaire P, Matthews A, Förllin L, Livingstone DR.** Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*platichys flesus*) and perch (*perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch Environ Contam Toxicol,* 1994; 26: 191- 200.
105. **Singh SK, Pandey RS.** Toxicity of endosulfan on kidney of male rats in relation to drug 106. metabolizing enzymes and microsomal lipid peroxidation. *Indian J Exp Biol,* 1989; 27: 725- 728.

106. **Ladics GS, Smith C, Heaps K, Loveless SE.** Evaluation of the humoral immune response of CD rats following a 2 week exposure to the pesticide carbaryl by the oral, dermal, or inhalation routes. *J Toxicol Environ Health*, 1994; 42: 143- 156.
107. **Gill TS, Pande J, Tewart H.** Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of f reshwater fish. *Ecotoxicol Enviromental Saf*, 1991; 21:80-91.
108. **Hasegawa R, Cabral R, Hoshiya T, Hakoi K, Ogiso T, Boony Aphiphat P, Shirai T, Ito N.** Carcinogenic potential of some pesticides in a medium-term multi-organ bioassay in rats. *Int J Cancer*, 1993; 54: 489- 493.
109. **Institoris L, Siroki O, Desi I.** Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations. *Hum Exp Toxicol*, 1995; 14: 879-883.
110. **Gallicchio VS, Casale GP, Wats T.** Inhibition of human bone marrow-derived stem cell colony formation (CFU-E, BFU-E, and CFU-GM) following in vitro exposure to organophosphates. *Exp Hematol*, 1987; 15: 1099- 102.
111. **Gupta M, Bagchi G, Bandyopadhyay S, Sasmal D, Chatterjee T, Dey SN.** Hematological changes produced in mice by nuvacron or furadan. *Toxicology*, 1982; 25: 255- 260.
112. **Lembowicz K, Starska E, Gorski T, Ludwicki JK.** The effect of organic chlorine compounds and their metabolites present in human milk on newborn mice. *Toxicol Lett*, 1991; 57: 215-226.
113. **Lox CD.** Effects of acute pesticide poisoning on blood clotting in the rat. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1983; 7: 451- 454.
114. **Gromysz-Kalkowska K, Szubartowska E, Kaczanowska E.** Peripheral blood in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in acute poisoning by different insecticides. *Comp Biochem Physiol*, 1985; 81: 209-212.
115. **Schimizu Y, Kawarada S, Suzuki M.** Interstrain differences in red cell enzyme activities in mice and rats. *Comp Biochem Physiol*, 1991; 100: 687-690.
116. **Chasseaud LF.** The role of glutathione and glutathione-S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res*, 1979; 29: 175-274.
117. **Dere E, Yanikoglu A.** The effect of endosulfan on glycogen levels in liver and in muscle of male mice (Swiss Albino). *Doğa: Turk Biyol Der*, 1988; 18: 9.3-100.

118. Szabo L, Matkovich B, Barabas K, Oroszlan GY. Effects of various thiols on paraquat toxicity. *Comp Biochem Physiol*, 1986; 83: 149-153.
119. Cerutti PA. Oxy-radical and cancer. *Lancet*, 1994; 344: 862-863.
120. Blat A, Almar MM, Romero FJ. The effect of two sulphur-containing pesticides, fenitrothion and endosulfan, on glutathione (GSH) content and on glutathione-S-transferase and gamma-glutamyltranspeptidase activities in midgut gland of the American red crayfish *Procambarus*. *Drug Metabol Drug Interact*, 1988; 6: 383-394.
121. Yadwad VB. Effect of endosulfan on glutathione-S-transferase and glutathione content of the premoult field crab, *Paratelphusa hydrodromus*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1989; 43: 597-602.
122. Garg A, Kunwar K, Das N, Gupta PK. Endosulfan intoxication: Blood glucose, electrolytes, Ca levels, ascorbic acid and glutathione in rats. *Toxicol Lett*, 1980; 5: 119-123.
123. Costagliola C, Romano L, Sorice P, Di-Benedetto A. Anemia and chronic renal failure: the possible role of the oxidative state of glutathione. *Nephron*, 1989; 52: 11-14.
124. Yüregir GT, Aksoy K, Arpacı A, Ünlükurt I, Tuli A. Studies on red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase: evaluation of reference values. *Ann Clin Biochem*, 1994; 31: 50-55.
125. Caneghem PV. Influence of phenylhydrazine on the antioxidant system of the erythrocytes and the liver in mice. *Biochem Pharmacol*, 1984; 33: 717-720.
126. Ünsal İ, Ögüş H. Koyun karaciğeri glutatyon-S-transferaz izozimlerinin saflaştırılması. *Türk Biyokimya Der*, 1991; 16: 11-19.
127. Sharma R, Ahmad H, Singhal SS, Saxena M, Srivastava SK, Awasthi YC. Comparative studies on the effect of butylated hydroxyanisole on glutathione and glutathione-S-transferase in the tissues of male and female CD-1 mice. *Comp Biochem Physiol*, 1993; 105: 31-37.
128. Hazelton GA, Lang CA. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *J Biochem*, 1980; 188: 25-30.
129. Agrawal D, Khanna RN, Anand M, Gupta GSD, Ray PK. Lindane-induced changes in glucose and glutathione levels in cats. *Toxicol Lett*, 1987; 38: 77-82.
130. Ankrah N, Wei R. Effect of a single subtoxic dose aflatoxin B₁ (AFB₁) on glucose 6-phosphate dehydrogenase in mouse liver. *Biochem Pharmacol*, 1987; 36: 1181-1182.

131. **Inbaraj RM, Haider S.** Effect of malathione and endosulfan on brain acetylcholinesterase and ovarian steroidogenesis of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Safety*, 1988; 16: 123-128.

132. **Makary M, Kim HL, Safe S, Womack J, Ivie GW.** Constitutive and aroclor 1254-induced hepatic glutathione-S-transferase, peroxidase and reductase activities in genetically inbred mice. *Comp Biochem Physiol*, 1988; 91: 425-429.



ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimi Adana'da tamamladım. 1989 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden "Biyolog" ünvanıyla mezum oldum.

1992 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Güneş T.YÜREGİR danışmanlığında başladığım "Anestezik Maddelerin Fare Eritrosit ve Karaciğer G6PDH Enzim Aktivitesine Etkisi" konulu yüksek lisans çalışmamı 1994 yılında tamamladım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Güneş T.YÜREGİR danışmanlığında doktora öğrenimine başladım. 1992 yılından beri Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evliyim.