

28377

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GUTHİON İNSEKTİSİTİNİN *Microtus canicaudus* (RODENTIA)'DA  
ETKİSİNİN BİYOBELİRTEÇLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Murat ÖZMEN

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. A.Nihat BOZCUK

Üye Prof.Dr. Eşref YÜKSEL

Üye Doç.Dr. Kayahan FIŞKIN

Onay:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.21./12../1993

Prof. Dr. Eşref YÜKSEL  
Enstitü Müdürü



**Canım Babam, Mehmet ÖZMEN (1333-22.2.1975)**

**ve**

**Canım Annem, Sadakat ÖZMEN 'e**



**ÖZET**

Bir organofosforlu insektisit olan Guthion'un (azinhosmethyl) laboratuvar koşullarında barındırılan *Microtus canicaudus* (Kuzey Batı Amerika tarla faresi)'da bazı biyobelirteçler kullanılarak, etkileri araştırıldı. Bu amaçla hayvanlardan alınan plazma örneklerinde laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin kinaz (CK) ve izositrat dehidrogenaz (ICDH) enzim aktiviteleri incelendi. Ayrıca plazma kreatinin ve kan üre nitrojeni (BUN) konsantrasyonları belirlendi. Bundan başka asetilkolinesteraz enzim aktivitesi beyin doku homojenatlarında incelendi. Kan akyuvar hücre farklılaşması oranları ve hematokrit değerleri insektisit etkisine bağlı olarak ele alındı. Vücut ağırlığı, besin ve su tüketimi gibi bazı toksikolojik parametreler hayvanların sağlık durumlarının belirlenmesinde değerlendirme kapsamına alındı. Araştırmada tüm spektrofotometrik analiz yöntemleri için bir mikropate okuyucu sistemi seçildi ve yöntemler bu cihaz için modifiye edildi.

Hayvanların elimizdeki kimyasal ile muamelesi için iki ana test grubu oluşturuldu. Bunlardan birisi "Letal Konsantrasyon (LC)" test grubu, diğeri de "Disseksiyon (DS)" test grubu olarak adlandırıldı. Uygulama grupları olarak üç farklı insektisit konsantrasyonu seçildi ve bunlardan birisi *M. canicaudus* için LC50 dozu olarak bilinen 322 ppm'lik konsantrasyondur. Insektisit dozlarından birisi daha düşük konsantrasyonda (161 ppm) ve diğeri de LC50 dozundan yüksek konsantrasyonda (428 ppm) seçildi. Herbir test grubu için ayrıca bir kontrol grubu oluşturuldu ve bu

hayvanlar yalnızca dilusyon maddeleri olan aseton ve mısırözü yağı ile muamele edilmiş yem ile beslendiler. Test gruplarının her birini oluşturan uygulama gruplarında tüm hayvanlar her kafeste bir *Microtus* olacak şekilde barındırıldı. "LC" test grubu hayvanları deney süresince iki günde bir kan örneklerinin alınması için kullanıldı. Deneğin son gününde (14. gün) canlı kalan hayvanlar ise dissekte edildi. "DS" test grubu hayvanlar rastgele seçilerek, yalnızca disseksiyon günlerinde kan örneklerinin alınmasını takiben öldürüldü ve beyin dokuları alındı.

Yapılan deneysel çalışma sonuçlarına göre;

a) Guthion etkisine bağlı olarak, vücut ağırlığının her iki test grubunda da önemli düzeyde azaldığı saptandı ( $P < 0.05$ ).

b) İnsektisit uygulama grupları ile kontrol grupları arasında, hematokrit değerleri bakımından farklılık saptanmadı. Ancak akyuvar farklılaşma yüzdesi verilerine göre, bazı gruplarda önemli istatistiksel farklılıklar bulundu ( $P < 0.05$ ).

c) Guthion etkisi ile, beyin AChE aktivitesinin gerek "disseksiyon" ve gerekse "Letal Konsantrasyon" test grubunda eşey karışık (erkek ve dişi birlikte) ve erkek hayvanlarda önemli düzeyde inhibe edildiği ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ), buna karşın dişilerde aktivite değişiminin kontrol grubu dişilerinden farklı olmadığı belirlendi.

d) "DS" test grubu hayvanlarının kan plazması örneklerinde bazı farklı günlerde ve uygulanan farklı dozlarda LDH, CK, ICDH aktivitelerinin yada BUN konsantrasyonunun önemli düzeyde değiştiği bulundu ( $P < 0.05$ ). Benzer bulgular "LC" test grubu hayvanlardan alınan örneklerin çalışılması ile de bulundu. Ancak bu grup hayvanlarda bazı farklı uy-

gulama günlerinde kreatinin düzeyinin de değiştiği göz-  
lendi. Bununla beraber, tüm kan plazma biyokimyasal biyo-  
belirteçlerinin deneye alınmamış, sağlıklı stok laboratu-  
var hayvanlarındaki normal sınırları içerisinde olduğu  
saptandı.

Gruplar arası istatistiksel farklılıklar varyans ana-  
lizi ve Fisher'in PLSD testi kullanılarak ortaya konuldu.  
Bulgular biyokimyasal, fizyolojik ve toksikolojik bazı  
biyobelirteç verileri kullanılarak tartışıldı.

**anahtar kelimeler:** Guthion, *Microtus canicaudus*,  
biyobelirteç, asetilkolinesteraz,  
plazma enzimleri

**ABSTRACT**

Some biomarker parameters were investigated to detect the effects of Guthion (Azinphosmethyl), which is an organophosphate insecticide on gray tailed voles (*Microtus canicaudus*) in the laboratory conditions. Lactate dehydrogenase (LDH), creatin kinase (CK) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) enzyme activities and creatinin and blood urea nitrogen (BUN) concentrations were investigated in the plasma samples. Also brain acetylcholinesterase (AChE) activity was studied with brain tissue homogenates. On the other hand, white blood cell differentiation ratios and hematocrit values were investigated as blood physiological biomarkers of insecticide exposure. Some toxicological parameters, such as body weight, food and water consumptions, were considered to detect the health conditions of the animals. All biochemical experiments were assayed by using a microplate reader system for spectrophotometric techniques and assay methods were modified for this system.

Two test groups were designed for chemical exposure. They called the "lethal concentration (LC) test" and the "sacrifice (DS) test" groups. Treatment groups were selected as three exposure concentrations, one of which was the LC50 (322 ppm) for voles. The other dose was lower (161 ppm) and the last dose was higher (428 ppm). Control group (diluent only) was also included each test groups. Animals were individually housed for the duration of the experiment for each treatment group of the test groups.

Lethal concentration test animals were bled every second day [on (-1)st, 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th and 14th days] during the laboratory exposure using orbital bleeding techniques. If the animals are alive on day 14th, they were sacrificed for collection of brain tissues. But, sacrifice test animals were used for bleeding on the sacrifice day only (on day 3th, 7th or 9th) and those were selected randomly for this procedure. Finally, they were sacrificed to collect brain tissues. Analysis of variance (ANOVA) tests and Fisher's PLSD test were used to determine the significant differences among test groups compared to results of control groups.

This experimental study results are shown that;

a) Average body weight of both test group voles were significantly decreased because of Guthion exposure ( $P < 0.05$ ).

b) Hematocrit values were not found significantly different between control and treatment groups. However, white cell differentiation ratios were shown significant differences for some treatment groups on the different test days.

c) Brain AChE activity of both "sacrifice" and "LC" test group animals were significantly inhibited because of insecticide exposure for both sexes combined and male voles ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ) but, enzyme activity were not significantly changed for females.

d) Plasma LDH, CK, ICDH activities or BUN concentrations of "sacrifice" test group animals were changed for different exposure doses on the different test days ( $P < 0.05$ ). Similar results were also detected for "LC" test group voles. But, creatinin concentrations of this test



group animals were changed for different treatment days. However, biochemical results of blood plasma biomarkers were found in normal limits on the animals when they compared to healthy stock laboratory voles.

Analysis of variance (ANOVA) and Fisher's PLSD tests were used for determine to test results. Experimental results were discussed using toxicological, biochemical and physiological biomarker criterias.

**keywords:** Guthion, vole, biomarker, acetylcholinesterase  
plasma enzymes

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın yürütülmesi amacı ile beni destekleyerek A.B.D.'de görevlendirilmem hususunda gösterdiği çabalar ve yapıcı eleştirileri ile bana yön verip, bilimsel yönden yetişmemde büyük katkılarda bulunan tez danışmanım, Sayın Prof.Dr. A.Nihat BOZCUK'a (Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu araştırmanın deneysel kısımlarınının planlanıp yürütüldüğü U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory'den (Corvallis, Oregon) Dr. Anne FAIRBROTHER (DVM, PhD), Stephen E. DOMINGUEZ, Tamotsu SHIROYAMA ve Missy FIX'e yardım ve önerilerinden ötürü teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesi amacı ile, maddi olarak A.B.D.'de görevlendirilmemi destekleyen İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına, Fen Edebiyat Fakültesi Dekanlığına ve İnönü Üniversitesi Rektörlüğüne de teşekkür ederim.

Araştırmalarım süresince büyük bir özveri ile beni destekleyen eşim Nesrin ÖZMEN'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	xvi
KISALTMALAR .....	xviii
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİ .....	1
2. MATERYAL VE METOD .....	21
2.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Kullanılması .....	21
2.2. Yem Preparasyonu ve Hayvanların Beslenmesi .....	23
2.3. Kan Örneklerinin Toplanması .....	25
2.4. Toplanan Kanın Preparasyonu .....	26
2.4.1. Plazma örneklerinin toplanması .....	26
2.4.2. Kan frotilerinin boyanması .....	27
2.4.3. Hematokrit değerlerinin saptanması .....	28
2.5. Hayvanların Disseksiyonu ve Doku Örneklerinin Alınması .....	28
2.6. Beyin Dokusu ve Plazma Örneklerinde Yapılan Deneysel Çalışmalar .....	29
2.6.1. Beyin asetilkolinesteraz aktivitesinin tayini .....	30
2.6.2. Plazma laktat dehidrogenaz enziminin aktivite tayini .....	35
2.6.3. Plazma kreatin kinaz enzimi aktivite tayini .....	38
2.6.4. Plazma izositrat dehidrogenaz enzimi aktivitesinin tayini .....	39
5. Plazma kreatinin konsantrasyonunun tayini .....	42

2.6.6. Plazma kan üre nitrojeni konsantrasyonunun tayini .....	47
2.7. Matematiksel ve İstatistik Analizler .....	50
3. BULGULAR .....	51
3.1. Deneye Alınan Hayvanların Genel Durumları .....	51
3.2. Kan Fizyolojisi ile İlgili Biyobelirteçler .....	64
3.3. Biyokimyasal Biyobelirteçlerden elde Edilen Bulgular .....	74
3.3.1. Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi sonuçları .....	74
3.3.2. Plazma laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi bulguları .....	85
3.3.3. Plazma kreatin kinaz enzim aktivitesi bulguları .....	91
3.3.4. Plazma izositrat dehidrogenaz enzim aktivitesi bulguları .....	100
3.3.5. Plazma kreatinin konsantrasyonu bulguları ....	104
3.3.6. Plazma kan üre nitrojeni konsantrasyonu bulguları .....	118
4. TARTIŞMA .....	126
5. YARARLANILAN KAYNAKLAR .....	144

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Guthion insektisitinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 1.2. Asetilkolin-Asetilkolinesteraz kompleksinin oluşumu .....	11
Şekil 1.3. LDH enzimi aracılığı ile laktat'ın pruvat'a oksidasyonu .....	13
Şekil 1.4. Kreatin Kinaz enzimi ile katalizlenen reaksiyon .....	15
Şekil 1.5. İzositrat'ın oksidatif dekarboksilasyonunda ICDH enziminin rolü .....	16
Şekil 2.1. <i>Microtus canicaudus</i> "Kuzey Batı Amerika Gri kuyruklu tarla faresi" .....	21a
Şekil 2.2. <i>Microtus canicaudus</i> beyin asetilkolinesteraz enzimi standart eğrisi .....	33
Şekil 2.3. <i>Microtus canicaudus</i> plazma laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri .....	37
Şekil 2.4. <i>Microtus canicaudus</i> plazma kreatin kinaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri .....	40
Şekil 2.5. <i>Microtus canicaudus</i> plazma izositrat dehidrogenaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri .....	43
Şekil 2.6. <i>Microtus canicaudus</i> plazma kreatinin konsantrasyonu tayini için standart eğri .....	46
Şekil 2.7. <i>Microtus canicaudus</i> plazma kan üre nitrojeni tayini için standart eğri .....	49

- Şekil 3.1.a. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi .....53
- Şekil 3.1.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi ....54
- Şekil 3.1.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da deney başlangıç gün (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi .....55
- Şekil 3.2.a. Guthion uygulamasına bağlı olarak "LC" test grubu *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-1. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi .....56
- Şekil 3.2.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak "LC" test grubu erkek *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-1. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi .....57

- Şekil 3.2.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-1. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlık değişim yüzdesi .....58
- Şekil 3.3. Disseksiyon test grubu hayvanlar için günlük ortalama Guthion insektisiti uygulanmış besin tüketimi ve besin tüketimine bağlı olarak hayvanların maruz kaldıkları insektisit miktarları .....63
- Şekil 3.4. Letal konsantrasyon test grubu hayvanlar için günlük ortalama Guthion insektisiti uygulanmış besin tüketimi ve besin tüketimine bağlı olarak hayvanların maruz kaldıkları insektisit miktarları .....65
- Şekil 3.5.a. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" test grubu *M. canicaudus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi .....78
- Şekil 3.5.b. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi .....79
- Şekil 3.5.c. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi .....80
- Şekil 3.6.a. Guthion uygulamasına bağlı olarak deney peryodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan hayvanlarda AChE enzim aktivitesi değişimi .....82
- Şekil 3.6.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak deney peryodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan

erkek hayvanlarda AChE enzim aktivitesi değişimi.....	83
Şekil 3.6.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak deney periyodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan dişi hayvanlarda AChE enzim aktivitesi değişimi .....	84
Şekil 3.7.a. "DS" test grubu hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	88
Şekil 3.7.b. "DS" test grubu erkek hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	89
Şekil 3.7.c. "DS" test grubu dişi hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.....	90
Şekil 3.8.a. "LC" test grubu hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	94
Şekil 3.8.b. "LC" test grubu erkek hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	95
Şekil 3.8.c. "LC" test grubu dişi hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	96
Şekil 3.9.a. "DS" test grubu hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	97



- Şekil 3.9.b. "DS" test grubu erkek hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....98
- Şekil 3.9.c. "DS" test grubu dişi hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....99
- Şekil 3.10.a. "LC" test grubu hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....101
- Şekil 3.10.b. "LC" test grubu erkek hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....102
- Şekil 3.10.c. "LC" test grubu dişi hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....103
- Şekil 3.11.a. "DS" test grubu *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....105
- Şekil 3.11.b. "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....106
- Şekil 3.11.c. "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak

- değişimi .....107
- Şekil 3.12.a. "LC" test grubu *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....108
- Şekil 3.12.b. "LC" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....109
- Şekil 3.12.c. "LC" test grubu dişi *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....110
- Şekil 3.13.a. "DS" test grubu *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....112
- Şekil 3.13.b. "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....113
- Şekil 3.13.c. "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....114
- Şekil 3.14.a. "LC" test grubu *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....115
- Şekil 3.14.b. "LC" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak

	değişimi .....	116
Şekil 3.14.c.	"LC" test grubu dişi <i>M. canicaudus</i> 'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	117
Şekil 3.15.a.	"DS" test grubu <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	119
Şekil 3.15.b.	"DS" test grubu erkek <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	120
Şekil 3.15.c.	"DS" test grubu dişi <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	121
Şekil 3.16.a.	"LC" test grubu <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	123
Şekil 3.16.b.	"LC" test grubu erkek <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	124
Şekil 3.16.c.	"LC" test grubu dişi <i>M. canicaudus</i> 'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi .....	125

- Şekil 4.1. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 3. günde regresyon ile ifadesi .....134
- Şekil 4.2. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 7. günde regresyon ile ifadesi .....135
- Şekil 4.3. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 9. günde regresyon ile ifadesi .....136

## TABLOLAR DİZİNİ

SAYFA

Tablo 3.1. Disseksiyon test grubu <i>Microtus canicaudus</i> 'un Guthion etkisine bağlı olarak besin ve su tüketimi .....	60
Tablo 3.2. Letal Konsantrasyon test grubu <i>Microtus canicaudus</i> 'un Guthion etkisine bağlı olarak besin ve su tüketimi .....	61
Tablo 3.3. Disseksiyon test grubu hayvanlarda günlere bağlı olarak ortalama hematokrit değeri .....	67
Tablo 3.4. Letal Konsantrasyon test grubu hayvanlarda kan alma günlerine bağlı olarak hematokrit değerleri .....	68
Tablo 3.5. Disseksiyon test grubu <i>M. canicaudus</i> 'da Guthion etkisine bağlı olarak akyuvar farklılaşma yüzdesi .....	69-70
Tablo 3.6. Letal Konsantrasyon test grubu <i>M. canicaudus</i> 'da Guthion etkisine bağlı olarak akyuvar farklılaşma yüzdesi .....	72-73
Tablo 3.7. Disseksiyon ve Letal Konsantrasyon test gruplarında Guthion insektisiti etkisi ile beyin asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ve enzim inhibisyonu değişimi .....	75-76
Tablo 3.8. Disseksiyon test grubu <i>Microtus canicaudus</i> 'da plazma LDH, CK ve ICDH aktiviteleri ile kreatinin ve BUN konsantrasyon değerleri .....	86-87

Tablo 3.9. Letal Konsantrasyon test grubu <i>Microtus canicaudus</i> 'da plazma LDH, CK ve ICDH aktiviteleri ile, kreatinin ve BUN konsantrasyon değerleri .....	92-93
--	-------



**KISALTMALAR**

AChE	: asetilkolinesteraz
ACTI	: asetilkolin iodid
BUN	: kan üre nitrojeni
BWB	: <i>Colinus virginianus</i> normal kontrol beyin homojenatı
ChE	: kolinesteraz
CK	: kreatin kinaz, kreatin fosfokinaz
DS	: disseksiyon
DTNB	: 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)
ICDH	: izositrat dehidrogenaz
LC	: letal konsantrasyon
LDH	: laktat dehidrogenaz
mg/dL	: miligram/desilitre
NAD <sup>+</sup>	: nikotinamid adenin dinukleotid
NADH <sup>+</sup>	: nikotinamid adenin dinukleotid (redükte)
NADP	: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OD	: optik dansite
OP	: organofosforlu insektisit
QCS-ABN	: Ciba-Corning kontrol abnormal serum
QCS-NOR	: Ciba-Corning kontrol normal serum
QSA	: Sigma kontrol abnormal serum
QSN	: Sigma kontrol normal serum
U/L	: unite/litre
VCB	: <i>Microtus</i> normal kontrol beyin homojenatı
VCP	: <i>Microtus</i> normal kontrol plazma

## 1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİ

Günümüzde endüstriyel gelişim ile birlikte, kimyasal madde kullanımını da giderek artan boyutlarda yaşantımıza katılmaktadır. Bu kimyasal maddelerden bir kısmı da insanların özellikle tarımsal amaçlarla ürün verimini arttırmak, daha kaliteli ürünler elde etmek ya da çevresinde ona zarar veren canlıları yok etmek amacı ile kullandığı pestisitlerdir.

Pestisit terimi insan yaşamı için zararlı olan canlıları öldürmek amacı ile kullanılan bileşikleri ya da maddeleri ifade eden genel bir terimdir ve insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit ve benzeri kimyasal bileşikler kapsamaktadır (McEven ve Stephenson, 1979). Günümüzde kullanılan kimyasal pestisitler ilk kez DDT'nin keşfinden uzun bir süre sonra, onun ilk defa ikinci Dünya Şavaşı sırasında sıtma etkeni taşıyan sivrisinekleri öldürmek için kullanılmaya başlaması ile günlük yaşantımızda yerini almıştır. Ancak günümüzde insanlığın kullanımına sunulan diğer kimyasal maddelerle birlikte, pestisit kullanımını da giderek artan boyutlara ulaştırmıştır. İlk kimyasal insektisit olan DDT'nin keşfini ve kullanımını takiben, kısa sürede zararlı bitkileri yok etmek için herbisitler, böcekler için insektisitler, rodentler için rodentisitler, balık kontrolü için ya da nematod kontrolü için formüller, pestisit teknolojisinin gelişimi ile hızla üretilmeye başlanmış ve kullanıma sunulmuştur (McEven ve Stephenson, 1979).

Ancak pestisitlerin kullanılmaya başlamasından çok



kısa bir süre sonra, 1950'li yılların ortalarından itibaren, önce DDT (Kerswill ve Elson, 1955; Burdick vd., 1964; Hunt ve Bischoff, 1960), daha sonra da kullanılan diğer pestisitlerin (Ratliffe, 1969; Hickey, 1969) insanlar ve diğer yabancı yaşamda hedef olmayan (non-target) canlılara zararları ortaya konulmaya başlamıştır.

İnsanların yaşadığı yerlerde ya da tarımsal alanlarda böceklerin kontrol altında tutulması amacı ile kullanılan pestisitlere "insektisit" adı verilmektedir (McEven ve Stephenson, 1979). Günümüzde hedef (target) olarak seçilen böcekleri kontrol etmek amacı ile kullanılan bütün kimyasal insektisitler neurotoksikantlardır ve hedef organizmalarda sinir sistemini etkileyerek etkilerini göstermektedir. Ancak insektisitler seçici olmamaları nedeni ile, hedef organizmaları etkiledikleri kadar hedef olmayan canlılar üzerine de etkilidirler (Amdur vd., 1991). Bugün yaygın olarak kullanılan insektisitler genel kimyasal yapılarına göre 2 temel grupta sınıflandırılmaktadır (McEven ve Stephenson, 1979). Bunlar;

- 1) Organoklorinli (karbamat) insektisitler
- 2) Organofosforlu (OP) insektisitler

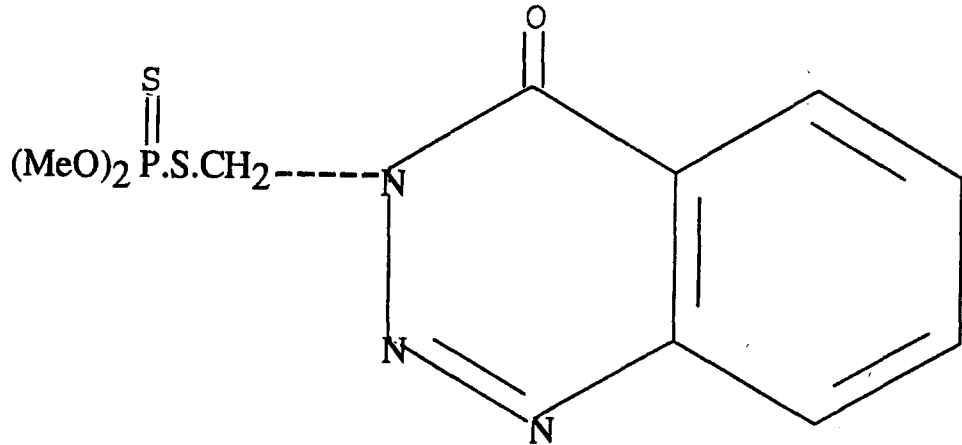
OP insektisitler karbamat insektisitlerle karşılaştırıldığında çevresel koşullarda daha az dirençli bir yapıda buldukları görülmektedir. Bundan ötürü daha fazla kullanılmaktadır. Ancak bazı OP insektisitler akut dozlarda toksik etkilerini daha fazla göstermektedir ve birçok organizma tarafından da daha hızlı metabolize edilmektedirler (Bennet ve Williams, 1985). Bu grup insektisitlerin ilki 1937 yılında bir grup Alman bilim adamı tarafından sentez edilmiştir. Bu grup organik yapıllı insektisitler genel olarak organizmalarda sinapsda asetilkolin

esteraz (AChE) enziminin inhibe edilmesi ile sinir sistemi üzerinde etkilerini göstermektedir. Bu nedenle bu tip bileşikler "kolinesteraz inhibe eden insektisitler" ya da "antikolinesteraz insektisitleri" olarak da adlandırılmaktadır (Amdur vd., 1991; Mineau, 1991).

Günümüzde OP insektisitler dünyada çok yaygın olarak tarımsal alanlarda ve çevrede böcek kontrolü amacı ile kullanılmaktadır (Pope ve Chacrabarti, 1992; Hart, 1993; Machera ve Kostakis, 1993). Genel olarak OP insektisitlerin yüksek yapılı organizmalar üzerinde etkileri incelendiğinde, yabancı yaşamda, özellikle tarım alanlarına insektisit uygulanmasını takiben toplu halde kuş, memeli ve balık ölümlerine neden olabildiği rapor edilmektedir (Coppage, 1971; Hill ve Fleming, 1982). Fensulfothion ve parathion insektisitlerinin tarımsal arazilerde uygulanmasının ardından çok sayıda kuş ve memelinin ölü olarak bulunduğu bildirilmiştir (Mills, 1973). Araştırmacılar çoğu hayvan ölümlerinin ise muhtemelen ikincil mekanizmalar ile, yani besin zinciri halkası nedeni ile oluştuğunu iddia etmişlerdir. Özellikle OP insektisitlerin besin zincirinde birikimler nedeni ile canlılarda ikincil zehirlenmelere neden olabildiği bilinmektedir (Rattner ve Hoffman, 1984). Organofosfat ve karbamat bileşikli insektisitler etkilerini doğrudan doğruya periferik ve merkezi sinir sistemi üzerinde göstererek, organizmanın yaşamını tehdit etmektedir. Örneğin, parathion ve malathion insektisitleri periferik sinir sisteminde etkili olarak, organizmada lakrimasyon, salya akması, ishal, titreme gibi belirtilerle etkisini ortaya koymaktadır (Hart, 1993; Mendoza, 1976; Mills, 1973; Reiter, vd., 1972; Edson ve Noakes, 1960). Diğer taraftan, OP insektisitlerin etkisini

AChE enzimini inhibe ederek göstermesi yanısıra, alt beyin kökünde solunum kontrol merkezlerinin baskılanması ile canlılığın ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Genç memelilerin erişkin hayvanlara oranla akut toksik etkiye daha duyarlı oldukları da rapor edilmektedir (Pope ve Chacrabarti, 1992; Mendoza, 1976).

Bu grup insektisitlerden birisi olan Guthion (azinhosmethyl; S-(3,4-dihydro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ylmethyl)O,O-dimethyl phosphorodithioate; O,O-dimethyl S-[(4-oxo-1,2,3-benzothiazin-3(4H)-ylmethyl]-phosphorodithioate) yaygın olarak birçok böcek türü için kullanılan bir insektisittir (Şekil 1.1). Meyve, sebze, üzüm, mısır, pamuk, narenciye gibi tarım alanlarında çok sıklıkla kullanılmaktadır (Worthing, 1979). Ayrıca metil-triazotion, Gusathion-M, Bay 17147 veya Carfene adları ile de kullanılmaktadır (Hall vd., 1992).



Şekil 1.1. Guthion insektisitinin kimyasal yapısı (Hall vd., 1992).

Guthion'un diğ er OP insektisitler gibi, hayvanlarda AChE enzimini inhibe ederek, toksik etkisini gösterdiğ i daha önceki birçok ç alışma ile ortaya konulmuştur (Worden vd., 1973; Benke ve Murphy, 1974; Short vd., 1980; Durda vd., 1989). Guthion'un hayvanlar üzerinde akut toksik etkileri (Gaines, 1960; Pasquet vd., 1976), kronik toksit etkileri (Worden vd., 1973) ve Guthion metabolizması ile ilgili ç alışmalar (Murphy, 1966; Levine ve Murphy, 1971) bulunmaktadır. Rodentler üzerinde yapılan ç alışmalarda Guthion'un hayvanlarda üreme fizyolojisini, öğrenme yeteneğini ve hareketlerini etkilediğ i kaydedilmekle beraber, akut fizyolojik ve davranış ekolojisi ile ilgili bilgilerin oldukç a az olduğu belirtilmektedir. Özellikle küç ük yabani memeli hayvanlarla bu konuda yapılan araştırma sayısı oldukç a sınırlıdır (Durda vd., 1989). Düş ük dozlarda (50-100 ppm) Guthion ile muamele edilmiş yem ile beslenen rat ya da köpeklerde leucocytogenesis ya da hematopoiesis, besin tüketimi, renal fonksiyon bozuklukları gibi etkiler gözlenmezken, 50 ppm insektisit ile muamele edilmiş yem ile bir yıl süreyle beslenen hayvanlarda da kolinesterazın düşük düzeyde inhibe edildiğ i rapor edilmektedir. Ancak hayvanlarda herhangi bir doku ya da organ hasarı saptanmamıştır (Worden vd., 1973).

Bir kimyasal maddenin laboratuvar hayvanlarında etkisini belirlemede kullanılan başlıca kriterler subakut ve akut toksitite testleri ile letal doz (LD) ve letal konsantrasyon (LC) ç alışmalarıdır. Letal konsantrasyon hayvanların belirli bir bölümünün belirli bir zaman süreci içinde ölümine neden olan ve oral yol ile alınan kimyasal madde konsantrasyonudur. LC dozu istatistik olarak belirlenen tek bir kimyasal madde miktarını ifade etmelidir

(Amdur vd., 1991). Eğer yapılan çalışmada kimyasal madde muamelesi ile hayvanların %50'sinin 5 günlük süre içeri-sinde ölümüne neden olan madde konsantrasyonu hesaplanı-yorsa LC değeri LC50 olarak ifade edilmektedir (Mayers, 1991; Bascietto, 1985).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile Guthion'un çeşit-li hayvanlar üzerinde LD50 ve LC50 değerleri bilinmekte-dir. Laboratuvar farelerinde LD50 değeri 3-4.5 mg/kg (Benke ve Murphy, 1974), ratlarda akut oral LC50 dozu 15 mg/kg (McEven ve Stephenson, 1979; Short vd., 1980; Hall vd., 1992; Worthing, 1979) olarak bildirilmiştir. U.S. Environmental Protection Agency tarafından yayınlanan ra-porlara göre, ratlarda akut oral LC50 dozu 13mg/kg, tavuk-larda 100-250 mg/kg, köpekte 10 mg/kg iken, kuşlarda sub-akut LC50 değeri 488-1940 ppm olarak belirlenmiştir. Meme-li hayvanlar ile yapılan çalışma sonuçlarına göre, 7-17 mg/kg LD50 değeri ile Guthion "ok yüksek oranda toksik insektisit" sınıfına dahil edilmiştir. Balıklarda elde edilen LC50 değeri ise 0.13-56 ppm olarak bildirilmektedir (U.S. EPA, 1990).

Diğer taraftan, doğal koşullarda yaşayan hayvanlar üzerinde, gerek laboratuvar ve gerekse arazi koşullarında yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Guthion'un hedef olmayan ve ekolojik dengede besin zincirinde yer alan hay-vanlara biyolojik etkilerini belirlemek amacı ile yapıla-cak çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Laboratuvar ko-şullarında yapılan bir araştırmaya göre, azinphosmethyl insektisitinin *Microtus canicaudus*'da LC50 dozu 300 ppm olarak saptanmıştır (Meyers ve Wolff, 1993). Short ve arkadaşları (1980), Guthion ile muamele edilmiş besin ile beslenen fare ve ratlarda, bu maddenin gebe hayvanlarda

herhangi bir vücut ağırlığı değişimine ve besin tüketimi üzerine etkisi olmadığını kaydetmektedir. Ayrıca günlük 5 mg/kg insektisit dozunun rat ve fareler üzerinde ortaya çıkardığı anti-ChE toksitesinin çok benzer olduğu rapor edilmiştir. Gebe hayvanlardan doğacak yavru sayısında ise bir değişiklik olmadığını kaydedilmektedir. Dubois (1963), ise yaptığı çalışmalar ile OP insektisitlerin letal doz değeri ile beyin AChE enzim inhibisyonu arasında çok iyi bir korelasyon bulunduğunu rapor etmiştir.

Genel olarak hayvanlar üzerinde Guthion'un etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların hemen hepsinde bu insektisit ChE enzimleri ile ilişkisi incelenmiştir. Ancak Worden ve arkadaşları (1973), Guthion'un rat ve köpeklerde bir organ hasarına yol açmadığını, bunun hayvanlara uygulanan doz ile de ilişkili olmadığını kaydetmektedir. Yabani yaşamda *Microtus pinetorum* üzerinde yapılan incelemelerde, arazi koşullarında Guthion spreyleneşini takiben, hayvanlarda sosyal davranış değişikliklerinin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Durda vd., 1989).

Organizmalarda bütün kimyasal maddelerin etkileri, bir populasyon ya da ekosistem düzeyindeki bir bireyde, fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyon ile başlamaktadır (Lenhardt, 1992). Diğer taraftan, bir tek kan örneğini, organizmada metabolik olayların ürünlerini ve enzim aktivite düzeylerini, alyuvar ve akyuvar hücrelerinin fonksiyon ve karakteristiklerini analiz etmede kullanabiliriz. Bu parametrelerin birisinin ya da bir kısmının belirlenmesi ve karşılaştırılması ile, sonuçta organizmanın sağlık durumunu gözlemek, eğer hastalık ya da sağlık göstergelerinde bir anormallik varsa hangi organlarda bozukluk bulunduğunu saptamak olasıdır (Fairbrother, 1992). Yabani

yaşam ve ekotoksikolojik çalışmalarda, yaşayan organizmalarda bir kimyasal maddenin bilinmeyen etkilerinin ortaya konulması birçok biyolojik testi gerektirmektedir (Lamb ve Kenega, 1981). Bundan dolayı biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerin kullanılması, gerek hayvan ve gerekse insanda kimyasalın etkisini belirlemede büyük önem taşımaktadır. Ekotoksikolojik çalışmalar bu nedenle hücresel, biyokimyasal ve fizyolojik araştırmaları gerektiren bir konudur (Zinkl vd., 1980; Amdur vd., 1991).

Çevre biyolojisi ile ilgilenen biyologlar tarafından organizmada çevresel faktörlerin etkisini belirlemek amacı ile kullanılan biyolojik kriterler "biyomarker" ya da "biyobelirteç" olarak adlandırılmaktadır (Hugget vd., 1992). Biyobelirteçler çevresel kontaminasyonun etkilerini belirlemek amacı ile ekotoksikologlar tarafından kullanılan oldukça yeni ve güçlü biyolojik laboratuvar aletleri olarak da tanımlanmaktadır (McCarthy ve Shugart, 1990). Fizyolojik ve özgül ya da özgül olmayan biyobelirteçler çevresel kirleticilerin etkili dozunu ya da organizmaya etkilerini saptamada laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir başka tanıma göre de, biyobelirteçler bir biyolojik sistem ya da örnekte, hücre bileşenleri veya biyokimyasal döngülerde ya da fonksiyonlarda ksenobiyotik olarak indüklenen değişimlerdir (Natl. Res. Council, 1989).

Kimyasal bir stresin özgül belirteçleri (indikatörleri) iki tip olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlardan birincisi olan "organa özgü biyobelirteçler", organ fonksiyon testleri, histopatolojik ve hematolojik çalışmalar, organa özgü enzim ve izoenzim çalışmaları olarak sayılabilir. Bu çalışmalar sonuçta organizmanın kirletici ya da

toksik etkili madde ile teması sonucunda ortaya çıkan sağlık koşullarını belirlemede bir kriter olarak kullanılabilir. Diğer taraftan, ikinci grupta incelenebilecek olan "toksik maddeye (toksikant) özgü biyobelirteçler" dokuda belirli bir enzim ya da biyomolekülün aktivitesini ya da miktarını ortaya koyarlar (Mayer vd., 1992).

Ekotoksikolojik araştırmalarda göz önünde bulundurulması gereken noktalardan birisi de, doğal koşullar ile laboratuvar koşullarında aynı kimyasalın, aynı tür organizmalar üzerinde etkisinin farklı olacağıdır. Bir araştırmacıya göre, doğal olarak oluşan popülasyonlar pestisitlere karşı laboratuvar koşullarında yaşayan hayvanlardan daha fazla dirençlidirler. Laboratuvar koşullarında pestisitlerin etkisini incelerken birçok parametrenin bir arada kullanılması kimyasalın organizmaya primer ve sekonder etkilerini anlamamızı kolaylaştırabilir (Cholakis vd., 1981). Memelilerde organ fonksiyon bozuklukları ya da hasarlarının belirlenmesinde serum enzimleri sıklıkla kullanılmaktadır. Kan plazması ya da serum kullanılarak yapılan biyokimyasal çalışmaları bize toksikant stresinin belirlenmesinde birçok potansiyel biyolojik belirleyiciyi kullanmaya olanak sağlamaktadır. Serum enzim konsantrasyonlarındaki artışlar bize çeşitli açılardan fikir verebilir. Bunlar;

- a) hücre ve hücre membranında hasarlara bağlı enzim sızıntıları,
- b) hücrede enzim üretiminin artışına bağlı sızıntılar
- c) kanda enzimi azaltmak amacı ile temizliktir (Mayer vd., 1992).

Organizmaların metabolizmasında ortaya çıkan değişimlerin biyokimyasal düzeyde iki büyük sonuç için biyobelirteç olarak kullanılması avantaj sağlamaktadır. Birincisi,



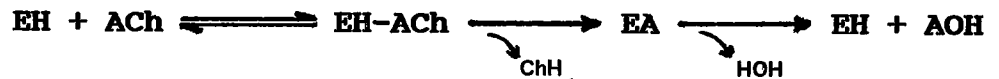
biyokimyasal ya da moleküler değişimler genelde organizmada çevresel ya da kimyasal değişimlere bağlı olarak sorumludurlar. İkinci olarak da, biyokimyasal değişimler organizmada hem maruz kalınan madde miktarınının hem de etkenin belirlenmesine hizmet etmektedirler (Stegeman vd., 1992). Bu nedenle, Guthion insektisitinin *Microtus canicaudus* üzerine laboratuvar koşullarında etkisinin incelendiği bu araştırmada, bazı serum biyokimyası parametreleri ve kan fizyolojisi parametreleri organa özgül ve özgül olmayan biyobelirteçler olarak kullanılmıştır. Ayrıca beyin AChE enzimi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar da toksikant özgül biyobelirteç olarak ele alınmıştır. Ancak bu konuda yapılan literatür incelemelerinde, gerek OP ve gerekse diğer kimyasal insektisitlerin sekonder biyobelirteçler olarak da tanımlayabileceğimiz fizyolojik ve biyokimyasal, organa özgül ya da özgül olmayan parametrelerle ilişkisini ortaya koyabilecek yeterli sayıda literatüre rastlanamıştır.

OP insektisitler bir organizmada etkisini AChE enzimini inhibe ederek göstermektedir. Bu durumda OP insektisitlerin etkisi ile bu enzimin aktivitesinde oraya çıkan değişimin izlenmesi gerekmektedir. Bu kullanılan kriter ise toksikant özgül biyobelirteç olarak ele alınmaktadır (Benke ve Murphy, 1974; Cholakis vd., 1981; Jett, 1986; WHO, 1986; Machera ve Kostakis, 1993; Block vd., 1993).

Yüksek yapıllı organizmalarda OP insektisitlerin etkisini saptamada kullanılan en yaygın biyobelirteç beyin AChE enziminin (EC:3.1.1.7) inhibisyonudur (Bubsy vd., 1987). Bu grup ChE, B-tipi esteraz (asetilkolin asetilhidroksilaz) olarak da adlandırılmaktadır. Diğer taraftan A-tipi esteraz (EC:3.1.1.8) olarak bilinen pseudokolineste

raz (asetil kolin açilhidroksilaz) ise serum ve plazmada bulunmaktadır (Coppage, 1971). Bu tip esterazkuşlardan daha yüksek aktiviteye sahiptir. Pseudokolinesteraz da OPinsektisit kontaminasyonunu belirlemede biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Fossi vd., 1992). OP insektisitlerle organizmanın kronik olarak maruz kalması organizmada hem AChE hem de pseudokolinesteraz aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Brown vd., 1981).

Fizyolojik olarak mesajlar organizmalarda bir transmitter madde varlığında, sinir sinapslarını geçerek iletilmektedir ve kolenerjik sinapslarda da asetilkolin (ACh) hizmet etmektedir (Şekil 1.2). Bir uyartı geçtiğinde, AChE asetilkolini aktif iyonik yapıya dönüştürür. Reaksiyonun ilk basamağında ACh, enzim (EH) ile birleşerek, geçici ve dönüşebilir bir kompleks (EH-ACh) oluşturmaktadır. Bu kompleks daha sonra kolin (ChH) salınımı ile enzimi asetillemektedir (EA). Reaksiyona su eklenmesi ise enzim molekülünün deasetile edilmesine ve serbest enzim ile asetik asit (AOH) oluşumuna hizmet etmektedir.



Şekil 1.2. Asetilkolin-Asetilkolinesteraz kompleksinin oluşumu (Chambers ve Levis'den, 1992).

OP insektisitlerin varlığında P=O grubu AChE'ın hidrokسيل grubuna karşı kuvvetli elektriksel bir çekime sahiptir. Bu grup AChE'a bağlandığında, enzim serbest olarak transmitter maddeye bağlanamamaktadır. Böylece, OP insek

tisitinin enzime çok kuvvetli bağlanması durumunda, suyun reaksiyona eklenmesi de çok yavaş olmaktadır. OP zehirlenmesi bu nedenle AChE enziminin fosforilasyonu ve sinir sinapslarında ACh birikimi ile ilintilidir (McCarthy ve Shugart, 1990). Ancak bir OP insektisit organizma tarafından alındığında, molekül ilk olarak karaciğerde metabolik aktivasyon ile, aktif bir enzim inhibitörü haline dönüşmektedir. Akut bir zehirlenmede insektisit normalde 5-10 dakika gibi kısa bir sürede aktivite kazanmakla beraber, enzim inhibisyonunun gelişimi, insektisit kimyasal aktivasyonu, absorpsiyonu ve enzim ile yavaş bağlanması nedenleri ile daha uzun bir zaman almaktadır. Ayrıca zehirlenme etkilerinin ortaya çıkışı insektisit konsantrasyonu ile de bağlantılıdır (Brown vd., 1981). Genel olarak, OP insektisitler organizmada dönüşümsüz olarak enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle de bir organizmada AChE enzim aktivitesinin normal değerler içinde bulunması, canlılığın OP insektisit ile zehirlenmediğine bir delil olarak kabul edilebilir (Namba, 1971). Sonuçta OP insektisit zehirlenmesi etkisini yüksek yapıllı organizmalarda titreme, salya akması, baş dönmesi, bulantı, miyosis, koma, kasılma, hareketsiz kalma, felç ve ölüm şeklinde göstermektedir (McEven ve Stephenson, 1979).

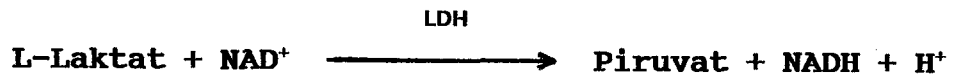
Bir çevresel etkenin ya da kimyasal bir maddenin bir organizma üzerinde etkisinin incelenmesi için çok sayıda araştırmanın yapılması gerekmektedir (Mayer vd., 1992). Son yıllarda, genel olarak yüksek yapıllı canlılarda bir kimyasalın etkisinin incelenmesi için tıp alanında da yaygın olarak kullanılan laboratuvar testlerinden yararlanılmaktadır (Khan, 1980; Folmar, 1993). Böylece serum enzim düzeyinde ya da bir doku veya organa özel madde konsant

rasyonunda ortaya çıkan değişimler, organizmada bir doku ya da organın hasarına bir kanıt olarak kullanılabilir.

Guthion insektisitinin bir rodent türü olan *Microtus canicaudus*'a etkisinin incelendiği bu araştırmada, toksikant maddeye özgü bir biyobelirteç olan beyin AChE enzim aktivitesinin saptanması dışında, insektisit organizmada çeşitli doku ya da organlarda hasara neden olabilecek başkaca etkilerinin olup olmadığının incelenmesi amacı ile çeşitli biyobelirteçler de incelenmiştir.

Bunlardan birisi plazma laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesinin tayinidir. LDH (EC 1.1.1.27), glikolitik yolda nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)'in redüklenmesi ile (NADH) laktat'ın piruvat' a okside olmasını katalizleyen bir enzimdir. Laktik asit ise anaerobik koşullarda glikolitik yolun son ürünüdür (Lehninger 1982) (Şekil 1.3).

Bu reaksiyon yüksek yapıllı organizmaların hücrelerinde kas aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan oksijen azlığı durumunda oluşmaktadır. Laktat aktif iskelet kasları ve eritrositler tarafından üretilen, glukoneogenesis'de rol oynayan temel materyaldir. LDH dokuların birçoğunda beş farklı izoenzim formunda oluşmaktadır. Bu izoenzimlerin sentezinden ise 2 gen sorumludur (Lehninger, 1982).

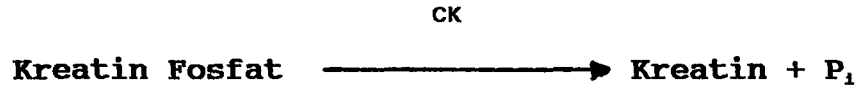


Sekil 1.3. LDH enzimi aracılığı ile laktat'ın Piruvat'a oksidasyonu

Diğer taraftan LDH aktivitesinin ve düzeyinin çeşitli pestisitleri de içeren kimyasallar tarafından etkilendiği rapor edilmiştir (Gupta vd., 1991). Ayrıca LDH enzim düzeyi dokudan dokuya farklılık göstermekle birlikte, normal koşullarda plazmada enzim düzeyi dokulardakine oranla 500 kat daha düşük seviyededir. Ancak dokuda ortaya çıkacak küçük bir hasar durumunda bile serum (ya da plazma) da LDH aktivitesinin arttığı kaydedilmektedir. Özellikle serumdaki enzim düzeyinin artışı, kas dokularında ortaya çıkan bir hasara işaret eden bir biyobelirteç olarak değerlendirilmelidir (Oikari vd., 1983; Versteeg, 1985). Kalp enfarktüsü, karaciğer hastalıkları ve tahribatı, kanser gibi durumlarda plazma LDH düzeyi 3-4 kat artış göstermektedir (Tietz, 1987).

Kreatin kinaz (CK) (ATP:kreatin fosfotransferaz) (EC 2.7.3.3) adenosin trifosfat (ATP) aracılığı ile kreatin fosforilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Strayer, 1988). CK özellikle kas, beyin ve kalp dokularında bol olarak bulunmaktadır. Enzim kas kasılması ve diğer eksite edilen dokulardan beyin ve sinir dokusunda enerji bakımından önemli rol oynamaktadır. Bu dokularda ortaya çıkacak bir hasar plazmada CK aktivitesinin artışına neden olmaktadır (Tietz, 1987; Sigma CK Manual). Özellikle kalp kası harabiyetlerinde ve miyokardial enfarktüs durumlarında kan CK düzeyi 4-6 saat içinde 7-12 kat artış kaydetmekte, ancak 3 gün içerisinde yeniden normal düzeyine dönmektedir (Kashmar ve Moss, 1976). Karaciğer harabiyet ve hastalıklarında ise serum enzim seviyesinin değişmediği bildirilmiştir (Tietz, 1987). Kreatin kinaz, kreatin fosfatın hidrolizi ile standart bir enerjinin açığa çıkması için kullanılmaktadır. Reaksiyonda kreatin fosfat yüksek enerjili

fosfat grubunu ADP'ye transfer ederek, ATP sentezine neden olmaktadır (Şekil 1.4). Böylece yüksek enerji gereken kas, sinir gibi dokularda, enerji sağlanmasında bu yol önemli bir mekanizmadır (Lehninger, 1982).

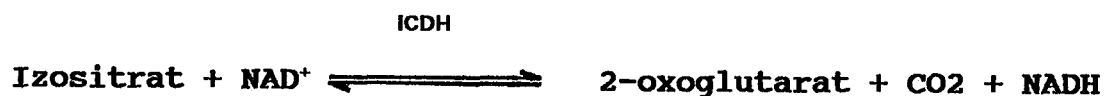


Şekil 1.4. Kreatin Kinaz enzimi ile katalizlenen reaksiyon

LD ve CK enzimlerinin düzeyleri kalp dokusunda ortaya çıkan bir hasara bağlı olarak (örneğin miyokardial enfarktüs'de), plazmada artış göstermektedir. Miyokardial enfarktüsü izleyen 1. günde önce plazma CK düzeyi maksimum düzeye çıkar ve total LDH düzeyi ise daha yavaş bir artış göstererek, 12-24. saatler içerisinde yükseliş gösterir. Ancak LDH enzim seviyesinin artışı incelenirken, izoenzim seviyesindeki değişiklik de önem taşımaktadır (York, 1986; Fairbrother, 1992). Diğer taraftan OP ve karbamat grubu insektisitler genel olarak nörotoksinler sınıfına dahil organik maddelerdir ve önemsiz derecede sistemik organ hasarlarına etkili oldukları düşünülmektedir (Fairbrother, 1992). Gupta ve arkadaşları (1991) Karbofuran'ın tek bir doz uygulanmasını takiben, ratlarda serum total LDH aktivitesinin arttığını rapor etmektedir. Ayrıca çeşitli OP insektisit uygulamasına maruz kalan tavuk embriyolarının plazma LDH aktivitesinin artışına neden olduğunu da kaydetmişlerdir. Metil merkür, DDE ve alaklor 1254 *Sturnus vulgaris* (sığırcık) ve *Coturnix coturnix japonica* (bıldırcın) da LDH ve CK enzim aktivitelerinin 2-4 kat

artışına neden olurken, malathion insektisiti uygulaması ile LDH aktivitesi sığırcık kuşlarında %50 artış göstermiştir (Dieter, 1974; 1975). Paraquat ile maruz bırakılan *Falco sparverius*'da da LDH aktivitesinin yüksek olarak bulunduğu rapor edilmektedir (Hoffman vd., 1987). Embriyonik tavuklara in-ovo verilen metil parathion, 2,4-D ve carben-dazim pestisitlerinin plazma LDH aktivitesinin inkübasyonun 19. gününde önemli düzeyde artışına neden olduğu bildirilmektedir (Somlyay ve Varnagy, 1989). Balıklarda (*Cyprinus carpio*) paraquat uygulamasını takip eden methidathion pestisiti uygulamasının LDH enzim aktivitesinde bir inhibisyona neden olduğu kaydedilmiştir (Asztalos vd., 1990). Ancak yapılan literatür incelemelerinde, Guthion insektisitinin LDH ve CK enzim aktivitesine etkisi ile ilgili bir çalışma kaydına rastlanılmamıştır.

Bu araştırmada ele alınan kriterlerden bir tanesi de plazma izositrat dehidrogenaz (ICDH) (EC 1.1.1.42) aktivitesinin saptanmasıdır. Bu enzim izositratın 2-oxoglutarat ( $\alpha$ -keto glutarat)'a oksidatif dekarboksilasyonunda rol oynayan Trikarboksilik asit (Krebs) döngüsü enzimlerinden birisidir (Lehninger, 1982) (Şekil 1.5). ICDH dokularda yüksek oranda bulunmaktadır, ancak genelde serumda bulunan enzim karaciğer kökenlidir (Sigma Proc., 1986).



Şekil 1.5. Izositratın oksidatif dekarboksilasyonunda ICDH enziminin rolü (Strayer'dan, 1988).

Dokularda ICDH iki tipte bulunmaktadır ve birisi elektron akseptörü olarak  $NAD^+$  gerektirirken, diğeri  $NADP^+$  'ye gereksinim göstermektedir. Enzim özellikle karaciğer, kalp, iskelet kasları, böbrekler, adrenal bezler ve eritrositlerde çok bol miktarda bulunmaktadır. Bununla beraber serum ICDH aktivitesi sağlıklı organizmalara çok düşük düzeydedir (Tietz, 1987). Ancak enzim düzeyi özellikle karaciğer harabiyetine neden olan hastalıklar, enfarktüs gibi durumlarda yükseliş kaydetmektedir (Kashmar, 1970). Amador ve Wacker (1965), plazma ICDH aktivite düzeyini karaciğer hücre harabiyetlerinin saptanmasında en önemli kriter olarak tanımlamaktadır. Özellikle toksikant tarafından indüklenen karaciğer hasarlarında ICDH düzeyinde önemli artış saptanmıştır (Davy vd., 1989). Ancak yapılan literatür araştırmalarında, ICDH enzimi ile insektisitler ya da Guthion arasında ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Diğer taraftan bu araştırmada Guthion insektisitinin etkisini incelemede bir biyobelirteç olarak ele alınan nonenzimatik testlerden birisi plazma Kreatinin konsantrasyonunun saptanması ile ilgili çalışmalardır. Plazma kreatinin düzeyi bu maddenin yapım ve vücuttan atılım hızları arasındaki bir dengeye bağlıdır. Kreatin normal olarak karaciğer, pankreas ve böbreklerde glisin, arjinin ve metionin aminoasitlerinden sentez edilmektedir. Sentezden hemen sonra, kreatin vasküler sisteme difüze olmakta ve böylece birçok hücrede özellikle de kas hücrelerinde fosforilasyona uğramaktadır (Tietz, 1987; Baron, 1982). Kreatin fosfat, ATP'ye dönüşmeye hazır halde kas ve diğer dokularda yüksek enerji kaynağı olarak rol oynamaktadır. Kreatin metabolizmasında kaslardaki son ürün kreatinin'dir



ve bu madde metabolik olarak inaktif bir yapıdadır (Baron, 1982). Kreatinin memelilerde plazmadan glomerular filtrasyon ile uzaklaştırılmakta ve daha sonra idrar ile vücuttan atılmaktadır (Devlin, 1986). Böylece plazma kreatinin konsantrasyonunun belirlenmesi, böbreklerde bir hasar olup olmadığını ortaya koyması bakımından önemlidir. Ancak yapılan literatür incelemelerinde insektisitlerin organizmada böbrek harabiyeti ile sonuçlanacak hasara yol açıp açmadığı ve buna bağlı olarak kreatinin düzeyinin nasıl etkilenebileceğine ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Protein metabolizması esnasında, aminoasitlerin deaminasyonu sonucu olarak, karaciğerde amonyaktan üre sentez edilmektedir. Plazma üre konsantrasyonu protein katabolizmasında üre oluşumu ve böbreklerden atılması arasında temel bir dengeyi sergilemektedir (Baron, 1982). Plazma üre konsantrasyonu böbrek fonksiyonlarının olmadığı durumlarda bile organizmanın yaşına bağlı olarak artış gösterebilir. Ancak serum (ya da plazma) da kan üre nitrojeni (BUN) konsantrasyonunun saptanması, böbrek fonksiyonlarının ortaya konulması bakımından yaygın olarak klinik amaçla kullanılan testlerden birisidir ve glomerular tübüllerin vücuttan atılacak maddeleri absorblaması hakkında fikir sağlamaktadır (Tietz, 1987). Diğer taraftan OP insektisit etkisine maruz kalan hayvanlarda plazma BUN konsantrasyonunun artıp artmadığı hakkında bir literatür bilgisi mevcut değildir. Ancak BUN düzeyinin insanda 37 mg/dl değerinin üzerine çıkması genel olarak böbrek fonksiyonlarının bozukluğuna işaret etmektedir.

Kan hücrelerinin sayısal değişimi organizmalarda fizyolojik fonksiyonların önemli göstergelerinden birisi

olarak kabul edilmektedir. Özellikle akyuvar hücre tablosunda ortaya çıkan değişiklikler canlının sağlık durumunu göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Fairbrother ve O'Loughlin, 1990). Diğer taraftan, *Microtus* türlerinde akyuvar farklılaşması ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu araştırmalardan birisine göre, *Microtus pennsylvanicus* türü ile yapılan çalışmalarda nötrofil oranı %13, lenfosit oranı %78, monosit oranı %5, eosinofil oranı %3 ve bazofil oranı ise %0.2 olarak saptanmıştır. Ayrıca diğer Kuzey Amerika mikrotinlerinde de akyuvar farklılaşma oranının benzer olduğu kaydedilmektedir (Dieterich ve Preston, 1977). Yapılan bir başka çalışmaya göre de, Mihok ve arkadaşları (1986), yabancı *Microtus pennsylvanicus* 'da diğer hücrelerden farklı olarak gördükleri bir lökosit hücre tipini "azurosit" olarak adlandırmışlardır. Araştırmacılar bu hücrenin geniş, tek bir nükleusa sahip olduğunu ve sitoplazmasında mor renk ile boyanan sitoplazmik cisimciklerin yer aldığını rapor etmişlerdir. Bu tip hücreler erişkin hayvanlarda yaygın olarak görülmektedir. Araştırmacılar bu hücreleri genç lenfositlere benzetmişler ve lenfosit hücresi olarak kabul etmişlerdir. Farelerde yapılan çalışmalar ile de akyuvar farklılaşmasının *Microtus* türlerinde bulunan oranlara benzer olduğu görülmektedir (Schalm vd., 1975). Bu sonuç insan akyuvar farklılaşma oranları ile zıt olarak görülmektedir. Diğer taraftan yapılan literatür incelemelerinde Guthion insektisiti ya da diğer pestisitlerin organizmada kan akyuvar farklılaşmasına etkisi ile ilişkili çalışmalara rastlanmamıştır. Bu nedenle *Microtus* ya da diğer memelilerde insektisitlerin akyuvar farklılaşmasına olan etkileri bilinmemektedir. Ancak Folmar (1993), manadione ve dichlone et

kisine bağlı olarak balıklarda hematokrit değerinin azalırken, malathion etkisi ile hematokrit değerinde artış olduğunu kaydetmiştir.

Organofosforlu insektisitler günümüzde oldukça yaygın kullanılan pestisitlerin başında yer almaktadır ve bunlardan birisi olan Guthion'da bu grup insektisitler içerisinde Dünyada ve Türkiye'de yaygın kullanım alanına sahip kimyasallardan bir tanesidir. Ancak pestisitler ürün verimini arttırmak amacı ile insanlığın hizmetine sunulurken, diğer taraftan da bu maddeler ile çevresel kontaminasyonun artması sonuçta çevrede yer alan ve hedef olmayan organizmaların da bu maddelerden önemli ölçüde etkilenmesine, besin zincirinde ortaya çıkan hasarlar nedeni ile doğal dengenin bozulmasına yol açmaktadır.

Bu tezdeki araştırmalarda, guthion'un doğal koşullarda Kuzey Batı Amerika'da yaygın olarak bulunan bir rodent türü olan *Microtus canicaudus*'un laboratuvar soylarına etkilerinin çeşitli biyokimyasal, fizyolojik ve toksikolojik parametreler kullanılarak saptanması amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra çalışmalarda spektrofotometrik tayinler için mikroplate okuyucu kullanılması ve çeşitli biyobelirteçlerin ele alınması ile ekotoksikolojik araştırmalara yeni boyutlar kazandırılması, ayrıca kullanılan biyobelirteç çeşitliliği ile yeni katkıların getirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Kullanılması

Araştırmamızda, doğadan yakalanarak, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory-Corvallis, Wildlife Research Facility (U.S. EPA, ERL-C, WRF) de laboratuvar koşullarına adapte edilerek üretilmiş olan hayvanlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan *Microtus canicaudus*, *Mammalia* (Linneaus, 1758) sınıfının *Theria* (Parker & Hasswell, 1879) alt sınıfına dahil olup, *Rodentia* (Bowdich, 1821) ordosu içerisinde sınıflandırılmıştır. Yeni dünya mikrotinleri olarak da bilinen bu hayvanlar *Muridae* (Gray, 1821) familyasına bağlı *Avricolinae* (Gray, 1821) altfamilyasında incelenmektedir. Kuzey Amerika'da yaygın olarak rastlanan bir kemirgen türü olan bu hayvanlar "gri kuyruklu tarla faresi" olarak da adlandırılmaktadır (Anderson, 1985) (Şekil 2.1). Genel olarak bu hayvanların besinlerini bitkiler oluşturmaktadır ve tarım alanlarında çok yaygın olarak bulunan bu hayvanlar özellikle Kuzey Batı Oregon Eyaletinde yayılış göstermektedir (Cholakos vd., 1981). *Microtus canicaudus* doğal yaşamda besin zincirinde önemli bir halka olması nedeni ile ekolojik olarak önem taşımaktadır (Pearson, 1985).

Bu araştırmada ağırlıkları 18-38 gr arasında değişen ergin hayvanlar deney materyali olarak seçildi ve toplam 100 hayvan (56 ♂, 44 ♀) ile deney planlandı. Deney önce



Şekil 2.1. *Microtus canicaudus* "Kuzey Batı Amerika  
gri-kuyruklu tarla faresi"

sinde hayvan ağırlıklarının deney gruplarına göre homojen dağılımını sağlamak amacı ile, hayvanlar tesadüfi olarak seçilip deney grupları belirlendi. Deneyler süresince her kafeste bir hayvan barındırıldı ve araştırma iki temel deney grubu olarak planlandı. Birinci grup hayvanlar "Letal Konsantrasyon (LC)" grubu olarak adlandırıldı ve bu grupta toplam 40 (20 ♂, 20 ♀) *Microtus* kullanıldı. İkinci deney grubunda ise toplam 60 hayvan (36 ♂, 24 ♀) kullanılmış olup, bu test grubu "Disseksiyon (DS)" grubu olarak adlandırıldı.

Hayvanlar kimyasal madde muamelesine başlanılmadan 5 gün önce deney koşullarına alınarak, ağırlıkları saptandı ve normal fare diyeti ve çeşme suyu (ad libitum) ile beslenmeye devam edildi. Böylece deney öncesinde hayvanların koşullara adaptasyonu ve eğer varsa hastalık belirtilerinin ortaya çıkması ve sağlıklı hayvanların deneyden çıkarılması planlandı. Bu dönemde, hayvanlar içerisinde yatak materyali olarak talaş bulunan kafeslerde barındırıldı. Ancak bu yatak materyalleri deneye başlanılmadan bir gün önce (-1. gün) ince deniz kumu ile değiştirildi. Böylece deney süresinde kafes içerisine dağılmış ve tüketilmemiş olan yemlerin kolaylıkla geri toplanması planlandı. Bunun için gerek yatak materyalinin yenisi ile değiştirilmesi ve gerekse boşalan kafeslerin temizlenmesi esnasında yemler kumdan dikkatlice ayıklandı ve tartıldı. Hayvanlar deney koşullarına alındıkları (-5). günden başlanarak tüm deney boyunca 16 saat ışık periyodunda, 20°C (±1°C) oda sıcaklığında ve % 40-60 nisbi nem koşullarında havalandırma düzeyine sahip deney hayvanları laboratuvarında barındırıldı.

Deneyde LC test grubu olarak ayrılan deney hayvanla

rı, (-1). deney gününden itibaren başlanılarak, iki gün aralıkla (-1, 2, 4, 6, 8, 10, 14. günler) kan örnekleri toplandı ve vücut ağırlıkları kaydedildi. Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların son günü olan 14. günde halen yaşamını sürdüren tüm LC grubu hayvanlar dissekte edilerek, doku örnekleri alındı. Diğer taraftan, "DS" test grubu hayvanlarda "LC" test grubu *Microtus*'larla birlikte aynı koşullarda ve aynı deney odasında deneye alındı. Ancak bu hayvanların deney süresince çeşitli günlerde dissekte edilmeleri planlandı. Buna bağlı olarak, bu grup deneklerden rastgele seçilen örneklerin 3, 7 ve 9. deney günlerinde her doz grubu için 5 hayvan (3 ♂, 2 ♀) olmak üzere disseksiyonu amaçlandı. Bu hayvanlardan da öldürülmeden önce kan örnekleri toplandı ve vücut ağırlıkları saptanarak kaydedildi. Ancak birinci disseksiyon gününde her doz grubundan 5 *Microtus* öldürüldüğü halde, diğer disseksiyon günlerinde insektisit etkisi ile başlayan hayvan ölümlere bağlı olarak, bazı doz gruplarında daha az sayıda hayvan dissekte edilebildi. Deney süresince hayvanlar günde 3 kez kontrol edilerek, ölen hayvanlar ve ölüm zamanları yaklaşık olarak saptanmaya çalışıldı. Deneylerde elde edilen laboratuvar verileri protokol defterine günlük olarak kaydedildi.

## 2.2. Yem Preparasyonu ve Hayvanların Beslenmesi

Araştırmamız süresince deneye alınan hayvanlar normal

fare diyeti ile beslendi. Ancak hayvanlar deney odasına alındıkları -5. günden -1. güne kadar hiç bir işlem uygulanmamış yem ile beslenirken, (0). günden itibaren insektisit ile muamele edilmiş yem ile beslendi. Bu günden itibaren hayvanlara verilen yemler küçük parçalara kırıldıktan sonra, insektisit ile muamele edildi. Bunun için Guthion insektisiti (Bayer Mobay Corp., USA) %1 aseton ile eritilerek, karışıma %2 oranında mısırözü yağı eklendi ve yemler bu karışım ile iyice karıştırıldı. Araştırmada kullanılan kontrol grubu hayvanların yemleri ise %1 aseton ve %2 mısırözü yağı ile muamele edildi. Hayvanlara uygulanacak insektisit konsantrasyonları, *Microtus canicaudus* ile daha önce EPA'da Meyers ve Wolff (1993) tarafından yapılan Guthion LC50 deney sonuçları göz önüne alınarak seçildi. Hayvanlar LC50 değeri olarak 322 ppm Guthion ile muamele edilmiş yem ile beslenirken, ayrıca bu dozdan düşük bir konsantrasyon olarak 161 ppm ve yüksek doz olarak da yine önceki çalışmanın sonuçları göz önüne alınarak, 428 ppm Guthion ile muamele edilmiş yem verildi.

Deney süresince hayvanların yemi kafesler içerisine konulan 4 cm çapında ve 4 cm yükseklikteki cam kavonozlardan almaları sağlandı. Hayvanların deney süresince tükettikleri toplam ve günlük ortalama insektisit ile muamele edilmemiş ve edilmiş yem miktarını belirlemek için, yemler gerek kafese konulduklarında ve gerekse de kafesten alındıkları anda titizlikle tartıldı. Özellikle tüketilmeyen ve yatak materyaline saçılan yemlerin de titizlikle toplanmasına özen gösterildi. Ayrıca deney süresince hayvanların tükettikleri toplam ve günlük ortalama su miktarları da hesaplandı. Hayvanların içme sularını şişelerden alması sağlandı.



### 2.3. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri, araştırma gruplarını oluşturan LC ve DS grubu hayvanlardan, gözden kan alma tekniği (Stone, 1954; Schalm vd., 1975; Reynolds, 1992) kullanılarak toplandı. Bu yöntemde hayvanların göz kılcal damarlarından heparinize (amonyum heparin ile) edilmiş kılcal tüpler (Scientific Products Corp., USA) aracılığı ile kan alındı. Bu amaçla "LC" test grubu olarak adlandırdığımız hayvanlar (-1), 2, 4, 6, 8, 10 ve 14.günlerde, narkoz maddesi olarak izofluran (AErrane) (Anaquest Chemical Corp., USA) kullanılarak, yaklaşık 30 saniye süre ile uyutuldu ve 70  $\mu$ l kapasiteli 3 kılcal tüp dolusu kan örneği, plazma eldesi amacı ile, 10  $\mu$ l kan örneği ise hematokrit ölçümü amacı ile bir başka tüpte (Ames Corp., Germany) toplandı. Daha sonra bu kan örnekleri içeren kılcal tüpler süratle hayvanın kimlik numarasını taşıyan etiketli cam tüplere konularak, kırık buz parçaları ile dolu olan bir kaptaki günlük kan alma işlemleri tamamlanıncaya kadar bekletildi. Kan alma işlemi sırasında 14. günde halen yaşayan hayvanlardan olabildiği kadar çok miktarda kan toplanıp bu hayvanlar CO<sub>2</sub> ile ölüldü ve disseksiyonları yapıldı.

Diğer taraftan, "DS" test grubu olarak adlandırılan ve deneye alınan Microtinlerden kan örnekleri yalnızca dissekte edilecekleri gün (3, 7 ya da 9. günde) ve olabildiği kadar çok miktarda (300-700  $\mu$ l) toplandı. Bunun için kan örneği alınıp dissekte edilecek hayvanlar "DS" test grubu yaşayan test hayvanları içinden rastgele seçildiler. Ancak bu hayvanlardan kan alma işlemi sırasında,

bayıltmak için narkoz maddesi kullanılmadı. Araştırmada gerek "DS" test grubu gerekse 14. günde yaşamda olan "LC" test grubu hayvanlar kan örneklerinin alınmasını takiben, karbondioksit gazı ile öldürüldüler.

#### 2.4. Toplanan Kanın Preparasyonu

##### 2.4.1. Plazma örneklerinin hazırlanması

Gerek "LC" grubu gerekse "DS" grubu hayvanlardan alınan kan örnekleri süratle laboratuvara taşınarak, mikrokappiller tüplerdeki kanlar 500  $\mu$ l'lik mikrosantrifüj (Eppendorf Corp., USA) tüplerine boşaltıldı. Tüm işlemler sırasında kanlar buz kabı içinde tutuldu. Daha sonra her kan örneğinden Fairbrother ve O'Loughlin tarafından (1990) önerildiği gibi, ikişer tane olmak üzere ince tabaka sürme froti yöntemi ile kan frotileri hazırlandı ve preparatlar kurumaya terk edildi. Bu sırada, mikrosantrifüj tüplerinde bulunan kanlar ise soğutmalı santrifüj (Sorvall, RC5C, USA) de 3000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Bu süre sonunda santrifüjden alınan tüplerdeki plazma kısmı, her tüp için temiz bir transfer pipeti kullanılarak, temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve etiketlendi. Tüm bu işlemler sonunda buz kabından toplanan tüpler süratle daha sonraki laboratuvar deneysel çalışmaları için

70°C'lık derin dondurucuya transfer edildi.

#### 2.4.2. Kan frotilerinin boyanması

Kan preparasyon işlemleri sırasında hazırlanan ve kurumaya terk edilen preparatlar Diff-Quik boyama seti (Baxter Corp., USA) kullanılarak boyandı. Bu boyama seti akyuvar hücreleri için spesifik olup, Wright boyama yönteminin bir modifikasyonudur (Trust, 1992). Bu yöntemde ilk olarak preparatlar 5 saniye süre ile fiksatif solusyonda (1.8 mg/lt Triarylmethane:metil alkol) fikse edildi. Fiksasyon işlemini takiben preparatlar Diff-Quik solusyon-I (1 gr/lt Xanthene:Buffer çözeltisi; %0.01 Sodyum Azide)'de 5 saniye süre ile boyandı ve fazla boya distile su ile uzaklaştırıldı. Daha sonra preparatlar Diff-Quik solusyon-II (1.25 gr/lt Thiazine:Buffer çözeltisi) 'de (Thiazine: 0.625 gr/lt azure, 0.625 gr/lt metilen mavisi) 5 saniye süre ile bekletildi ve preparatlar yeniden distile su ile yıkanıp kurumaya terk edildi.

Boyanmış preparatlar daha sonra ışık mikroskobu (Leitz, Orthoplan) ile 100X objektif (P1 Apo Del 100/1.32) ile taranarak incelendi. Bunun için, her kan örneğinden hazırlanan 2 preparat da kullanılarak, Fairbrother ve O'Loughlin'in (1990) kullandığı yöntem ile, her preparatta 100 adet akyuvar hücresi tesadüfi olarak sayıldı ve ortalama akyuvar farklılaşması yüzde (%) olarak ifade edildi.

### 2.4.3. Hematokrit değerlerinin saptanması

Hayvanlardan kan alma işlemleri sırasında 10 µl'lik kılcal tüplerle alınan kan örnekleri, Dein (1984) ve Trust (1992) yöntemleri kullanılarak, hematokrit değerlerinin saptanmasında kullanıldı. Bunun için örnekler otomatik mini hematokrit santrifüjünde (Ames-Compur M1100, Germany) 3 dakika 20 saniye süre ile 11500 rpm'de santrifüj edildi ve tüplerdeki çökeltme standart hematokrit cetveli kullanılarak ölçüldü.

### 2.5. Hayvanların Disseksiyonu ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmalarımız süresince 3, 7 ve 9. günlerde disseksiyona alınan "DS" test grubu hayvanlar ve hayvan deneylerinin son gününde (14. gün) dissekte edilen "LC" test grubu hayvanlar, kan örneklerinin alınmasını takiben karbondioksit gazı ile özel öldürme kabında öldürülerek, süratle dissekte edildiler ve hayvanların beyin dokuları alındı. Her hayvandan alınan bu doku örnekleri ayrı ayrı alüminyum folyoya sarılıp, küçük plastik torbalara konulduktan sonra, üzerlerine hayvan ile ilgili bilgiler eklenip, disseksiyon tamamlanana kadar buz kabı içerisinde korundu. Tüm hayvanların günlük disseksiyonu tamamlandığında dokular

süratle ileriki laboratuvar araştırmalarında kullanılmak üzere  $-70^{\circ}\text{C}$ 'lık derin dondurucuya taşındı.

## 2.6. Beyin Dokusu ve Plazma Örneklerinde Yapılan Deneysel Çalışmalar

Günlük kan alma işlemleri ile toplandıktan sonra, daha önce belirtilen prosedürlerden geçirilip  $-70^{\circ}\text{C}$  da derin dondurucuda muhafaza edilen plazma örnekleri ya da dissekte edilen hayvanlardan alınan ve derin dondurucuda bekletilen beyin doku örnekleri, çeşitli biyokimyasal testler için kullanıldı. Bu amaçla beyin AChE, plazma LDH, ICDH, CK enzim aktiviteleri ve plazma kreatinin ve BUN değerleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak saptandı. Deneylerin başlangıcında derin dondurucudan alınan örnekler oda sıcaklığında bırakılarak çözümleri sağlandı ve çalkalamadan derhal kırık buz dolu kap içerisine konuldu. Örnekler deney başlangıcında gerekiyorsa yöntemler gereğince 1/2 ya da 1/5 oranlarında seyreltildi. Deneylerde gerek seyreltme işlemleri ve çözeltilerin hazırlanması işlemleri sırasında ve gerekse de diğer tüm pipetleme işlemleri sırasında mikrokompütürize elektronik 25, 100, 250, 1000 ve 2500  $\mu\text{l}$  kapasiteli pipetler (Rainin Corp., USA) kullanılarak, deneysel hataların en aza indirgenmesine büyük önem verilmiştir. Ayrıca tüm pipetleme işlemleri için temiz pipet uçları kullanıldı. Biyokimyasal spektrofotometrik çalışmalar

esnasında, araştırmada kullanılan çözelti ve tamponlar günlük olarak hazırlandı ve çalışma anına kadar buzdolabında +4°C da yada buz kabı içerisinde bekletildi. Seyreltilerek ya da doğrudan kullanılan plazma örnekleri de buz kabı içerisinde korundu.

Araştırmada spektrofotometrik olarak enzim aktivite tayini ya da plazma da BUN ve kreatinin miktarlarının belirlenmesi amacı ile Mikroplate okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., USA) kullanıldı. Bu sistem çeşitli dalga boylarında (340-750 nm) spektrofotometrik ölçüm yapan bir sistem ve bu sisteme bağlı olarak kişisel komputer ile birlikte kullanılan bir bilgisayar programından (SOFTmax, Molecular Devices Corp., USA) oluşmaktadır. Bu okuyucu sistemi ile birlikte kullanılan plaklar her seferinde aynı anda 96 örneğin spektrofotometrik analizine olanak sağlamaktadır.

#### 2.6.1. Beyin asetilkolin esterase aktivitesinin tayini

Beyin AChE enzim aktivite tayininin Guthion insektisiti ile muamele edilmiş yem ile beslenen hayvanlarda saptanması amacı ile Ellmann ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bu yöntem mikroplate okuyucu için modifiye edildi. Yöntemde ChE aktivitesi 405 nm de absorbans artışının saptanması ile ölçülmektedir. Yöntem ortamda bulunan 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)'in thiokolin ile reaksiyon vererek sarı

renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Ortamda oluşan bu maddenin saptanması doğrudan doğruya örnekte bulunan AChE enziminin aktivitesini saptamaya olanak sağlamaktadır.

Beyin AChE enzim aktivite tayini için  $-70^{\circ}\text{C}$  da derin dondurucuda muhafaza edilen beyin dokusu örnekleri, oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra, derhal kırık buz dolu kap içerisine alındı. Daha sonra örnekler tek tek tartılarak homojenizasyon kavanozu (Virtis Corp., U.S.A) içerisine alındı. Her 35 mg beyin dokusu için 1.0 ml hesabı ile 0.05 M soğuk Trizma tamponu (tris [hidroksimetil] aminometan: tris hidroklorid) (pH: 7.4) (Sigma Corp., USA no: T-4003) pipetlendi. Beyin dokusu yatay bıçaklı homojenizatör (Virtis Corp., USA) kullanılarak, 50 devirde 15 saniye süre ile buz kabı içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 50 ml kapasiteli polipropilen santrifüj tüplerine alınarak ağızları kapalı bir şekilde buz kabı içerisinde tüm homojenizasyon işlemleri tamamlanana kadar saklandı. Daha sonra, homojenatlar 12500 rpm'de 20 dakika süre ile  $0-4^{\circ}\text{C}$ 'da soğutmalı santrifüjde (Sorvall, RC5) santrifüj edildi. Süpernatant transfer pipetleri ile alınarak, her örnek için ayrı ayrı etiketlenmiş olan mikrofüj tüplerine transfer edildi ve derhal buz kabı içerisine alınıp enzim aktivite tayini aşamasına geçildi.

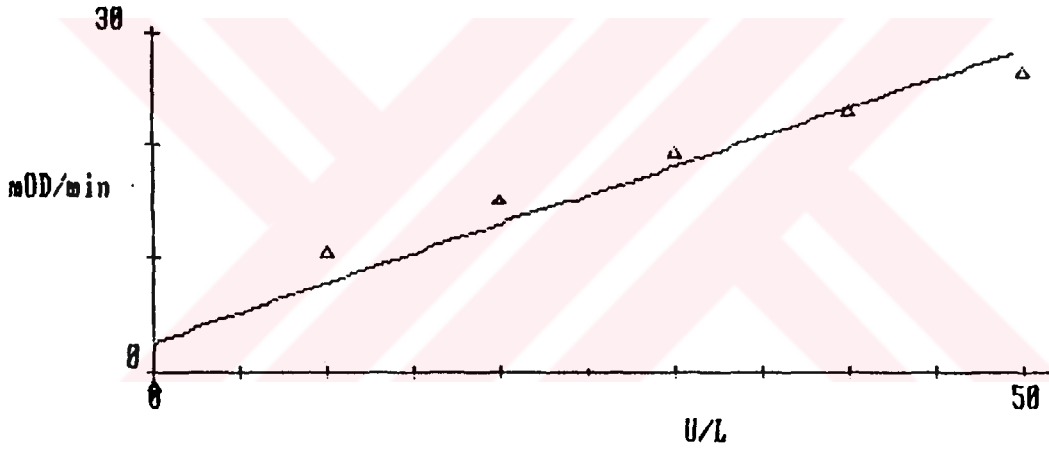
Beyin AChE enzim aktivitesinin spektrofotometrik tayini için mikroplate okuyucu (Molecular Devices Corp., USA) kullanıldı. Deneysel prosedür için kullanılan tüm çözeltiler taze olarak hazırlandı. Çalışmalarda kullanılan çözelti ve substratların ve cihaz kalibrasyonlarının doğruluğunu test etmek ve aktivite tayininde kullanılacak standart eğrinin eldesi amacı ile laboratuvar koşullarında

yaşayan sağlıklı *Microtus* beyin örneği (VCB) ve *Colinus virginianus* beyin örneği (BWB) kullanıldı. Enzim aktivitesinin saptanması için kullanılacak mikropate okuyucu, cihaz için hazırlanmış bilgisayar programı kullanılarak programlandı. Beyin AChE enzim aktivite tayini 405 nm dalga boyunda yapıldı. Spektrofotometrik okuma işlemi kinetik analiz için 1 dakika süre ile yapıldı. Okuma işlemi esnasında örnekler için bir inkübasyon süresi kullanılmazken, analiz amacı ile 37 °C inkübatör sıcaklığı seçildi. Standart eğri lineer olarak elde edildi.

Mikropate okuyucunun programlanmasını takiben, 100 ml 0.1 M Trizma tamponu (pH: 8.0) (Sigma Corp., USA, no:T-4753) hazırlanarak alüminyum folyo ile sarılmış olan erlen içerisinde, 37°C'lik su banyosuna konuldu. Daha sonra *Microtus* beyin AChE enzimi standart eğrisinin hazırlanması için, VCB'nin %20, 40, 60, 80 ve 100'lük dilasyonları kullanılarak, standart eğri elde edildi (Şekil 2.2). Bunun için 96 çukurlu, düz tabanlı mikropate plaklarına 10 µl beyin doku homojenatı ya da 10 µl kör solusyonu (% 0.85 NaCl) pipetlendi. Daha sonra aynı çukurlara 160 µl 37°C 'a ısıtılmış Trizma tamponu eklendi ve mikropate plak kısa bir inkübasyon periyodu için mikropate okuyucuya yerleştirildi. Bunu takiben, plak mikropate okuyucudan alınmaksızın her çukura 10 µl 0.0417 M'lık Asetilkoliniodid (ACTI) (Sigma Corp., USA no:A-5751) pipetlendi ve plak yeniden 1 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda mikropate plak yerinden alınmadan süratle aynı çukurlara 0.00404 M'lık 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Aldrich Chem. Corp., USA no:01112LY)'nin Trizma tamponu içerisinde hazırlanmış çözeltisi (DTNB + NaHCO<sub>3</sub> + Trizma tamponu) çukurlara pipetlendi ve 1 dakika süre ile



Korelasyon Katsayısı: 0.967



Şekil 2.2. *Microtus canicaudus* için beyin asetilkolinesteraz enzimi standart eğrisi

spektrofotometrik okuma yapıldı. Elde edilen AChE standart eğrisi örneklerdeki enzim aktivitesini saptamak için kullanıldı.

İkinci aşamada, aynı işlemler sırası ile tekrar edilerek, VCB ve BWB örnekleri için AChE aktivite tayini yapıldı. Ancak bu amaçla kullanılan homojenatlar seyreltilmedi. Üçüncü aşamada ise anlatılan tüm işlemler deney hayvanlarından alınan beyin doku homojenatları için uygulandı ve sonuç olarak her örnek için, kullanılan bilgisayar programı yardımı ile, AChE aktivitesi mOD/dakika olarak saptandı. Daha sonra ise aşağıdaki formül kullanılarak beyin AChE aktivitesi U/L olarak hesaplandı.

$$\begin{aligned} & \text{(A/dakika) (0.300) (10 )} \\ \text{Beyin AChE Aktivitesi (U/L)} &= \frac{\text{(A/dakika) (0.300) (10 )}}{\text{(13.6x10 ) (1) (0.010) (10)}} \\ &= \text{(mOD/dakika) (2.206) (1.5)} \end{aligned}$$

A : 1 dakikada oluşan absorbans değişimi

0.300 : toplam hacim (ml)

(10 ) : mol'ü  $\mu\text{mol}$ 'e dönüştürme sabitesi

13.6 x 10 : DTNB için extinction coefficient

1 : ışık yolu (cm)

0.010 : kullanılan örnek hacmi (ml)

10 : mOD/dakika değerini A/dakika değerine dönüştürme sabitesi

1.5 : 1 cm'den az ışık yolu için düzeltme faktörü

### 2.6.2. Plazma laktat dehidrogenaz enziminin aktivite tayini deneyleri

Plazma LDH enziminin Guthion insektisiti ile muamele edilmiş yem ile beslenen hayvanlarda aktivitesini belirlemek amacı ile, Ekspres LDH-L reagent (CIBA-CORNING, 721429) kullanıldı. Bu yöntemde LDH aktivitesi spektrofotometrik olarak aşağıda belirtilen temel ile saptanmaktadır; LDH,  $NAD^+$  'nın  $NADH$ 'ya sürekli olarak redüklenmesi ile, laktat'ın piruvat'a oksidasyonunu katalizlemektedir (Şekil 1.3) ve reaksiyona bağlı olarak absorbans artışı 340 nm'de ölçülerek, LDH aktivitesi doğrudan doğruya saptanmaktadır (Ciba-Corning, Reagent manual, E08842).

Araştırmada, mikroplate okuyucu ile yapılan LDH aktivite tayini işlemlerinde, standart LDH eğrisinin elde edilebilmesi amacı ile multienzim (LIN-TROL) standart çözeltileri (Sigma, M2266) kullanıldı. Ayrıca gerek mikroplate okuyucunun kalibrasyonunun ve gerekse çalışmalarda kullanılan tampon ve çözeltilerin kalitesinin test edilmesi amacı ile standart değerleri bilinen QCS abnormal kontrol serum (ABN) (ciba-corning, no:9075) ve QCS normal kontrol serum (NOR) (Ciba-Corning, no:9072) kullanıldı. Böylece test edilen *Microtus canicaudus* plazma örnekleri için elde edilen sonuçların doğruluğu sağlandı.

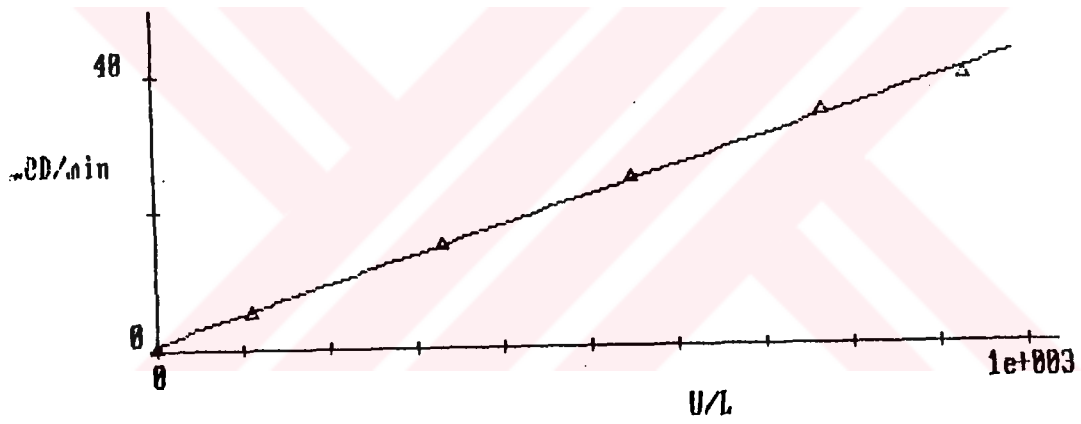
Ekspres LDH-L Reagent'in hazırlanması amacı ile karışımın bulunduğu şişelere 14 ml deiyonize su pipetlenerek, çalkalamadan karıştırıldı ve maddelerin çözünmesi sağlandı. Bu çözelti normal koşullarda oda sıcaklığında 8 saat ve  $+4^{\circ}C$  da buz dolabında ise 5 gün süre ile kararlılığını korumaktadır (Dominguez vd., 1992,a). Kontrol serumlarının

hazırlanması amacı ile şişelere (QCS-NOR ya da QCS-ABN) 5 ml deiyonize su pipetlenerek liyofilize haldeki serumların çözünmesi sağlandı ve şişeler deney süresince buz kabı içerisinde tutuldu. Multienzim (LIN-TROL) şişelerine 3 ml deiyonize su pipetlenerek hazırlandı ve daha sonra % 0.85 lik NaCl çözeltisi kullanılarak, standart eğri eldesi amacı ile % 10, 30, 50, 70 ve 85'lik seyreltileri hazırlanıp kullanıldı.

LDH aktivite tayini amacı ile mikroplate okuyucu ve bilgisayar programı kullanıldı. Spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi 340 nm'de, kinetik analiz ile 1 dakika süreyle okundu. Ancak okuma işlemi öncesinde örnekler 90 saniye süre ile cihazda 30°C'da inkübe edildi.

LDH enzim aktivite tayini çalışmalarında ilk olarak, 96-çukurlu mikroplate okuyucu plaklarına 5 µl standart (LIN-TROL) dilüsyonları (% 0-85) ve kör olarak da % 0.85 NaCl çözeltisi pipetlendi. Daha sonra aynı çukurlara 100 µl LDH reagent pipetlenerek, mikroplate plaka derhal mikroplate okuyucuya yerleştirildi ve LDH standart eğrisi elde edildi (Şekil 2.3). Bu işlem her deney günü yinelenerek, yeni bir standart eğri hazırlandı. Bu eğri örnek plazmaların çalışılması için kullanıldı. Daha sonraki aşamada aynı işlemler QCS-ABN ve NOR serumlarının ve dolayısı ile cihaz kalibrasyonu ve çözelti kalitesinin test edilmesi için yinelenildi. Bu işlemi takiben ise plazma örneklerinin analizine geçildi. Plazma örneklerinde LDH enzim aktivite tayini için örnekler 1/5 oranında, % 0.85 NaCl çözeltisi kullanılarak seyreltildi ve mikroplate okuyucu ile 340 nm de okunan optik dansite değerleri doğrudan doğruya bilgisayar programı aracılığı ile değerlendirilerek, LDH aktivitesi bir litre plazmada ünite değeri ile saptandı.

Korelasyon Katsayısı: 0.999



Şekil 2.3. *Microtus canicaudus* plazma laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri

### 2.6.3. Plazma kreatin fosfokinaz aktivitesinin tayini

Plazma CK aktivitesinin tayini için CK reagent (Sigma no: 47-20) kullanıldı. Çözeltinin hazırlanması amacı ile şişelere 20 ml deiyonize su pipetlendi ve madde çalkalamadan yavaşça karıştırılarak çözüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında (18-26°C) 16 saat ve +4°C'da buzdolabında ise 30 gün süre ile kararlılığını korumaktadır (Sigma corp. Manuel). CK LIN-TROL (Sigma, C 1773) preparasyonu için şişelere 2 ml deiyonize su pipetlendi ve karışım çalkalamadan çözülerek, buz kabı içerisinde deney süresince korundu. CK çalışmalarının hemen öncesinde, bu stok çözeltiden %30, 50, 70 ve 90'luk seyreltiler % 0.85'lik NaCl çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Bu seyreltiler mikroplate okuyucuda plazma örneklerinde CK aktivitesini saptanmada standart eğrinin eldesi amacı ile kullanıldı. Mikroplate okuyucu ile yapılan bu deneylerde her yeni deney günü için yeni bir standart eğri hazırlandı.

Gerek mikroplate okuyucu sistemin kalibrasyonunun ve gerekse hazırlanan reagent'ların doğruluğunu test etmek amacı ile CPK-1 kontrol serum (Sigma), Accutrol normal kontrol serum (QSN) (Sigma, no:A2034) ve Accutrol abnormal kontrol serum (QSA) (Sigma, no:A3034) kullanıldı. Bunlardan CPK-1 şişesine 1 ml deiyonize su, QSN VE QSA şişelerine ise 5'er ml deiyonize su pipetlenerek çözünmeleri sağlandı ve bu kontrol serumları günlük olarak hazırlanıp, deneyler süresince buz kabı içinde tutuldu. Bu işlemlerin ardından, mikroplate okuyucunun programlanmasına geçildi. Spektrofotometrik analiz kinetik olarak 340 nm dalga boyunda yapıldı. Örnekler cihazda 3 dakika süre ile 30° C'da

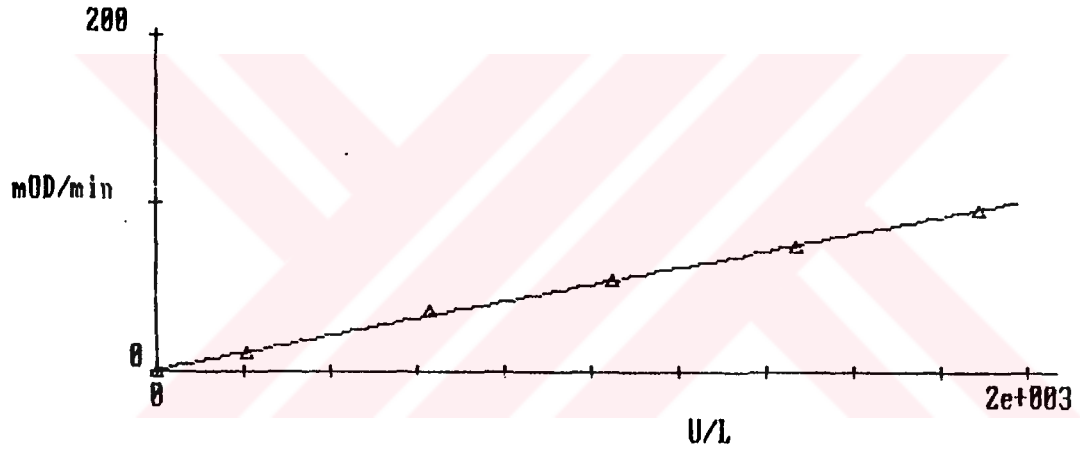
inkübe edildikten sonra, 2 dakika süre ile enzim aktivitesi okundu. Deneyde kullanılacak standart eğri lineer olarak elde edildi. Okuma sırasında mikroplate plak otomatik olarak çalkalanarak, örneklerin karışması sağlandı.

Cihazın programlanmasını takiben, ilk olarak 96 çukurlu mikroplate plaklarına önceden seyreltileri hazırlanan standartlar (% 0-90) 5  $\mu$ l pipetlendi ve kör olarak ise % 0.85'lik NaCl çözeltisi kullanıldı. Daha sonra çukurlara 250  $\mu$ l CK reagent süratle pipetlenerek, mikroplate plak mikroplate okuyucuya yerleştirildi ve standart eğri elde edildi (Sekil 2.4). İkinci aşamada ise kontrol serumları CK-1, QSN ve QSA pipetlenerek (herbiri 5  $\mu$ l) okuma işlemi tekrarlandı. Kontrol serumları ile deney koşullarının doğruluğu saptandıktan sonra, *Microtus* plazma örneklerinin daha önceden 1/5 oranında hazırlanmış seyreltileri temiz plak çukuruna 5  $\mu$ l pipetlendi. Aynı plaklara daha sonra süratle 250  $\mu$ l CK reagent pipetlenerek, mikroplate okuyucu ile okuma yapıldı. Bu işlem sonucunda bilgisayar programı (SOFTmax, Molecular Devices Corp, USA) ile doğrudan doğruya daha önce elde edilen standart eğri değerleri kullanılarak, CK enzim aktivitesi her örnek için ayrı ayrı U/L değeri ile saptandı.

#### 2.6.4. Plazma izositrat dehidrogenaz aktivitesinin tayini

Guthion insektisiti ile muamele edilmiş yem ile beslenen *Microtus canicaudus*'ta plazma ICDH enzim aktivitesi

Korelasyon Katsayısı: 0.999



Şekil 2.4. *Microtus canicaudus* plazma kreatin kinaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri



nin saptanması amacı ile Sigma Corp. (USA) tarafından geliştirilen diagnostik yöntem (Sigma, 153-UV) kullandı. Bu yöntem de diğer uygulanan enzim aktivite tayin yöntemleri gibi mikropate okuyucu için modifiye edildi.

Çalışmalarda kullanılan Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat (NADP) (Sigma, 240-301) normal koşullarda 20°C' da derin dondurucuda muhafaza edildi. NADP çözeltisi deneyden hemen önce şişe içine 1.5 ml deiyonize su pipetle nerek hazırlandı ve 30°C' da su banyosu içerisine konuldu. İzositrat substratı (Sigma, 176-1) ve Manganez klorit (MnCl<sub>2</sub>) (Sigma, 150-2A) çözelti halinde üretilmektedir ve deney anına kadar buzdolabında +4°C' da muhafaza edildi. Deneylerde plazma örneklerindeki enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılacak olan standart eğrilerin hazırlanması için, deneylerde kullandığımız yöntem ile sağlıklı, normal laboratuvar koşullarında barındırılan ergin hayvanlardan alınan kan örneklerinden elde ettiğimiz normal *Microtus canicaudus* plazma (VCP) kullanıldı. VCP, %10, 50 ve 70 konsantrasyonlarında % 0.85 NaCl çözeltisi kullanılarak seyreltildi. Tüm hazırlıkların tamamlanmasından sonra, mikropate okuyucunun programlanması işlemine geçildi. Standart eğrinin hazırlanması için kinetik analiz uygulanırken, serum ve plazma örneklerindeki okuma için ham okuma seçildi. Spektrofotometrik ICDH aktivite tayini 340 nm dalga boyunda 5 dakikalık okuma ile yapıldı. Bu süreden önce örnekler mikropate okuyucu içinde 30°C'da 3 dakika inkübe edildi. Standart eğri lineer olarak elde edildi.

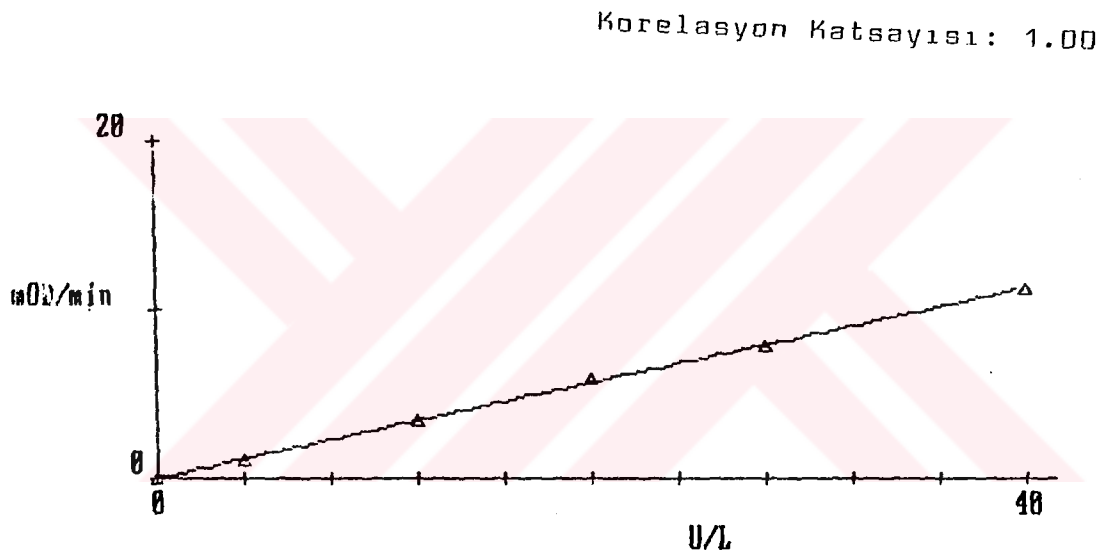
Bilgisayar programlama işleminden sonra, 96 çukurlu (düz tabanlı) mikropate plaklar kullanılarak, standart eğri için kullanılacak çukurlara sırası ile 24 µl izosit

rat substratı, 2  $\mu$ l MnCl<sub>2</sub> ve 10  $\mu$ l % 0-70 seyreltilmiş VCP ya da kör olarak % 0.85 NaCl çözeltisi pipetlendi. Mikroplate plak okuyucuya yerleştirildi ve 30 saniye süre ile çalkalama pozisyonunda karıştırıldı. Mikroplate okuyucu içerisinde 5 dakika süre ile bekletilerek pipetlenmiş olan substratın 30°C'da inkübasyonu ve cihazın kendini kalibre etmesi sağlandı. Daha sonra plak cihazdan alınarak, çukurlara süratle 24  $\mu$ l NADP pipetlendi ve cihaza yerleştirilen plakta okuma yapılarak, ICDH standart eğrisi elde edildi (Şekil 2.5). Daha sonraki aşamada, temiz çukurlar kullanılarak, dilue edilmemiş *Microtus* plazma örneklerinde enzim aktivitesinin tayini amacı ile aynı işlemler tekrarlandı. Mikroplate okuyucu ile örneklerin optik dansite değerleri mOD/dakika olarak elde edildi.

Bu işlemten sonra, standart çarpan değeri (3.353) hesaplandı. Kullanılan plaklarda her çukur için ışık yolu 1 cm den az olduğu için ikinci bir standart değer (1.5) kullanıldı. Bu değerlerin örneklerin spektrofotometrik okunması ile elde edilen mOD/dakika değeri ile çarpımı sonucu ICDH enzim aktivitesi her örnek için ayrı ayrı U/L değeri ile saptandı.

#### 2.6.5. Plazma kreatinin konsantrasyonunun tayini için deneyler

*Microtus canicaudus* 'da Guthion insektisitine bağlı olarak ortaya çıkabilecek olan plazma kreatinin konsant



Şekil 2.5. *Microtus canicaudus* plazma izositrat dehidrogenaz enzim aktivitesi tayini için standart eğri

rasyon değişikliklerini belirlemek amacı ile Sigma Corp. (USA) tarafından geliştirilen diagnostik yöntem kullanıldı (Sigma, no: 555). Bu yöntem mikropate okuyucu için modifiye edildi.

Bu tayin yönteminde, kreatinin alkalın pikrat çözeltisi ile reaksiyon verdiğinde turuncu-sarı renkli bir ortam oluşmaktadır. Ancak reaksiyon ile oluşan bu renk değişimi kreatinin için özgül değildir. Ortamda bulunan bir kısım kan plazma içeriği de alkalın pikrat çözeltisinin ortama eklenmesi ile aynı renk reaksiyonunu vermektedir. Bununla beraber, asidik koşullarda bu renkli çözeltideki kreatinin reaksiyonundan kaynaklanan renk maddesi öncelikle tahrip olmaktadır. Bundan dolayı ortama asit eklenmeden önceki ve sonraki absorbans 500 nm civarında ölçüldüğünde, bu iki değerin birbirinden çıkarılması ile, [(başlangıç OD) - (sonuç OD)], ortamdaki kreatinin konsantrasyonu saptanabilmektedir (Tietz, 1987).

*Microtus* plazma kreatinin konsantrasyonunun saptanması amacı ile, yöntemde aşığıda belirtilen reagent ve çözeltiler kullanıldı:

- Kreatinin renk reagent (CCR) (%0.6 pikrik asit ve sodyum borat içermektedir) (Sigma, no: 555-1),
- 1 N sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma, no:930-65),
- Asit reagent (Sigma, no: 555-2),
- Kreatinin standart stok çözeltisi (3.0 mg/dl ve 15.0 mg/dl), (Sigma, no:925-3 ve 925-15),
- Accutrol normal kontrol serum (QSN) (Sigma, no: A 2034)
- Accutrol abnormal kontrol serum (QSA) (Sigma, no: A 3034)
- *Microtus* normal kontrol plazma (VCP)

Çalışmalarda kullanılan NaOH, asit reagent, CCR ve

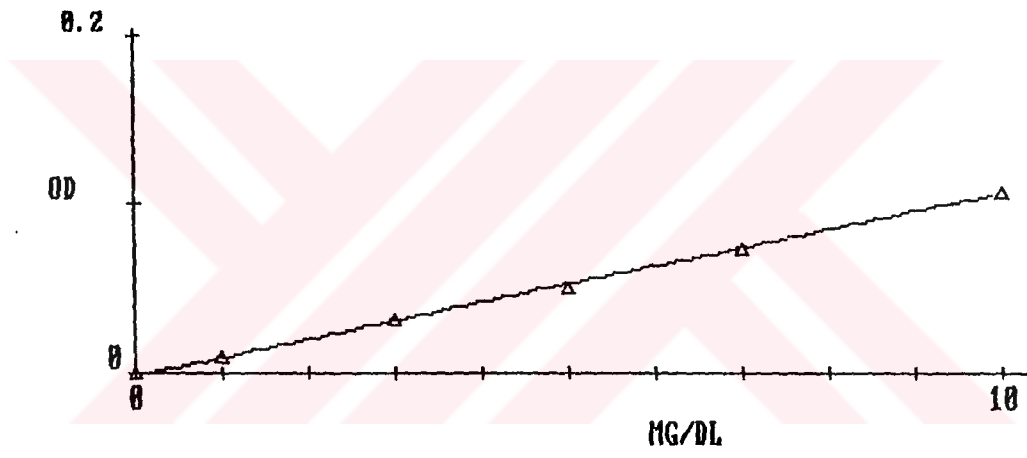
alkalin pikrat normal koşullarda oda sıcaklığında saklanmaktadır. CCR, 18°C 'ın altında sıcaklıkta jelsi bir yapıda olduğundan, çalışmalar öncesi 30°C'da ısıtılarak iyice çalkalandı. Kreatinin standart solusyonlar ise normalde +4°C' da buz dolabında stoklanmaktadır. Deneyler sırasında bu stoklardan % 0.85'lik NaCl çözeltisi kullanılarak 1, 3, 5, 7 ve 10 mg/dl seyreltiler hazırlandı. Alkalin pikrat solusyonu 5 kısım CCR ve 1 kısım NaCl karıştırılarak, deneysel aşama öncesinde taze olarak hazırlandı. QSN ve QSA kontrol serumlar daha önceki yöntemlerde anlatıldığı şekilde hazırlandı. VCP ise daha önce anlatıldığı gibi, sağlıklı ve deneye alınmamış hayvanların kanı kullanılarak elde edildi ve normal plazma kreatinin değerinin saptanması amacı ile kullanıldı.

Tüm kullanılacak maddelerin hazırlanmasından sonra, mikroplate okuyucunun kullanılabilmesi amacı ile cihazın programlanması işlemine geçildi. Spektrofotometrik analiz ile okuma 490 nm dalga boyunda endpoint olarak yapıldı. Çalışmada kullanılan standart eğri lineer olarak elde edildi ve ölçümler 30°C'da yapıldı.

Bu işlemlerden sonra 96 çukurlu düz tabanlı mikroplate plakları kullanılarak, önceden 1/5 oranında dilue edilmiş standartlar (0 - 10 mg/dl) ya da kör olarak da % 0.85 NaCl çözeltisinden 5 µl çukurlara pipetlendi. Daha sonra her çukura 50 µl alkalin pikrat çözeltisi eklendi ve karışım mikroplate okuyucuda 30 saniye için karıştırıldı. Okuyucudan alınan plak oda sıcaklığında 10 dakika süre ile inkübe edildi ve bu süre sonunda mikroplate okuyucuda plak okunarak standart eğri elde edildi (Sekil 2.6).

Daha sonra temiz plak çukurlarına 5 µl kontrol serumlar QSN, QSA, kör (% 0.85 NaCl) ya da 1/5 seyreltilmiş VCP

Korelasyon Katsayısı: 1.00



Şekil 2.6. *Microtus canicaudus* plazma kreatinin konsantrasyonu tayini için standart eğri

pipetlenerek standart eğri eldesi için yapılan işlemler yinelenildi. Ancak 10 dakikalık inkübasyondan sonraki spektrofotometrik okuma ile elde edilen OD değeri başlangıç OD olarak kaydedildi. Bundan sonra çukurlara 2  $\mu$ l asit reagent süratle pipetlendi ve 5 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda ikinci kez mikroplate okuyucuya yerleştirilen plakta okuma tekrarlandı. Bu okuma ile elde edilen OD ise sonuç değeri olarak kaydedildi. Değerlerin birbirinden çıkarılması ile kreatinin konsantrasyonu hesaplandı. Böylece cihazın kalibrasyonunun ve hazırlanan çözeltilerin doğruluğu test edildi. Aynı işlemler daha sonra plazma örnekleri için yinelenildi. Sonuçta plazma örneklerindeki kreatinin konsantrasyonu mg/dl olarak saptandı.

#### 2.6.6. Plazma kan üre nitrojeni (BUN) konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan deneyler

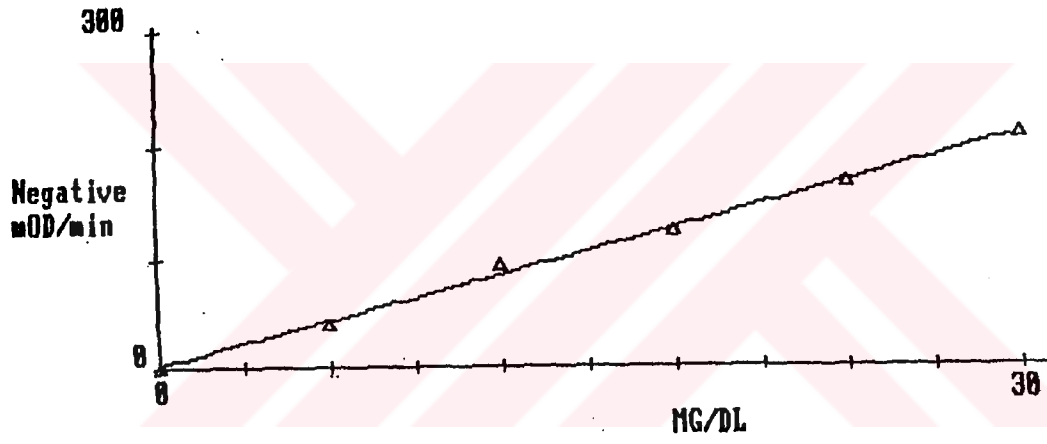
Üreaz enzimi ürenin amonyak ve karbondioksit'e hidrolizini katalizlemektedir. Glutamat dehidrogenaz'ın, reaksiyon ürünü olarak glutamat oluşumunu katalizlemesi ile ortamda bulunan amonyak NADH varlığında, 2-oxoglutarat ile bağlanmaktadır. Sonuçta NADH oksidasyonuna bağlı olarak 340 nm dalga boyundaki bir absorbans azalışı kan üre nitrojeninin örnekteki konsantrasyonunun doğrudan doğruya mikroplate okuyucu ile ve SOFTmax programı kullanılarak saptanmasına olanak vermektedir (Dominguez vd., 1992,b).

Bu araştırmada, Ciba-Corning Express BUN belirleme yöntemi mikropate okuyucu için modifiye edilerek kullanıldı. Bu amaçla Express BUN reagent (Ciba-Corning, no: E31542) kullanıldı. Reagent madde üzerine 14 ml deiyonize su pipetlenerek hazırlandı. Bu zelti +4°C da buzdolabında 30 gün süre ile kararlılığını korumaktadır. Plazma BUN konsantrasyonunun saptanmasında kullanılacak standart eğri, BUN/Glukoz standart stok çözeltisi (30 mg/dl) (Ciba-Corning, no:E31542) kullanılarak hazırlandı. Bunun için %20, 40, 60 ve 80'lik standart seyreltiler kullanıldı. Mikropate okuyucunun kalibrasyonunun ve hazırlanan çözeltilerin kalitesinin test edilmesi amacı ile normal kontrol serum (QCN) (Ciba-Corning no: 9702) ve abnormal kontrol serum (QCA) (Ciba-Corning, no:9705) kullanıldı. Kontrol serumlarının hazırlanmasında daha önceki yöntemlerde açıklanan yol izlendi. Tüm reagent ve çözeltilerin hazırlanmasını takiben, mikropate okuyucunun programlanması aşamasına geçildi. BUN spektrofotomerik analizi için 340 nm dalga boyu kullanıldı. Miktar tayini amacı ile 45 saniye süre ile 30°C'da okuma yapıldı. Standart eğri lineer olarak hazırlandı.

Daha sonra örneklerin analizi amacı ile, ilk olarak standart eğri hazırlanması işlemine geçildi. 96 çukurlu düz tabanlı mikropate plakları kullanılarak standart eğri için kullanılacak çukurlara 5 µl kr (deiyonize su) ya da daha önceden seyreltileri hazırlanmış (% 0-80) BUN/Glukoz standartları pipetlendi. BUN reaksiyonunun substratın bulunduğu ortamlarda çok hızlı olması nedeni ile, çok hızlı olarak çukurlara 250 µl reagent pipetlendi ve plak derhal okuyucuya yerleştirildi. Böylece BUN standart eğrisi elde edildi (şekil. 2.7). Aynı işlemler daha sonra zeltilerin



Korelasyon Katsayısı: 0.998



Şekil 2.7. *Microtus canicaudus* plazma kan üre nitrojeni tayini için standart eğri

doğruluğu ya da cihazın kalibrasyonunun saptanması için kontrol serumları QCN ve QCA ile tekrarlandı. Ardından *Microtus* plazma örnekleri için okuma yapıldı ve bilgisayar programı (SOFTmax) aracılığı ile örneklerdeki BUN konsantrasyonu mg/dl olarak saptandı.

## 2.7. Matematiksel ve İstatistik Analizler

Araştırmada elde edilen tüm kalitatif ve kantitatif deney sonuçları Apple Machintosh kişisel bilgisayar (Brain Power Inc., USA) kullanılarak, Stat View 512+ istatistik programı ile test edildi. Bu amaçla varyans analizi (ANOVA) ile Fisher'in "Korunmuş En az Önemlilik (PLSD) Testi" kullanıldı. Sonuçlar kontrol grubu hayvanlardan gelen veriler ile karşılaştırılarak, istatistiksel hata oranlarının önemli farklılığa neden olup olmadığı saptandı ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ ). Deneysel çalışma sonuçlarına göre, test gruplarından elde edilen veriler genel test grubu ortalaması ve dişi ya da erkek hayvanlar için elde edilen veriler olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Tüm ortalama değerler ( $\pm$ ) standart hata değerleri hesaplanarak, grafik ya da tablolarda gösterildi (Peterson, 1985). Ortalama matematiksel değerlerin ya da P istatistiksel değerlerinin hesaplanması amacı ile de aynı bilgisayar programı kullanıldı. Elde edilen verilerin grafiklerinin hazırlanmasında Cricket Grafik Programı kullanıldı.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada deneye alınan hayvanlar deney başlangıcında 2 temel gruba ayrılmış ve araştırma için sonuçlar ayrı ayrı değerlendirilmiştir. "LC" ve "DS" test gruplarından gelen sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

#### 3.1. Deneye Alınan Hayvanların Genel Durumları

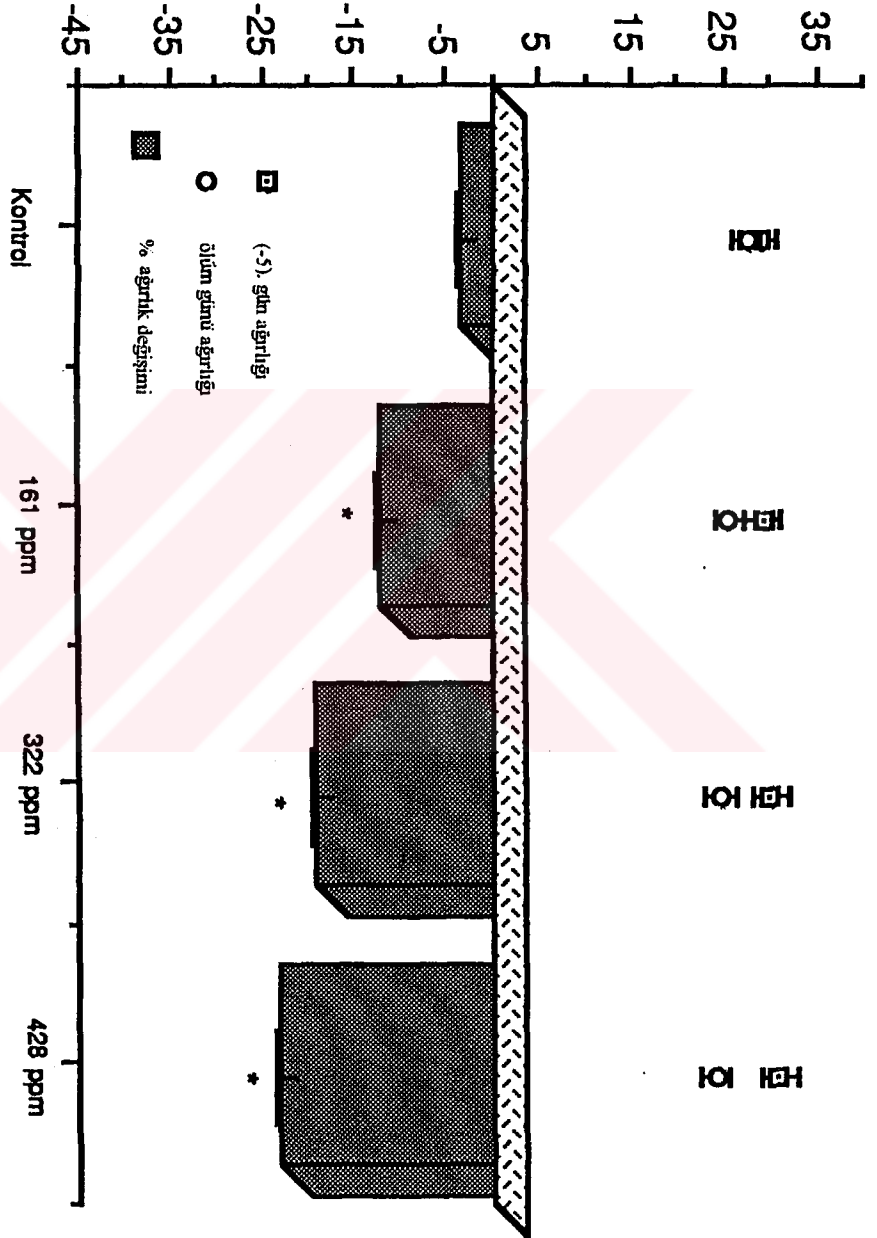
Deneye alınan 60 adet "DS" test grubu *Microtus canicaudus*'dan 16 tanesi 9 günlük deney periyodu süresinde kendiliğinden öldü. Bu hayvanların deney gruplarına göre dağılımına bakıldığında, 1 tanesinin (1 ♀) kontrol grubu (%6.6), 2 hayvanın (2 ♂) 161 ppm uygulama dozu (%13.4), 8 hayvanın (5 ♂, 3 ♀) 322 ppm doz grubu (%53.3) ve 5 hayvanın da (4 ♂, 1 ♀) 428 ppm uygulama grubundan (%33.4) olduğu saptandı. Bundan başka 428 ppm uygulama grubundan 1 erkek fare ölüm halinde (morbid) iken disseksiyona alındı ve kendiliğinden ölüm olarak kabul edildi. Guthion insektisi-ti ile muamele edilmiş yem uygulanan hayvanlarda ilk ölüm insektisit uygulamasını takip eden günde (1. gün) saptandı ve aynı gün 161 ppm ve 322 ppm uygulama gruplarından birer hayvanın ölümü kaydedildi. Bundan sonraki seri halde hay

van ölümleri 3. deney gününde başladı. En çok denek ölümünün olduğu gün 322 ppm uygulaması için 6. deney günü (3 *Microtus*) ve 7. gün (4 *Microtus*) olarak kaydedilirken, 5. deney gününde de 428 ppm uygulama grubundan 4 hayvanın ölümü saptandı.

Diğer taraftan, "LC" test grubu için deneye alınan toplam 40 adet hayvandan 12 tanesinin Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenmeye başladıktan sonraki çeşitli günlerde ölümleri kayıt edildi. 161 ppm uygulaması için 6 ve 11.günlerde, 322 ppm için 1, 5, 7 ve 9. günlerde birer hayvan ölümü kaydedilirken, 428 ppm uygulamasında da 5., 6. ve 7. günlerde 2 şer hayvan ölü olarak bulundu. Ayrıca çeşitli günlerde kan alma işlemini takiben kaydedilen hayvan ölümleri ayrı olarak not edildi. Bu hayvanlardan 2 tanesi (1 ♂, 1 ♀) 161 ppm, 4 tanesi (1 ♂, 3 ♀) 322 ppm ve 6 tanesi (2 ♂, 4 ♀) de 428 ppm uygulama gruplarına aitti. Bunun yanı sıra "LC" test grubu hayvanlardan, her iki günde bir olan kan alma işlemlerini takiben de 5-60. dakikalık periyot içerisinde çeşitli doz gruplarından 15 hayvanın ölümü saptandı ve bu hayvan ölümlerinin insektisit uygulaması yanı sıra, kan alınması sırasında ortaya çıkabilecek muhtemel stress etkisi ile de olabileceği göz önüne alınarak, bu ölümler ayrı olarak kaydedildi.

Deneyler süresince hayvanların vücut ağırlık değişimleri gerek "DS" ve gerekse de "LC" test grupları için ayrı ayrı saptandı. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 sırası ile "DS" ve "LC" deney grupları için deney periyotlarına bağlı olarak, hayvanlarda toplam vücut ağırlıkları ve vücut ağırlığı değişim yüzdesini göstermektedir. "DS" test grubu hayvanlar için genel vücut ağırlığı değişiminin %3.54 - %23.37 ( $\pm 2.16$ ) oranında olduğu saptandı. Dişi ya da erkek hayvan

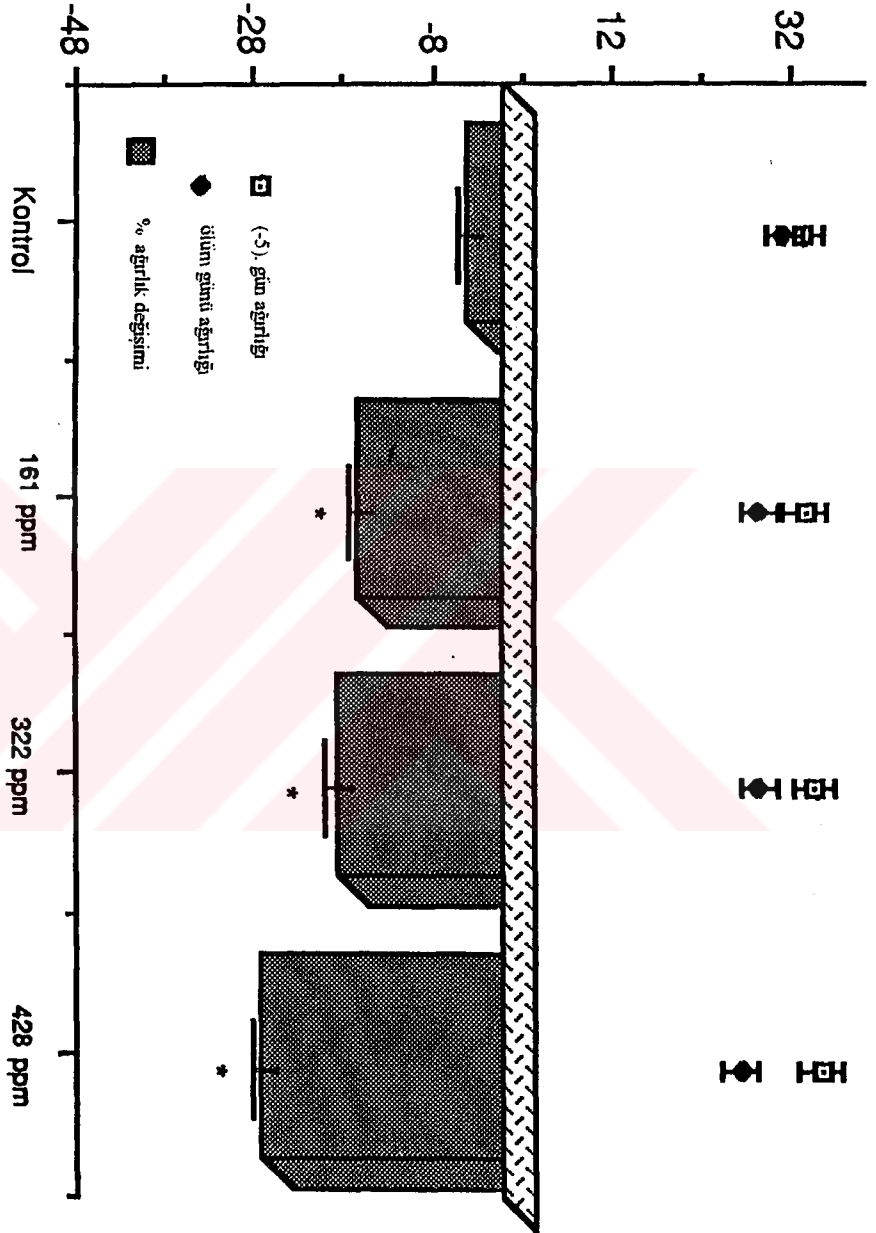
## Ağırlık Değişimi (%) / Vücut Ağırlığı (gr)



Şekil 3.1.a. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" testi grubu *M. Canicaudus* 'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların

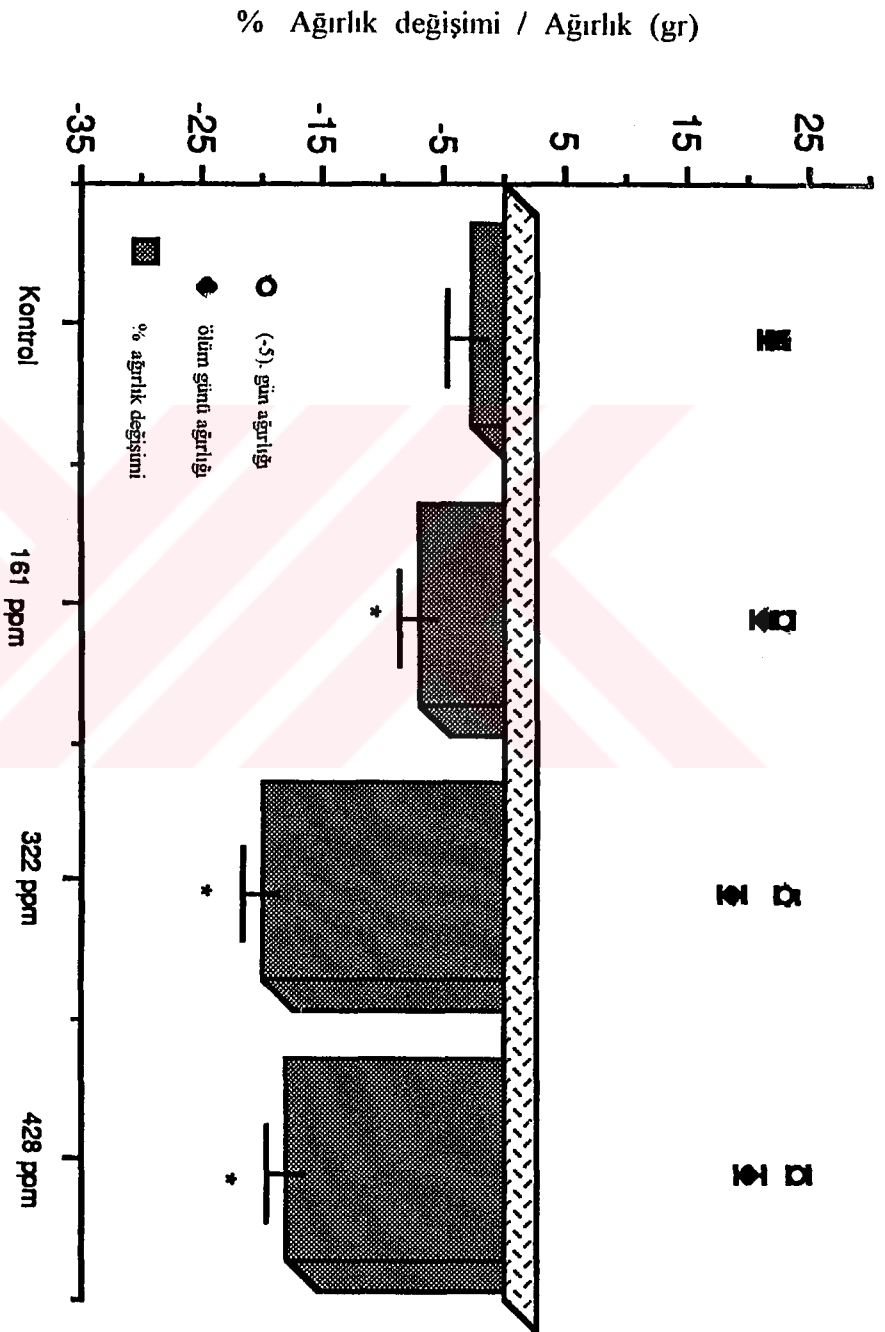
ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\* $P < 0.05$ ).

## Ağırlık Değişimi (%) / Vücut Ağırlığı (gr)

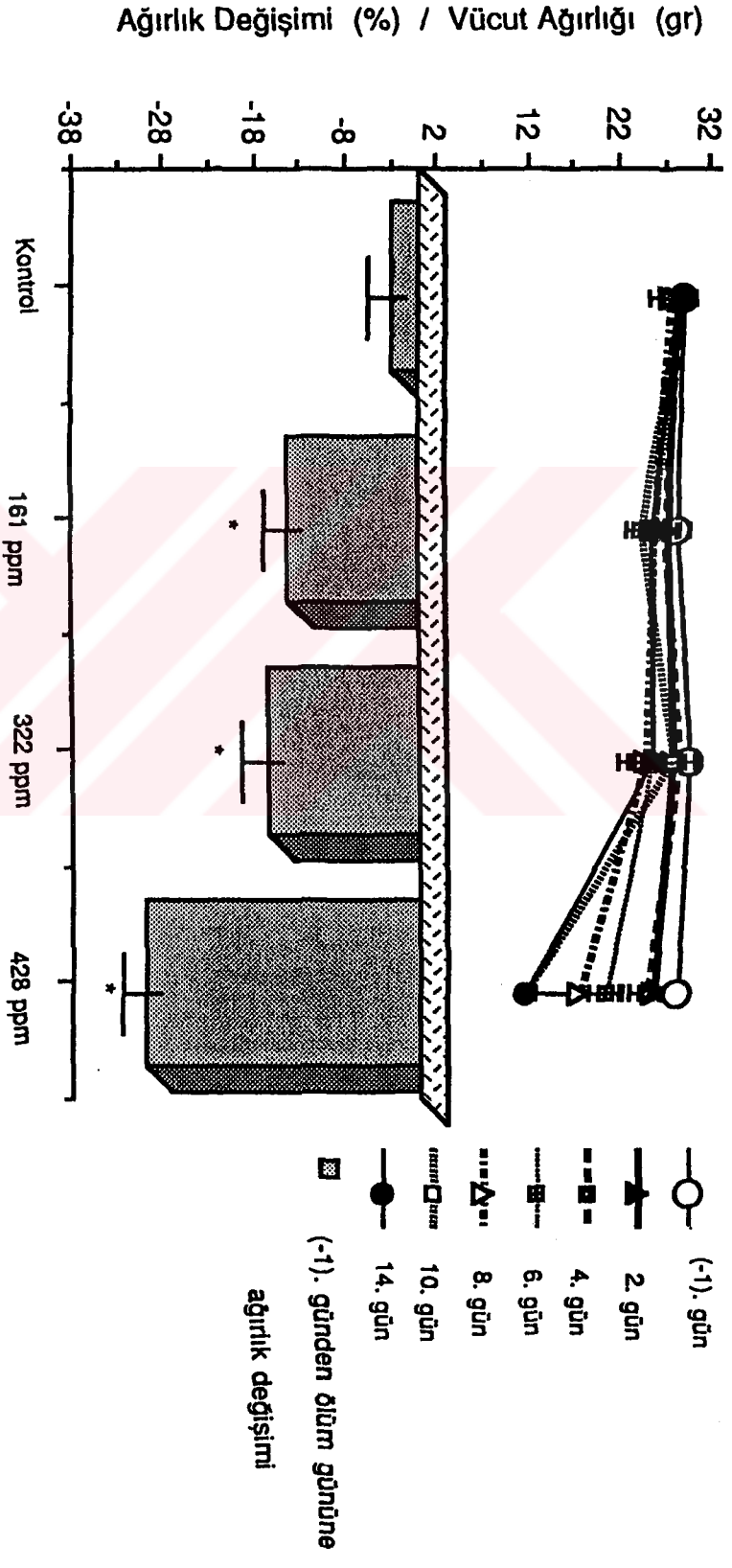


Şekil 3.1.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu erkek

*M. Canicaudus*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\* $P < 0.05$ ).



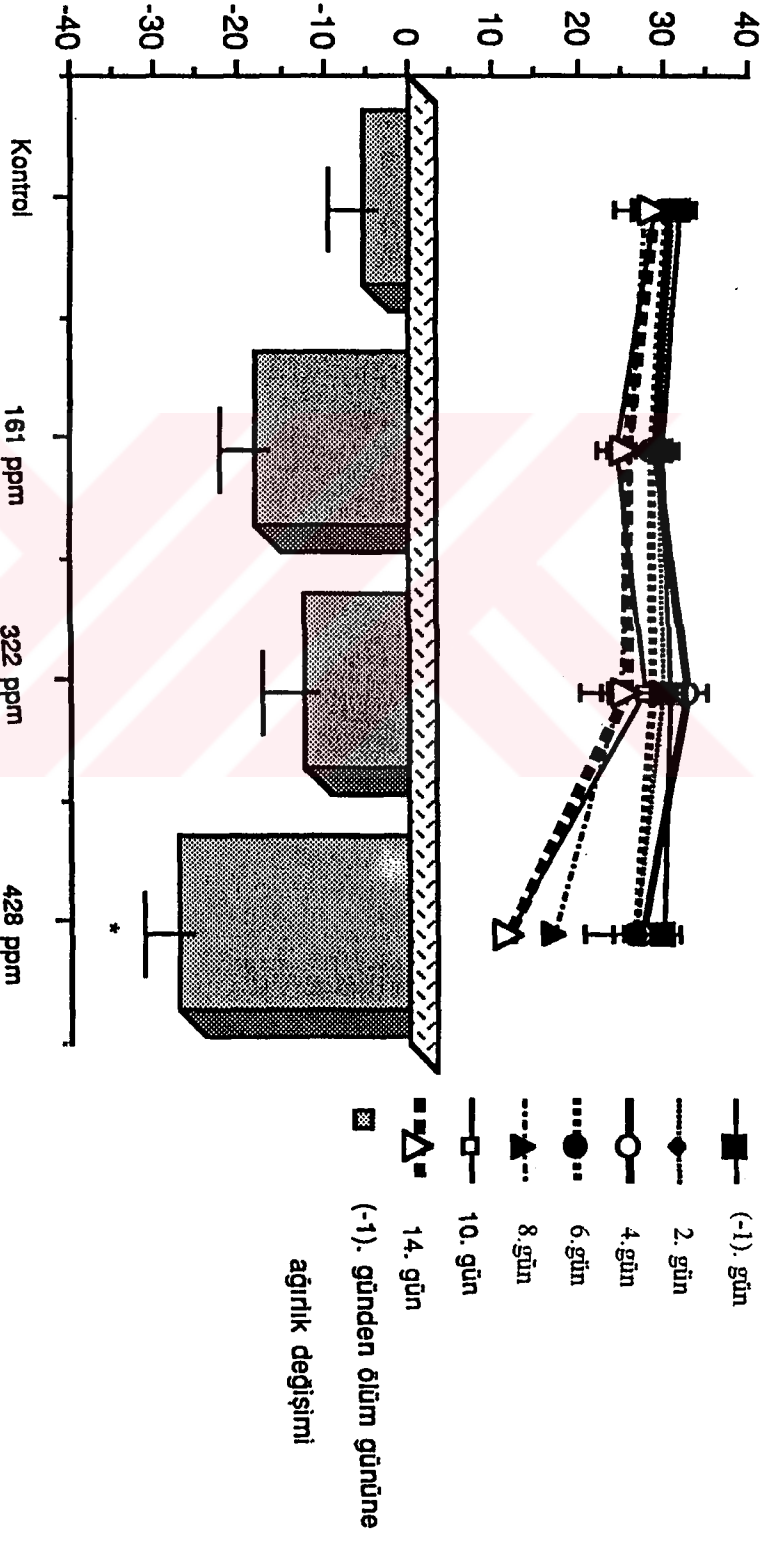
Şekil 3.1.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak "DS" test grubu dişi *M. canicaudus* 'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\*P < 0.05).



Şekil 3.2.a. Gurthion uygulamasına bağlı olarak "LC" test grubu *M. canicoides*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\*P < 0.05).

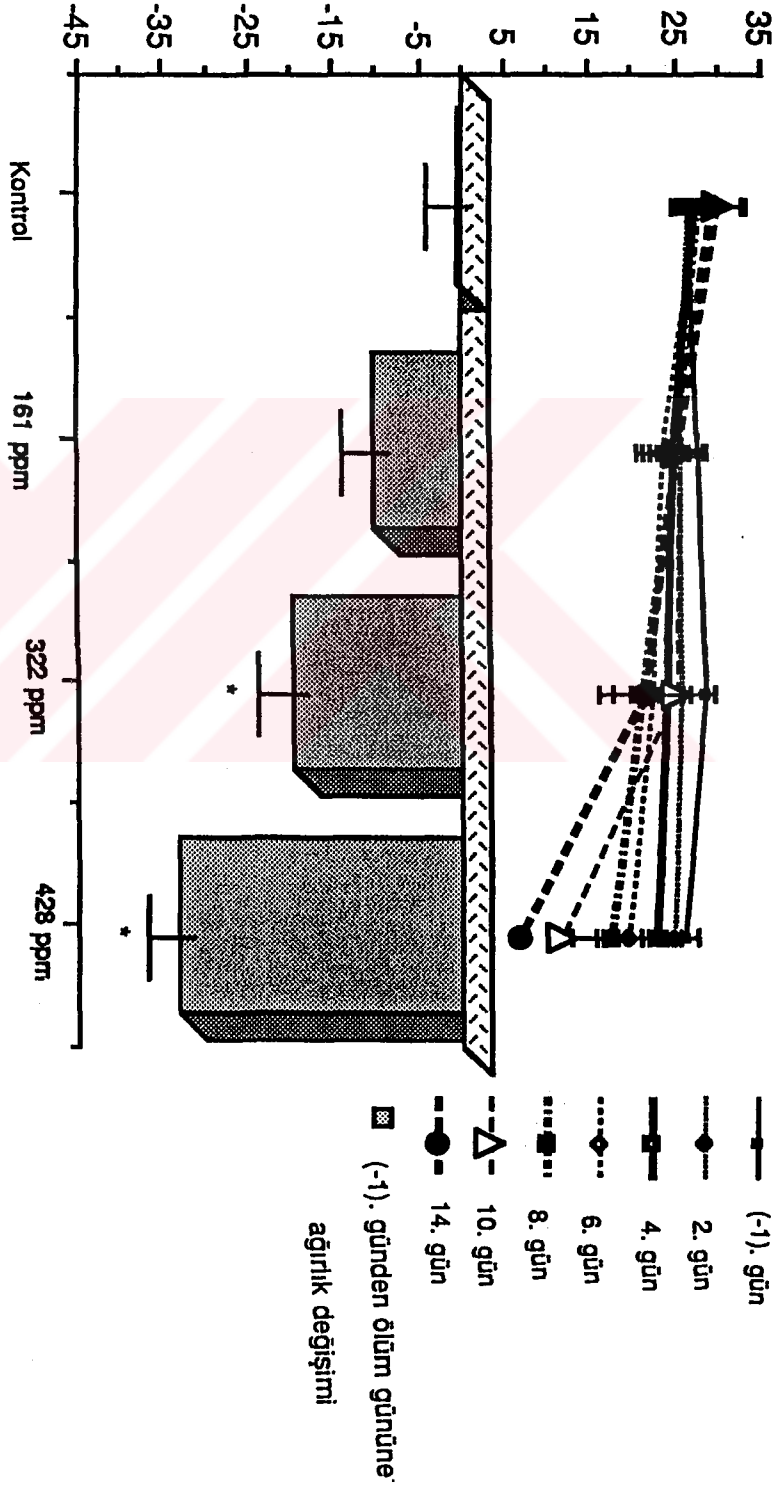


## Ağırlık Değişimi (%) / Vücut Ağırlığı (gr)



Şekil 3.2.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak "LC" testi grubu erkek *M. Canicaudus*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\*P < 0.05).

## Ağırlık Değişimi (%) / Vücut Ağırlığı (gr)



Şekil 3.2.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak "LC" test grubu dışı *M. canicaudus*'da deney başlangıç günü (-5. gün) ve hayvanların ölüm günü ya da disseksiyon gününde kaydedilen ortalama vücut ağırlıkları ile bu periyotlar arasında vücut ağırlığı değişim yüzdesi (\* $P < 0.05$ ).

lar için ayrı ayrı yapılan hesaplamalar da benzer sonuçları ortaya koydu. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre ise, insektisit uygulanmış yem ile beslenen hayvanlar ile kontrol grubu hayvanlar arasında farklılık önemli düzeyde bulundu ( $P \leq 0.05$ ).

"LC" test grubu hayvanlar için yapılan veri analizi sonuçlarına göre, hayvanlarda vücut ağırlığı (-1). günden başlayarak, her iki günde bir kaydedildi ve (-1). günden ölüm gününe kadar geçen süredeki vücut ağırlık değişim yüzdesi hesaplandı. Sonuçlara göre "LC" test grubu hayvanlarda insektisit uygulamasına bağlı olarak vücut ağırlığının kontrol grubu hayvanlarda %2.93 ( $\pm 3.92$ ), 161 ppm uygulama grubunda %14.21 ( $\pm 3.92$ ), 322 ppm doz grubunda %16.58 ( $\pm 4.13$ ) ve 428 ppm uygulama grubunda da %30.10 ( $\pm 3.92$ ) oranında deneyin başlangıç gününe oranla bir azalma gösterdiği kaydedildi. İstatistiksel analiz sonuçlarında da Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenen hayvanların vücut ağırlığı değişimi oranının kontrol grubu deneklerine göre önemli farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) saptandı. Buna karşın hayvanlar eşeylerine göre istatistiksel analize tabi tutulduklarında, erkek bireylerde vücut ağırlığı değişiminin yalnız 428 ppm uygulama grubunda ve dişilerde de 322 ppm ve 428 ppm uygulama gruplarında kontrol hayvanlardan önemli farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) belirlendi.

Deneye alınan hayvanların toplam ve günlük ortalama besin ve su tüketimleri hayvanların deney koşullarına alındıkları günden itibaren kaydedilerek izlendi (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2). Toplam ve günlük besin ya da su tüketimi hayvanların insektisit uygulanmamış besin ile besledikleri dönemde [(-5).günden (-1).güne kadar] gerek "DS"

Tablo 3.1. Disseksiyon test grubu *Microtus canicollis* 'ın Guthion etkisine bağlı olarak besin ve su tüketimi (\*P < 0.05).

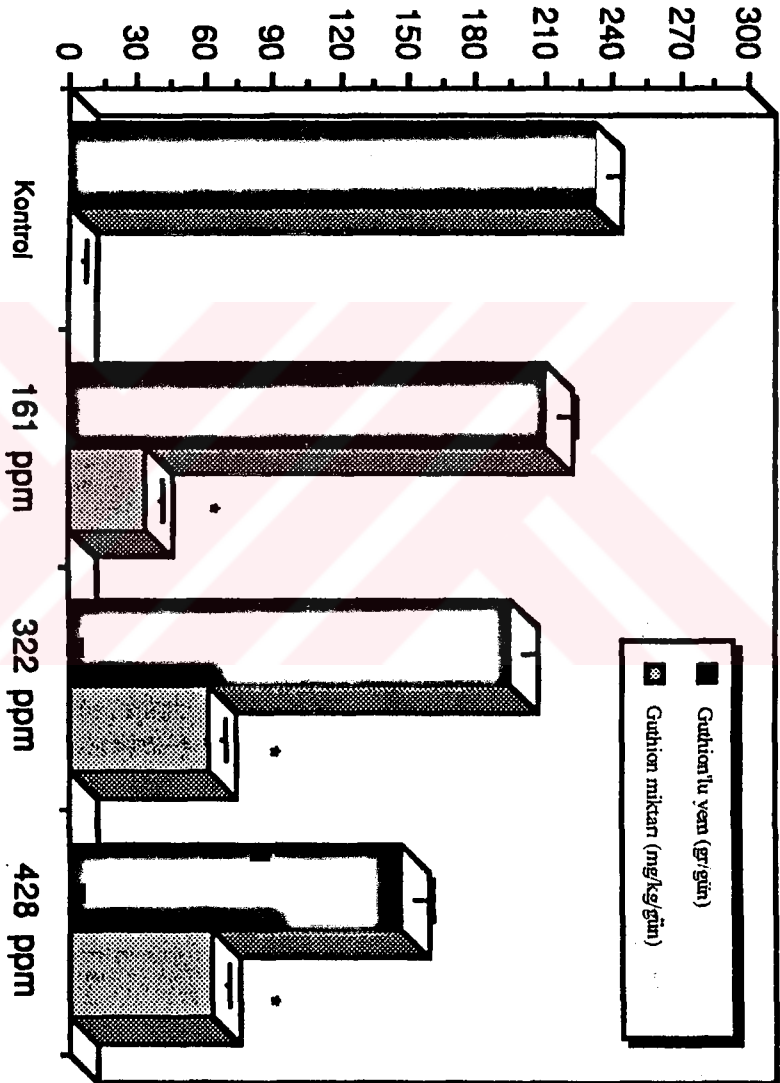
Uygulama dozu (ppm)	Esey	n	T. insektisiz yem (gr)	T. insektisizli yem (gr)	T. su tüketimi (ml)	insektisiz yem (gr/gün)	insektisizli yem (gr/gün)	su tüketimi (ml/gün)
Kontrol	E + D erkek	15	34.52 (±1.95)	45.16 (±4.51)	214.1 (±20.1)	6.90 (±0.39)	5.74 (±0.50)	17.64 (±1.55)
	Dışı	9	37.84 (±3.95)	48.86 (±6.20)	218.4 (±30.6)	7.56 (±0.39)	5.91 (±0.68)	17.57 (±5.81)
161 ppm	E + D erkek	6	29.53 (±3.64)	39.60 (±6.75)	207.7 (±23.3)	5.90 (±0.72)	5.48 (±0.78)	17.74 (±1.62)
	Dışı	9	33.44 (±3.95)	29.62 (±6.20)*	180.2 (±30.6)	6.68 (±0.39)	5.19 (±0.68)	15.47 (±5.81)
322 ppm	E + D erkek	6	36.67 (±1.95)	31.44 (±4.51)*	185.1 (±20.1)	6.93 (±0.39)	4.83 (±0.50)	15.02 (±1.55)
	Dışı	9	36.51 (±3.64)	34.16 (±6.75)	192.4 (±23.3)	7.30 (±0.72)	4.29 (±0.78)	14.34 (±1.62)
428 ppm	E + D erkek	6	36.66 (±1.95)	25.30 (±4.51)*	165.0 (±20.1)	7.33 (±0.39)	4.06 (±0.50)*	14.92 (±1.55)
	Dışı	9	38.97 (±3.95)	25.81 (±6.20)*	160.7 (±30.6)	7.79 (±0.39)	4.06 (±0.68)	14.84 (±5.81)
428 ppm	E + D erkek	6	33.20 (±3.64)	24.55 (±6.75)	171.6 (±23.3)	6.64 (±0.72)	4.07 (±0.78)	15.04 (±1.62)
	Dışı	9	36.99 (±1.95)	18.59 (±4.51)*	127.3 (±20.1)*	7.39 (±0.39)	3.06 (±0.55)*	11.63 (±1.55)*
428 ppm	E + D erkek	9	38.74 (±3.95)	16.00 (±6.20)*	113.1 (±30.6)	7.74 (±0.39)	2.81 (±0.68)*	10.43 (±5.81)
	Dışı	6	34.36 (±3.64)	22.48 (±6.75)	148.7 (±23.3)	6.87 (±0.72)	3.43 (±0.78)	13.42 (±1.62)

Tablo 3.2. Letal konsantrasyon test grubu *Microtus canicaudus* 'ın Guthion etkisine bağlı olarak besin ve su tüketimi (\*P < 0.05).

Uygulama dozu (ppm)	Esey	n	T. insektisiz yem (gr)	n	T. insektisiti yem (gr)	n	T. su tüketimi (ml)	n	insektisiz yem (gr/gün)	n	insektisiti yem (gr/gün)	n	su tüketimi (ml/gün)
Kontrol	E+D	10	34.53 (±2.40)	10	69.75 (±10.1)	10	271.9 (±29.3)	10	6.90 (±0.48)	10	6.29 (±0.56)	10	16.51 (±1.34)
	entek	5	36.48 (±2.59)	5	70.72 (±17.3)	5	283.0 (±73.0)	5	7.29 (±0.51)	5	6.67 (±1.06)	5	16.47 (±3.04)
	dişi	5	32.58 (±3.77)	5	68.78 (±19.9)	5	260.8 (±39.3)	5	6.51 (±0.75)	5	5.91 (±0.79)	5	16.56 (±0.66)
161 ppm	E+D	10	35.00 (±2.40)	9	69.10 (±10.7)	10	260.3 (±29.3)	10	7.00 (±0.48)	9	5.96 (±0.59)	10	17.52 (±1.34)
	entek	5	36.58 (±3.24)	5	68.92 (±17.2)	5	321.1 (±44.6)	5	7.31 (±0.65)	5	5.57 (±0.76)	5	19.08 (±0.90)
	dişi	5	33.42 (±4.78)	4	69.32 (±22.7)	5	199.4 (±39.8)	5	6.68 (±0.95)	4	6.44 (±1.23)	5	15.96 (±1.86)
322 ppm	E+D	10	34.30 (±2.40)	9	34.43 (±10.7)*	9	199.1 (±30.9)	10	6.86 (±0.48)	9	4.20 (±0.59)*	9	16.53 (±1.41)
	entek	5	36.18 (±1.97)	4	42.40 (±22.4)	4	182.7 (±24.7)	5	7.23 (±0.39)	4	4.29 (±1.07)	4	14.76 (±2.61)
	dişi	5	32.42 (±2.36)	5	28.06 (±10.2)	5	212.3 (±41.4)	5	6.48 (±0.47)	5	4.13 (±0.72)	5	17.96 (±2.28)
428 ppm	E+D	10	34.12 (±2.40)	10	18.19 (±10.1)*	10	186.4 (±29.3)	10	6.82 (±0.48)	10	2.60 (±0.56)*	10	15.76 (±1.34)
	entek	5	39.20 (±4.47)	5	15.96 (±5.45)	5	214.2 (±10.2)	5	7.84 (±0.89)	5	2.63 (±0.82)*	5	19.11 (±0.56)
	dişi	5	29.04 (±1.48)	5	20.42 (±2.73)	5	158.6 (±2.95)	5	5.80 (±0.29)	5	2.58 (±0.26)*	5	12.41 (±0.22)

ve gerekse "LC" test gruplarında farklılık göstermedi. Diğer taraftan "DS" test grubu hayvanlarda toplam ve günlük Guthion insektisiti uygulanmış yem tüketimi incelendiğinde, her üç doz grubunda da genel ortalama ve erkek hayvanlarda besin tüketiminin kontrol gruplarına göre istatistiksel farklılık gösterdiği saptandı ( $P \leq 0.05$ ) (Tablo 3.1). Hayvanların günlük ortalama maruz kaldıkları insektisit miktarı normalize edilerek hesaplandığında ise, maruz kalınan insektisit miktarınının 322 ppm ve 428 ppm uygulamalarında birbirine benzer oranlarda olduğu, buna karşın her üç uygulama dozunun da kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.0001$ ) saptandı (Şekil 3.3). "DS" test grubunda günlük insektisit uygulanmış ortalama besin tüketimi kontrol grubu için 0.232 kg/kg/gün iken, bu miktar 161 ppm için 0.211 kg/kg/gün, 322 ppm için 0.194 kg/kg/gün ve 428 ppm için de 0.147 kg/kg/gün olarak hesaplandı. Buna karşın uygulama grupları için hayvanların maruz kaldıkları insektisit miktarı 161 ppm uygulamasında 33.97 mg/kg/gün, 322 ppm uygulamasında 62.31 mg/kg/gün ve 428 ppm uygulamasında da 63.14 mg/kg/gün olarak hesaplandı.

"LC" test grubu hayvanlar için elde edilen veri sonuçlarına göre de toplam ve günlük Guthion insektisiti uygulanmış yem tüketimi 322 ppm ve 428 ppm uygulama dozları için kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık gösterdi ( $P \leq 0.05$ ) (Tablo 3.2). Bu grupta normalize edilmiş hesaplamalara göre, kontrol hayvanları günlük ortalama 0.233 kg/kg/gün yem tükettiler. Buna karşın insektisit uygulanmış yem tüketimi 161 ppm grubunda 0.250 kg/kg/gün, 322 ppm uygulamasında 0.184 kg/kg/gün ve 428 ppm uygulamasında da 0.120 kg/kg/gün olarak saptandı. Bu verilere gö



Şekil 3.3. Disseksiyon test grubu hayvanlar için günlük ortalama Guthion insektisiti uygulanmış besin tüketimi ve besin tüketimine bağlı olarak hayvanların maruz kaldıkları insektisit miktarları (değerler normalize edilerek hesaplanmıştır) (\* $P < 0.0001$ ).

re, günlük maruz kalınan insektisit miktarı 161 ppm dozu için 40.33 mg/kg/gün, 322 ppm için 59.48 mg/kg/gün ve 428 ppm için de 51.60 mg/kg/gün olarak hesap edildi. Vücut ağırlığına oranla hayvanların günlük maruz kaldıkları insektisit miktarının ise her üç uygulama dozunda da kontrol hayvanlara göre istatistiksel farklılık gösterdiği saptandı (Şekil 3.4).

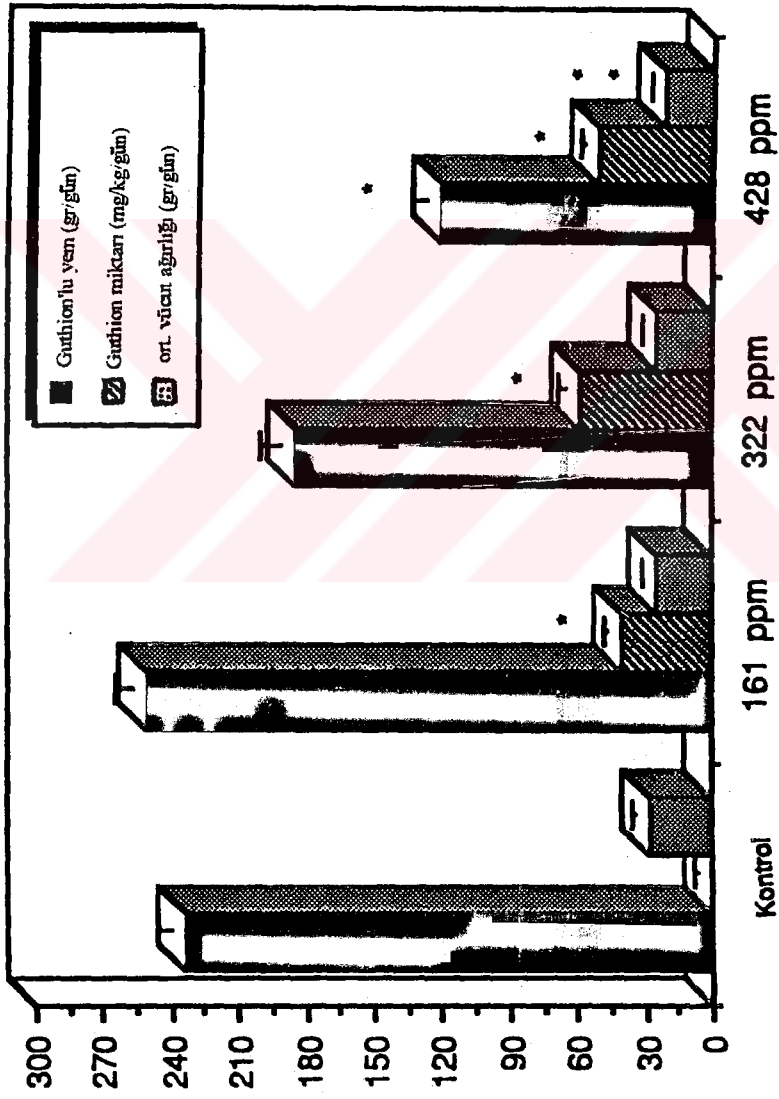
"DS" ve "LC" test grupları için saptanan toplam ve günlük su tüketimi verilerine göre ise "DS" test grubunun yalnızca 428 ppm uygulama dozunda istatistiksel farklılık bulunurken ( $P \leq 0.05$ ), "LC" test grubu için gruplar arasında bir farklılık saptanmadı (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2).

### 3.2. Kan Fizyolojisi İle İlgili Biyobelirteçler

Akyuvar (lökosit) hücre farklılaşması oranları ve hematokrit değerleri Guthion insektisiti ile muamele edilmiş yem ile beslenen "DS" ve "LC" test grubu hayvanlarda fizyolojik biyobelirteçler olarak saptandı.

"DS" test grubu hayvanların disseksiyonu öncesinde alınan kan örneklerinde hematokrit değerlerinin ölçülmesi sonucunda kontrol grubu hayvanlar için hematokrit değeri ortalama %57.7 olarak bulunurken, 3. gün , 7. gün ya da 9. günde hayvanlardan alınan kan örneklerinde hematokrit değerinin %56.4-58.8 oranında olduğu saptandı. 161 ppm, 322 ppm ve 428 ppm uygulama grubu hayvanlarda da hematokrit





Şekil 3.4. Letal konsantrasyon test grubu hayvanlar için günlük ortalama Guthion insektisiti uygulanmış besin tüketimi ve besin tüketimine bağlı olarak hayvanların maruz kaldıkları insektisit miktarları (değerler normalize edilerek hesaplanmıştır) (\*P < 0.001; \*\*P < 0.05).

değerlerinin kontrol grubu hayvanlardan elde edilen sonuçlara benzer olduğu bulundu (Tablo 3.3). İstatistiksel analiz sonuçlarına göre de gruplar arasında farklılık bulunmadı.

Diğer taraftan "LC" test grubu hayvanlarda da hematokrit değerleri kan alma günlerinde hayvanlardan toplanan örneklerde ayrı ayrı ölçüldü (Tablo 3.4). Bu test grubu için saptanan ortalama hematokrit değerleri kontrol ve uygulama grubu hayvanlarda (-1). günde % 54.2-50.3, 2. günde % 49.0-44.2, 4. günde % 48.2-41.0, 6. günde % 45.0-38.0, 8.günde % 46.0-38.3, 10.günde % 48.7-41.0 ve 14. günde de % 61.5-49.0 oranlarında bulundu. İstatistiksel analiz sonuçlarında gruplar arasında farklılık önemli düzeyde bulunmadı.

Sürme kan frotisi ile hazırlanan kan preparatlarında saptanan ortalama akyuvar farklılaşması sonuçları "DS" test grubu için Tablo 3.5'de verilmiştir. Nötrofil oranı kontrol grubu hayvanlar için günlere bağlı olarak % 28.7-21.2 olarak bulunurken, 161 ppm uygulama grubunda bu oran % 33.5-18.1, 322 ppm uygulama grubunda % 37.7-23.1 ve 428 ppm uygulama grubunda da %27.3 olarak saptandı. İstatistik analiz sonuçlarında ise, günlere bağlı olarak, gruplar arasında farklılık bulunmadı. Lenfosit oranı kontrol grubunda günlere bağlı olarak % 73.2-65.5 değerleri arasında değişirken, uygulama gruplarında % 77.5-54.1 arasında saptandı. Lenfosit oranı bakımından da gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmedi. Monosit oranı kontrol grubu hayvanlarda % 2.9-1.5 olarak saptandı. Buna karşın uygulama grupları için bu oran % 4.32-1.87 olarak tesbit edildi. İstatistiksel analizlerde monosit oranı bakımından 322 ppm uygulama grubunda 3. günde erkek ve dişi hayvanlar genel

Tablo 3.3. Disseksiyon test grubu hayvanlarda günlere bağlı olarak ortalama hematokrit değerleri

Uygulama dozu (ppm)	Esey	n	Ortalama Hematokrit (%)		3.Gün		7.Gün		9.Gün	
			n	Hematokrit (%)	n	Hematokrit (%)	n	Hematokrit (%)	n	Hematokrit (%)
Kontrol	erkek + dişi	14	57.7 (±1.30)	5	58.8 (±2.65)	4	58.0 (±1.74)	5	56.4 (±1.80)	
	erkek	9	58.3 (±1.23)	3	60.3 (±1.74)	3	58.6 (±2.69)	3	56.0 (±3.00)	
	dişi	5	56.6 (±2.72)	2	56.5 (±5.80)	1	56.0 (±0.50)	2	57.0 (±3.25)	
161 ppm	erkek + dişi	13	55.6 (±1.35)	5	54.0 (±2.65)	5	54.4 (±1.56)	3	60.3 (±2.33)	
	erkek	7	58.0 (±1.40)	3	59.0 (±1.74)	3	56.3 (±2.69)	1	60.0 (±5.19)	
	dişi	6	52.8 (±2.48)	2	46.5 (±5.80)	2	51.5 (±0.35)	2	60.5 (±4.60)	
322 ppm	erkek + dişi	7	59.1 (±1.84)	5	59.0 (±2.65)	2	59.5 (±2.46)	0	-	
	erkek	4	58.5 (±1.85)	3	58.0 (±1.74)	1	60.0 (±4.67)	0	-	
	dişi	3	60.0 (±3.51)	2	60.5 (±5.80)	1	59.0 (±0.50)	0	-	
428 ppm	erkek + dişi	8	59.1 (±1.72)	5	58.0 (±2.65)	3	61.0 (±2.01)	0	-	
	erkek	4	58.2 (±1.85)	3	57.3 (±1.74)	1	61.0 (±4.67)	0	-	
	dişi	4	60.0 (±3.04)	2	59.0 (±5.80)	2	61.0 (±0.35)	0	-	

ANOVA varyans analizi sonuçlarına göre gruplar arası fark istatistiksel olarak önemsizdir (  $P \geq 0.05$ ).

**Tablo 3.4. Letal konsantrasyon testi grubu hayvanlarda kan alma günlerine bağlı olarak ortalama hematokrit değerleri**

Uygulama dozu (ppm)	Esey	Gün (-1) n	Hematokrit (%)	Gün 2 n	Hematokrit (%)	Gün 4 n	Hematokrit (%)	Gün 6 n	Hematokrit (%)	Gün 8 n	Hematokrit (%)	Gün 10 n	Hematokrit (%)	Gün 14 n	Hematokrit (%)
Kontrol	E + D	10	52.7 (±1.39)	9	47.1 (±1.28)	9	46.7 (±1.96)	8	44.2 (±1.79)	7	41.1 (±1.59)	5	42.6 (±1.50)	5	56.5 (±2.61)
	erkek dişi	5 5	53.7 (±2.20) 53.4 (±1.85)	5 4	48.2 (±1.87) 47.4 (±1.88)	5 4	47.7 (±2.66) 43.7 (±2.68)	4 4	44.5 (±1.94) 44.0 (±3.43)	3 4	38.3 (±2.12) 43.2 (±2.48)	3 2	42.3 (±1.95) 43.0 (±3.16)	3 2	61.5 (±3.95) 51.5 (±1.27)
161 ppm	E + D	10	52.5 (±1.47)	9	47.6 (±0.85)	9	43.2 (±2.08)	6	46.1 (±2.05)	6	42.0 (±1.72)	6	47.8 (±1.37)	4	54.0 (±2.16)
	erkek dişi	5 5	52.6 (±2.20) 52.5 (±2.07)	5 4	47.8 (±1.87) 47.5 (±2.11)	5 4	43.8 (±2.66) 42.3 (±3.09)	4 2	46.7 (±1.94) 45.0 (±4.21)	4 2	41.7 (±1.83) 42.5 (±3.51)	4 2	48.7 (±1.89) 46.0 (±3.16)	2 2	55.0 (±3.95) 53.0 (±1.27)
322 ppm	E + D	10	52.5 (±1.67)	8	46.5 (±1.49)	7	43.5 (±2.94)	4	40.2 (±2.30)	3	46.0 (±2.44)	2	42.5 (±2.37)	2	52.0 (±3.69)
	erkek dişi	5 5	54.2 (±2.46) 50.3 (±2.39)	4 4	49.0 (±2.42) 44.7 (±2.11)	3 4	42.5 (±4.20) 44.5 (±3.79)	2 2	38.5 (±2.75) 42.0 (±4.21)	1 2	46.0 (±3.67) 46.0 (±5.51)	1 1	44.0 (±3.38) 41.0 (±4.47)	1 1	55.0 (±5.59) 49.0 (±1.80)
428 ppm	E + D	10	52.4 (±1.39)	10	44.7 (±1.28)	9	44.2 (±1.95)	4	39.7 (±2.30)	1	39.0 (±4.23)	0	-	0	-
	erkek dişi	5 5	52.0 (±1.87) 52.8 (±1.85)	5 5	45.2 (±1.87) 44.2 (±1.88)	4 5	48.2 (±2.97) 41.0 (±2.39)	1 3	44.0 (±3.89) 38.0 (±3.43)	0 1	- 39.0 (±4.96)	0 1	- 39.0 (±4.96)	0 1	- 39.0 (±4.96)

ANOVA varyans analizi sonuçlarına göre gruplar arasındaki fark önemsizdir ( $P \geq 0.05$ ). Tablodaki E:erkek ve D: dişi eşeyi ifade etmektedir. E+D her iki eşey ortalamasının göstermektedir.

Tablo 3.5. Disseksiyon test grubu *M. canicaudus* 'da Guthion etkisine bağlı olarak akyuvar farklılaşma yüzdesi (\*P < 0.05).

Uygulama dozu (ppm)	Esey	gün	n	Nütrofil (%)	Lentosit (%)	Monosit (%)	Eosinofil (%)	Basofil (%)
kontrol	erkek ve dişi	3	5	21.2 (±5.94)	73.2 (±5.60)	1.50 (±0.50)	3.50 (±1.57)	0.50 (±0.29)
		7	5	23.7 (±3.67)	70.2 (±3.67)	2.90 (±0.77)	2.90 (±0.57)	0.30 (±0.17)
		9	5	28.7 (±3.75)	65.5 (±4.75)	1.80 (±0.18)	3.10 (±1.09)	0.90 (±0.37)
	erkek	3	3	14.5 (±7.98)	81.2 (±6.56)	1.83 (±0.71)	2.00 (±2.34)	0.33 (±0.29)
		7	3	27.1 (±3.02)	66.5 (±3.26)	2.83 (±1.06)	3.16 (±0.78)	0.33 (±0.24)
		9	3	31.1 (±2.77)	62.0 (±4.85)	1.66 (±0.16)	4.33 (±1.64)	0.83 (±0.60)
161 ppm	dişi	3	2	31.2 (±11.3)	61.2 (±11.4)	1.00 (±0.52)	5.57 (±1.74)	0.75 (±0.53)
		7	2	18.5 (±7.08)	75.7 (±7.08)	3.00 (±1.25)	2.50 (±0.97)	2.50 (±0.12)
		9	2	25.0 (±6.12)	70.7 (±6.12)	2.00 (±0.35)	1.25 (±0.17)	1.00 (±0.70)
	erkek ve dişi	3	5	33.5 (±5.94)	58.5 (±5.6)	1.90 (±0.50)	5.70 (±1.57)	0.60 (±0.29)
		7	5	22.9 (±3.67)	72.4 (±3.76)	2.50 (±0.77)	1.96 (±0.57)	0.24 (±0.17)
		9	3	18.1 (±4.84)	77.5 (±6.13)	2.16 (±0.23)	1.66 (±1.41)	0.00 (±0.48)
322 ppm	erkek	3	3	34.3 (±7.98)	57.0 (±6.56)	2.16 (±0.71)	6.33 (±2.34)	0.50 (±0.29)
		7	3	18.8 (±3.02)	76.3 (±3.26)	3.00 (±1.06)	1.43 (±0.78)	0.40 (±0.24)
		9	1	29.0 (±4.80)	63.5 (±3.41)	2.50 (±0.28)	4.00 (±2.84)	0.00 (±1.04)
	dişi	3	2	32.2 (±11.3)	60.7 (±11.4)	1.50 (±0.52)	4.75 (±1.74)	0.75 (±0.53)
		7	2	29.0 (±7.08)	66.5 (±7.08)	1.75 (±1.25)	2.75 (±0.97)	0.00 (±0.12)
		9	2	12.7 (±6.12)	84.5 (±6.12)	2.00 (±0.35)	0.50 (±0.17)	0.00 (±0.70)
322 ppm	erkek ve dişi	3	4	37.7 (±6.65)	54.1 (±6.27)	4.32 (±0.56)*	2.77 (±1.76)	0.75 (±0.33)
		7	3	23.1 (±4.74)	71.3 (±4.85)	3.16 (±0.99)	2.00 (±0.74)	0.33 (±0.23)
		9	0	-	-	-	-	-
	erkek	3	3	37.6 (±7.98)	55.5 (±6.56)	3.76 (±0.71)	2.27 (±2.34)	0.33 (±0.29)
		7	2	26.2 (±3.02)	68.0 (±4.00)	4.00 (±1.31)	1.75 (±0.69)	0.00 (±0.30)
		9	0	-	-	-	-	-
dişi	3	1	36.0 (±16.1)	50.0 (±16.1)	6.00 (±0.73)*	4.00 (±2.46)	2.00 (±0.76)	
	7	1	17.0 (±10.0)	78.0 (±10.0)	1.50 (±1.77)	2.50 (±1.38)	1.00 (±0.17)*	
	9	0	-	-	-	-	-	

Tablo 3.5. devamı

Uygulama dozu (ppm)	çeyr	gün	n	Nütrofil (%)	Lenfosit (%)	Monosit (%)	Eosinofil (%)	Basofil (%)
428 ppm	erkek ve dişi	3	4	27.3 (±6.65)	67.3 (±6.27)	1.87 (±0.56)	2.62 (±1.76)	0.75 (±0.33)
		7	3	27.3 (±4.74)	68.6 (±4.85)	2.50 (±0.99)	1.50 (±0.74)	0.00 (±0.23)
		9	0	-	-	-	-	-
	erkek	3	2	25.2 (±9.78)	67.5 (±8.03)	2.00 (±0.87)	4.75 (±2.87)	0.50 (±0.36)
		7	0	-	-	-	-	-
		9	0	-	-	-	-	-
	dişi	3	2	29.5 (±11.3)	67.2 (±11.4)	1.75 (±0.52)	0.50 (±1.74)	1.00 (±0.53)
		7	3	27.3 (±5.78)	68.6 (±5.78)	2.50 (±1.02)	1.50 (±0.79)	0.00 (±0.10)
		9	0	-	-	-	-	-

ANOVA varyans analizi ve Fisher'in en az önemlilik testi sonuçlarına göre;

\* P≤ 0,05 ve \*\* P≤0,1 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

ortalamasının ve dişi hayvanlardan gelen verilerin kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) ve bu gruplarda monosit oranında bir artış olduğu tesbit edildi. Eosinofil ve bazofil oranları bakımından, "DS" test grubunun uygulama grupları ile kontrol hayvanları arasında istatistiksel bir farklılık saptanmadı. Bu verilere göre, eosinofil oranı günlere bağlı olarak kontrol grubunda % 3.5-2.9 arasında, bazofil oranı ise % 0.9-0.3 oranlarında saptandı. Uygulama gruplarında ise eosinofil oranının % 5.7-1.66 değerleri arasında olduğu, bazofil oranı için ise değerlerin % 0.75-0.0 arasında değiştiği bulundu.

"LC" test grubu için akyuvar farklılaşma oranları Tablo 3.6'da verilmiştir. Uygulama günlerine bağlı olarak hayvanlardan alınan kan örneklerinde, kontrol grubu için nötrofil oranı % 26.9-17.3, lenfosit oranı % 77.9-67.2, monosit oranı % 4.28-3.8, ve bazofil oranı da % 0.35-0.0 olarak saptandı. Bu oranlar insektisit uygulanmış yem ile beslenen hayvanlarda nötrofil için ortalama % 49.7-14.1, lenfosit için % 83.3-51.0, monosit oranı % 2.0-0.31, eosinofil için % 5.0-0.5 ve bazofil için de % 0.66-0.0 olarak tesbit edildi. İstatistik analiz sonuçlarına göre ise, kontrol grubu hayvanlardan gelen veriler Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenen hayvanların verileri ile karşılaştırıldığında, nötrofil oranı bakımından 322 ppm uygulama grubunda 8.gün dişilerinin istatistiksel olarak önemli farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) bulundu. 428 ppm uygulama grubunda da 6. gün ve 8. gün ortalama sonuçlarının ve aynı günler için dişi hayvanlardan gelen verilerin istatistiksel olarak önemli farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ), bu hayvanların nötrofil miktarında artış olduğu saptandı. Lenfosit oranı ile ilgili verilerde de aynı

Tablo 3.6. Letal konsantrasyon test grubu *M. canicaudus*'da Guthion etkisine bağlı olarak alkyuvar farklılaşma yüzdesi (\*P < 0.05).

Uygulama dozu (ppm)	Eşey	gün	n	Nüfuzlül (%)	Leziflül (%)	Monoflül (%)	Basiflül (%)	Basiflül (%)
KONTROL	erkek+dişi	-1	10	17.3 (±3.02)	79.7 (±2.96)	0.95 (±0.23)	2.05 (±0.37)	0.05 (±0.08)
		2	9	18.9 (±5.78)	77.9 (±5.85)	0.61 (±0.15)	2.55 (±0.37)	0.05 (±0.08)
		4	9	23.8 (±4.20)	72.1 (±4.48)	1.80 (±0.23)	2.50 (±0.46)	0.18 (±0.14)
		6	8	21.1 (±3.60)	74.7 (±3.73)	0.93 (±0.26)	2.87 (±0.67)	0.25 (±0.13)
		8	7	25.9 (±3.72)	67.2 (±3.05)	2.14 (±0.37)	4.28 (±0.66)	0.35 (±0.11)
		10	5	26.9 (±8.79)	68.6 (±8.61)	1.70 (±0.48)	2.90 (±0.90)	0.00
		14	5	17.9 (±3.33)	77.7 (±3.45)	0.80 (±0.20)	3.80 (±1.03)	0.00 (±0.15)
	erkek	-1	5	16.2 (±4.94)	80.4 (±4.93)	1.00 (±0.28)	2.30 (±0.49)	0.10 (±0.12)
		2	5	20.3 (±3.36)	76.2 (±8.56)	0.60 (±0.20)	2.90 (±0.55)	0.00 (±0.10)
		4	5	25.1 (±6.05)	71.4 (±6.17)	1.10 (±0.23)	2.10 (±0.63)	0.10 (±0.12)
		6	4	26.5 (±6.40)	68.5 (±6.56)	1.00 (±0.41)	3.75 (±1.17)	0.25 (±0.22)
		8	3	36.1 (±5.84)	57.1 (±6.92)	2.66 (±0.84)	3.66 (±0.69)	0.33 (±0.23)
		10	3	25.0 (±14.1)	69.8 (±13.8)	2.00 (±0.62)	3.17 (±1.04)	0.00 (±0.11)
		14	3	17.1 (±4.40)	78.0 (±5.64)	1.16 (±0.17)	4.00 (±1.93)	0.00 (±0.23)
161 ppm	dişi	-1	5	18.4 (±3.63)	79.0 (±3.40)	0.90 (±0.37)	1.80 (±0.57)	0.00 (±0.11)
		2	4	17.2 (±8.81)	80.1 (±8.82)	0.60 (±0.20)	2.10 (±0.49)	0.10 (±0.12)
		4	4	21.3 (±6.00)	74.2 (±6.66)	1.75 (±0.36)	2.38 (±0.74)	0.25 (±0.25)
		6	4	15.8 (±3.81)	81.0 (±3.37)	0.88 (±0.40)	2.00 (±0.44)	0.25 (±0.39)
		8	4	18.2 (±1.12)	74.8 (±1.77)	1.75 (±0.19)	4.75 (±1.19)	0.37 (±0.33)
		10	2	29.7 (±7.85)	66.7 (±8.28)	1.25 (±0.75)	2.50 (±1.49)	0.00
		14	2	19.0 (±5.66)	77.2 (±4.42)	0.25 (±0.35)	3.50 (±1.06)	0.00 (±0.55)
	erkek+dişi	-1	10	18.6 (±3.02)	78.0 (±2.96)	1.30 (±0.23)	2.05 (±0.37)	0.05 (±0.08)
		2	9	21.5 (±6.13)	76.8 (±6.21)	0.62 (±0.15)	1.18 (±0.39)*	0.25 (±0.09)
		4	9	24.3 (±4.20)	72.5 (±4.48)	0.94 (±0.23)	1.66 (±0.46)	0.16 (±0.14)
		6	6	20.0 (±4.16)	74.0 (±4.31)	1.50 (±0.30)	3.91 (±0.77)	0.66 (±0.15)
		8	6	17.7 (±4.01)	75.5 (±4.37)	2.00 (±0.40)	4.41 (±0.71)	0.33 (±0.12)
		10	6	37.2 (±8.02)	56.5 (±7.86)	1.75 (±0.44)	4.16 (±0.82)	0.27 (±0.07)
		14	4	25.2 (±3.72)	68.5 (±3.86)	1.25 (±0.22)	5.00 (±1.15)	0.50 (±0.17)
dişi	erkek	-1	5	16.9 (±4.94)	80.1 (±4.93)	0.90 (±0.28)	2.00 (±0.49)	0.10 (±0.12)
		2	5	17.6 (±9.35)	79.5 (±9.75)	0.12 (±0.22)	1.75 (±0.62)	0.25 (±0.11)
		4	5	29.0 (±6.05)	67.6 (±6.17)	1.00 (±0.23)	2.00 (±0.63)	0.20 (±0.12)
		6	4	22.5 (±6.40)	70.3 (±6.56)	1.63 (±0.41)	4.75 (±1.17)	0.87 (±0.22)
		8	4	19.5 (±5.99)	74.1 (±5.99)	2.00 (±0.73)	4.00 (±0.59)	0.37 (±0.20)
		10	4	43.7 (±12.2)	50.6 (±12.0)	3.25 (±0.53)	3.25 (±0.90)	0.12 (±0.09)
		14	2	31.0 (±5.44)	63.2 (±6.91)	1.25 (±0.22)	4.00 (±2.36)	0.50 (±0.28)
	dişi	-1	5	20.3 (±3.63)	75.9 (±3.40)	1.70 (±0.37)	2.10 (±0.57)	0.00 (±0.11)
		2	4	25.3 (±8.81)	74.1 (±8.82)	0.00 (±0.20)	0.62 (±0.49)	0.25 (±0.47)
		4	4	18.6 (±6.00)	79.1 (±6.66)	0.88 (±0.36)	1.25 (±0.74)	0.12 (±0.25)
		6	2	15.0 (±3.39)	81.2 (±4.77)	1.25 (±0.56)	2.25 (±0.62)	0.25 (±0.55)
		8	2	14.2 (±2.55)	78.2 (±2.51)	2.00 (±0.27)	5.25 (±1.88)	0.25 (±0.47)
		10	2	24.2 (±7.85)	68.5 (±8.28)	0.75 (±0.75)	6.00 (±1.49)	0.50 (±0.00)
		14	2	19.5 (±5.66)	73.7 (±4.42)	1.25 (±0.35)	6.00 (±1.06)	0.50 (±0.55)



Uygulama dozu (ppm)	cinsiyet	gün	n	Nitrofil (%)	Levofit (%)	Monosit (%)	Eksofil (%)	Basofil (%)
322 ppm	etkek+dışı	-1	10	23.5 (±3.02)	74.2 (±2.96)	0.75 (±0.22)	1.95 (±0.37)	0.10 (±0.08)
		2	8	25.1 (±6.13)	73.9 (±6.21)	0.31 (±0.15)	0.50 (±0.39)*	0.06 (±0.09)
	4	5	32.2 (±5.63)	65.5 (±6.02)	0.80 (±0.31)	1.10 (±0.62)	0.40 (±0.19)	
		6	4	21.6 (±5.09)	73.6 (±5.28)	1.13 (±0.37)	3.50 (±0.94)	0.12 (±0.18)
	8	3	37.5 (±5.68)	57.0 (±6.18)	1.50 (±0.57)	3.50 (±1.01)	0.50 (±0.17)	
		10	2	22.5 (±13.8)	74.2 (±13.6)	0.75 (±0.76)	2.50 (±1.42)	0.00 (±0.13)
	14	2	26.0 (±5.27)	67.0 (±5.46)	1.75 (±0.32)	5.00 (±1.63)	0.00 (±0.25)	
		etkek	-1	5	27.3 (±4.94)	71.2 (±4.93)	0.60 (±0.28)	2.00 (±0.49)
	2		4	28.7 (±9.35)	70.0 (±9.75)	0.37 (±0.22)	0.87 (±0.62)	0.00 (±0.11)
	4	3	27.3 (±7.81)	71.8 (±7.97)	0.16 (±0.30)	0.66 (±0.82)	0.00 (±0.16)	
		2	2	21.5 (±9.06)	72.5 (±9.28)	1.25 (±0.58)	4.75 (±1.66)	0.00 (±0.32)
	8	1	28.0 (±11.9)	67.0 (±11.9)	1.50 (±1.46)	3.00 (±1.19)	0.50 (±0.41)	
		10	1	16.5 (±24.5)	81.5 (±24.0)	1.00 (±1.07)	1.00 (±1.81)	0.00 (±0.19)
	14	1	27.0 (±7.70)	66.0 (±9.77)	2.00 (±0.51)	4.50 (±3.34)	0.00 (±0.40)	
etkek+dışı		-1	5	19.7 (±3.63)	77.3 (±3.40)	0.90 (±0.37)	1.90 (±0.57)	0.20 (±0.11)
	2	4	21.6 (±8.81)	77.8 (±8.82)	0.25 (±0.20)	0.12 (±0.49)	0.12 (±0.47)	
4	4	39.5 (±8.49)	56.0 (±9.41)	1.75 (±0.51)	1.75 (±1.05)	1.00 (±0.36)		
	2	2	21.7 (±5.39)	74.7 (±4.77)	1.00 (±0.56)	2.25 (±0.62)	0.25 (±0.55)	
6	2	42.2 (±2.51)*	52.0 (±2.51)*	1.50 (±0.27)	3.75 (±1.68)	0.50 (±0.47)		
	10	1	28.5 (±11.1)	67.0 (±11.7)	0.50 (±1.06)	4.00 (±2.12)	0.00	
14	1	25.0 (±8.01)	68.0 (±6.23)	1.50 (±0.50)	5.50 (±1.50)	0.00 (±0.78)		
	428 ppm	etkek+dışı	-1	10	14.1 (±3.02)	83.3 (±2.96)	0.90 (±0.23)	1.45 (±0.37)
2			10	23.9 (±5.50)	74.6 (±5.55)	0.50 (±0.14)	0.85 (±0.35)*	0.04 (±0.08)
4	9	28.3 (±4.20)	69.5 (±4.48)	0.94 (±0.23)	1.22 (±0.46)	0.05 (±0.14)		
	4	4	49.7 (±5.09)*	47.3 (±5.28)*	1.25 (±0.37)	1.75 (±0.94)	0.00 (±0.18)	
8	1	45.5 (±9.84)*	51.0 (±10.7)	1.00 (±0.99)	2.50 (±1.75)	0.00 (±0.30)		
	10	0	-	-	-	-	-	
14	etkek	-1	5	17.3 (±4.04)	79.4 (±4.93)	1.00 (±0.28)	2.10 (±0.49)	0.20 (±0.12)
		2	5	29.9 (±8.36)	69.1 (±8.56)	0.10 (±0.20)	0.90 (±0.55)	0.00 (±0.10)
4	4	30.3 (±6.76)	68.1 (±6.90)	0.62 (±0.26)	0.88 (±0.71)	0.00 (±0.13)		
	6	1	53.0 (±12.8)	44.5 (±13.1)	0.50 (±0.83)	2.00 (±2.34)	0.00 (±0.45)	
8	dışı	0	0	-	-	-	-	-
		10	0	-	-	-	-	-
14	etkek	-1	5	10.9 (±3.63)	87.3 (±3.40)	0.80 (±0.37)	0.80 (±0.57)	0.20 (±0.11)
		-1	5	20.9 (±7.88)	77.3 (±7.89)	0.50 (±0.18)	0.80 (±0.44)	0.10 (±0.42)
4	5	26.7 (±5.37)	70.6 (±5.95)	1.20 (±0.32)	1.50 (±0.66)	0.10 (±0.22)		
	3	48.6 (±4.40)*	48.3 (±4.89)*	1.33 (±0.46)	1.66 (±0.50)	0.00 (±0.45)		
8	1	45.5 (±2.25)*	51.0 (±3.55)*	1.00 (±0.38)	2.50 (±2.38)	0.00 (±0.67)		
	10	0	0	-	-	-	-	

sonuçlar elde edilirken, yalnızca 428 ppm uygulama grubu için 8. günde ortalama lenfosit farklılaşma oranınının kontrol gruplarından istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü. Ancak lenfosit miktarı bu gruplarda kontrol hayvanlarına göre bir azalış gösterdi. Gruplar arasında monosit ve bazofil farklılaşma oranları bakımından istatistiksel bir farklılık saptanmazken, ortalama eosinofil değerleri için 161 ppm, 322 ppm ve 428 ppm uygulama gruplarında 2. günde sayısal bakımdan bir azalış kaydedildi. Bu hücrelerin uygulama grubu hayvanlarda sayısal değişimi istatistiksel olarak da önemli düzeyde bulundu (  $P \leq 0.05$  ).

### 3.3. Biyokimyasal Biyobelirteçlerden Elde Edilen Bulgular

#### 3.3.1. Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi sonuçları

"DS" ve "LC" test grupları beyin AChE enzim aktivitesi ve Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenen hayvanlardaki enzim inhibisyonu oranları Tablo 3.7'de verilmiştir.

"DS" test grubu hayvanlarda kontrol grubu enzim aktivitesi ortalama değeri erkek ve dişi eşeyler birlikte incelendiğinde 89.9 ( $\pm 3.32$ ) U/L olarak bulunurken, yalnızca erkek denekler için bu değeri 96.8 ( $\pm 2.34$ ) U/L ve dişiler

**Tablo 3.7. Disseksiyon ve Letal Konsantrasyon test gruplarında Guthion insektisiti etkisi ile beyin asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ve enzim inhibisyonu değişimi**

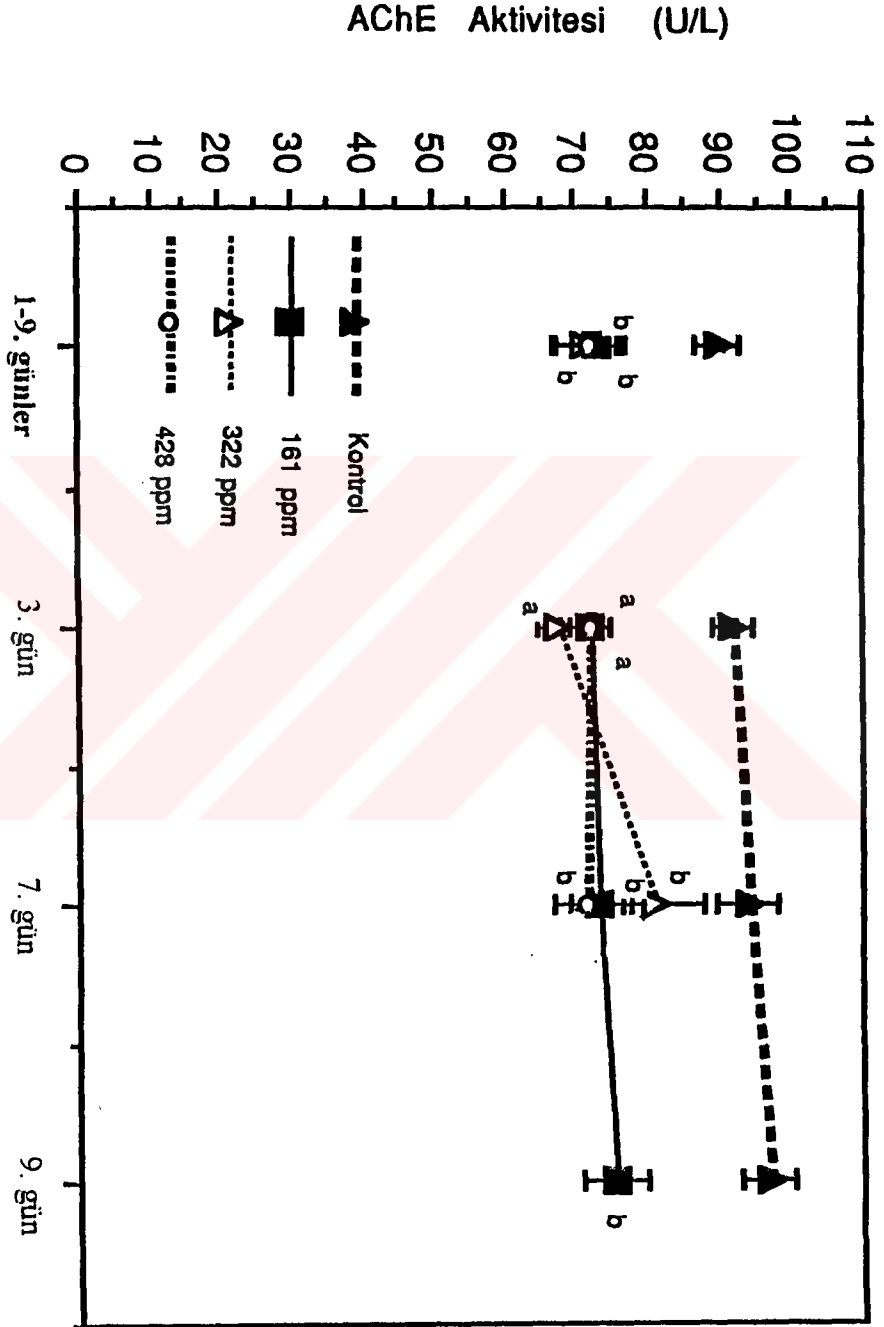
Uygulama dozu (ppm)	G¼tn	Eşey	n	AChE aktivitesi (U/L)	Enzim inhibisyonu (%)	
<b>"DISSEKSIYON" TEST GRUBU</b>						
Kontrol	3-9	E+D	15	89.93 ( $\pm$ 3.32)		
		E	10	96.80 ( $\pm$ 2.34)		
		D	5	89.17 ( $\pm$ 7.23)		
	3	E+D	5	91.87 ( $\pm$ 2.88)		
		E	3	94.25 ( $\pm$ 2.45)		
		D	2	88.30 ( $\pm$ 5.99)		
	7	E+D	5	93.88 ( $\pm$ 4.20)		
		E	4	94.66 ( $\pm$ 4.78)		
		D	1	90.78 ( $\pm$ 8.43)		
	9	E+D	5	96.70 ( $\pm$ 3.51)		
		E	3	102.2 ( $\pm$ 0.98)		
		D	2	88.43 ( $\pm$ 4.60)		
161 ppm	3-9	E+D **	13	73.31 ( $\pm$ 3.57)	18.48	
		E *	7	69.58 ( $\pm$ 2.80)	28.11	
		D	6	77.65 ( $\pm$ 6.60)	12.91	
	3	E+D *	5	72.08 ( $\pm$ 2.88)	21.54	
		E *	3	67.50 ( $\pm$ 2.45)	28.38	
		D	2	78.96 ( $\pm$ 5.99)	10.57	
	7	E+D **	5	73.37 ( $\pm$ 4.20)	21.84	
		E ***	3	67.49 ( $\pm$ 5.53)	28.70	
		D	2	82.19 ( $\pm$ 5.96)	9.46	
	9	E+D **	3	75.24 ( $\pm$ 4.53)	22.19	
		E **	1	82.11 ( $\pm$ 1.71)	19.11	
		D	2	71.81 ( $\pm$ 4.06)	18.79	
	322 ppm	3-7	E+D **	7	71.67 ( $\pm$ 4.86)	20.30
			E *	5	74.45 ( $\pm$ 3.31)	23.08
			D	2	64.72 ( $\pm$ 11.4)	27.41
3		E+D *	5	67.57 ( $\pm$ 2.88)	26.45	
		E *	3	69.47 ( $\pm$ 2.45)	26.29	
		D	2	64.72 ( $\pm$ 5.99)	26.70	
7		E+D **	2	81.21 ( $\pm$ 6.64)	13.49	
		E ***	2	81.91 ( $\pm$ 6.77)	13.41	
		D	0	-	-	
428 ppm		3-7	E+D **	9	71.86 ( $\pm$ 4.29)	20.00
			E *	4	72.38 ( $\pm$ 3.70)	25.22
			D	5	71.45 ( $\pm$ 7.23)	19.87
	3	E+D *	5	72.07 ( $\pm$ 2.88)	21.55	
		E *	3	71.24 ( $\pm$ 2.45)	24.74	
		D	2	73.32 ( $\pm$ 5.99)	16.96	
	7	E+D **	4	71.61 ( $\pm$ 4.69)	23.72	
		E ***	1	75.82 ( $\pm$ 9.57)	19.90	
		D	3	70.20 ( $\pm$ 5.07)	22.67	

Uygulama dozu (ppm)	Gün	Eşey	n	AChE aktivitesi (U/L)	Enzim inhibisyonu (%)
<b>"LETAL KONSANTRASYON" TEST GRUBU</b>					
Kontrol	Genel	E+D	8	90.84 (±3.88)	
		E	5	93.77 (±3.47)	
		D	3	85.95 (±5.96)	
	14	E+D	5	86.19 (±4.91)	
		E	3	89.63 (±4.25)	
		D	2	81.03 (±7.03)	
161 ppm	Genel	E+D *	5	60.99 (±4.91)	32.85
		E **	3	59.55 (±4.48)	36.49
		D	2	63.17 (±7.30)	26.50
	14	E+D **	4	60.87 (±5.49)	29.37
		E ***	2	58.57 (±5.20)	34.65
		D	2	63.17 (±7.03)	22.04
322 ppm	Genel	E+D *	3	44.47 (±6.34)	51.04
		E **	2	56.21 (±5.48)	40.05
		D **	1	20.98 (±10.3)	75.59
	14	E+D**	2	36.73 (±7.77)	57.38
		E ***	1	52.48 (±7.36)	41.44
		D	1	20.98 (±9.94)	74.10
428 ppm	Genel	E+D *	3	66.72 (±6.34)	26.55
		E ***	1	64.67 (±7.76)	31.03
		D	2	67.75 (±7.30)	21.17
	14	E+D	0	-	-
		E	0	-	-
		D	0	-	-

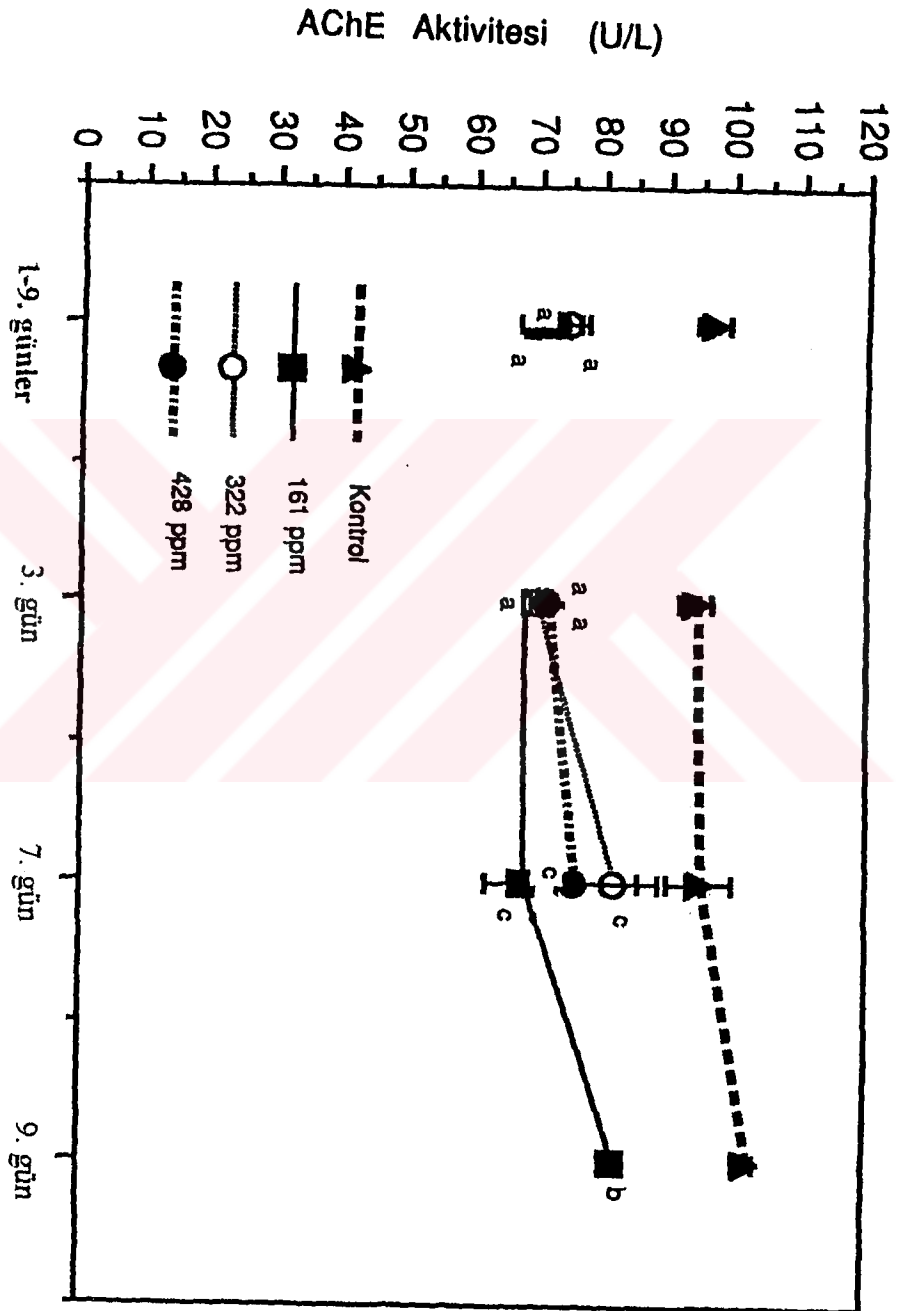
İstatistiksel analizler varyans analizi kullanılarak yapılmış olup, sonuçların değerlendirilmesinde Fisher'in "Korunmuş En Az Önemlilik Testi" (PLSD) testi uygulanmıştır. Parantez içindeki rakamlar standart hatayı ifade etmektedir. Asteriksler: \* P≤0.001; \*\* P≤0.01; \*\*\* P≤0.05 düzeyinde önemlilik derecesini ifade etmektedir. (E+D:Erkek ve Dişi ortalaması, E: Erkek hayvanlar;D: Dişi hayvanlar için ortalama hesaplamaları kapsamaktadır).

için de 89.1 ( $\pm 7.23$ ) U/L olarak saptandı. Disseksiyon günlerine bağlı olarak örneklerde yapılan enzim aktivite tayini sonuçlarına göre ise 3. gün, 7. gün ya da 9. gün verilerinden ortalama aktivite değerinin 96.7 ( $\pm 3.51$ ) - 91.8 ( $\pm 2.88$ ) U/L arasında değiştiği görüldü. Buna karşın hayvanların eşeylerine bağlı olarak yapılan analiz sonuçlarında da birbirine benzer sonuçlar elde edildi. İnsektisit uygulanmış yem ile beslenen hayvanlarda uygulama grupları için enzim aktivitesi 161 ppm dozunda ortalama 73.3 ( $\pm 3.57$ ) U/L, 322 ppm için 71.6 ( $\pm 4.86$ ) ve 428 ppm uygulama dozu için de 71.8 ( $\pm 4.29$ ) olarak saptandı. "DS" test grubu hayvanlarda 3-9 günlük test periyodu içerisinde AChE enziminin % 20.3-18.48 oranında inhibe edildiği saptanırken, disseksiyon günlerine bağlı olarak en yüksek enzim inhibisyonunun 161 ppm uygulama grubunda 9. günde % 22.19 oranında, 322 ppm grubunda 3.günde % 26.45 oranında ve 428 ppm uygulama dozunda da 7. günde % 23.72 oranında olduğu saptandı. İstatistiksel analiz sonuçlarında ise kontrol grubu ile uygulama grubu verileri karşılaştırıldığında, tüm uygulama grupları için farklılık önemli düzeyde bulunurken ( $P \leq 0.001$  ve  $P \leq 0.01$ ), gerek genel ortalama (3-9.günler) ve gerekse de disseksiyon günlerine göre bakılan sonuçlarda dişi hayvanlar için gruplar arasında farklılık önemli düzeyde bulunamadı. Şekil 3.5:a,b,c "DS" test grubu hayvanlarda AChE enzim aktivitesinin günlere bağlı olarak sırası ile ortalama, erkek ve dişi hayvanlardan gelen verileri için yapılan grafiklerini göstermektedir.

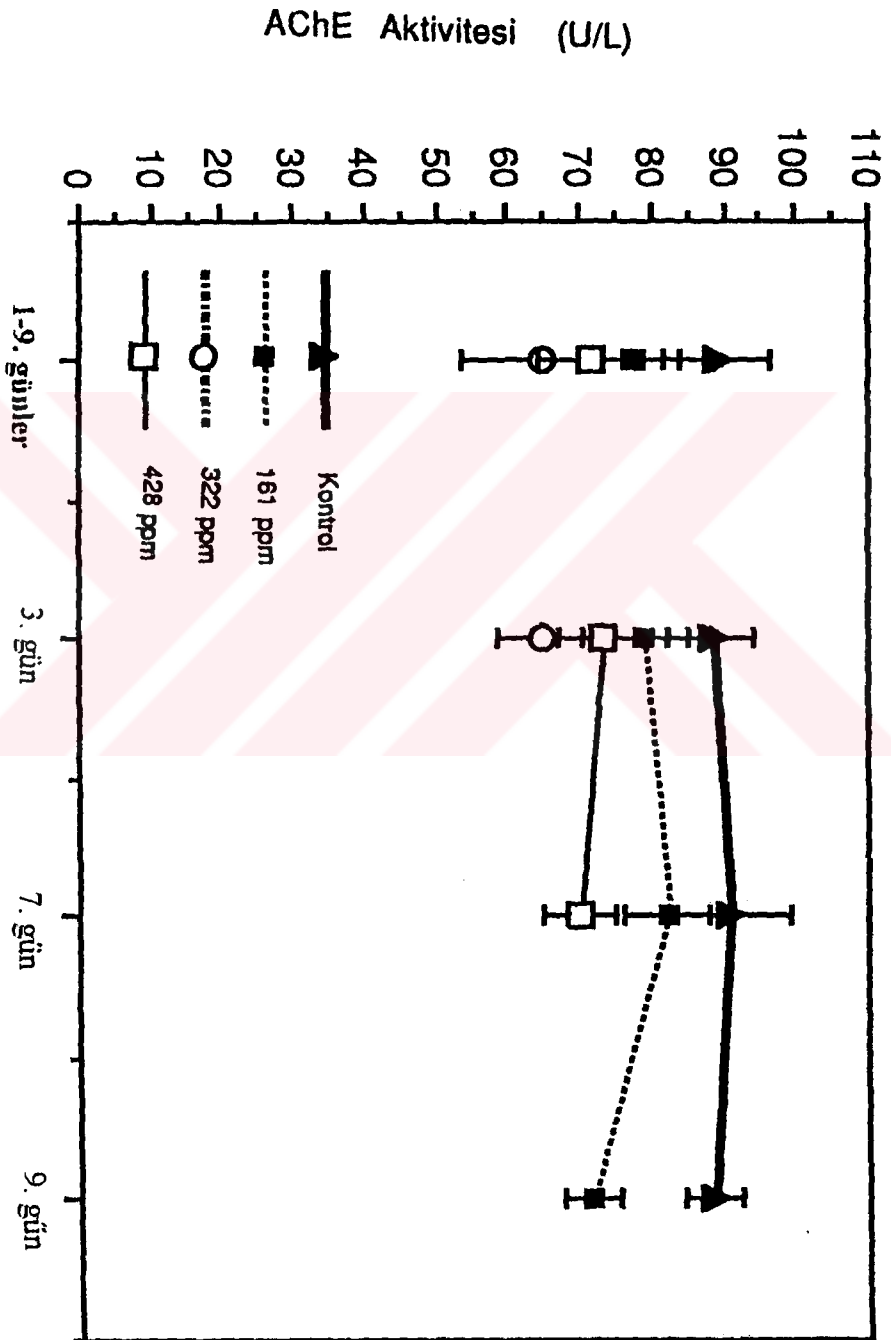
Beyin AChE enzim aktivitesi ve insektisit uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan enzim inhibisyon oranı "LC" test grubu hayvanlar için de 1-14 günlük deney periyodu boyunca toplanan beyin doku örnekleri ile hazırlanan homo



Şekil 3.5.a. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" test grubu *M. caniculus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi (a:  $P < 0.001$ ; b:  $P < 0.01$ )



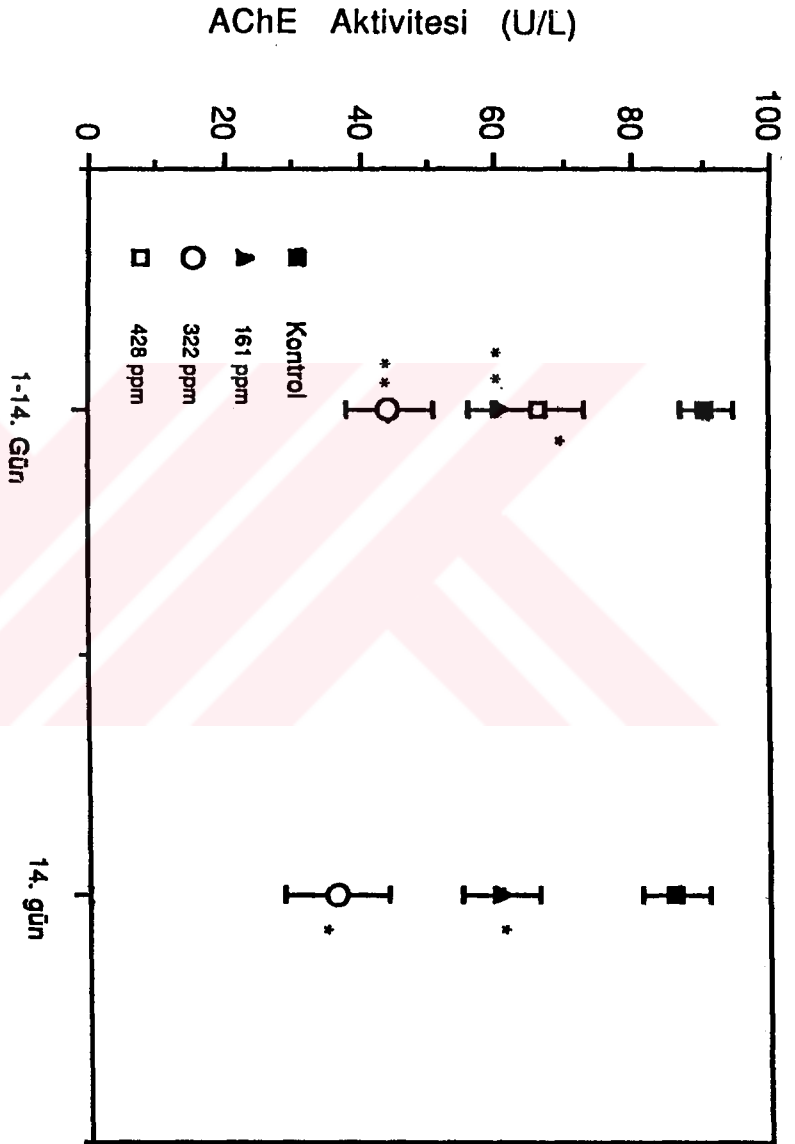
Şekil 3.5.b. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" test grubu erkek *M. carnicus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi (a:  $P < 0.001$ ; b:  $P < 0.01$ ; c:  $P < 0.05$ ).



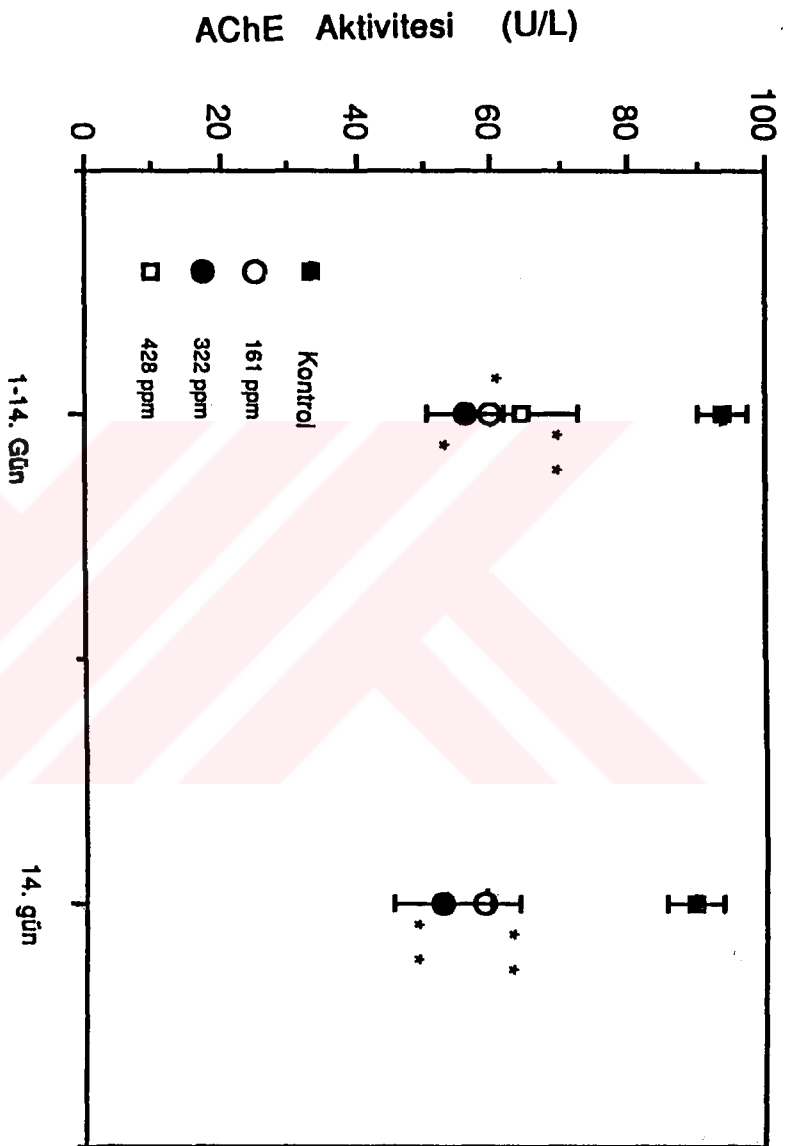
Şekil 3.5.c. Guthion uygulaması ve günlere bağlı olarak "DS" testi grubu dışı *M. carnicudus*'da beyin AChE aktivitesi değişimi (istatistik analiz sonuçlarına göre gruplar arasındaki fark önemsizdir).



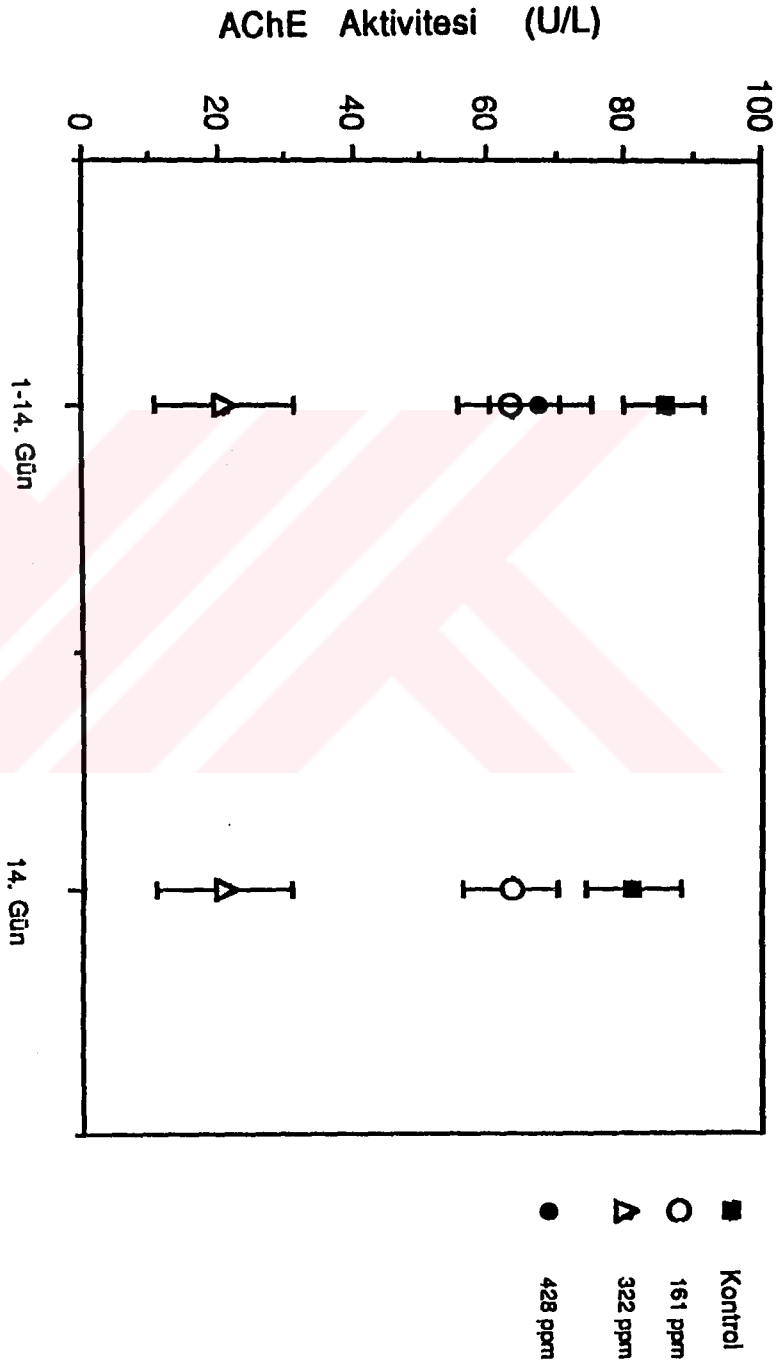
jenatlardan ölçüldü. Deney periyodu boyunca toplanan örneklerde kontrol grubu için bulunan ortalama enzim aktivite değeri 90.8 ( $\pm 3.88$ ) U/L iken, 161 ppm uygulama grubu için 60.9 ( $\pm 4.91$ ) U/L ve 14. günde alınan örneklerde ise 60.8 ( $\pm 5.49$ ) U/L olarak bulundu. 322 ppm uygulama dozunda bu değerler sırası ile 44.4 ( $\pm 6.34$ ) U/L ve 36.7 ( $\pm 7.77$ ) U/L olarak bulundu. 428 ppm uygulama dozunda veriler yalnızca 14. güne kadar toplanan beyin doku örneklerinden elde edildi ve bu değer 66.7 ( $\pm 6.34$ ) U/L olarak bulundu. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, 1-14. günler arasında enzim aktivite değişimi bakımından kontrol grubu ile uygulama grupları arasında farklılık önemli düzeyde ( $P \leq 0.001$ ;  $P \leq 0.01$ ;  $P \leq 0.05$ ) bulunurken, dişi hayvanlardan gelen aktivite değerleri bakımından gruplar arasında farklılığın önemli olmadığı belirlendi. Şekil 3.6: a,b,c'de 14 günlük test periyodu sonunda hayvanlardan alınan beyin doku örneklerinde ölçülen AChE aktivitesi değişimi her iki eşey için birlikte ve erkek ya da dişi hayvanlardan gelen veriler ayrı ayrı değerlendirilerek, elde edilen grafiklerle gösterilmiştir. Diğer taraftan, beyin AChE inhibisyonu sırası ile 161 ppm uygulama dozunda genel olarak % 32.8 ve 14. gün de de % 29.3; 322 ppm uygulamasında % 51.0 ve % 57.3; 428 ppm uygulaması içinde % 26.5 olarak saptandı.



**Şekil 3.6.a.** Guthion uygulamasına bağlı olarak deney periyodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan hayvanlarda AChE enziminin aktivitesi değişimi (\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ ).



Şekil 3.6.b. Guthion uygulamasına bağlı olarak deney periyodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan erkek hayvanlarda AChE enzim aktivitesi değişimi (\*P < 0.01; \*\*P < 0.05).



Şekil 3.6.c. Guthion uygulamasına bağlı olarak deney periyodunda ölen ve 14. güne kadar yaşayan dişi hayvanlarda AChE enzim aktivitesi değişimi (istatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasındaki fark önemsizdir).

### 3.3.2. Plazma laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi bulguları

"DS" test grubu hayvanlarda LDH aktivitesinin saptanmasında kontrol ve 161 ppm uygulama grupları için 3., 7. ya da 9. günlerde toplanan plazma örnekleri ile analizler yapılırken, 322 ppm ve 428 ppm uygulama dozları için 7. güne kadar toplanan örneklerde çalışılabildi. Kontrol grubu hayvanlarda genel LDH aktivitesi 3. günde 1219 ( $\pm 305$ ) U/L olarak saptanırken, 9. günde bu değer 1780 ( $\pm 309$ ) U/L olarak kaydedildi. İnsektisit uygulama grupları için ise 3. günde 1929 ( $\pm 305$ ) - 1233 ( $\pm 278$ ) U/L'lik değerler elde edildi. 9. günde ise yalnızca 161 ppm uygulaması için saptanan LDH aktivitesinin 2419 ( $\pm 399$ ) U/L olduğu kaydedildi. İstatistiksel analiz sonuçlarında LDH aktivitesinin kontrol ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, yalnızca 322 ppm uygulama dozu için 7. günde önemli farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) ve enzim aktivitesinde bir artış olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra 322 ppm uygulama dozunda 7. günde erkekler ve 9. günde de dişi hayvanlar için, 428 ppm uygulamasında ise 3. ve 7. günlerde erkek hayvanlar için yapılan analizlerde enzim aktivitesinde artış kaydedilirken, gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (Tablo 3.8). Ayrıca Şekil 3.7 "DS" test grubu deneklerinde plazma LDH aktivitesinin, her iki eşey ortalamasına ya da erkek ve dişilerden gelen verilere bağlı olarak değişimini göstermektedir.

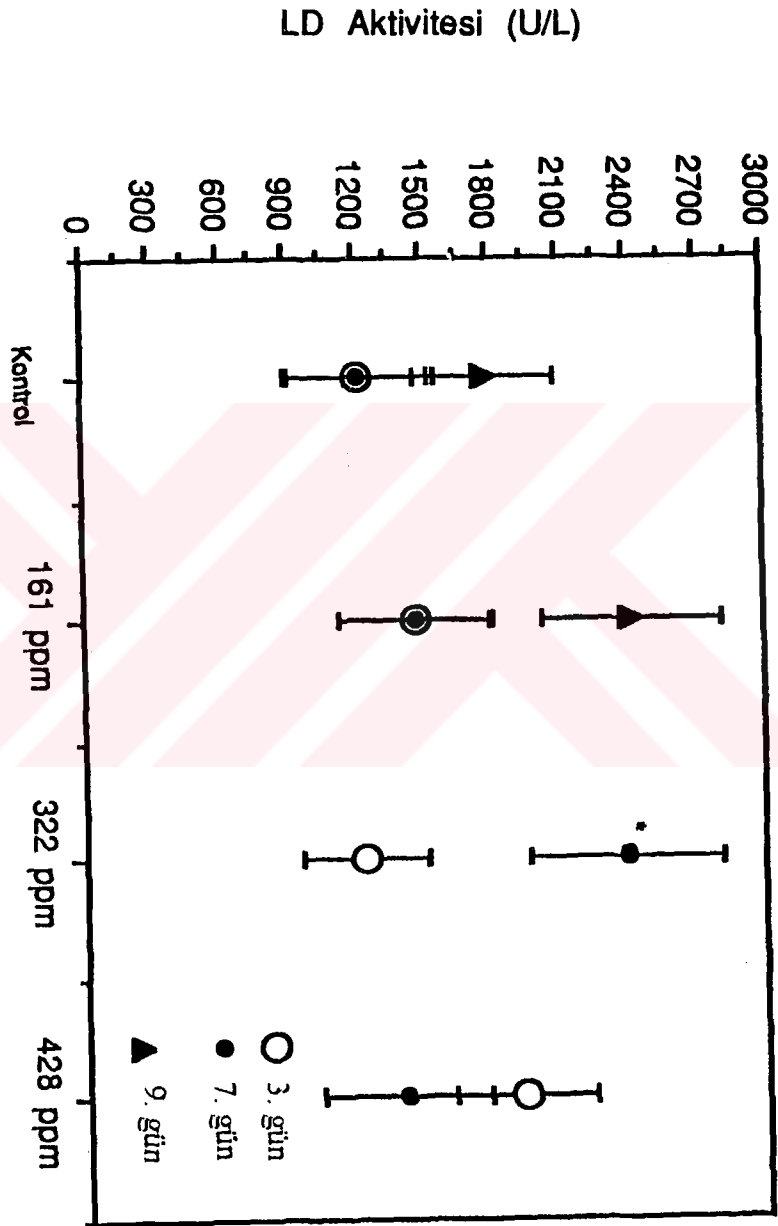
LDH enzim aktivitesi "LC" test grubu 161 ppm uygulama dozu hayvanlarda, iki eşey ortalaması için 4. günde bir artış gösterirken, 10. günde sadece erkekler için enzim

**Tablo 3.8. Disseksiyon test grubu *Microtus canicaudus*'da plazma LDH, CK ve ICDH aktiviteeleri ile kreatinin ve BUN konsantrasyon degerleri (\*P < 0.05).**

Uygulama (ppm)	Esey	Gün	n	Enzim Aktiviteeleri (U/L)		Diğer Biyobelirteçler (mg/dl)			
				LD	CK	ICDH	Kreatinin	BUN	
Kontrol	E+D	3	5	1219.2 (±305)	1748.7 (±799)	56.54 (±28.2)	0.612 (±0.10)	33.4 (±3.11)	
		7	5	1228.7 (±332)	2468.6 (±644)	64.33 (±16.7)	0.571 (±0.14)	39.8 (±4.13)	
		9	5	1780.8 (±309)	1369.6 (±284)	72.36 (±24.6)	0.779 (±0.08)	36.6 (±1.90)	
	Etek	3	3	1459.2 (±450)	1831.3 (±1241)	56.11 (±41.6)	0.640 (±0.11)	35.7 (±4.20)	
		7	3	1395.6 (±426)	2683.1 (±955)	63.90 (±16.1)	0.571 (±0.10)	35.7 (±4.59)	
		9	3	1712.0 (±492)	1434.1 (±519)	45.65 (±3.76)	0.813 (±0.06)	37.6 (±0.70)	
	Dişi	3	2	859.30 (±293)	1624.8 (±587)	57.19 (±12.9)	0.571 (±0.17)	29.9 (±5.73)	
		7	2	978.35 (±331)	2147.0 (±874)	64.83 (±11.7)	0.571 (±0.37)	46.0 (±8.41)	
		9	2	1884.0 (±514)	1272.8 (±381)	112.4 (±43.5)	0.726 (±0.03)	35.0 (±4.61)	
	161 ppm	E+D	3	4	1464.9 (±341)	2280.9 (±893)	81.63 (±23.0)	0.831 (±0.11)	31.5 (±3.11)
			7	5	1464.5 (±332)	2215.9 (±644)	36.90 (±16.7)	0.799 (±0.14)	37.2 (±4.13)
			9	3	2419.0 (±399)	2875.6 (±367)*	136.3 (±31.7)	0.744 (±0.11)	28.4 (±2.46)*
Etek		3	3	1586.9 (±450)	2885.3 (±1241)	89.89 (±41.6)	0.710 (±0.11)	32.8 (±4.20)	
		7	3	1709.3 (±426)	2830.0 (±955)	25.11 (±16.1)	0.777 (±0.10)	34.9 (±4.59)	
		9	1	1958.0 (±852)	2510.0 (±899)	194.9 (±6.52)*	1.091 (±0.11)	25.5 (±1.22)*	
Dişi		3	1	1099.0 (±415)	467.70 (±830)	56.85 (±18.2)	1.194 (±0.24)	27.8 (±8.11)	
		7	2	1097.2 (±331)	1294.9 (±874)	54.59 (±11.7)	0.830 (±0.37)	40.6 (±8.41)	
		9	2	2649.5 (±514)	3058.5 (±381)	106.9 (±43.5)	0.571 (±0.03)	29.9 (±4.61)	
322 ppm		E+D	3	6	1233.3 (±278)	1870.3 (±729)	95.21 (±25.2)	0.588 (±0.09)	28.0 (±2.84)
			7	3	2396.3 (±425)*	2520.8 (±832)	120.5 (±21.6)	0.848 (±0.18)	33.6 (±5.33)
			9	0	-	-	-	-	-
	Etek	3	3	1459.7 (±450)	1792.6 (±1241)	108.0 (±41.6)	0.606 (±0.11)	27.8 (±4.20)	
		7	2	2549.5 (±522)	3335.0 (±1170)	165.7 (±19.7)*	0.831 (±0.13)	36.6 (±5.63)	
		9	0	-	-	-	-	-	
	Dişi	3	3	1007.0 (±239)	1948.0 (±479)	82.34 (±10.5)	0.571 (±0.14)	28.3 (±4.68)	
		7	1	1890.0 (±468)	892.60 (±1236)	30.11 (±16.6)	0.882 (±0.52)	27.6 (±11.9)	
		9	0	-	-	-	-	-	

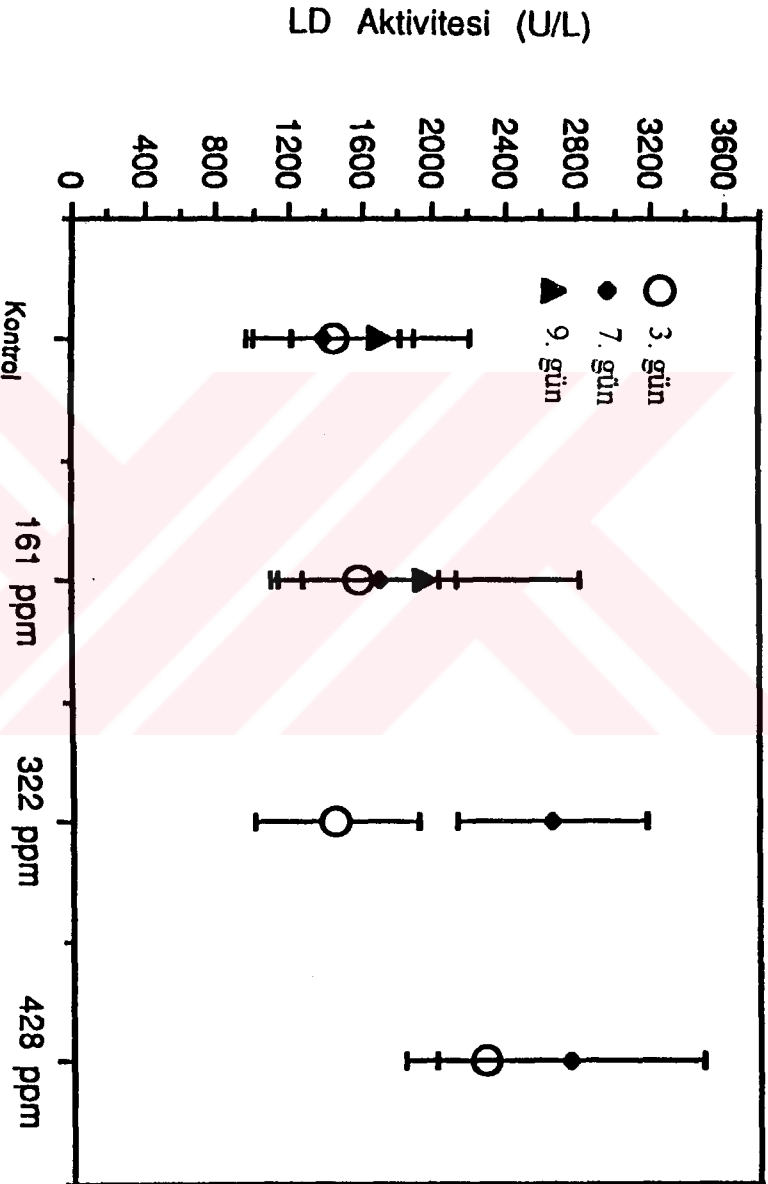
Tablo 3.8. devamı

Uygulama (ppm)	Esey	Gün	n	Enzim Aktivite (U/L)		ICDH	Diğer Biyobelirteçler (mg/dl)	
				LD	CK		Kreatinin	BUN
428 ppm	E+D	3	5	1929.7 (±305)	3273.5 (±799)	119.7 (±28.2)	0.654 (±0.10)	30.5 (±3.11)
		7	4	1403.4 (±368)	2053.4 (±720)	64.82 (±18.7)	1.012 (±0.15)	38.8 (±4.62)
		9	0	-	-	-	-	-
	Etkek	3	3	2293.3 (±450)	4231.2 (±1241)	148.7 (±41.6)*	0.744 (±0.11)	28.6 (±4.20)
		7	1	2747.0 (±739)	1874.0 (±1654)	63.67 (±27.9)	1.090 (±0.18)	41.3 (±7.96)
		9	0	-	-	-	-	-
Dişi	3	2	1384.4 (±293)	1837.0 (±587)	76.18 (±12.9)	0.520 (±0.17)	33.4 (±5.73)	
	7	3	955.53 (±270)	2113.2 (±7140)	65.20 (±9.61)	0.986 (±0.30)	37.9 (±6.87)	
	9	0	-	-	-	-	-	

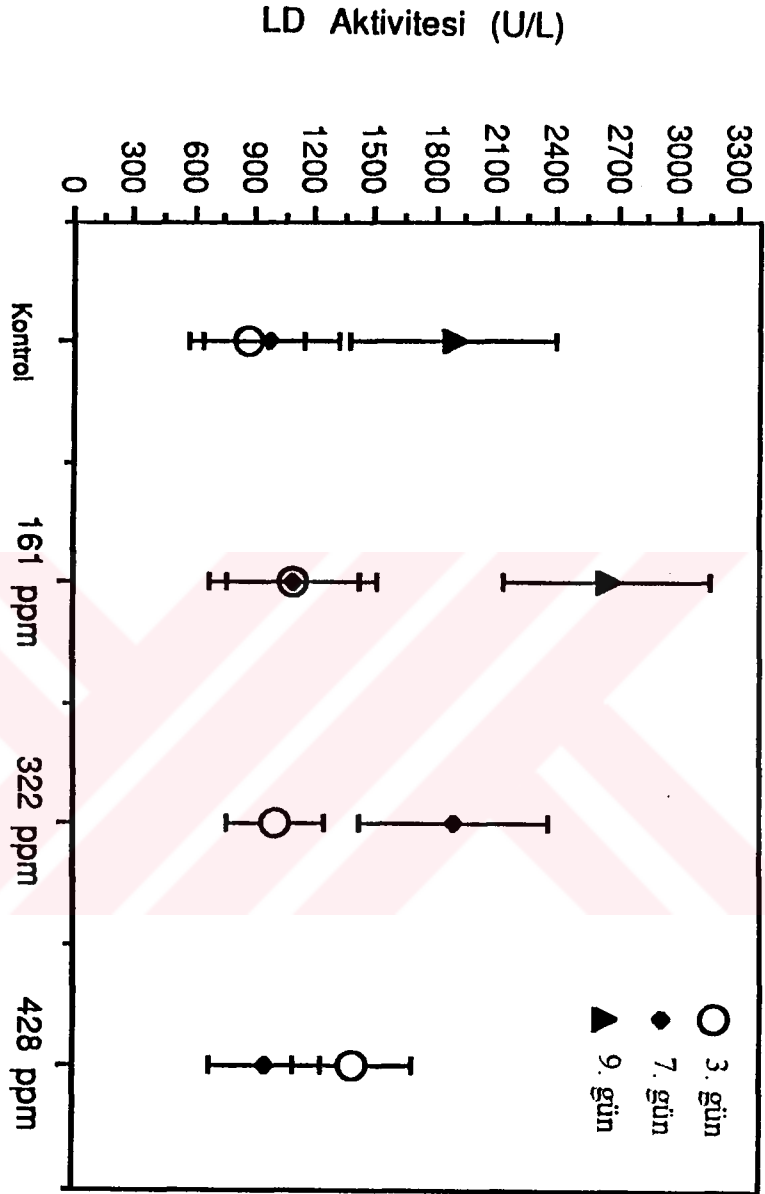


Şekil 3.7.a. "DS" test grubu hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).





Şekil 3.7.b. "DS" test grubu erkek hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



Şekil 3.7.c. "DS" test grubu dişi hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

aktivitesi kontrol hayvanları verilerine oranla yüksek düzeyde bulundu (Tablo 3.9). Enzim aktivitesi 6. günde 428 ppm uygulamasında genel ortalama ve aynı gün için dişi hayvanlardan elde edilen sonuçlarda artış gösterdi. Buna karşın istatistiksel analiz değerlendirmelerinde yalnız 10. günde 161 ppm uygulama grubu erkekleri için hesaplanan aktivite değerinin farklılık gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ), diğer uygulama gruplarında ise kontrol ile karşılaştırıldığında farklılık göstermediği saptandı. Şekil 3.8 plazma örneklerinin toplandığı farklı günlerdeki LDH enzim aktivitelerinin ortalama değer ile, erkek ve dişi denekler için grafiklerini ayrı ayrı vermektedir.

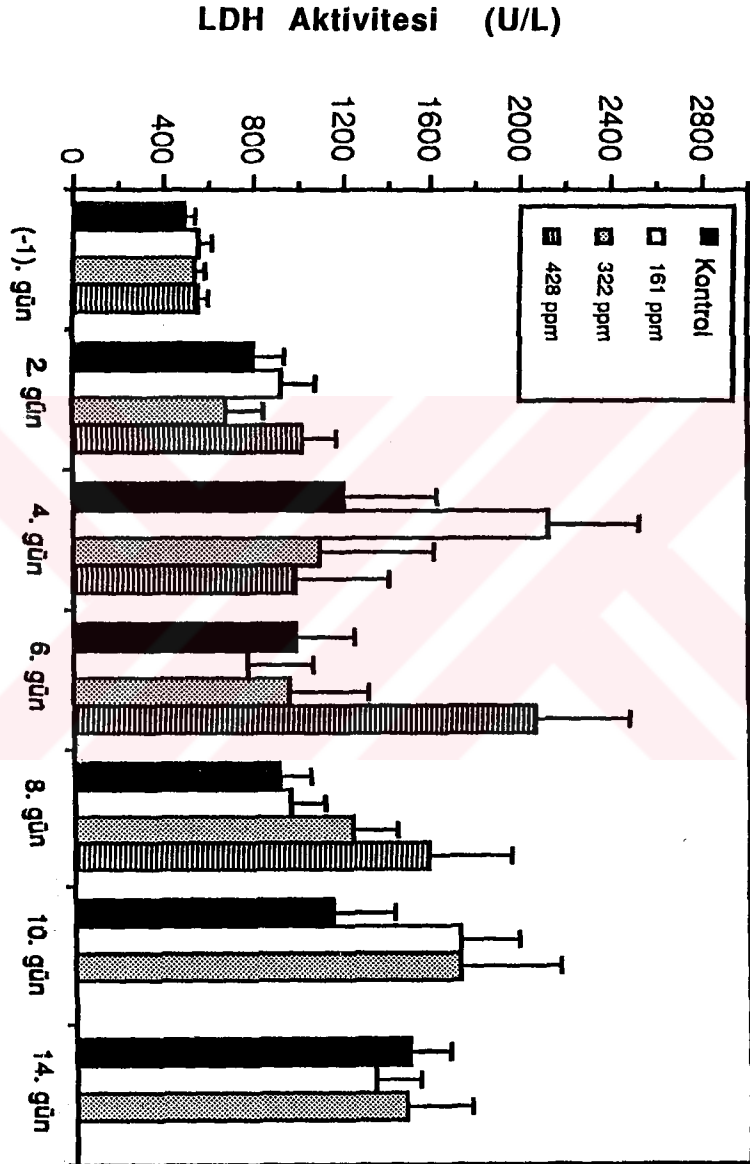
### 3.3.3 Plazma kreatin kinaz enzim aktivitesi bulguları

CK aktivitesi "DS" test grubunun 161 ppm uygulama dozu için 9. günde hayvanlardan alınan plazma örneklerinde önemli düzeyde artış gösterdi ( $P \leq 0.05$ ) ve enzim aktivitesi 2875 ( $\pm 367$ ) U/L olarak ölçüldü. Buna karşın enzim aktivitesi günlere bağlı değişim göstermekle birlikte, kontrol grubu hayvanlarda her iki eşey ortalaması için 1369-2468 U/L olarak saptandı. Uygulama grupları için bu değer 1870-3273 U/L olarak ölçüldü (Tablo 3.8). Guthion insektisiti uygulamasına maruz bırakılan hayvanlarda CK enzim aktivitesi değişiminin uygulama dozuna ve insektisit ile maruz kalma süresine bağlı olarak değişimini gösteren grafikler Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

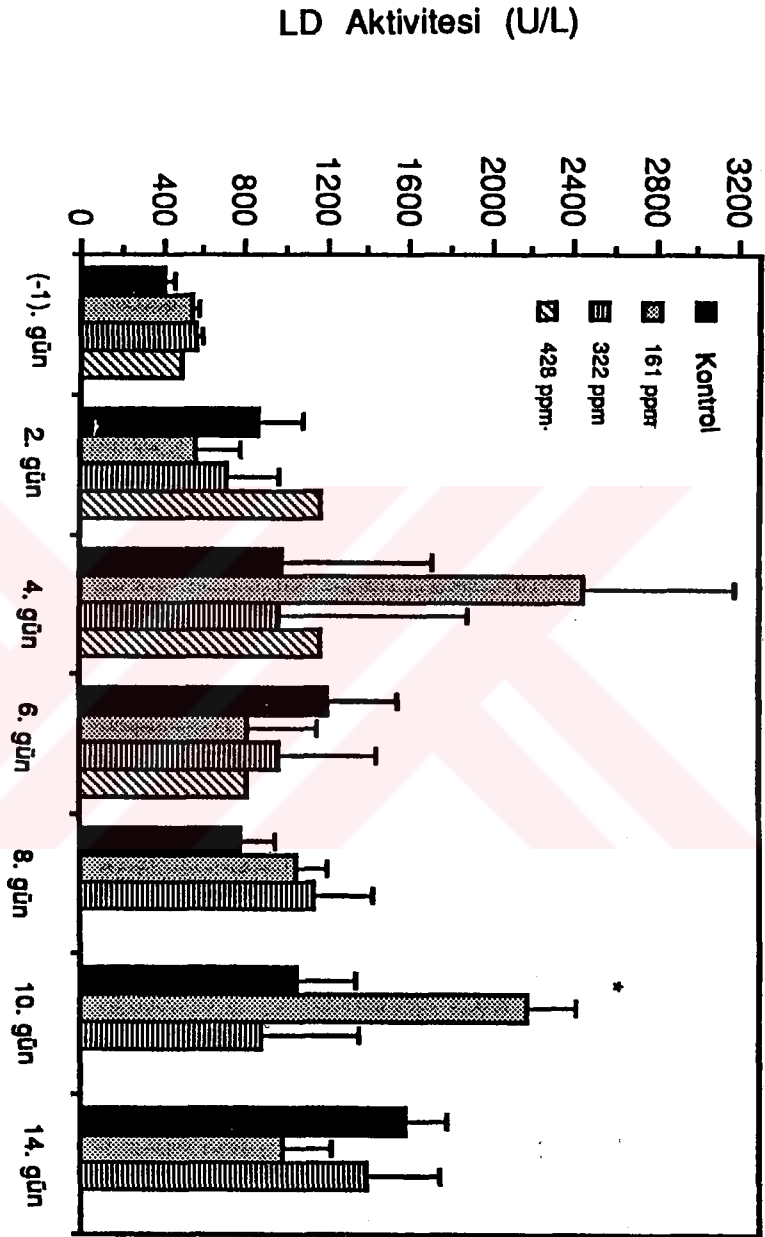
**Tablo 3.9. Letal konsantrasyon test grubu *Microtus canicaudus*'da plazma LDH, CK ve ICDH aktiviteleri ile kreatinin ve BUN konsantrasyon değerleri (\*P < 0.05).**

Uygulama (ppm)	Eşey	Gün	n	Enzimatik Aktiviteler (U/L)		ICDH	Diğer Biyobelirteçler (mg/dl)	
				LDH	CK		Kreatinin	BUN
Kontrol	E+D	(-1)	10	496,8	295,5	62,76	0,375	36,17
			10	(± 47,0)	(± 45,5)	(± 7,22)	(± 0,09)	(± 3,08)
			4	797,1	212,1	68,92	0,286	38,60
			4	(± 153)	(± 72,1)	(± 13,4)	(± 0,05)	(± 4,55)
			6	1206,4	285,5	57,90	0,632	26,16
			6	(± 411)	(± 45,7)	(± 6,0)	(± 0,09)	(± 2,65)
			8	992,5	370,0	79,35	0,315	24,68
	8	(± 252)	(± 23,3)	(± 20,7)	(± 0,06)	(± 2,73)		
	7	917,0	836,1	86,23	0,280	22,99		
	7	(± 140)	(± 40,1)	(± 6,5)	(± 0,01)	(± 2,35)		
	10	1137,7	293,3	65,12	0,567	33,61		
	10	(± 291)	(± 45,8)	(± 12,1)	(± 0,20)	(± 3,15)		
	14	1485,9	259,5	129,4	0,210	38,15		
	14	(± 188)	(± 90,7)	(± 19,0)	(± 0,09)	(± 3,72)		
Etkek	E+D	(-1)	5	414,4	295,3	62,47	0,260	35,57
			5	(± 41,1)	(± 48,6)	(± 8,07)	(± 0,14)	(± 5,11)
			2	869,2	195,9	78,64	0,354	37,30
			2	(± 222)	(± 93,1)	(± 10,7)	(± 0,06)	(± 7,98)
			4	993,9	280,9	60,29	0,046	22,52
			4	(± 718)	(± 28,5)	(± 24,9)	(± 0,16)	(± 3,37)
			6	1207,6	242,4	102,7	0,280	24,56
	6	(± 336)	(± 57,8)	(± 8,7)	(± 0,10)	(± 3,62)		
	8	788,9	453,9	94,04	0,350	24,30		
	8	(± 167)	(± 99,9)	(± 24,6)	(± 0,13)	(± 3,90)		
	10	1056,5	340,7	69,66	0,526	36,64		
	10	(± 279)	(± 73,1)	(± 19,4)	(± 0,40)	(± 4,32)		
	14	1585,0	3389	150,0	0,245	40,72		
	14	(± 199)	(± 253)	(± 27,8)	(± 0,10)	(± 3,39)		
Dişi	E+D	(-1)	5	579,2	295,6	63,05	0,528	36,78
			5	(± 82,6)	(± 78,4)	(± 12,4)	(± 0,14)	(± 3,81)
			2	725,1	228,3	59,20	0,231	39,89
			2	(± 185)	(± 109)	(± 23,4)	(± 0,07)	(± 4,33)
			4	1472,0	291,2	55,12	0,628	30,71
			4	(± 417)	(± 94,1)	(± 21,4)	(± 0,10)	(± 3,95)
			6	777,4	498,5	55,99	0,350	24,79
	6	(± 342)	(± 43)	(± 14,3)	(± 0,05)	(± 3,15)		
	8	1045,1	1218	78,42	0,210	21,68		
	8	(± 231)	(± 78,9)	(± 22,9)	(± 0,16)	(± 3,57)		
	10	1259,6	222,2	58,30	0,630	29,06		
	10	(± 336)	(± 48,1)	(± 14,9)	(± 0,13)	(± 3,55)		
	14	1377,2	2228	98,30	0,157	34,31		
	14	(± 354)	(± 175,4)	(± 31,0)	(± 0,03)	(± 7,86)		
161 ppm	E+D	(-1)	10	563,8	325,8	57,26	0,308	35,58
			10	(± 47,0)	(± 45,5)	(± 7,22)	(± 0,09)	(± 3,08)
			2	924,3	1704	93,00	0,477	35,95
			2	(± 162)	(± 76,7)	(± 14,2)	(± 0,05)	(± 4,78)
			4	2114,9	902,9	99,80	0,742	24,74
			4	(± 411)	(± 48)	(± 16,0)	(± 0,09)	(± 2,63)
			6	771,8	340,9	68,54	0,373	21,44
	6	(± 191)	(± 26,9)	(± 23,9)	(± 0,07)	(± 3,15)		
	8	963,3	467,2	66,30	0,553	21,82		
	8	(± 151)	(± 43,3)	(± 17,9)	(± 0,11)	(± 2,52)		
	10	1709,9	1539	61,58	0,650	34,99		
	10	(± 166)	(± 41,8)	(± 11,0)	(± 0,23)	(± 2,87)		
	14	1327,4	2028	93,60	0,237	28,41		
	14	(± 210)	(± 101,4)	(± 21,3)	(± 0,01)	(± 4,16)		
Etkek	E+D	(-1)	5	541,2	251,6	52,74	0,371	35,47
			5	(± 41,1)	(± 48,6)	(± 8,07)	(± 0,14)	(± 5,11)
			2	562,9	225,6	65,43	0,430	36,09
			2	(± 222)	(± 93,1)	(± 10,7)	(± 0,06)	(± 7,98)
			4	2453,6	535,6	111,3	0,644	21,79
			4	(± 718)	(± 28,5)	(± 24,9)	(± 0,16)	(± 3,37)
			6	813,2	410,8	84,68	0,373	22,72
	6	(± 336)	(± 57,8)	(± 8,7)	(± 0,10)	(± 3,62)		
	8	1062,2	579,6	81,65	0,443	21,56		
	8	(± 144)	(± 46,5)	(± 21,3)	(± 0,11)	(± 3,38)		
	10	2169,2	1992	67,71	0,814	37,24		
	10	(± 242)*	(± 63,3)	(± 16,8)	(± 0,37)	(± 3,74)		
	14	981,3	1654	82,91	0,473	28,53		
	14	(± 243)	(± 311,1)*	(± 34,1)	(± 0,13)	(± 4,15)		
Dişi	E+D	(-1)	5	586,3	399,9	61,78	0,257	35,69
			5	(± 82,6)	(± 78,4)	(± 12,4)	(± 0,14)	(± 3,81)
			2	1376,0	3182	127,4	0,539	35,77
			2	(± 207)	(± 121,9)	(± 26,2)	(± 0,08)*	(± 4,84)
			4	1691,4	1362	85,40	0,653	28,44
			4	(± 417)	(± 94,1)	(± 21,4)	(± 0,10)	(± 3,95)
			6	689,0	201,1	36,26	0,373	18,89
	6	(± 484)	(± 66,7)	(± 20,34)	(± 0,07)	(± 2,98)		
	8	765,7	242,5	35,61	0,771	22,35		
	8	(± 327)	(± 111)	(± 32,4)	(± 0,23)*	(± 5,05)		
	10	791,2	635,3	49,33	0,262	30,50		
	10	(± 336)	(± 48,1)*	(± 4,9)	(± 0,13)	(± 3,55)		
	14	1673,0	1754	104,3	0,000	28,30		
	14	(± 354)	(± 0,00)	(± 31,0)	(± 0,03)	(± 7,86)		

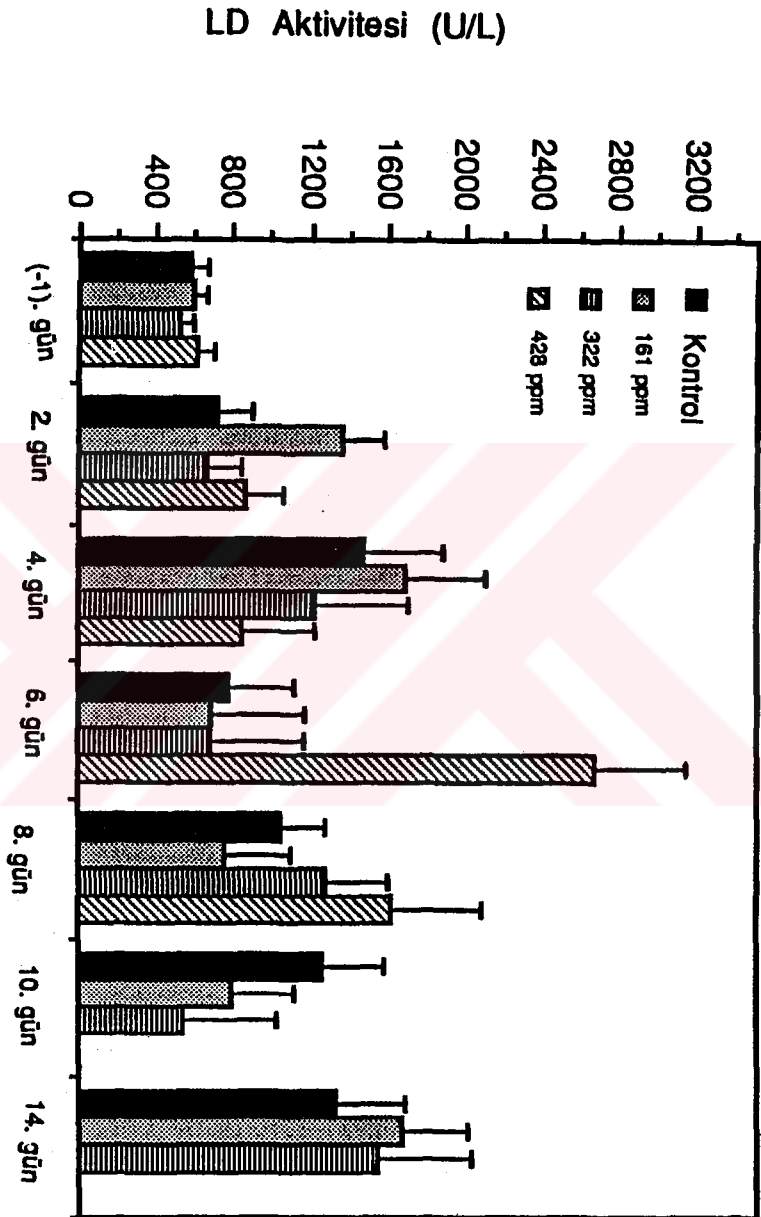
Uygulama (ppm)	Eşey	Gün	n	Buzmatik Aktivite (U/L) LDH	CK	ICDH	Düğü Bıyohimyasal (mg/dl) Kreatinin	BUN
322 ppm	E+D	(-1)	10	538,0 (±47,0)	266,1 (±45,5)	49,5 (±7,22)	0,334 (±0,09)	39,2 (±3,08)
			9	686,7 (±162)	438,1 (±76,7)	86,0 (±14,2)	0,437 (±0,05)	34,3 (±4,78)
			6	1099 (±503)	1816 (±561)	84,8 (±19,6)	0,613 (±0,11)	31,1 (±3,22)
			4	955,1 (±357)	1466 (±329)	70,1 (±29,2)	0,210 (±0,09)	28,6 (±3,86)
			6	1230 (±214)	576,3 (±613)	78,2 (±25,3)	0,459 (±0,16)	29,9 (±3,56)
			8	1709 (±461)	1539 (±725)	61,8 (±19,1)	0,630 (±0,40)	31,9 (±4,98)
			10	1472 (±298)	2028 (±1434)	82,2 (±30,1)	0,420 (±0,15)	30,1 (±5,89)
	Etek	(-1)	5	558,6 (±41,1)	252,9 (±48,6)	43,0 (±8,07)	0,416 (±0,14)	42,4 (±5,11)
			4	717,1 (±219)	431,1 (±104)	69,3 (±11,9)	0,326 (±0,07)	34,4 (±4,92)
			3	967,4 (±928)	922,6 (±368)	71,7 (±32,2)	0,354 (±0,21)	31,7 (±4,35)
			6	975,9 (±476)	2535 (±818)	58,4 (±34,8)	0,186 (±0,14)	28,8 (±5,13)
			8	1135 (±289)	287,1 (±173)	55,2 (±42,6)	0,373 (±0,22)	29,2 (±6,76)
			10	880,1 (±484)	305,0 (±126)	51,9 (±33,6)	0,210 (±0,75)	36,2 (±7,48)
			14	1400 (±344)	6930 (±439)*	87,1 (±48,2)	0,525 (±0,18)	38,9 (±5,87)
428 pp	Dişi	(-1)	5	517,4 (±82,6)	279,4 (±78,4)	56,0 (±12,4)	0,198 (±0,14)	36,0 (±3,81)
			2	662,3 (±185)	279,4 (±109)	99,3 (±23,4)	0,525 (±0,07)*	34,3 (±4,33)
			4	1232 (±482)	443,7 (±108)	97,8 (±34,7)	0,515 (±0,12)	30,6 (±4,56)
			6	689,0 (±484)	2709 (±667)	81,7 (±20,3)	0,234 (±0,07)	28,3 (±6,98)
			8	1278 (±327)	396,5 (±111)	89,7 (±32,4)	0,502 (±0,23)	30,2 (±5,05)
			10	543,0 (±475)	330,9 (±68,1)	71,7 (±21,2)	0,210 (±0,18)	30,5 (±5,03)
			14	1544 (±501)	956,8 (±248)	77,3 (±43,9)	0,315 (±0,05)	21,3 (±11,1)
	E+D	(-1)	10	557,9 (±47,0)	203,8 (±45,5)	47,1 (±7,22)	0,132 (±0,09)	37,6 (±3,08)
			10	1020 (±153)	1218 (±78)	76,1 (±13,4)	0,386 (±0,05)	35,9 (±4,53)
			9	991,1 (±411)	1030 (±458)	78,3 (±16,0)	0,637 (±0,09)	26,4 (±2,63)
			6	2055 (±412)	12045 (±3806)	115 (±33,8)	0,435 (±0,11)	30,1 (±4,46)
			8	1572 (±371)	5013 (±1062)*	76,0 (±43,8)	0,653 (±0,27)	47,2 (±6,18)*
			10	-	-	-	-	-
			14	-	-	-	-	-
Etek	(-1)	5	498,6 (±41,1)	173,9 (±48,6)	40,1 (±8,07)	0,149 (±0,14)	36,0 (±5,11)	
		5	1167 (±222)	2140 (±931)	70,0 (±10,7)	0,570 (±0,06)	44,9 (±7,98)	
		4	1174 (±803)	1362 (±318)	59,9 (±27,8)	0,144 (±0,18)	29,5 (±3,77)	
		6	823,5 (±673)	777,8 (±157)	69,3 (±7,5)	0,186 (±0,20)	35,5 (±7,25)	
		8	-	-	-	-	-	
		10	-	-	-	-	-	
		14	-	-	-	-	-	
	Dişi	(-1)	5	617,3 (±82,6)	233,7 (±78,4)	54,2 (±12,4)	0,119 (±0,14)	39,4 (±3,81)
			5	873,9 (±183)	421,5 (±109)	82,1 (±23,4)	0,262 (±0,07)	27,0 (±4,33)
			4	844,5 (±373)	764,8 (±841)	93,0 (±19,1)	0,659 (±0,09)	24,0 (±3,53)
			6	2671 (±484)	17679 (±6672)*	138 (±20,3)*	0,653 (±0,07)*	27,4 (±6,98)
			8	1622 (±463)	8681 (±1578)*	89,7 (±45,8)	0,653 (±0,33)	63,8 (±7,15)*
			10	-	-	-	-	-
			14	-	-	-	-	-



Sekil 3.8.a. "LC" test grubu hayvanlarda plazma LDH aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

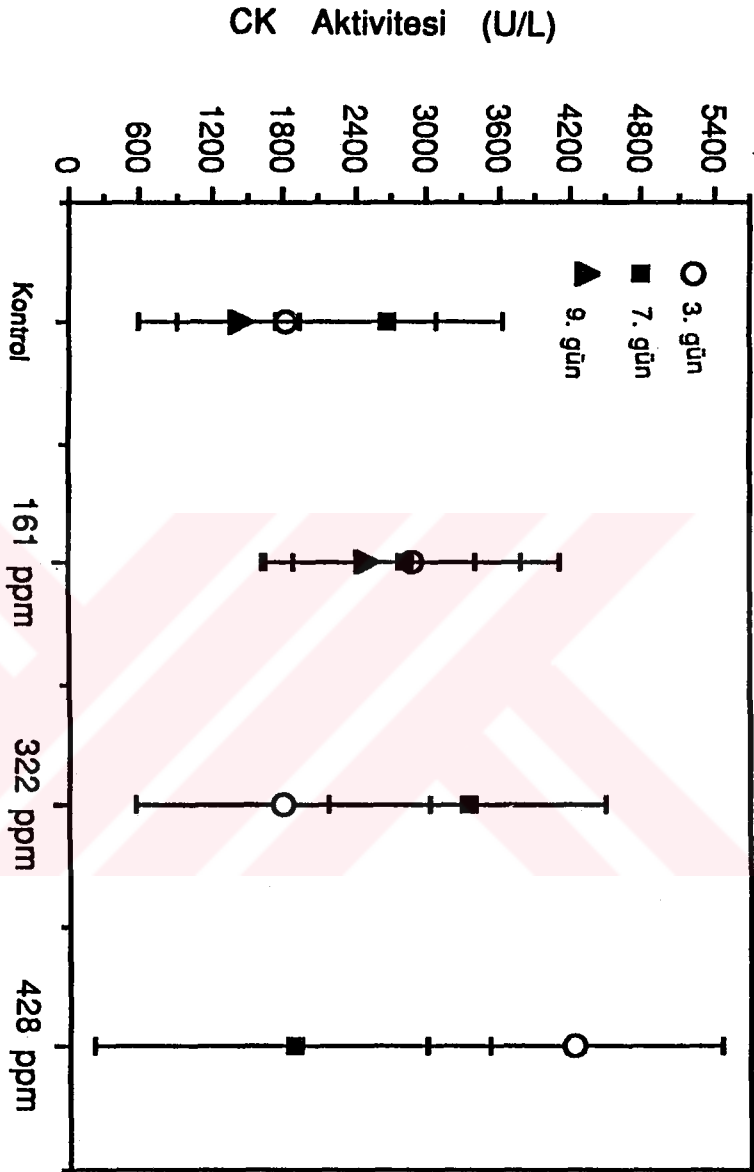


Şekil 3.8.b. "LC" test grubu erkek hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).

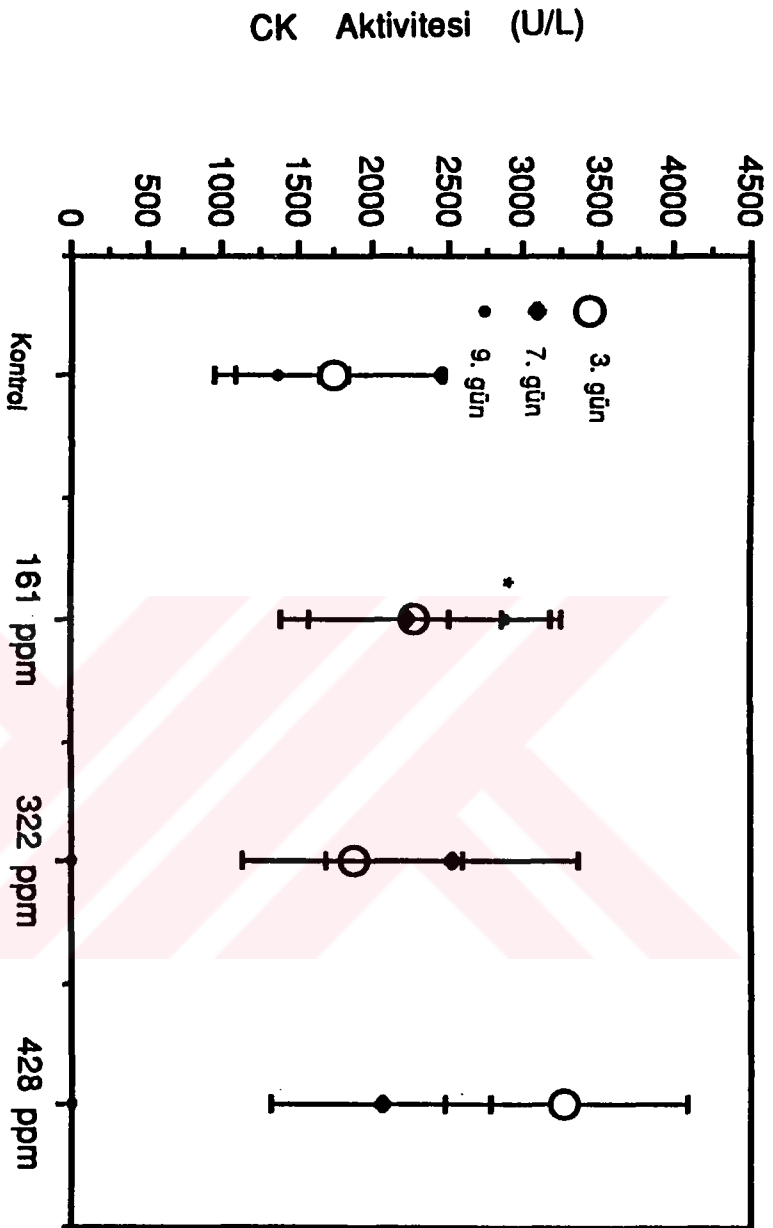


**Şekil 3.8.c. "LC" test grubu dışı hayvanlarda plazma LDH enzim aktivitesinin Gutthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.**

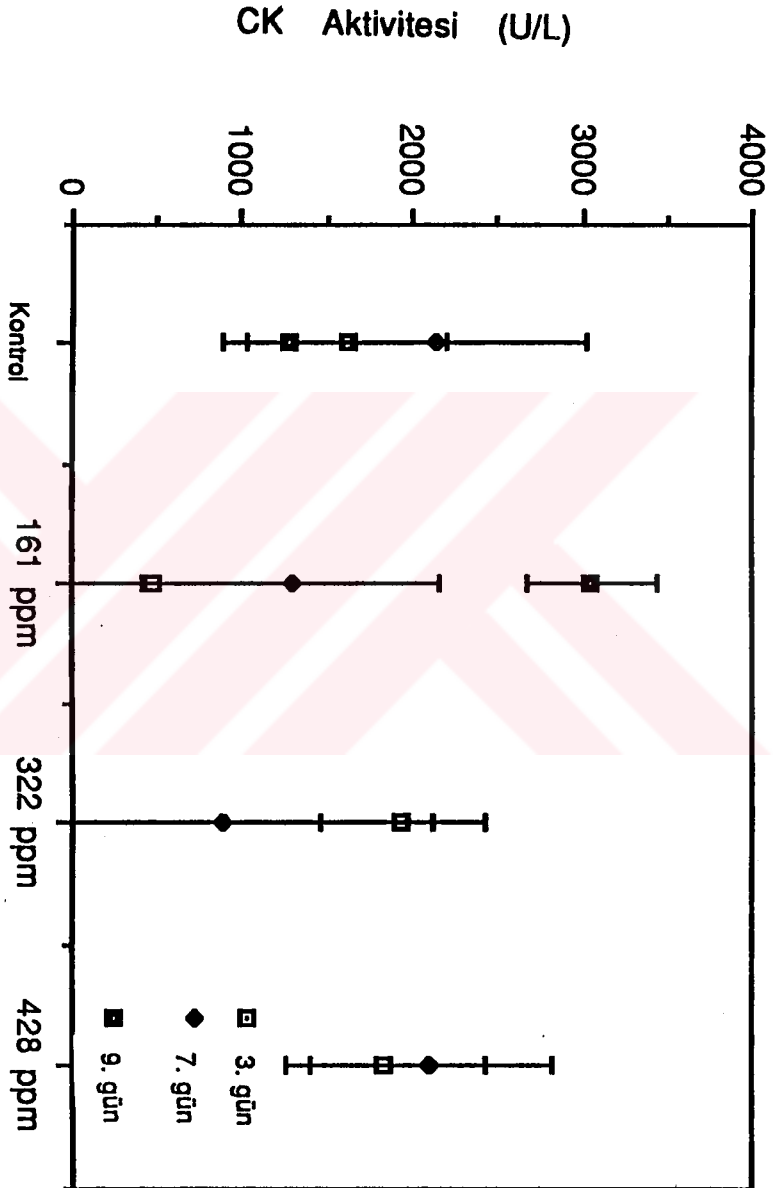




Şekil 3.9.a. "DS" test grubu hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).



Şekil 3.9.b. "DS" test grubu erkek hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

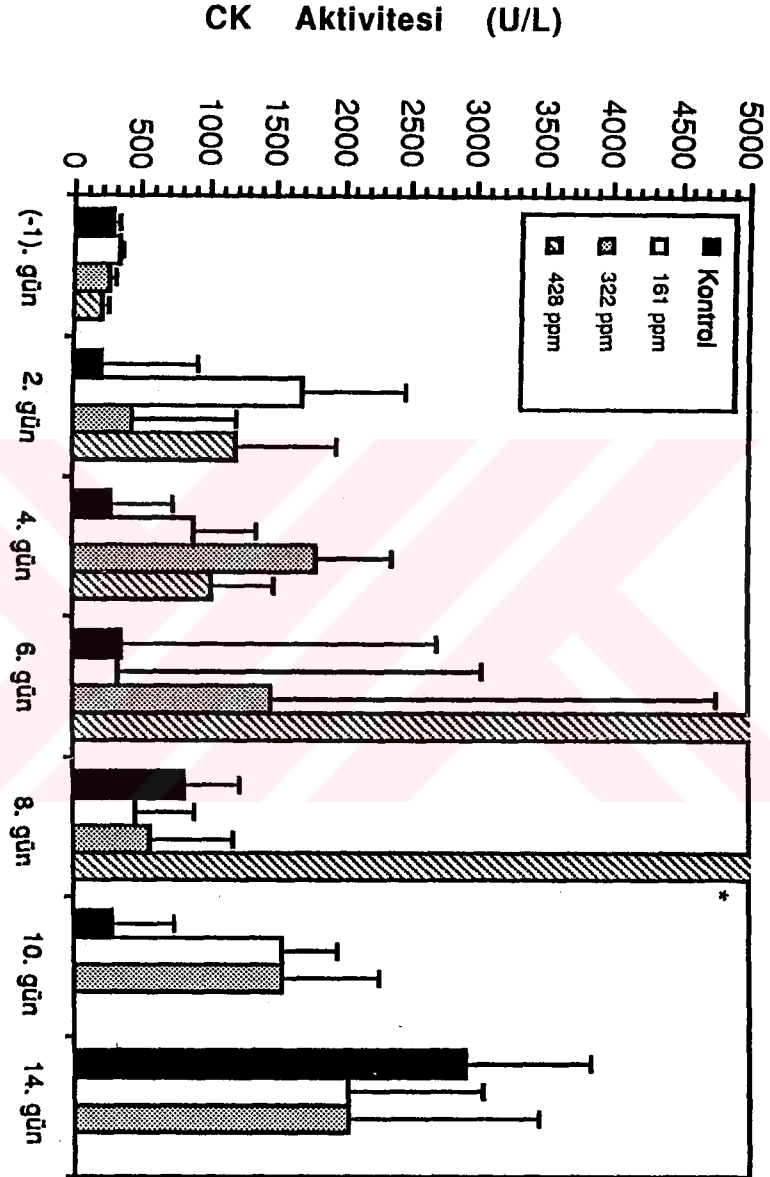


Şekil 3.9.c. "DS" test grubu dişi hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

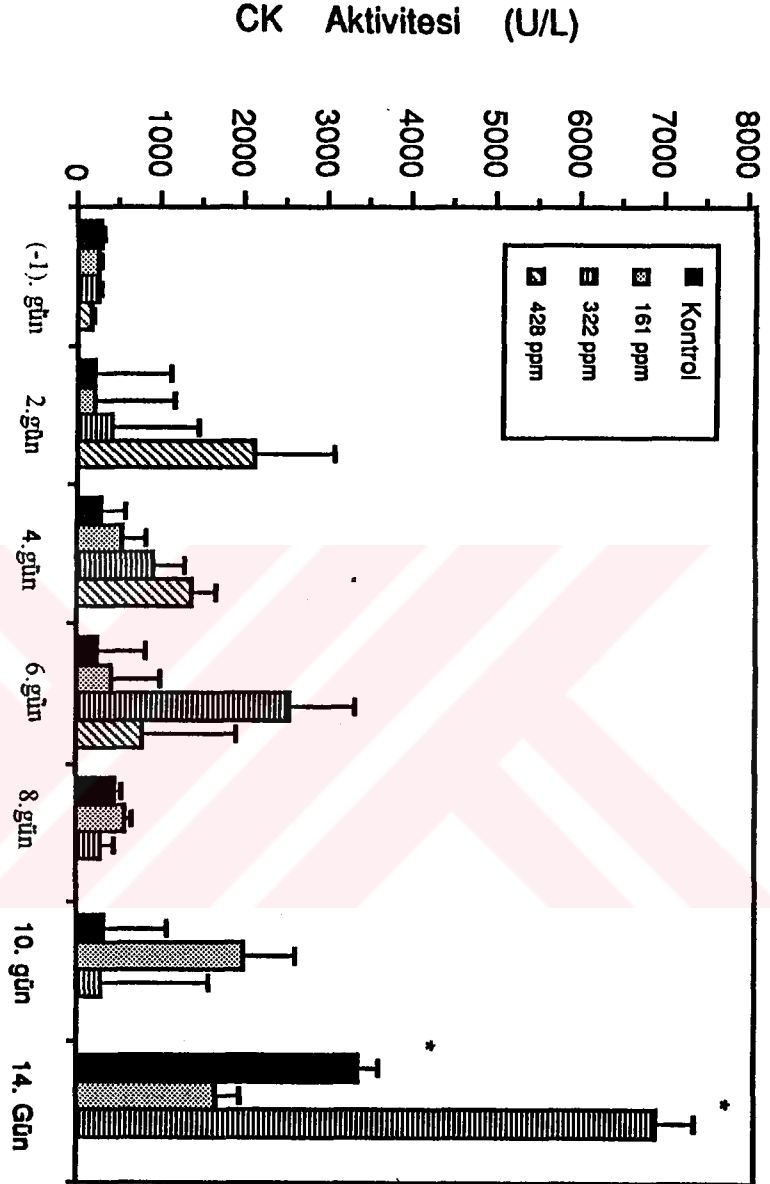
Diğer taraftan CK aktivitesi "LC" test grubu hayvanlar için kontrol grubunda 212.1-836.1 U/L aktivite gösterirken, bu değer 161 ppm uygulama grubu için 325.8-2028 U/L arasında, 322 ppm uygulaması için 266.1-2028 U/L ve 428 ppm için de 203.8-12045 U/L arasında saptandı. En yüksek enzim aktivitesi 6.günde ve 8. günde 428 ppm uygulama grubuna ait dişi hayvanlardan alınan plazma örneklerinde ve 14. günde 322 ppm için erkek hayvanlardan alınan örneklerde ölçüldü (Tablo 3.9). Enzim aktivitesinin uygulama gruplarına göre değişimini günlere bağlı olarak gösteren grafikler dişi ve erkek hayvanlar için ve her iki eşey ortalaması için Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Diğer taraftan, 322 ppm uygulama dozu için 14. günde erkeklerden alınan plazma örneklerinde, 6. ve 8. günlerde 428 ppm dozu hayvanlardan alınan örneklerde CK aktivitesinin kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artış gösterdiği ( $P \leq 0.05$ ) saptandı.

#### 3.3.4. Plazma izositrat dehidrogenaz aktivitesi bulguları

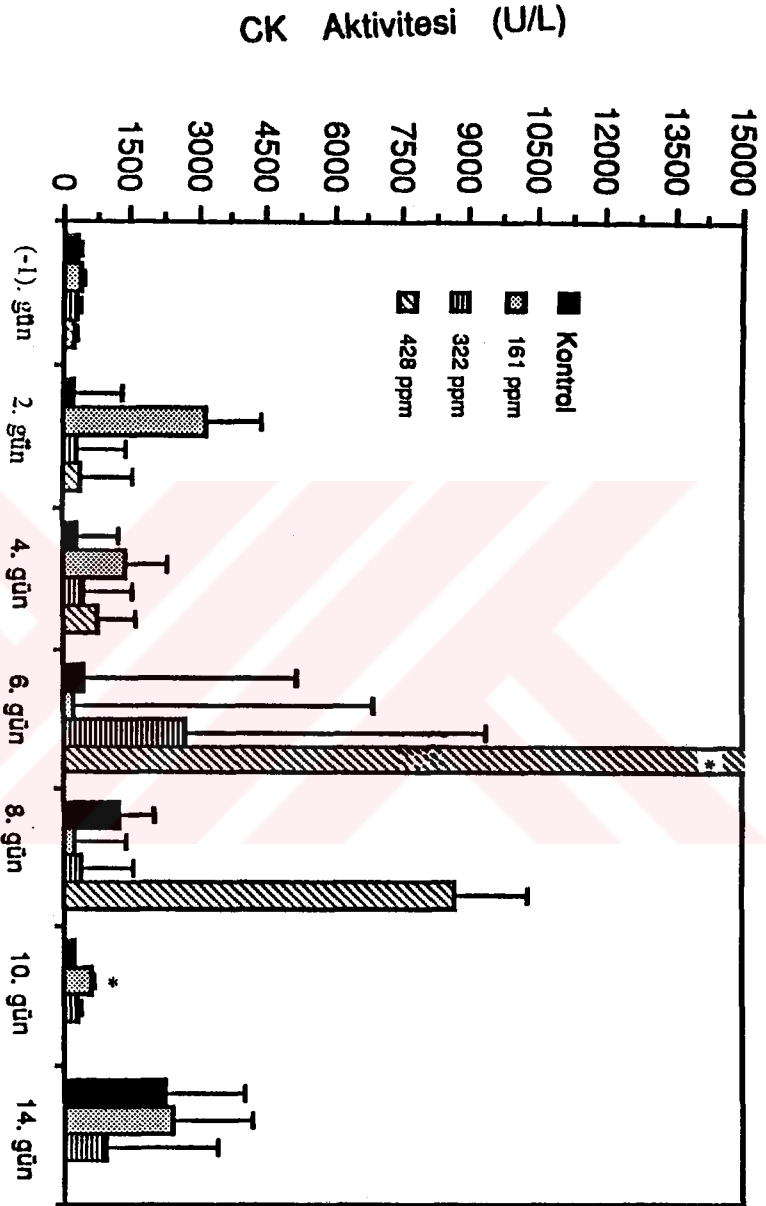
Plazma ICDH aktivitesi "DS" test grubu kontrol grubu örneklerinde 56.54-72.36 U/L olarak saptanırken, en yüksek enzim aktivitesi kontrol grubunda 9. gün dişileri için toplanan örneklerde görüldü. Uygulama gruplarında ise en yüksek enzim aktivitesi 161 ppm için 9. günde erkeklerden gelen verilerde saptanırken, 322 ppm uygulama dozunda 7. gün örneklerinde erkek hayvanlara ait verilerde ölçüldü. 428 ppm dozunda ise 3. günde erkeklere ait örneklerde enzim aktivitesinde artış kaydedildi (Tablo 3.8). 161 ppm uygulamasında 9. günde erkek hayvanlara ait aktivite de



**Şekil 3.10.a. "LC" test grubu hayvanlarda plazma CK aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ ).**



**Şekil 3.10.b. "LC" test grubu erkek hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).**



**Şekil 3.10.c. "LC" test grubu dışı hayvanlarda plazma CK enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).**

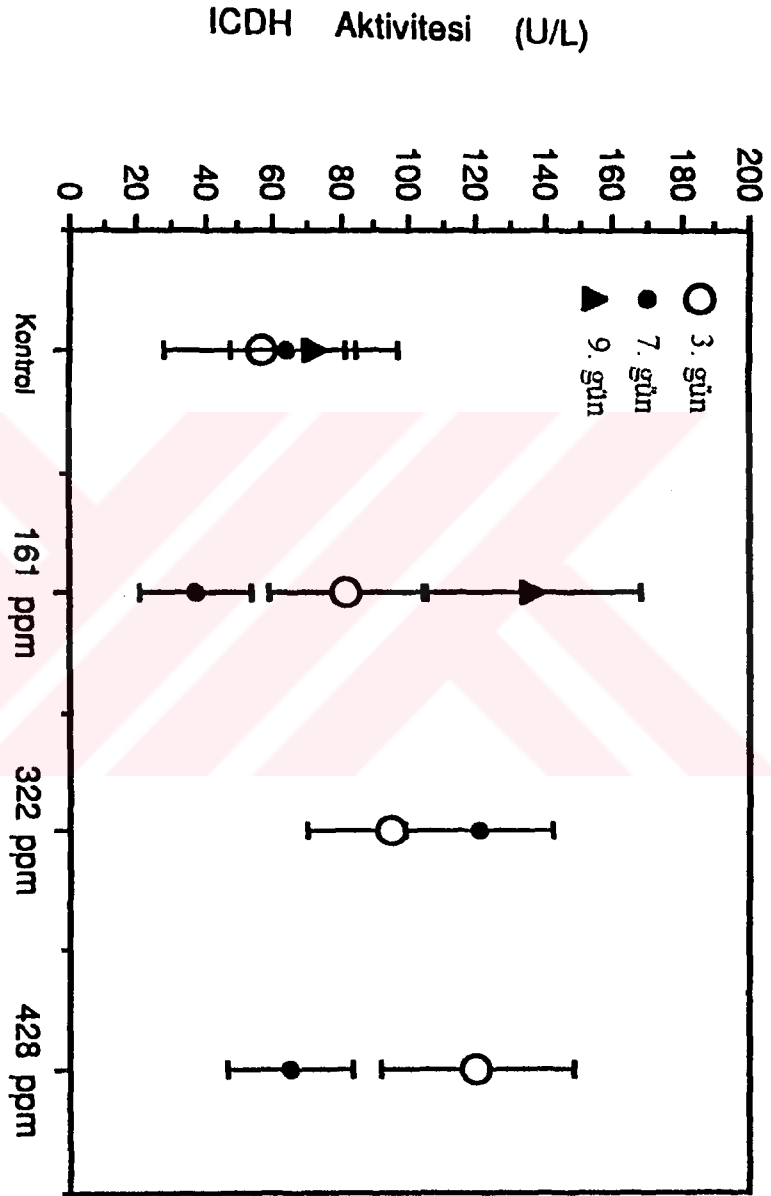
ğerleri, 322 ppm dozu için ise 7. güne ait erkek hayvanlara ait verilerde ICDH aktivitesinin kontrol grubu hayvanlara göre önemli düzeyde arttığı saptandı (  $P \leq 0.05$ ). Şekil 3.11'de ICDH enzim aktivitesinin günlere ve uygulama dozlarına bağlı olarak değişimi iki eşey için ortalama değer olarak ya da erkek ve dişi hayvanlar için ayrı ayrı grafiklerle gösterilmiştir.

ICDH enzim aktivitesinin "LC" test grubu için plazma örneklerinde yapılan spektrofotometrik ölçümleri sonucunda, 161 ppm uygulaması için erkeklerde 4. günde ve dişi hayvanlarda ise 2. günde artış gösterdiği saptanırken, 428 ppm uygulama dozunda da 6. günde dişi hayvanlardan alınan plazma örneklerinde enzim aktivitesi yüksek düzeyde bulundu (Tablo 3.9). Ancak kontrol grubu hayvanlara ait enzim aktivitesi sonuçları ile uygulama dozlarına ait sonuçların karşılaştırılması ile gruplar arasında farklılığın yalnız 428 ppm dozu için 6. günde dişilerden gelen verilerde olduğu belirlendi (  $P \leq 0.05$ ). Şekil 3.12'de ICDH enzim aktivitesinin uygulama gruplarına ve günlere bağlı olarak değişimini gösteren sonuçlar grafik olarak erkek ve dişi hayvanlar için ve her iki eşey ortalaması olarak ayrı ayrı gösterilmiştir.

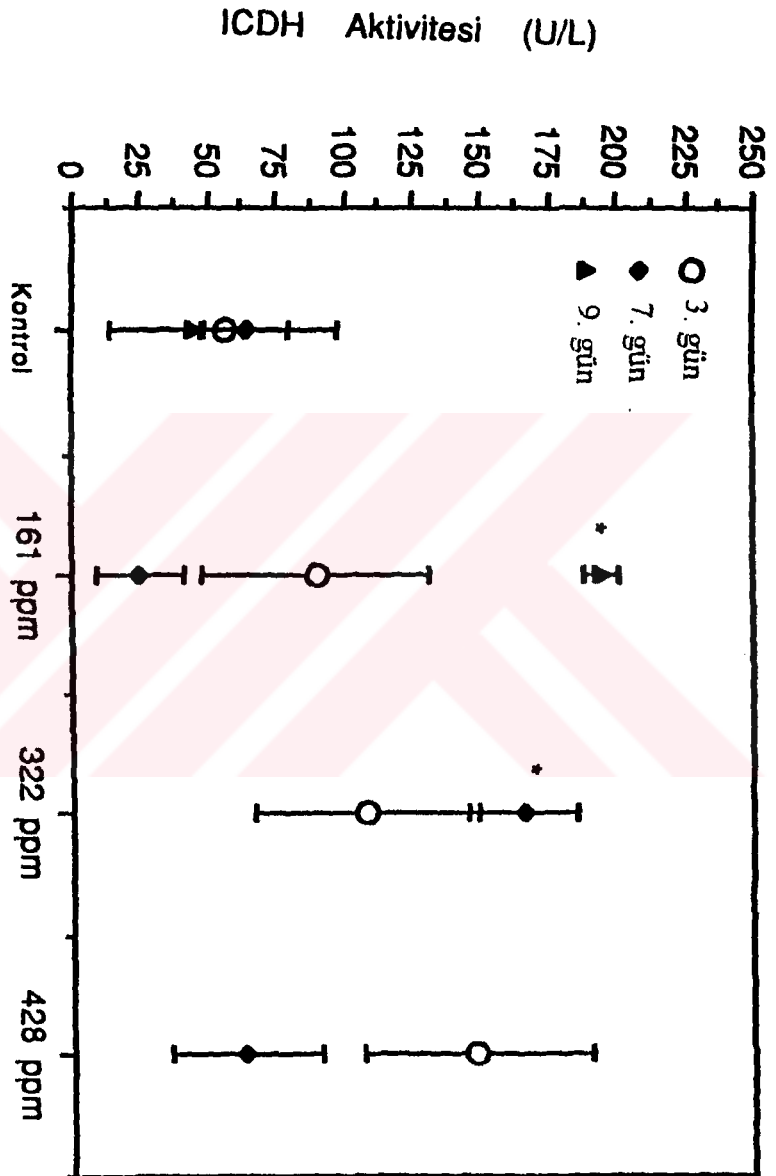
### 3.3.5. Plazma kreatinin konsantrasyonu bulguları

Yapılan veri analizi değerlendirmelerinde, plazma kreatinin düzeyinin "DS" test grubu hayvanlarda Guthion

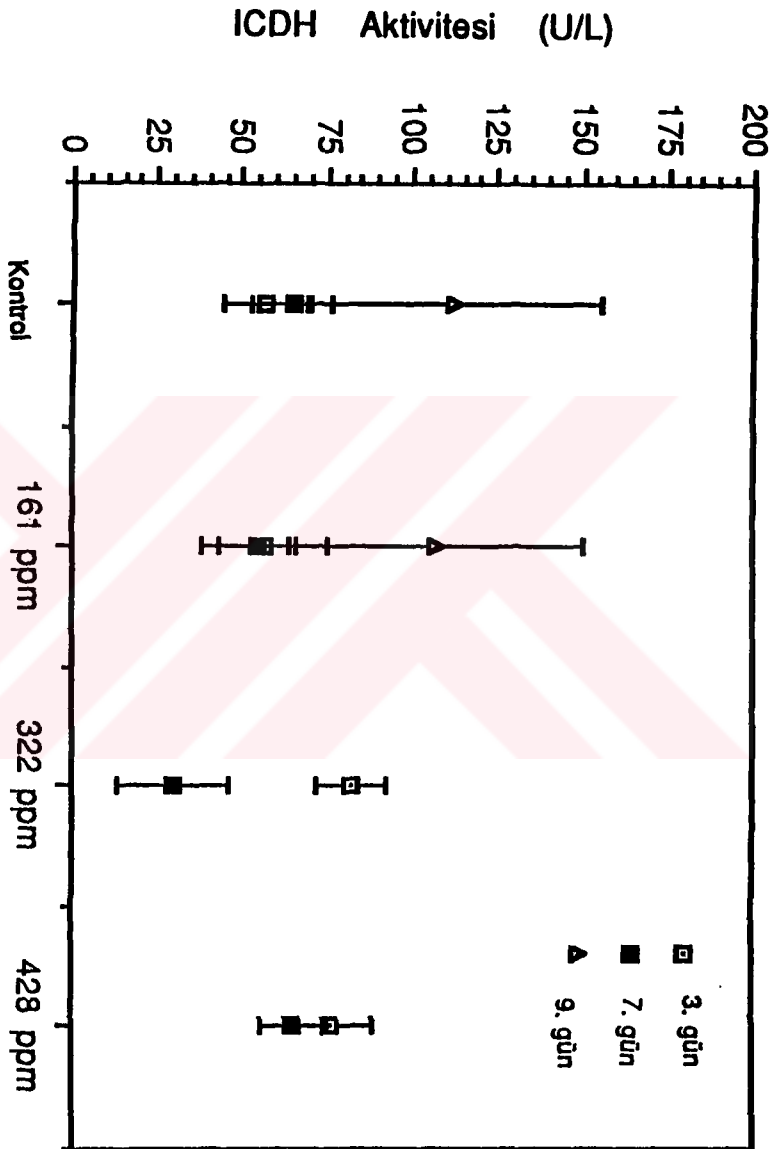




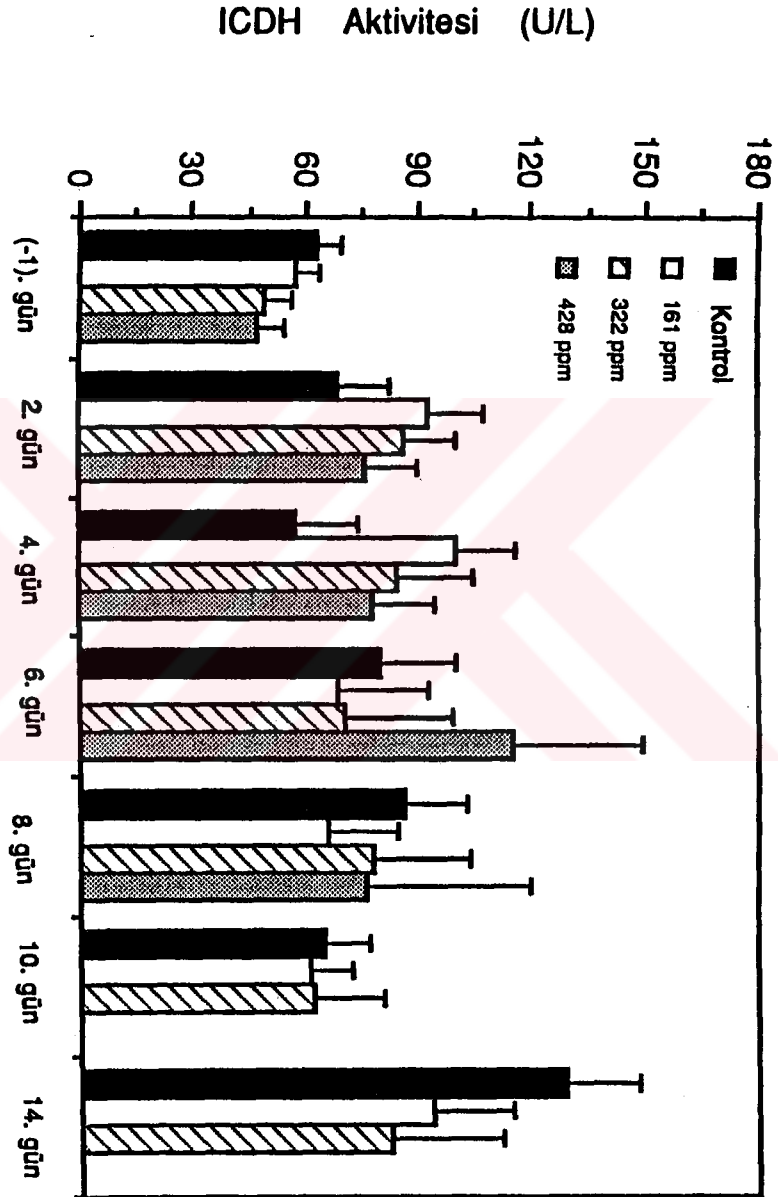
Şekil 3.11.a.. "DS" test grubu *M. carnicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Gutthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



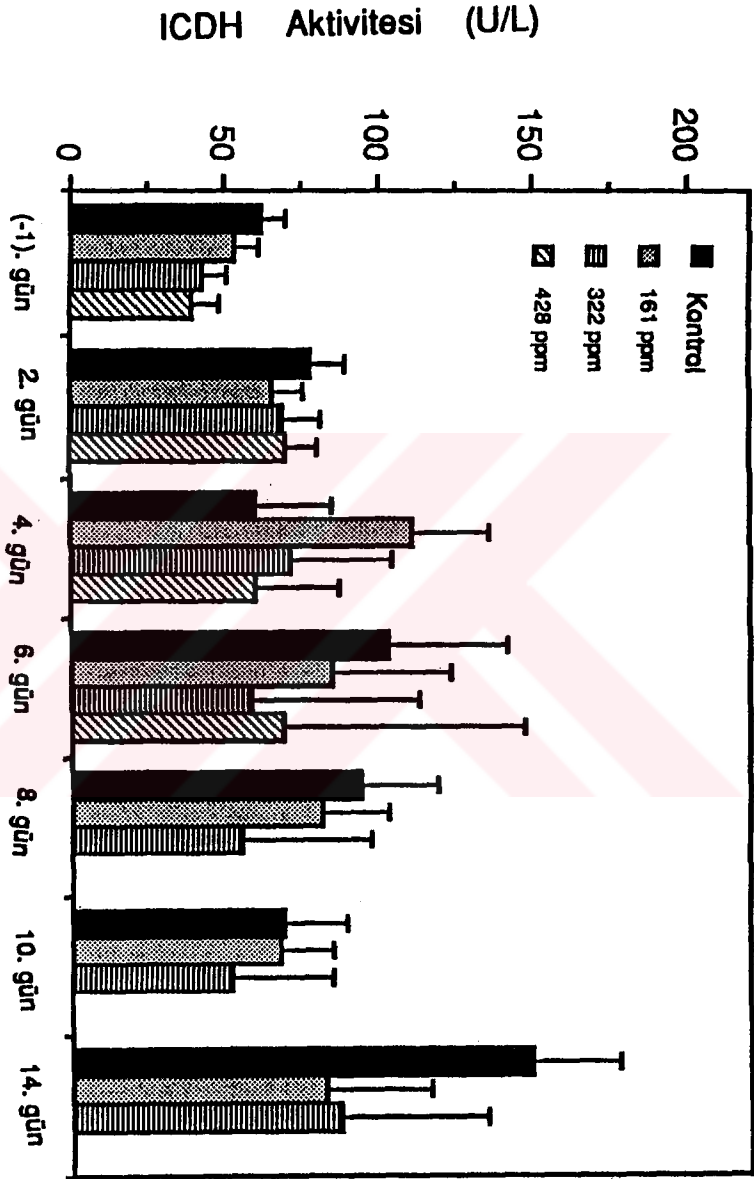
Şekil 3.11.b. "DS" test grubu erkek *M. carnicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Gudition uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).



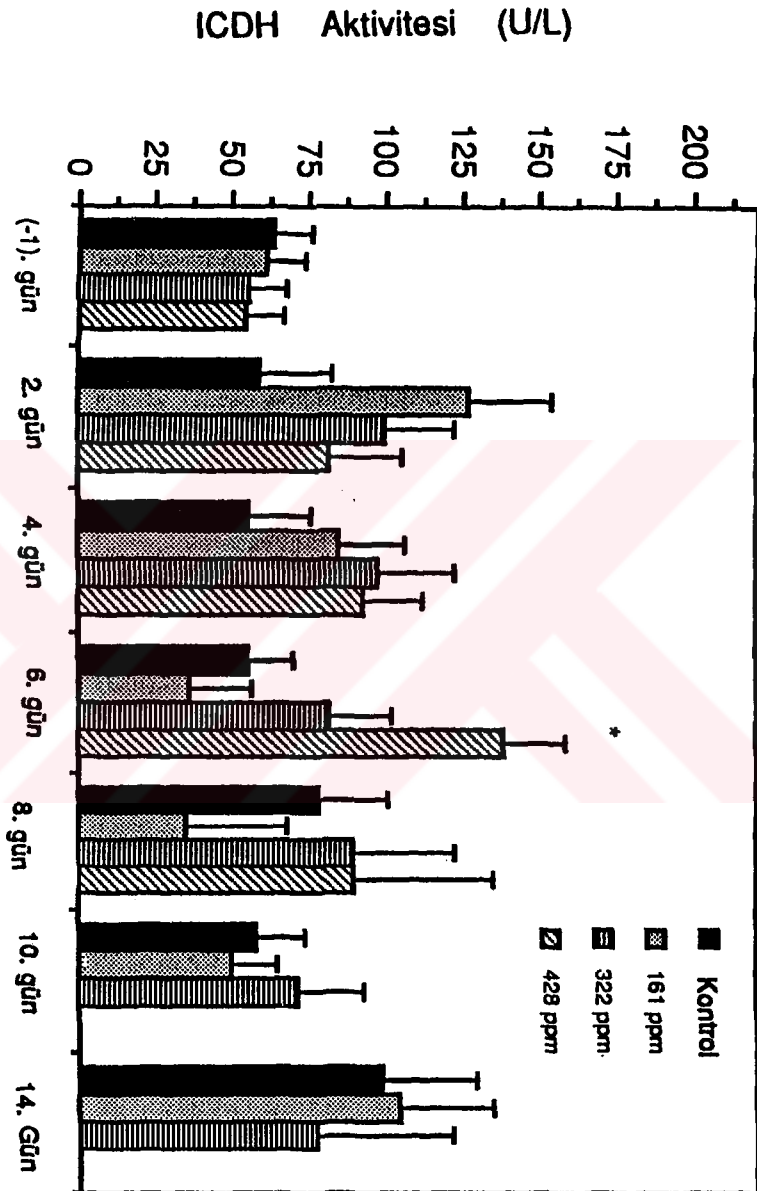
Şekil 3.11.c. "DS" test grubu dışı *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



Şekil 3.12.a. "LC" test grubu *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guttion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



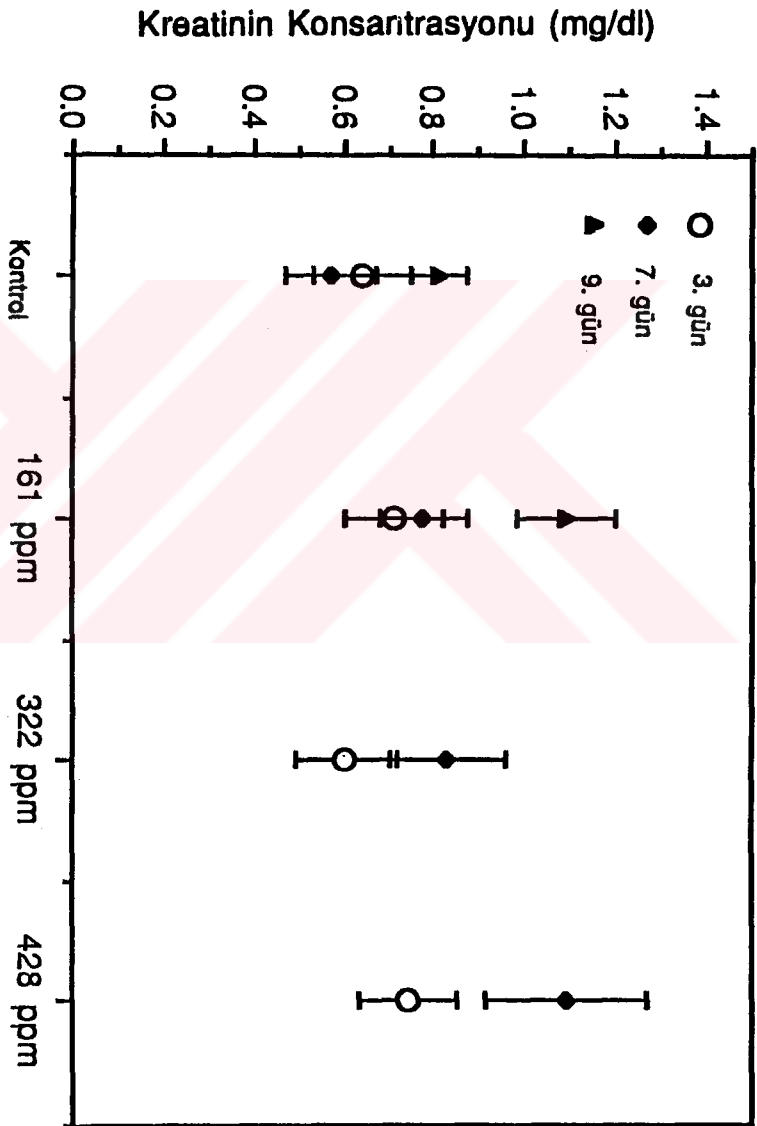
Şekil 3.12.b. "LC" test grubu erkek *M. carinicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



Şekil 3.12.c. "LC" test grubu dışı *M. canicaudus*'da plazma ICDH enzim aktivitesinin Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).

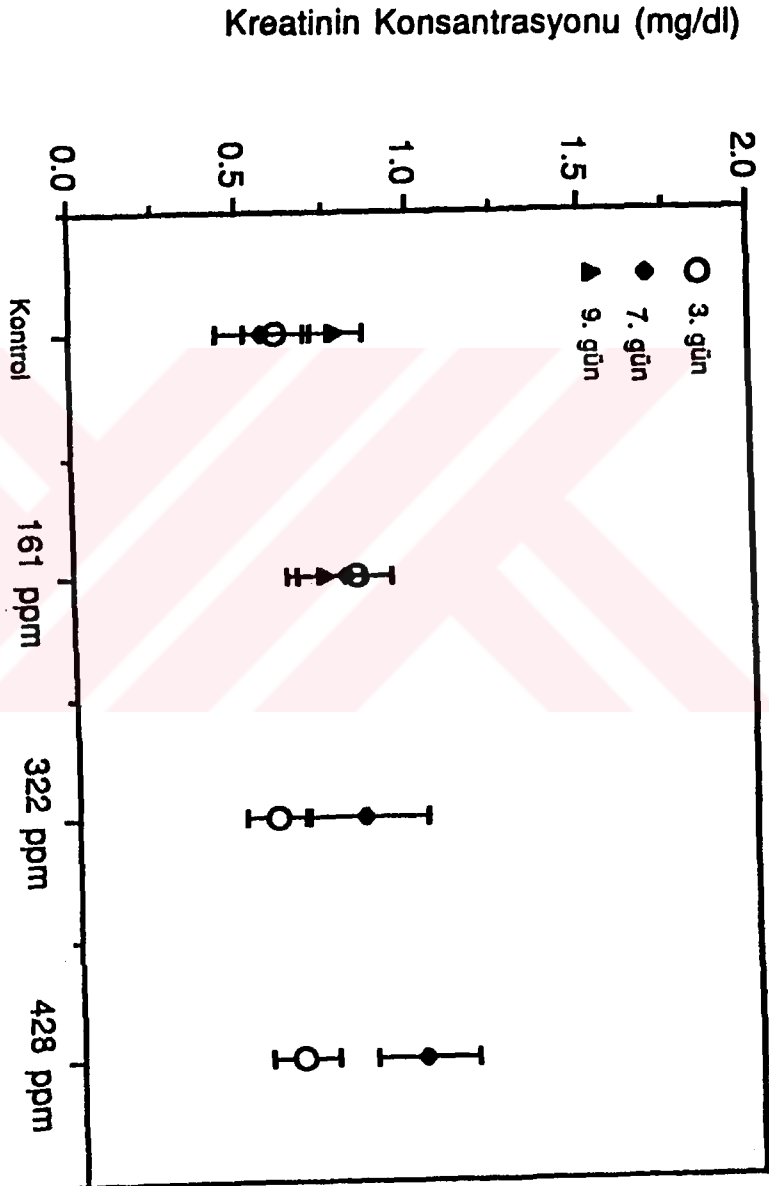
uygulamasına bağılı olarak önemli miktarda değişiklik göstermediği saptandı. Diğer taraftan kontrol grubu hayvanlar için kreatinin konsantrasyonu erkeklerde 0.640-0.813 mg/dl olarak saptanırken, dişilerde bu değerin 0.571-0.726 mg/dl olduğu bulundu. Guthion insektisiti uygulamasına bağılı olarak, en yüksek plazma kreatinin düzeyi 161 ppm uygulama dozunda 1.091 mg/dl olarak erkeklerde ve 1.194 mg/dl olarak dişi hayvanlarda saptandı. 322 ppm grubu için en yüksek konsantrasyon erkek hayvanlarda 0.831 mg/dl iken dişilerde 0.882 mg/dl olarak tesbit edildi. 428 ppm uygulama dozunda ise erkekler için en yüksek değer 1.090 mg/dl, dişi hayvanlarda 0.986 mg/dl, olarak belirlendi (Tablo 3.8). Bu test grubu için günlere bağılı olarak plazma kreatinin konsantrasyonunun insektisite maruz bırakılan ve kontrol grubu hayvanlarda değişimini ifade eden grafikler Şekil 3.13 'de gösterilmektedir.

Plazma kreatinin düzeyi "LC" test grubu dişi hayvanlarda 161 ppm uygulamasında 2. ve 8.günde, 322 ppm için 2. günde ve 428 ppm için de 6. günde önemli düzeyde artış gösterdi ( $P \leq 0.05$ ). Bu test grubunda, kontrol grubu hayvanlar için kreatinin konsantrasyonu erkeklerde 0.245-0.526 mg/dl dişilerde 0.157-0.628 mg/dl olarak saptandı. Bu değerler uygulama gruplarında ise 161 ppm için erkeklerde 0.371-0.814 mg/dl ve dişilerde 0.0-0.771 mg/dl, 322 ppm dozunda sırası ile 0.186-0.525 mg/dl ve 0.198-0.525 mg/dl, 428 ppm dozunda da 0.149-0.510 mg/dl ve 0.119-0.659 mg/dl olarak belirlendi (Tablo 3.9). Elde edilen plazma kreatinin konsantrasyonu değerlerini uygulama gruplarına ve günlere bağılı olarak gösteren grafikleri ise Şekil 3.14' de gösterilmektedir.

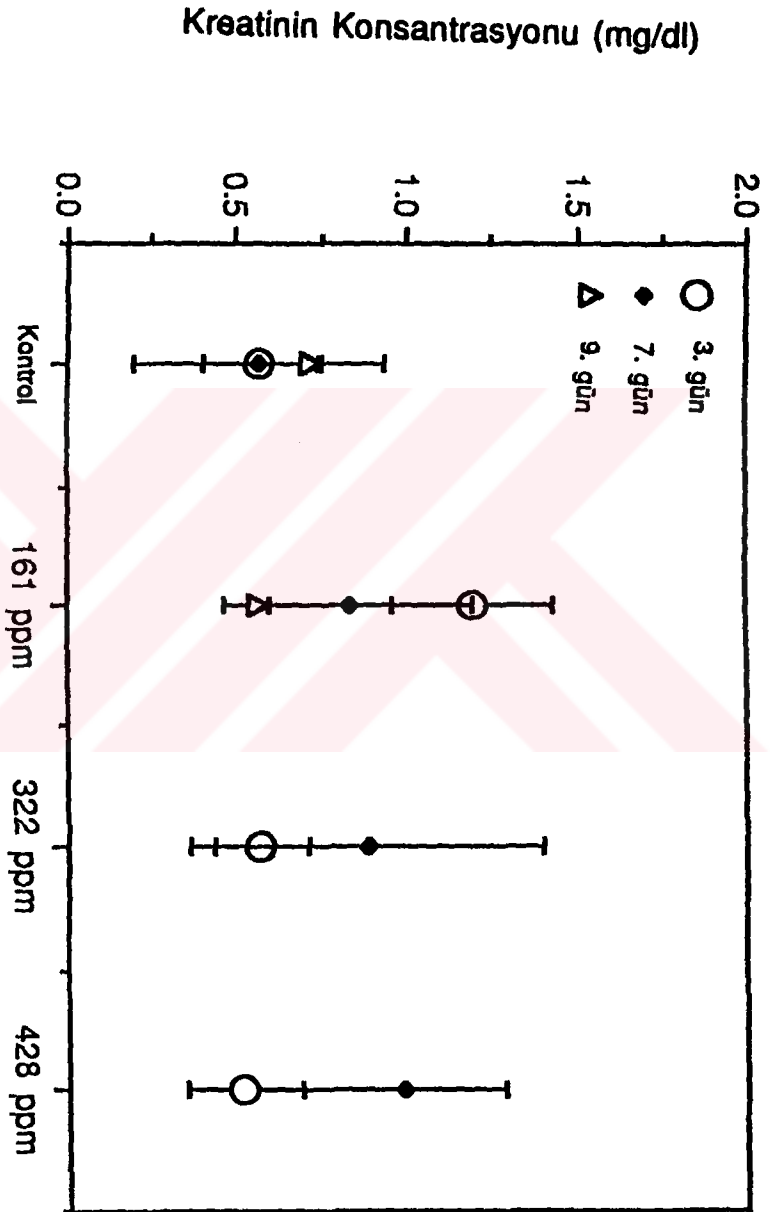


Şekil 3.13.a. "DS" test grubu *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ )



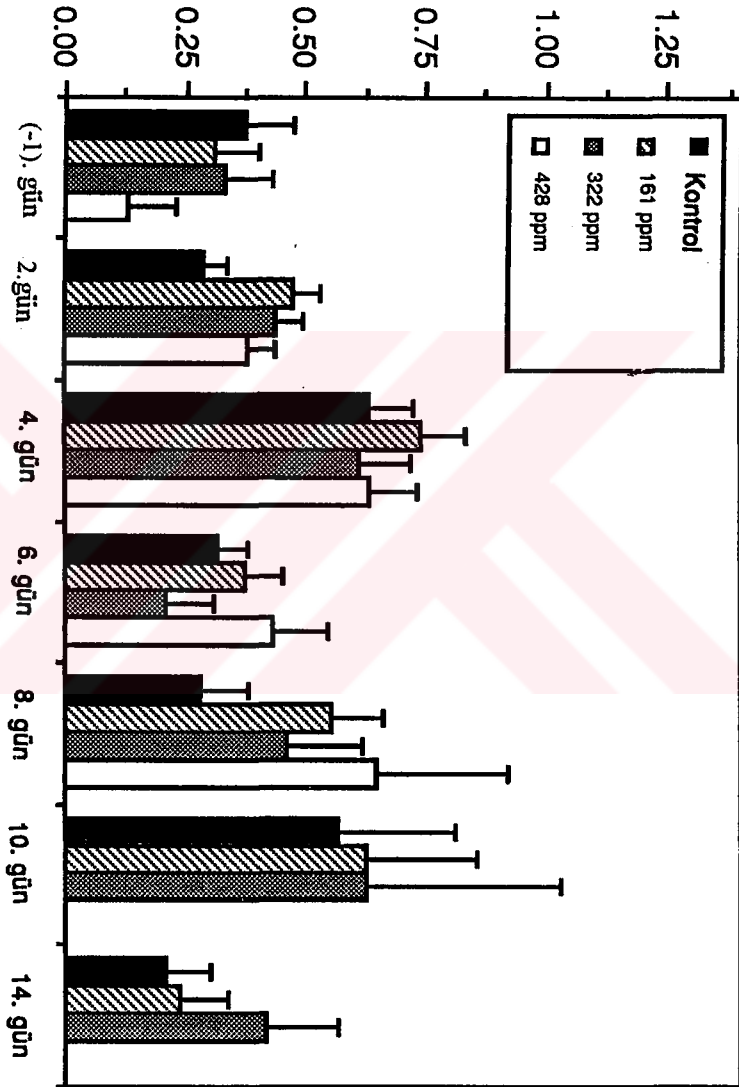


Şekil 3.13.b. "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Ürtion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

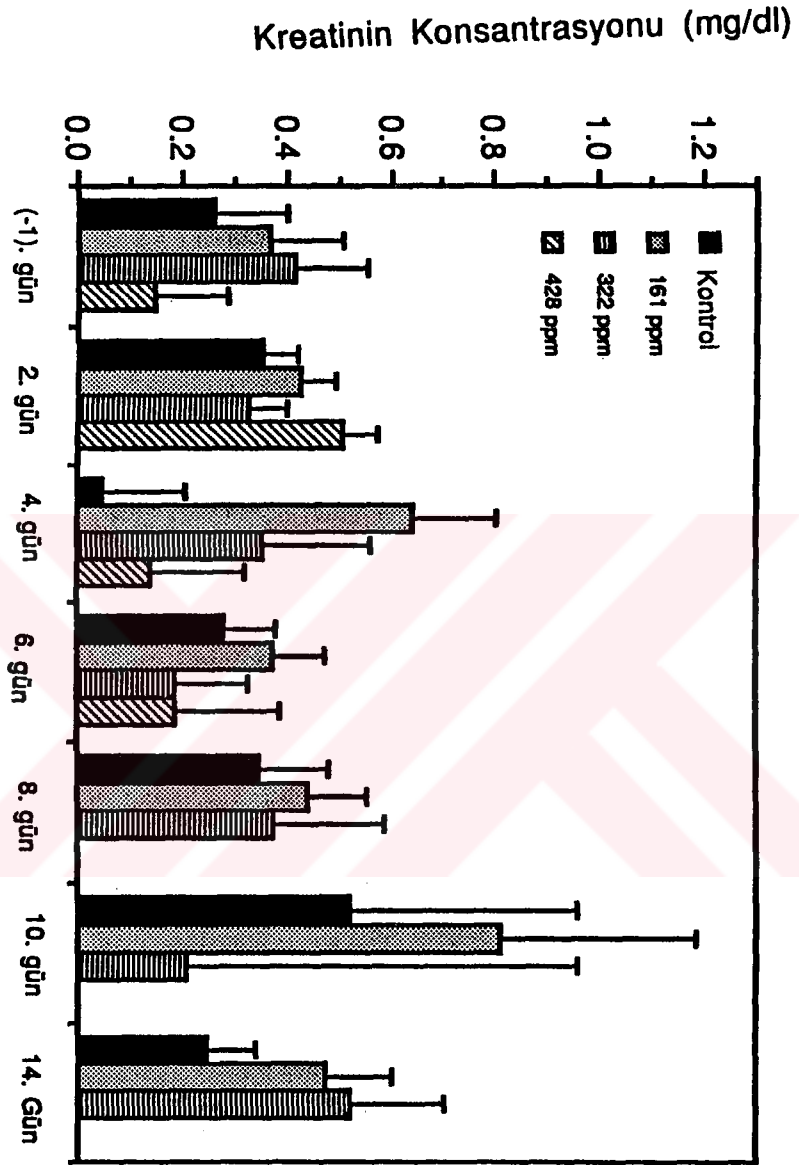


Şekil 3.13.c. "DS" test grubu dişi *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

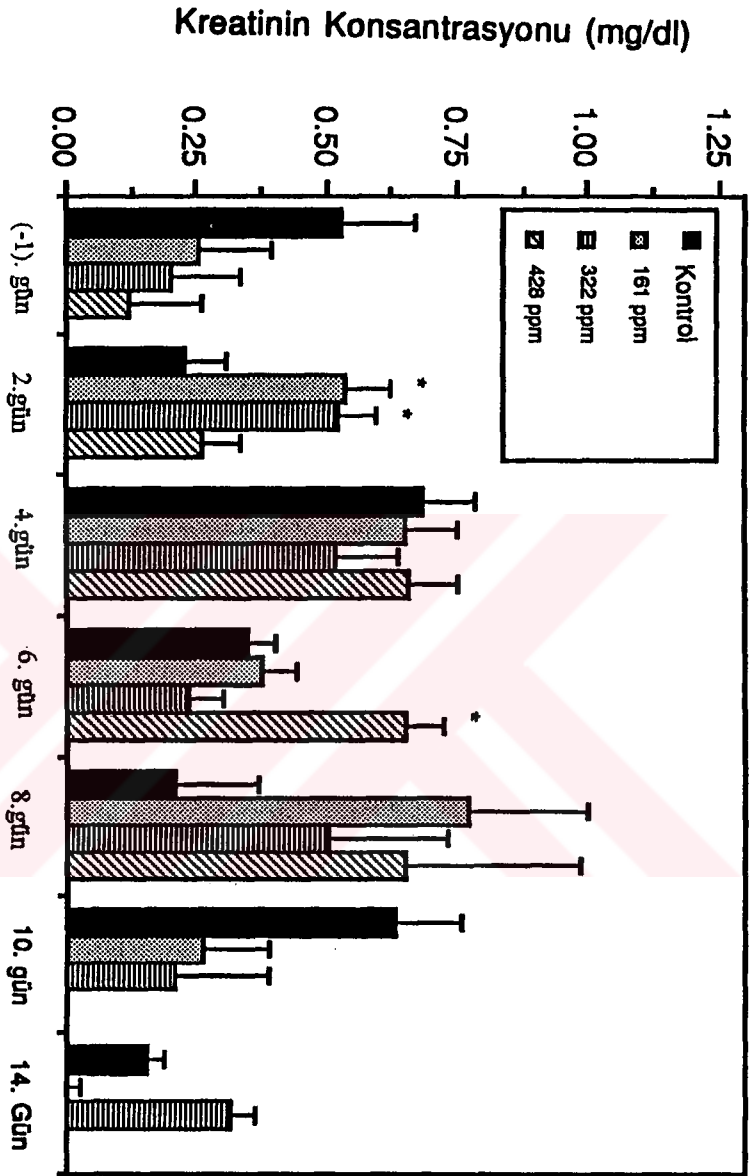
### KREATİNİN KONSANTRASYONU (mg/dL)



Şekil 3.14.a. "LC" test grubu *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Gutthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



Şekil 3.14.b. "LC" testi grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Gutition uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

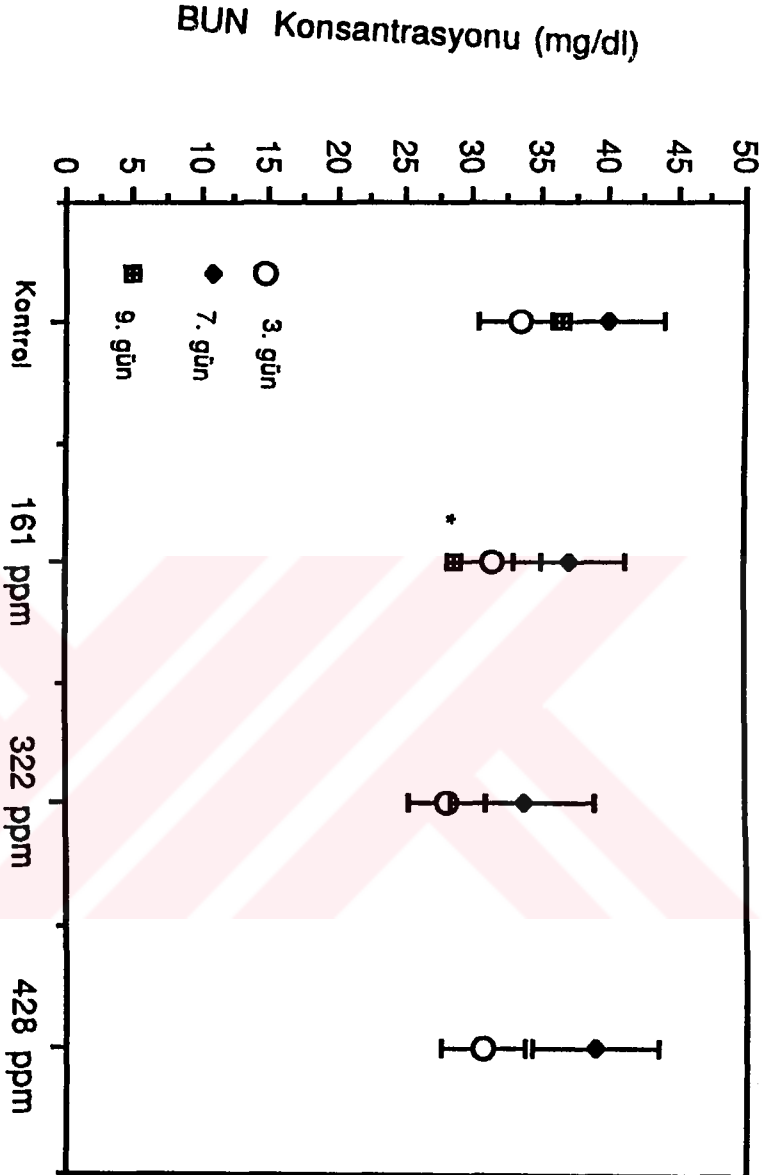


**Şekil 3.14.c. "LC" test grubu dışı *M. canicoides*'da plazma kreatinin konsantrasyonunun Gudhion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\*P < 0.05).**

### 2.3.6. Plazma kan üre nitrojeni konsantrasyonu bulguları

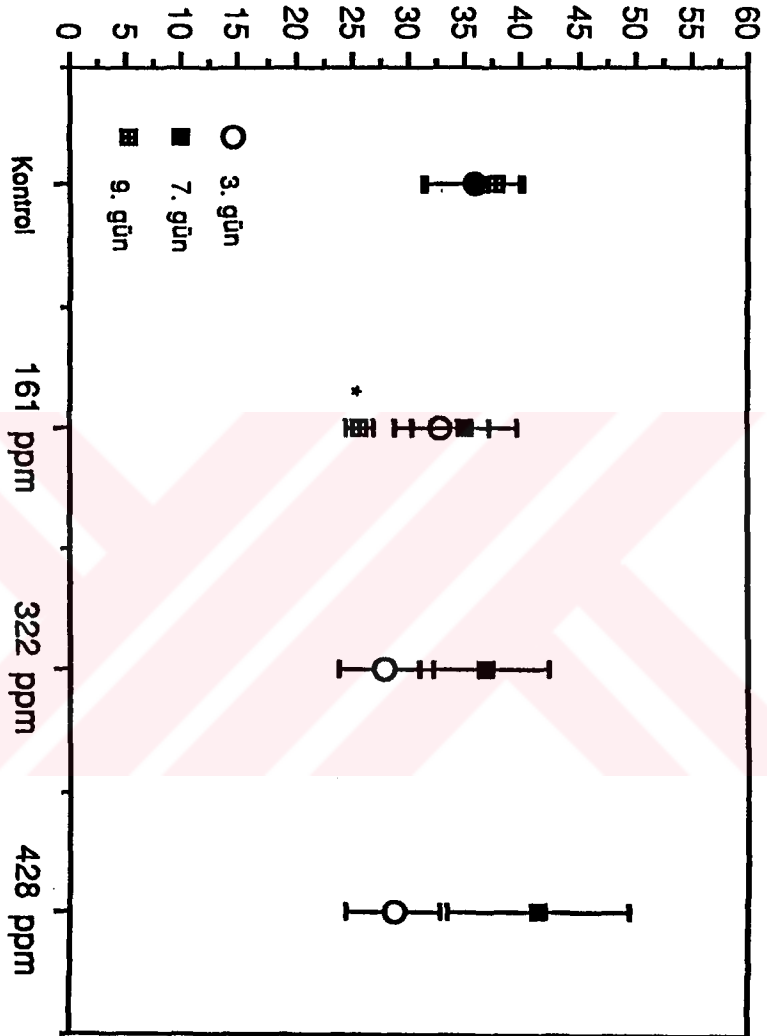
BUN miktarınının "DS" test grubu hayvanlarda değişimini saptamak amacı ile yapılan spektrofotometrik analizlerde kontrol grubu hayvanlar için, günlere bağlı olarak bu değerlerin erkek hayvanlarda 35.7-37.6 mg/dl ve dişi hayvanlarda 29.9-46.0 mg/dl arasında olduğu saptandı. Guthion insektisiti etkisine maruz kalmış hayvanlarda yapılan plazma biyokimyasal analizlerinde ise, 161 ppm dozu için BUN değeri erkeklerde 28.4-37.2 mg/dl ve dişilerde 27.8-40.6 mg/dl, olarak kaydedildi. 322 ppm ve 428 ppm Guthion uygulaması için yalnızca 3. ve 7. günlere ait plazma örneklerinde yapılan ölçümlerde, plazma BUN miktarı erkeklerde 322 ppm için 27.8-36.6 mg/dl ve 428 ppm için de 27.6-28.3 mg/dl olarak saptanırken, bu değerler dişilerde sırası ile 28.6-41.3 mg/dl ve 33.4-37.9 mg/dl olarak tesbit edildi (Tablo 3.8). Kontrol grubu ile uygulama grupları arasında insektisit uygulamasına bağlı olarak yapılan istatistiksel analizlerde ise 7. günde 161 ppm uygulaması için erkeklerde ve genel ortalama sonuçlarında plazmada BUN düzeyinin düşüşü ile ilintili olarak önemli farklılık saptandı ( $P \leq 0.05$ ). Şekil 3.15'de Guthion uygulaması ile plazma BUN konsantrasyonununun değişimi arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler günlere bağlı olarak uygulama grupları için gösterilmektedir.

"LC" test grubu hayvanlara ait plazma BUN düzeyi ile ilgili veriler Tablo 3.9'da verilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile çeşitli dozlarda Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenen hayvanlarda BUN miktarı değişimleri karşılaştırıldığında, 428 ppm uygulama dozu için 8. günde di



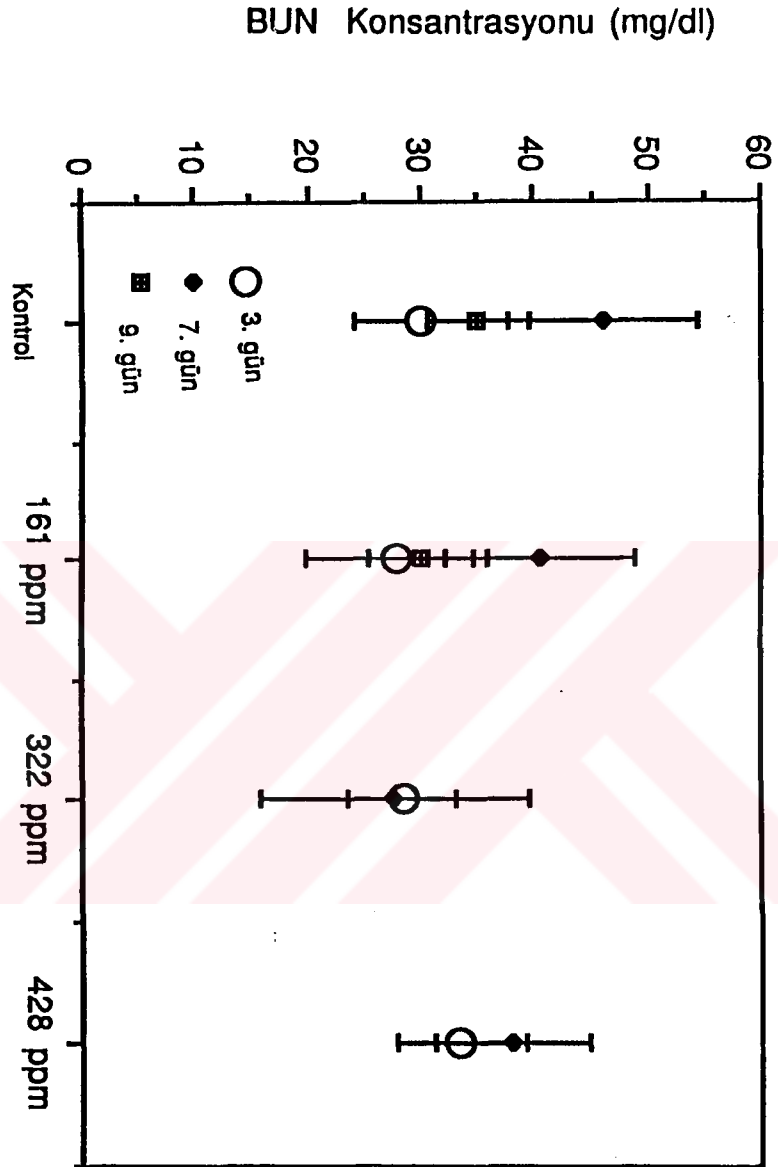
Şekil 3.15.a. "DS" test grubu *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Gutthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ ).

## BUN Konsantrasyonu (mg/dl)



Şekil 3.15.b. "DS" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ ).

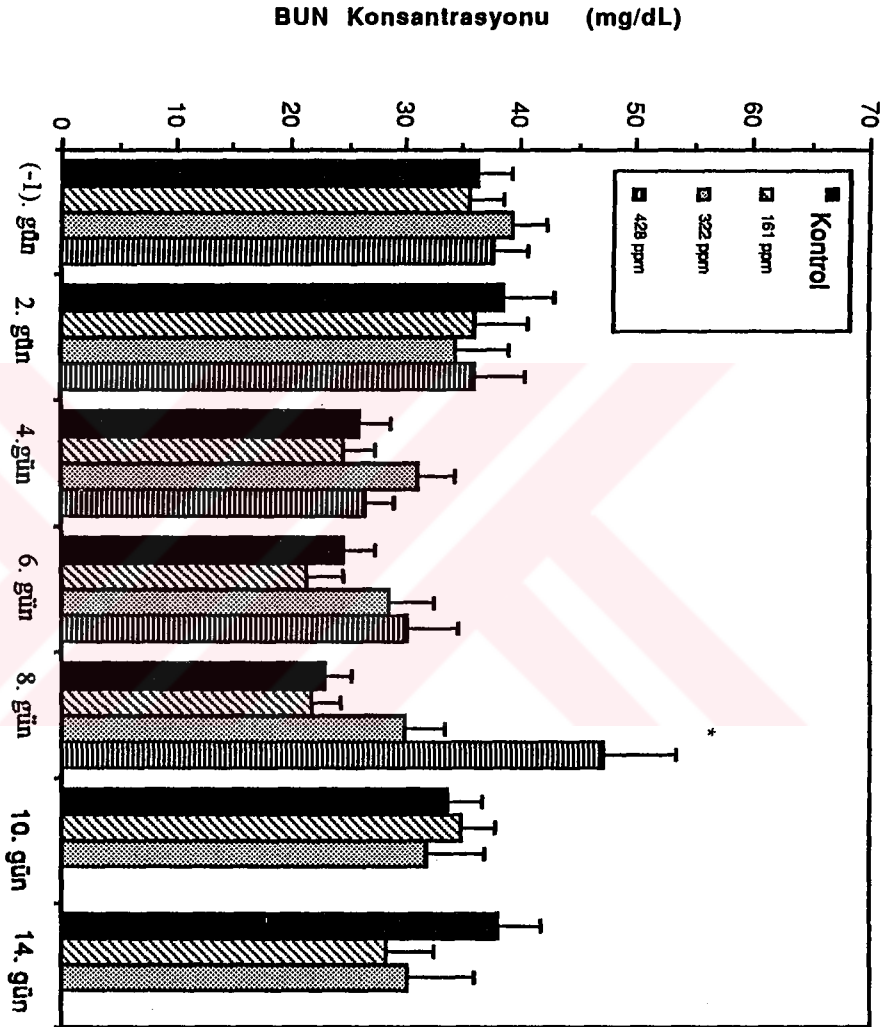




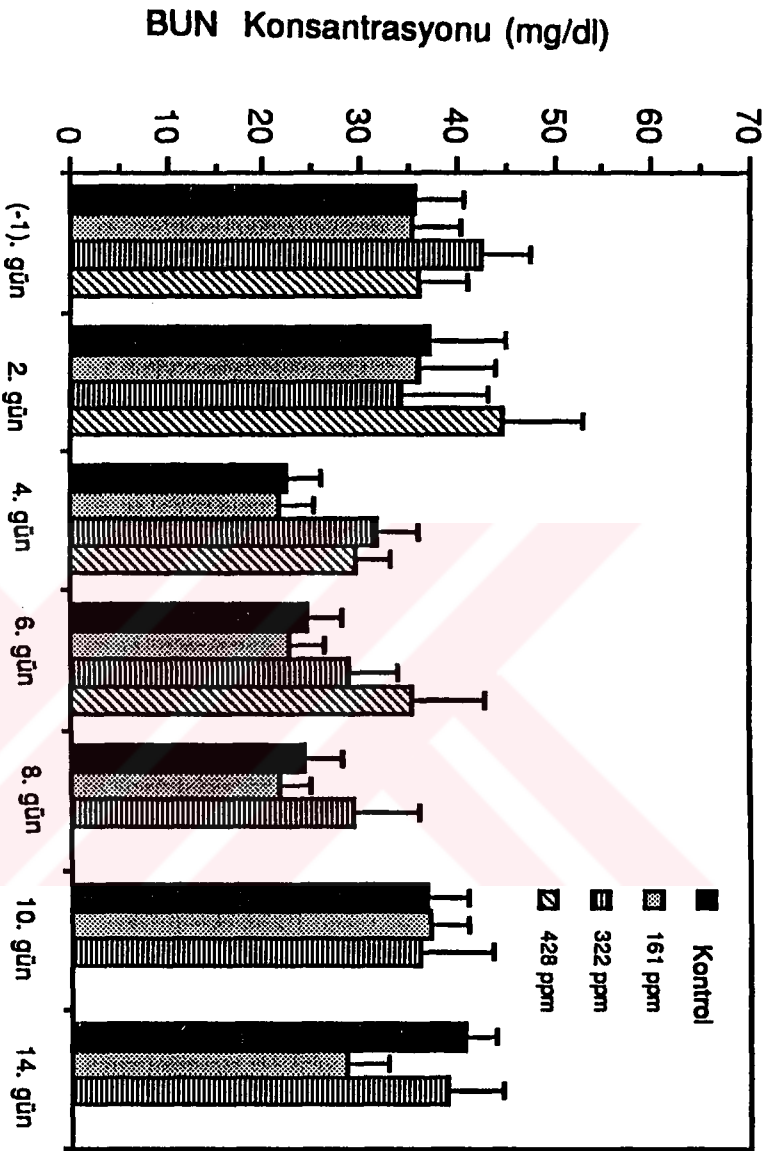
Şekil 3.15.c. "DS" test grubu dışı *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.

Ői hayvanlarda bu madde miktarının plazma düzeyinin önemli ölçüde artış gösterdiği görülmüştür ( $P \leq 0.05$ ). Buna bağlı olarak, aynı doz grubu için genel ortalama verilerinde de farklılık önemlidir ( $P \leq 0.05$ ). Buna karşın kontrol grubu ile diğer uygulama gruplarında plazma BUN düzeyinin günlere bağlı olarak değişim değerlerinin benzer olduğu saptandı. Çeşitli dozlarda Guthion insektisiti uygulaması ile BUN düzeyinin günlere bağlı değişimini gösteren grafikler Şekil 3.16 'da gösterilmiştir.

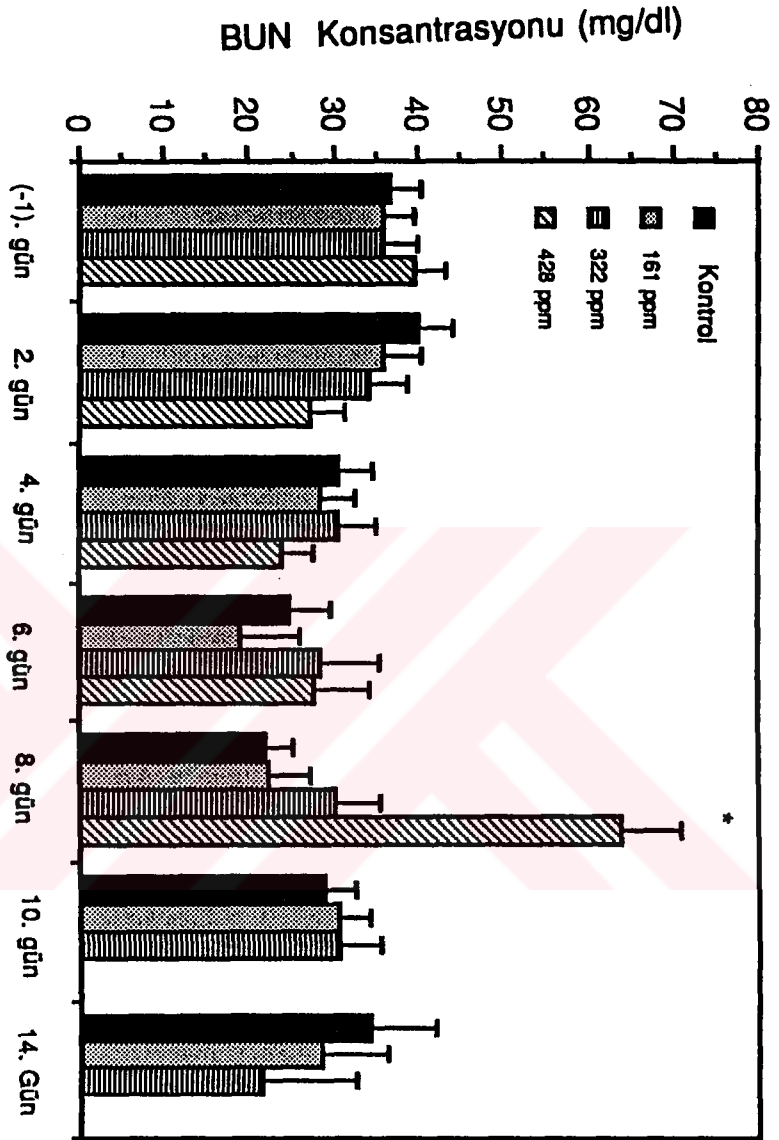




Şekil 3.16.a. "LC" testi grubu *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Gutthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ ).



Şekil 3.16.b. "LC" test grubu erkek *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi.



Şekil 3.16.c. "LC" test grubu dışı *M. canicaudus*'da plazma BUN konsantrasyonunun Guthion uygulaması ile günlere bağlı olarak değişimi (\* $P < 0.05$ ).

#### 4. TARTIŞMA

Çalışmalar farklı iki deney grubu olarak planlanmış ve bu iki grup için elde edilen veriler birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Araştırmayı oluşturan "Disseksiyon" test grubu ve "Letal Konsantrasyon" test grubu temelde birbirinin destekleyicisidir ve aynı insektisit konsantrasyonlarını kapsamaktadır. Ancak bu test grupları deneysel aşamalardaki uygulama farklılıkları ile birbirinden ayrılık göstermiştir. Her iki test grubu içinde hayvanlara uygulanacak insektisit konsantrasyonlarının belirlenmesinde daha önceki deneylerde *Microtus canicaudus* için belirlenen (Meyers ve Wolff, 1993) letal konsantrasyon dozu ile, bundan daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonlar kullanılmasına karşın, bu araştırma ile letal konsantrasyon dozunun belirlenmesi amaçlanmamıştır. Araştırmada oluşturulan test gruplarından birisi olan "LC" test grubu EPA (1990) tarafından önerilen test sistemine uygun olarak planlanmasına karşın, bazı yönlerden önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin, çeşitli biyobelirteçlerin test edilmesi amacı ile, periyodik olarak hayvanlardan kan örneklerinin alınması ve bu işlemin hayvan canlı kaldığı sürece sürdürülmesi "LC" test grubunu, gerek "DS" test grubundan ve gerekse standart "LC" test sistemlerinden ayıran önemli bir ayrıcalıktır. Bu grup hayvanları "DS" test grubundan ayıran önemli bir başka farklılık da bu hayvanlar için kan alma işlemi esnasında bir anesteziğin kullanılmasıdır. Bu madde, hayvanlar üzerinde periyodik kan alma işlemine bağlı olarak ortaya çıkabilecek

olası stres etkisini azaltmak amacı ile, bu araştırmada kullanıldı. Ancak bu kimyasalın hayvanlar üzerindeki diğer yan etkileri değerlendirme kapsamına alınmadı. Buna karşın, kan örnekleri alınan denekler kafeslerinde bir saat süre ile gözlem altında tutularak, kan alma işleminden sonraki ilk bir saat içerisinde ortaya çıkan ölümlerin narkoz etkeni ile de olabileceği gözönüne alındı.

Öte yandan, araştırmanın ikinci temel grubunu oluşturan "DS" test grubunda tesadüfi olarak seçilen hayvanların 3., 7. ya da 9. günlerde disseksiyonu planlandı. Böylece disseksiyon günlerinde her uygulama grubundan 5 hayvanın dissekte edilmesi amaçlandı. Ancak, insektisit uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan ölümler nedeni ile, ilerleyen günlerde özellikle 322 ppm ve 428 ppm dozlarından planlanan sayıda hayvan disseksiyonu yapılamadı. "DS" test grubu hayvanların disseksiyonu ile, insektisit uygulamasının farklı günlerinde alınan doku ya da plazma örneklerinde biyobelirteçlerin çalışılması amaçlandı. Bu grup hayvanları deneysel olarak "LC" test grubundan ayıran en belirgin farklılık ise kan örneklerinin yalnızca hayvanların disseksiyonu yapılacağı sırada alınmasıdır.

Bu araştırmada çeşitli biyokimyasal, fizyolojik ve toksikolojik kriterlerin biyobelirteç olarak kullanılması ile insektisit etkisine bağlı olarak hayvanların sağlık durumlarında ortaya çıkan değişimlerin farklı günlerde saptanması amaçlanmıştır. Daha önceki yıllarda gerek birçok OP ve karbamat insektisitinin gerekse özgül olarak Guthion'un çeşitli vertebrat türlerine etkileri konusunda araştırmalar bulunmaktadır. Ancak bu araştırmalarda ağırlıklı olarak insektisitlerin AChE enzimi inhibisyonu ile ilişkisi üzerinde durulduğu görülmektedir. Çeşitli araştı

rıcılar Guthion ya da diğer OP insektisitlere maruz kalan hayvanlarda (özellikle kuş, balık ve memeliler) hücrenel toksisiteye bağlı olarak, bazı biyolojik kriterleri de değerlendirmişlerdir. Ancak yapılan literatür incelemeleri ile, bu çalışmada kullanılan biyobelirteçlerin bir kısmının Guthion ile ilişkisinin çalışıldığına dair bir veri bulunamamıştır.

Araştırmada toksikolojik biyobelirteçler olarak vücut ağırlığı değişimi, besin ve su tüketimi bulguları değerlendirilirken, fizyolojik veriler olarak kan akyuvar farklılaşması ve hematokrit değerleri üzerinde duruldu. Biyokimyasal çalışmalarda ise çeşitli enzim aktivitesi ve non-enzimatik biyobelirteçler incelendi. Bu amaçla beyin asetilkolinesteraz, plazma laktat dehidrogenaz, kreatin kinaz ve izositrat dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile plazma kreatinin ve kan üre nitrojeni değerleri belirlendi. Böylece OP insektisit ile maruz kalan hayvanlarda ölüm ya da hayvanın sağlık durumunun bozulmasına neden olan başlıca etmenin AChE enzim inhibisyonu mu olduğu, yoksa başkaca faktörlerinde etken olup olamayacağı incelendi. Diğer taraftan, bu araştırmanın önemli özelliklerinden birisi, klinikte ELISA gibi özel immunolojik testlerde kullanılan mikropate okuyucu sistemin biyokimyasal analizlerde enzim aktivitesi ve non-enzimatik parametrelerin spektrofotometrik tayini için modifiye edilmesidir. Bu test sistemi son yıllarda biyokimyasal ve sitotoksikolojik araştırmalar için yaygın olarak laboratuvar araştırmalarına sokulmaya başlanmıştır (Silber vd., 1986; Brogdon ve Barber, 1987; Moores vd., 1988; Molecular Devices, 1988; Grant vd., 1989; Molecular Devices, 1990).

Deneysel çalışmalarda hayvanlardan toplanan plazma



örneklerinde çok sayıda biyobelirtecin çalışılması amaçlandı. Ancak her defasında hayvanlardan toplanan plazma örneklerinin sınırlı oluşu (yaklaşık 75-100  $\mu$ L), araştırmanın önemli güçlüklerinden birisi olarak karşımıza çıktı. Bu durumun telafisi ve herbir plazma örneğinde çok sayıda biyobelirtecin çalışılması için mikropate okuyucunun kullanılması bu açıdan avantaj sağladı. Bunun yanı sıra, mikropate okuyucu sistemi ile birlikte kullanılan 96-çukurlu mikropate plakları aynı anda çok sayıda örneğin spektrofotometrik analizine olanak sağladığından, deneysel aşamada uygulama açısından da bir standardizasyon sağlanmasını olanaklı kıldı. Mikropate plaklarının her çukurunun maksimum 300  $\mu$ L'lik hacime sahip olması ise araştırmada kullanılan plazma örneklerinin, substrat ve diğer kimyasal maddenin ekonomik olarak kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Böylece bu araştırmada 5-10  $\mu$ L hacimlerde ve yöntem gereğince dilusyonları yapılmış ya da yapılmamış örneklerin kullanılması mümkün oldu.

Guthion ve diğer OP insektisitlerin memeli hayvanlarda (özellikle rodent türlerinde) etkileri üzerine yapılmış bir çok araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmında insektisitlerin hayvanlara toksitesini üzerinde durulmaktadır. Durda ve araştırma grubunun (1989) *Microtus pinetorum* ile yaptıkları bir toksite çalışmasında 0-350 ppm'lik insektisit konsantrasyonlarının hayvanlarda vücut ağırlığı değişimine ya da besin tüketimi azalışı üzerinde bir etkisi olmadığı kaydedilmiştir. Araştırmacılar 400-700 ppm insektisit uygulamasının ise vücut ağırlığı azalışına etkili olurken, yalnızca 700 ppm insektisite maruz kalan hayvanlarda günlük besin tüketiminin azaldığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan günlük 5 mg/kg Guthion uygulama

sına bağlı olarak rat ve farelerde vücut ağırlığı ve besin tüketiminin kontrol grubu deneklerine kıyasla önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir. Ancak araştırıcılar insektisit etkisi ile fötal vücut ağırlığında ise bir azalma olmadığını kaydetmektedir (Short vd., 1980). Bir OP insektisit olan Counter'in *Peromyscus maniculatus*'a uygulanan tek bir oral dozunun hayvanlarda kontrol grubuna göre önemli vücut ağırlığı azalmasına neden olduğu da bir başka çalışma ile rapor edilmiştir (Block vd., 1993).

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, "DS" test grubu hayvanlarda vücut ağırlığı değişiminin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalış gösterdiği saptandı. Ancak "LC" test grubunda, erkeklerde 161 ppm ve 322 ppm insektisit uygulamasına, dişi hayvanlarda ise 161 ppm uygulamasına bağlı olarak vücut ağırlığında azalmaya neden olurken, bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Analiz sonuçlarında kontrol grubu hayvanlarda ortaya çıkan vücut ağırlığı azalışının ise çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıktığı düşünölmektedir. Bunların başında kontrol hayvanlarına verilen yemin mısırrözü yağı ve aseton ile muamele edilerek verilmesi, yemin öğütölmüş olması ve cam kavanoz içinde kafeslere konulması etkili olabilir. Buna karşın, kontrol ve uygulama gruplarının birbiri ile karşılaştırılması sonucu, bu faktörlerin yem tüketimine önemli etkisi olmadığı fikri çıkmaktadır. "LC" ve "DS" test gruplarına ait alt uygulama gruplarının karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan bu çelişkili sonuçda bir başka önemli etmen de "LC" grubu hayvanlara uygulanan periyodik kan alma işleminin sonucu hayvanların etkilenmesine de bağlanabilir. Çünkü bu prosedürün "LC" grubu hayvanlar üzerinde önemli bir stres faktörü yaratacağı ve buna bağlı olarak

da özellikle vücut ağırlığı azalışına neden olacağı düşünülebilir.

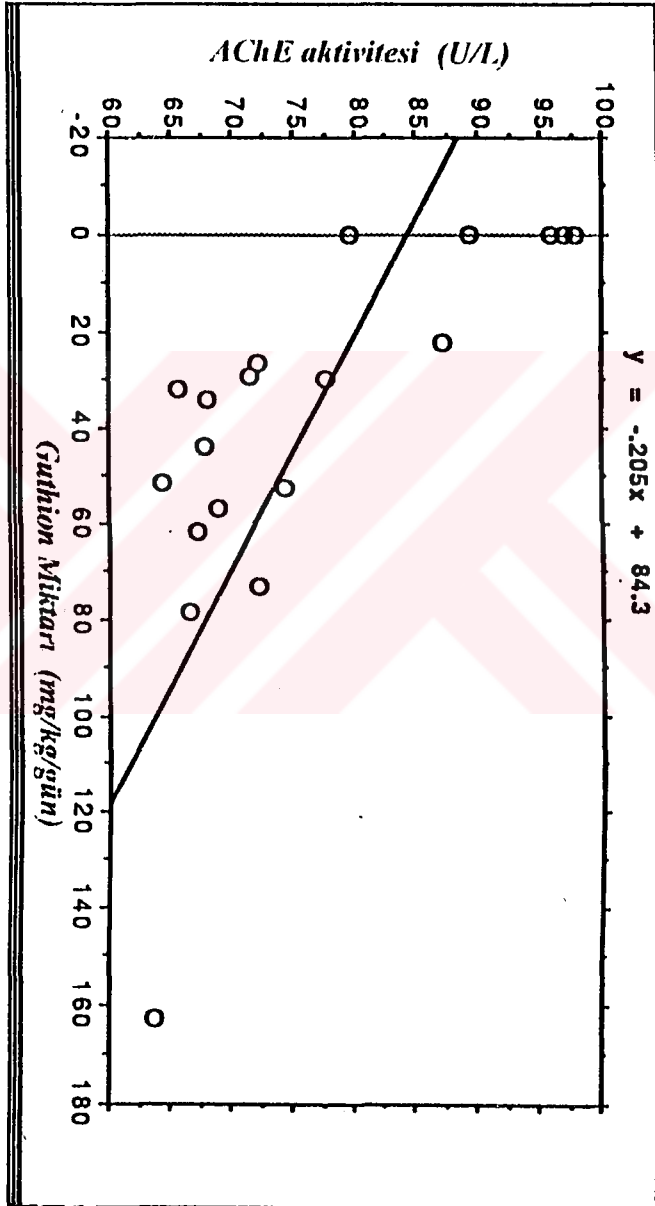
Bu araştırmada genel olarak mikroplate okuyucuda biyokimyasal analizler için kullanılan kitlere bağlı olarak, plazma örneklerinde ya da beyin doku homojenatlarında yapılan aktivite ve miktar tayinleri için standart değerlere ilişkin araştırmalar saptanmamıştır. Bu nedenle gerek araştırmada kalite kontrolünün sağlanması ve gerekse tüm spektrofotometrik değerlerin doğruluğunun test edilmesi amacı ile daha önceden laboratuvarında bulunan sağlıklı stok hayvanlardan alınan plazma ya da doku örneklerinde enzim aktivitesi ve miktar tayini için ön çalışmalar yapılmıştır. Bu sonuçlara göre, *Microtus canicaudus* plazma örneklerinde LD aktivitesi 353.5-1398 (ort. 1011) U/L, CK aktivitesi 1724-2813 (ort. 2201) U/L ve ICDH aktivitesi 48.23-64.42 (ort. 34.75) U/L olarak saptanmıştır. Plazma BUN miktarı 28.16-40.27 (ort. 34.75) mg/dl ve kreatinin miktarı da 0.148-0.859 (ort. 0.415) mg/dl olarak hesaplanmıştır. Ayrıca beyin AChE aktivitesi 82.35-91.16 (ort. 83.64) U/L olarak saptanmıştır. Bu saptanan değerler deney gruplarına ait verilerle karşılaştırılması bakımından bir kriter olarak kullanılabilir.

OP ve karbamat bileşiklerin etkisine bağlı olarak AChE enziminin inhibe edildiği bilinmektedir. Enzimin inhibisyonu toksik etkenin mekanizması ile doğrudan bağlantılıdır (Mayer et al., 1992). Böylece laboratuvar ve arazi çalışmalarında bu enzimin belirlenmesi vertebratlarda OP ve karbamat insektisitlere maruz kalıp kalmadıklarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Ludke vd., 1975; Grue vd., 1983). Beyin AChE enzim aktivitesinin insektisit etkisine bağlı olarak inhibisyonu ve bu inhibisyonun eşeye

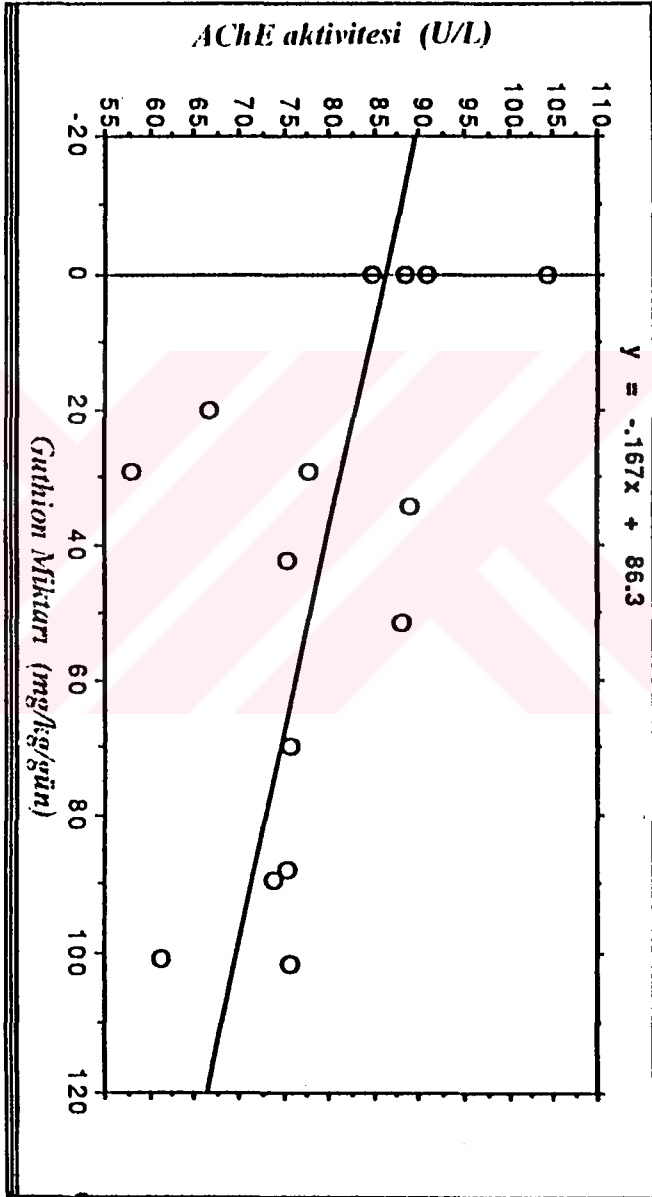
bağlı olarak düzeyi hakkında ortaya konulan literatür verileri çelişkilidir. Tüm bir beyin dokusu örneğindeki AChE aktivitesi bugüne kadar yapılan çalışmalarda kuş ve memeli hayvanlarda eşeye bağlı olarak farklılık göstermemiştir. Ancak bu yapılan çalışmalarda genelde çok az bir sayıda memeli türünde enzim aktivite sonuçları rapor edilmiştir. Bir araştırma sonucuna göre, bir OP insektisit olan Orthene spreylene tarlalardaki erkek ve dişi *Microtus pennsylvanicus*'da AChE enzim inhibisyonu bakımından eşeyler arasında fark bulunamamıştır. Bu bireylerde enzimin önemli düzeyde inhibe edildiği de rapor edilmektedir (Jett, 1986). Buna karşın plazma ChE aktivitesi bazı türlerde eşeye bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Örneğin insan ve kobaylarda serum ChE aktivitesi erkeklerde daha yüksek bulunmuştur (Rattner ve Fairbrother, 1991). Worden ve arkadaşları (1973), ratlarda Guthion'un 50-100 ppm'lik konsantrasyonunun plazma ve eritrosit ChE aktivitesini baskıladığını ve inhibisyonun dişi hayvanlarda erkeklerden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. *Microtus pinetorum*'da, araziye spreylene Guthion insektisitini takiben, 1. günde enzimin %8 düzeyinde inhibe edildiği bildirilirken, 5. günde enzim inhibisyonu %42 olarak belirlenmiştir (Durda vd., 1989). Zinkl ve grubu (1980), maksimum düzeydeki enzim inhibisyonunun küçük memelilerde arazide OP insektisit uygulamasının 3. gününde olduğunu belirlediler. Azinphosmethyl'in balık ve farelerde etkisi ile ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada ise, insektisite maruz kalmış balıklarda enzim inhibisyonunun 2. saatte oldukça düşük düzeyde olduğu, buna karşın 4. saatte inhibisyonun maksimum düzeyine ulaştığı bildirilmektedir (Benke ve Murphy, 1974). Ayrıca araştırmacılar enzimin fa

rede balıklara oranla çok daha hızlı inhibe edildiğini rapor etmektedir. Bu durumu farede AChE enziminin balıklara oranla daha duyarlı olmasına ve oksijen analogları üretiminin daha hızlı olmasına bağlamışlardır. Bunun yanı sıra aynı cinse ait türler arasında da insektisit etkisine duyarlılık bakımından farklılık bulunabilir. Bu konuda Cholakis ve çalışma grubu (1981) yaptıkları bir çalışmada farklı insektisitlerin farklı *Microtus* türleri üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar diğer türlerin erkek ve dişi bireyleri arasında eşeye bağlı farklılık gözlemezken, *M. canicaudus*'da dişi hayvanların metil parathion'a karşı erkeklerden 2-3 kat daha fazla bir duyarlılık gösterdiğini saptamışlardır.

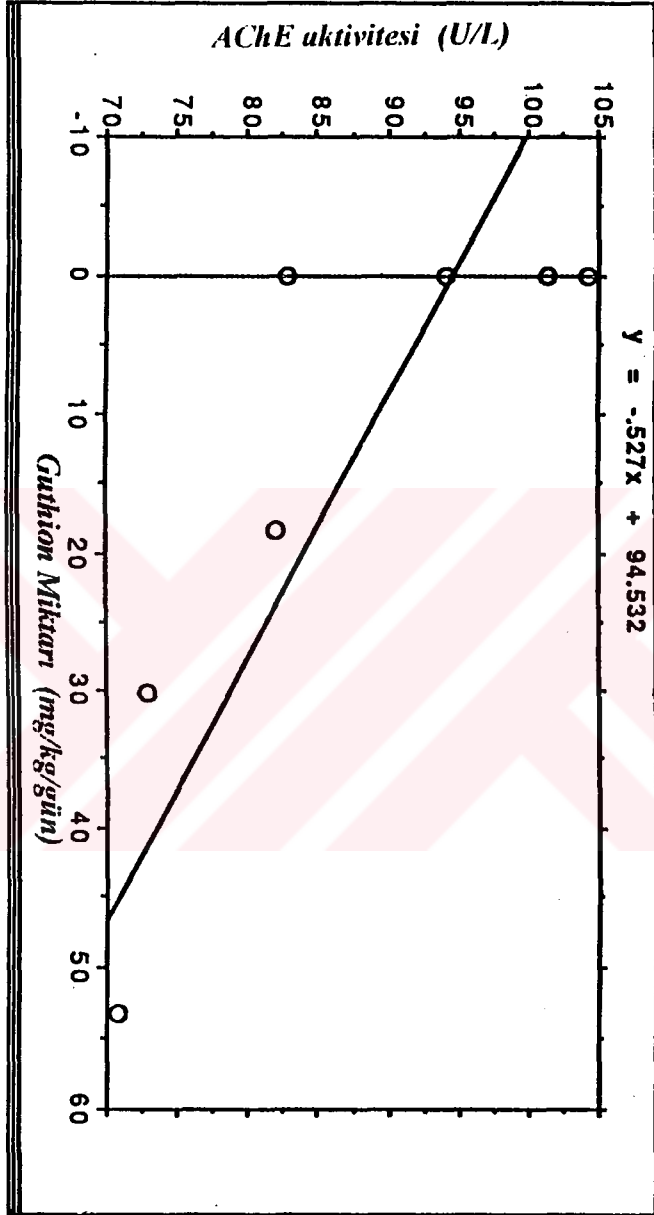
Bu araştırmada, *Microtus canicaudus* beyin asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi "DS" test grubu hayvanlarda test periyodu boyunca ortalama olarak 89.93 U/L olarak saptanırken, bu değer 161 ppm insektisit uygulamasında 73.31 U/L, 322 ppm 'de 71.67 U/L ve 428 ppm 'de 71.86 U/L olarak bulundu (Tablo 3.7). İnsektisit uygulamasını takiben farklı günlerde disseksiyonları yapılan hayvanlarda AChE enzim inhibisyonunun ortalama %18.48-20.3 arasında değiştiği belirlendi. İnsektisit uygulama dozuna bağlı olarak örneklerin alındığı günlerde hayvanların maruz kaldıkları günlük ortalama Guthion miktarı ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi Şekil 4.1, Şekil 4.2, ve Şekil 4.3'de sırası ile 3. gün, 7. gün ve 9. gün için gösterilmiştir. "DS" test grubu için AChE enzim inhibisyonu oranları incelendiğinde tüm insektisit uygulama dozları için 3. gündeki enzim inhibisyonunun hemen hemen sabit bir düzeyde kalarak, 7. gün ve 9. günde ölçülen değerlere benzer olduğu görülmektedir. Bu durum *Microtus canicaudus*'da Guthion in



Şekil 4.1. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 3. günde regresyon ile ifadesi



Şekil 4.2. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 7. günde regresyon ile ifadesi



Şekil 4.3. Disseksiyon test grubu hayvanların yem ile birlikte aldıkları günlük insektisit miktarına bağlı olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi değişiminin 9. günde regresyon ile ifadesi



sektisiti uygulamasını takiben uygulama dozuna bağlı olmaksızın, enzim inhibisyonunun belirli bir oranda olduğunu göstermektedir. Ancak, göz önünde bulundurulması gereken önemli bir nokta yüksek konsantrasyonda insektisit uygulamasına bağlı olarak hayvan ölümlerinin özellikle 3. günden sonra artış göstermesidir. Böylece Guthion'un hayvanların ölümüne AChE enzim inhibisyonu yanı sıra başkaca faktörlerinde katılması ile neden olduğu fikri çıkmaktadır. Ayrıca eşey ayrı olarak beyin doku homojenatlarında yapılan aktivite tayinleri erkek hayvanlarda enzim aktivitesinin dişilerden daha yüksek olduğunu ortaya koydu. Bu durum daha önce bu konuda elde edilen bazı sonuçları desteklemektedir. Ancak dişi hayvanlarda enzim inhibisyonunun erkek deneklere oranla düşük düzeyde oluşu çarpıcı bir sonuç olarak çıkmaktadır. Bu da dişilerde genel olarak metabolik faaliyetlerin yavaş işlemesine bağlı olarak, insektisit de metabolizmasının yavaş olmasına bağlanabilir. Böylece dişi hayvanlarda OP insektisitlere karşı dirençliliğin erkeklerden daha fazla olduğu fikrini vermektedir.

Diğer taraftan, "LC" test grubu hayvanlara ait beyin AChE aktivitesi sonuçları "DS" test grubundan gelen sonuçları desteklemektedir. Bu grup hayvanlarda da erkeklerde enzim aktivitesi dişilere oranla daha yüksek bulunurken, insektisit etkisine bağlı olarak, inhibisyon oranının dişilerde yine erkeklerden düşük olduğu saptandı (Tablo 3.7). Ancak bu grupta enzim inhibisyonu hem erkek hem de dişilerde "DS" test grubu ile karşılaştırıldığında, daha yüksek olarak görüldü. Bu durum "LC" grubu hayvanların insektisit ile daha uzun süre maruz kalması, özellikle hayvanlardan kan alma işlemleri sonucu strese maruz kalmaları ve bu işlem esnasında kullanılan narkoz maddesi etkisine

bağlanabilir. Araştırma sonuçlarımız daha önce bazı araştırmacıların ortaya koyduğu bulguları desteklememektedir. Bununla birlikte insektisit uygulanan hayvan türü ve uygulama şekli de önem taşımaktadır. Ayrıca insektisit etkisine maruz kalan hayvanların yaşı ve başkaca çevresel faktörler (örneğin sıcaklık ve ışık)'in de hayvanlarda indükleyici etmenler olarak düşünülebilir.

Araştırmada kullanılan toksikant-özümlenmeyen biyobelirteçler insektisit etkisine maruz kalan hayvanlarda "DS" ve "LC" test grupları için ayrı ayrı değerlendirildi. Çünkü enzim aktivitesi değeri canlılarda kirletici etken ya da etkinin belirlenmesine hizmet edebilir. Öte yandan, serum enzim aktiviteleri memelilerde organ fonksiyonlarını test etmek ve varsa fonksiyonel hasarları saptamak için özellikle klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu testler son yıllarda özellikle çevre biyolojisi ve çevresel kirleticilerin canlılara etkileri ile ilgilenen araştırmacılar tarafından da kullanılmaya başlamış bulunmaktadır (Mayer et al., 1992). Genelde kimyasal ve kimyasal olmayan uyarıcı maddeler hücresel enzimlerin salınımına doku hasarlarına yol açarak neden olmaktadır (Rattner vd., 1983). Gupta ve arkadaşları (1991), karbofuran'ın ratlara uygulanan bir tek dozu ile serum toplam LDH aktivitesinin arttığını bildirmektedir. Ayrıca bir başka araştırmada, embriyonik dönemdeki tavuklarda bir OP insektisit olan metil parathion ve bir herbisit olan 2,4-D etkisi ile plazma aspartat aminotransferaz (AST) ve LD aktivitelerinin arttığını rapor etmişlerdir (Somlyay ve Varnagy, 1989). Serum LD düzeyinin paraquat dışında kalan pestisitler tarafından etkilendiği ve balıklarda enzim düzeyinin yükseldiği rapor edilmektedir (Folmar, 1993).

Bu çalışmada insektisit uygulamasına maruz kalan *Microtus canicaudus*'da, "DS" test grubu hayvanlarda LD enzim aktivitesi yalnızca 7. günde her iki eşey verileri ortalaması için 322 ppm dozunda önemli olarak yüksek bulunurken, diğer uygulama günlerinde ve gruplarında herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Aynı hayvanlarda kreatin kinaz aktivitesi değerleri incelendiğinde ise, 7. gün verileri ile enzim aktiviteleri yüksek olarak bulunurken, bu farklılık istatistiksel olarak önemsizdir. Ancak 161 ppm uygulama grubunda 9. günde elde edilen yüksek CK aktivite değerine bağlı olarak, her iki eşey ortalama sonucuna göre istatistiksel farklılık önemlidir.

CK ve LD enzim aktivitelerinin günlere bağlı olarak "LC" test grubu hayvanlarda da kontrol hayvanlar ile karşılaştırıldığında, belirgin bir artış gösterdiği veri analizi sonuçları ile gösterilmiştir (Tablo 3.9). İstatistiksel olarak da LD aktivitesi 161 ppm uygulama grubunda 10. günde erkek hayvanlara ait verilerde önemli düzeyde artış göstermiştir. CK aktivitesi bakımından ise genelde 10. ve 14. günde insektisit uygulama dozlarına bağlı olarak önemli düzeyde artış görülmektedir. CK aktivitesi bu test grubu hayvanlarda özellikle 322 ppm uygulamasında 14. günde, 428 ppm uygulamasında ise 6. ve 8. günlerde plazma örneklerinde yüksek değerlerde saptanmıştır. Ancak *Microtus canicaudus* için hesaplanan standart enzim aktivite değerleri uygulama grupları ile karşılaştırıldığında, CK aktivitesinin normal değerler sınırında olduğu, LDH aktivitesinin ise yüksek olduğu görülmektedir. Böylece özellikle LDH aktivitesinin yüksekliği kalp kası harabiyetinden çok, karaciğerde ortaya çıkan doku harabiyetini akla getirmektedir. Bu durum yüksek konsantrasyonlarda (letal konsant

rasyon dozu yada daha yüksek dozlarda) insektisit uygulamasına maruz kalan hayvanlarda belirgin olarak doku hasarlarının ortaya çıktığına işaret etmektedir. Özellikle sürekli olarak yüksek konsantrasyonda insektisite maruz kalmanın, metabolizmada AChE enzim inhibisyonu yanı sıra başkaca enzimleride etkileyerek etkisini gösterdiği söylenebilir. Miyokardial enfarktüsün ya da diğer doku hasarlarının bir göstergesi olarak ele alınan LDH aktivitesindeki artış, Guthion insektisitinin kalp dokusundan çok karaciğerde hasara neden olduğu fikrini vermektedir.

"LC" ve "DS" test gruplarına ait hayvanlar için saptanan LD aktivite sonuçları, birbiri ile karşılaştırıldığında, "LC" test grubuna ait enzim aktivitesi değerinin daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. CK enzimaktivitesi bakımından da enzim aktivitesi bu uygulama gruplarında önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Bu durum "LC" test grubunda enzim aktivitesi inhibisyonuna neden olabilecek etmenleri akla getirmektedir. Bunlar arasında, hayvanlardan kan alma işlemine bağlı enzim inhibisyonu ya da kullanılan narkoz maddesi izofluran etkisine bağlı olarak oluşan bir inhibisyon en belirgin faktörler arasında akla gelmektedir.

Guthion insektisiti uygulanmış yem ile beslenen *Microtus*'da ICDH enzim aktivitesi "DS" test grubu için analiz edildiğinde, 161 ppm dozunda 9. günde, 322 ppm dozunda 7. günde artış gösterirken, 428 ppm uygulamasında 3. günde erkek hayvanlarda aktivite değeri yüksek olarak bulundu. Bu durum subletal dozlarda insektisit konsantrasyonlarına bağlı olarak enzim aktivitesinin farklı günlerde artışına neden olduğunu göstermektedir. Enzim düzeyindeki bu artışlar organizmada karaciğer doku harabiyetine bağlı

olarak plazma düzeyinde artmış bulunan enzim konsantrasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ancak "LC" test grubu hayvanlara ait ICDH enzim aktivitesi sonuçlarına göre, 6. günde 428 ppm insektisit uygulamasına maruz kalan dişi hayvanlar hariç, tüm uygulama gruplarında plazma enzim düzeyinin birbirine benzer seviyelerde olduğu görülmektedir. Altıncı gündeki dişi *Microtus*'lardan gelen bu yüksek enzim aktivite değeri, diğer enzim aktivite değerleri ile (LD ve CK) karşılaştırıldığında, tüm enzimatik değerlerin önemli ölçüde artış gösterdiği görülmektedir. Böylece bu gruptaki hayvanlarda insektisit etkisine bağlı doku hasarlarının olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca "LC" test grubunda çeşitli uygulama dozları ve uygulama günlerinde görülen aktivite artışları karaciğerde doku harabiyeti olduğuna ilişkin görüşümüzü desteklemektedir.

Diğer taraftan, ICDH enzim aktivitesinin insektisitler tarafından nasıl etkilendiğine ilişkin bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle özellikle ICDH'nin insektisitler ile ilişkili olarak nasıl bir aktivite gösterdiği ya da karaciğer doku hasarlarına neden olabilecek dozlarda insektisit uygulamasının enzim aktivitesini nasıl etkileyeceği konusunda yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Plazma kreatinin ve BUN düzeyinin belirlenmesi, kimyasal kontaminant etkisine bağlı olarak organizmada boşaltım sistemi bozukluk ve hasarlarını saptamak açısından önemlidir. Plazma kreatinin ve BUN düzeylerinin artışı glomerular filtrasyonun ve dolayısı ile böbrek hasarlarının artışına bir işaret olarak kabul edilmektedir. Bu araştırmada, Guthion etkisine bağlı olarak "DS" test sistemi uygulama gruplarında plazma kreatinin düzeyinin kont

rol grubuna oranla önemli ölçüde artış göstermediği görülmektedir. Ayrıca bulgularımız standart *Microtus* plazma değerleri ile de benzer değerlerde bulunmuştur. Veri analizi sonucuna göre elde edilen istatistiksel bulgular da bu durumu desteklemektedir. Plazma kreatinin düzeyinin "LC" test grubunda bazı uygulama dozları için özellikle dişilerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak önemli bulunan bu artış normal plazma kreatinin düzeyi sınırları içerisinde bulunmaktadır. Bu nedenle, Guthion insektisiti etkisine bağlı olarak deney hayvanlarında herhangi bir boşaltım sistemi hasarı meydana gelmesi beklenmemektedir. Plazma BUN konsantrasyonu değeri incelendiğinde de, gerek "DS" ve gerekse "LC" test gruplarında kontrol grubu hayvanlara oranla önemli bir artış bulunamamıştır. Ancak, "LC" test grubunda 428 ppm uygulaması için BUN düzeyi 8. günde dişi hayvanlar için yüksek değerde bulunmasına karşın, bu verinin tek bir denekten gelmesi nedeni ile bu istatistiksel farklılık fazla etkili görülmektedir. Böylece BUN düzeyinin tüm uygulama gruplarında birbirine benzer düzeyde ve kontrol grubu hayvanlardaki sınırlar içinde bulunması ile, boşaltım sistemi dejenerasyonunun olmadığı yönündeki görüşümüzü desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu araştırma ile Guthion insektisitinin *Microtus canicaudus* üzerinde etkileri biyokimyasal, fizyolojik ve toksikolojik parametreler kullanılarak ortaya konulurken, bu alanda yapılan araştırmalara da yeni bir katkı sağlanmıştır. Özellikle bu çalışmada kullanılan yöntemlerin modifikasyonu ile bu türde araştırmalara da yeni boyutlar getirilmesi amaçlanmıştır. Diğer taraftan, yurdumuzda tarım ve meyveciliğin büyük önem taşıması ve buna bağlı olarak kullanılan Guthion insektisiti ve diğer pes

tisit miktarının ve sayısının çokluğu, Türkiye'de çevresel kirliliğin yabancı yaşam üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla yönelik çalışmaları önemli kılmaktadır. Özellikle gün geçtikçe artan kimyasal çevre kirliliği ekolojik dengenin bozulmasına, doğal yaşamdaki birçok türün yaşamının tehlikeye girmesine ve yok olmasına yol açmaktadır. Böylece dünyanın ve yurdumuzun milli servetleri olarak kabul edebileceğimiz yabancı hayatı tehlikeye girmiştir. Çevre sorunlarında ve özellikle zirai çalışmalarda ekolojik dengenin gözetilmesi ile ve daha az kimyasal madde kullanımı ile çevre sorunlarının en az düzeye indirilmesini mümkündür. Bu durum ülkemizde güncel bir problem olarak yerini ve önemini korumaktadır.

## 5. YARARLANILAN KAYNAKLAR

Amador, D.E., Wacker, E.H., 1965, Enzymatic Methods Used in Diagnosis. IN Methods of Biochemical Analyses, Vol. 13, D. Glick (Ed)., Interscience, New York, pp 286-287.

Amdur, M.O., Doull, J., Klassen, C.D., (Eds)., 1991, Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Pergamon Press, New York. 1033 pp.

Anderson, S., 1985, Biology of New World Microtus: Taxonomy and Systematics, R.H. Tamarin (Ed), The American Society of Mammalogists, no:8, 52-83.

Asztalos, B.J., Nemcsok, J., Benedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A., Refaie, O.J., 1990, The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.), Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19: 275-282.

Baron, D.N., 1982, Essentials of Clinical Biochemistry, Elsevier Pub., 292 pp.

Bascietto, J., 1985, Standart Evaluation Procedure: Avian Dietary LC50 Test, U.S. EPA, Hazard Evaluation Division, 540/9-85-008, 11 pp.

Benke, G.M., Murphy, S.D., 1974, Anticholinesterase Action of Methyl Parathion, Parathion and Azinphosmethyl in Mice and Fish: Onset and Recovery of Inhibition, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 12(1): 117-122.

Bennet, J., Williams, B., 1985, Acetylcholinesterase determination procedure, U.S. EPA, Corvallis Research Lab., 20pp.



Block, E.K., Lacher, T.E., Kendall, R.J., 1993, Effects of the organophosphate pesticide Counter on laboratory deer mice (*peromyscus maniculatus*), *Enviro. Toxicol. Chem.*, 12: 377-383.

Brogdon, G.W., Barber, A.N., 1987, Microplate Assay of Acetylcholinesterase Inhibition Kinetics in Single-Mosquito Homogenates, *Pesticide Biochem. Physiol.*, 29: 252-259.

Brown, S.S., Kalov, W., Pilz, W., Whittaker, M., Woronick, C.L., 1981, The Plasma Cholinesterase: A New Perspective; *Advances in Clinical Chemistry*, Latner & Schwartz (Eds)., Academic Press, New York, 1-99.

Bubsy, D.G., Holmes, S.B., Pearce, P.A., Fleming, R.A., 1987, Effect of aerial application of Zectran on Brain Cholinesterase activity in forest song birds, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16(5): 623-628.

Burdick, G.E., Harris, E.J., Dean, H.J., Walker, T.M., Skea, J., Coley, D., 1964, The accumulation of DDT in lake trout and the effect on reproduction, *trans. amer. Fish Soc.*, 93: 127-136.

Chambers, J.E., Levis, P.E. (eds)., 1992, *Organophosphates; Chemistry, Fate and Effects*, Academic Press, 443 pp.

Cholakis, J.M., McKee, M.J., Wong, L.C.K., Gile, J.D., 1981, Acute and Subacute Toxicity of Pesticides in Microtine Rodents, Avian and Mammalian Wildlife Toxicology 2nd Conference, 143-154.

Ciba-Corning, Gilford LD-L (LDH L-P) Reagent, Gilford Systems, Ohio, USA, 4 pp.

Coppage, D.L., 1971, Charecterization of Fish Brain Acetylcholinesterase with an Automated pH Stat for

Inhibition Studies, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 6(4): 304-310.

Davy, C.W., Fulleylove, M., Edmonds, J.G., Eichler, D.A., Rushton, B., Tudor, R.J., Walker, J.M., 1989, The diagnostic usefulness of isocitrate dehydrogenase (ICDH) in the mormest (*Callithrix jacchus*), J. Appl. Toxicol., 9: 33-37.

Dein, J.H., 1984, Laboratory Manual of Avian Hematology, Association of Avian Veterinarians, East Northport, New York, 38 pp.

Devlin, T.M., 1986, Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1016 pp.

Dieter, M.P., 1974, Plasma enzyme activities in *Coturnix quail* fed graded doses of DDE, polychlorinated biphenyl, malathion and mercuric chloride, Toxicol. Appl. Pharmacol., 27: 86-98.

Dieter, M.P., 1975, Further studies on the use of enzyme profiles to monitor residue accumulation in wildlife: Plasma in starlings fed graded concentrations of mormodren, DDE, Aroclor 1254 and malathion, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 3: 142-150.

Dieterich, R.A., Preston, D.J., 1977, The Meadow Vole (*M. pennsylvanicus*) as a laboratory animal, Lab. Animal Sci., 27(4): 494-499.

Dominguez, S., Buchholz, P., Shiryama, T., 1992 a, Standard operating procedure for the quantitative determination of lactate dehydrogenase activity in vole serum or plasma using the thermomax microplate reader, U.S. EPA, SOP, WEP, 5-5-9: 8 pp.

Dominguez, S., Buchholz, P., Shiryama, T., 1992 b,

Standart operating procedure for the quantitative determination of blood urea nitrogen (BUN) in vole serum or plasma using the thermomax microplate reader, U.S. EPA, SOP, WEP, 5-5-10, 9 pp.

Dubois, K.P., 1963, Toxicological evaluation of the anticholinesterase agents: Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, G.B. Koelle (Ed)., Springer Verlag Pub., Berlin.

Durda, J.L., Powell, R.A., Barthalmus, G.T., 1989, Physiological and Behavioral Effects of Guthion on Pine Voles, *Microtus pinetorum*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43: 80-86.

Edson, E.F., Noakes, D.N., 1960, The comperative toxicicity of six organophosphorus insecticides in the rat, Toxicol. Appl. Pharmacol., 2: 523-539.

Ellmann, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, Biochem. Pharm., 7: 88-95.

Fairbrother, A., 1992, Clinical Biochemistry, U.S. EPA, Environmental Research Lab., Draft, 45 pp.

Fairbrother, A., O'Loughlin, D., 1990, Differential White Blood Cell Values of The Mallard (*Anas platyrhynchos*) Across Different Ages and Reproductive States, J. Wildlife Diseases, 26(1): 78-82.

Folmar, L.C., 1993, Effects of Chemical Contaminations on Blood Chemistry of Teleost Fish: A Bibliography and Synapsis of Selected Effects, Environ. Toxicol. Chem., 12: 337-375.

Fossi, M.C., Loenzio, C., Massi, A., Casini, S., 1992, Serum Esterase Inhibition in Birds: A Nondestructive

Biomarker to Assess Organophosphorus and Carbamate Contamination, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 99-104.

Gaines, T.B., 1960, The Acute toxicity of Pesticides to rats; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2: 88-99.

Grant, D.F., Bender, D.M., Hammock, B.D., 1989, Quantitative kinetic assays for Glutathione S-Transferase and general esterase in individual Mosquitoes using an EIA reader, *Insect Biochem.*, 19 (8): 741-751.

Grue, C.E., Fleming, W.J., Bubsy, D.G., Hill, E.F., 1983, Assessing Hazards of Organophosphate Pesticides to Wildlife, *Trans. North Am. Wildl. Nat. Res. Conf.*, 48: 200-220.

Gupta, R.C., Goad, J.T., Kadel, W.L., 1991, In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 263-269.

Hall, A.H., 1980, Bioconcentration of organophosphate pesticides to hazardous levels in amphibians, *J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 853-860.

Hall, R.F. Knake, E.L., McCarty, R.H., Mortvedt, J., Terry, D.L., 1992, *Farm Chemicals Handbook*, 78th ed., Meister Pub. Comp., USA.

Hart, A.D.M., 1993, Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides, *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 321-336.

Hickey, J.J., 1969, *Peregrine Falcon Populations: Their Biology and Decline*, Univ Wisconsin Press, Madison, pp 596.

Hill, E.F., Fleming, J.W., 1982, *Anticholinesterase*

poisoning of birds: Field monitoring and diagnosis of acute poisoning, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1: 27-38.

Hoffman, D.T., Franson, J.C., Pattee, O.H., Bunck, C.M., Murray, H.C., 1987, Toxicity of paraquat in nestling birds: effects on plasma and tissue biochemistry in American Kestrels, *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 16: 177-183.

Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., Dickson, K.L., Fava, J.A., McCarty, J.F., Parrish, R., Dorn, P.B., McFarland, V., Lahvis, G., 1992, Biomarkers: Biochemical Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress, Introduction, Ch. 1, Lewis Pub., 1-3.

Hunt, E.G., Bischoff, A.I., 1960, Inimial effects on wildlife of periodic DDD applications to Clear Lake, Calif. *Fish & Game*, 46: 91-105.

Jett, D.A., 1986, Cholinesterase inhibition in Meadow Voles (*Microtus pennsylvanicus*) following field applications of Orthene, *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 255-259.

Jett, D.A., Nichols, J.D., Hines, J.E., 1986, Effect of Orthene onan unconfined population of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*), *Can. J. Zool.*, 64: 243-250.

Kashmar, J.F., 1970, Enzymes: In *Fundamentals of Clinical Chemistry*, N.W. Tietz (Ed.), Saunders Pub., Philadelphia, 393-395.

Kashmar, J.R., Moss, D.W., 1976, Enzymes: In *Fundamentals of Clinical Chemistry*, N.W. Tietz (Ed.), Saunders Pub., Philadelphia, 682-689.

Kerswill, C.J., Elson, P.F., 1955, Preliminary observations on effects of 1954 DDT spraying on Miramichi

Salmon stocks, Fish Res. Bd. Can. Prog. Report, 62: 17-23.

Khan, M.A.Q., 1980, Induction of Drug- Metabolizing Enzymes by Insecticides and Other Xenobiotics, Pharmac. Ther., 11: 43-107.

Lamb, D.W., Kenega, E.E., 1981, Avian and Mammalian Wildlife Toxicology, 2nd Conference, Summary, 155-157.

Lehninger. A.L., 1982, Principles of Biochemistry, Worth Pub., New York, 1011 pp.

Lenhardt, M., 1992, Seasonal changes in some blood chemistry parameters and in relative liver and gonad weights of pike (*Esox lucius* L.) from the River Danube, J. Fish Biol., 40: 709-718.

Levine, B.S., Murphy, S.D., 1971, Effect of piperonyl butoxyde on the metabolism of dimethyl and diethyl phosphorothionate insecticides, Toxicol. Appl. Pharmacol., 40: 393-406.

Ludke, J.L., Hill, E.F., Dieter, M.P., 1975, Cholinesterase (ChE) responses and related mortality among birds fed ChE inhibitors, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 3: 1-21.

Machera, K., Kostakis, E., 1993, Anti-Cholinesterase Action of a New Organophosphorus Ester, diethylphosphoric ester of the dicyclopropyloketoxime on wistar Rats, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 48: 108-114.

Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 1992, Physiological and Nonspecific Biomarkers; Biomarkers, Eds. Hugget et al., Lewis Pub., 5-86.

Mayers, S.M., 1991, Source of variability in hazard assessment used to predict ecological risk of environmental contaminants to terrestrial wildlife-

laboratory phase, U.S. EPA QA Document, Corvallis, 40-91-01: 24 pp.

McCarthy, F., Shugart, L.R., 1990, Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Pub., Boca Raton, USA, 457 pp.

McEven, F.L., Stephenson, G.L., 1979, The Use and Significance of Pesticides in the Environment, John Wiley & Sons Pub., New York, 538 pp.

Mendoza, C.E., 1976, Toxicity and Effects of Malathion on Esterases of Suckling Albino Rats, Toxicol. Appl. Pharmacol., 35: 229-238.

Meyers, M.S., 1991, Sources of variability in hazard assessment used to predict ecological risk of environmental contaminants to terrestrial wildlife-laboratory phase, U.S. EPA, Quality Assurance Document, no:40/91-01, 24 pp.

Meyers, S.M., Wolff, J., 1993, Unpublished Results for *Microtus canicaudus* LC50 laboratory tests, U.S. EPA Corvallis Research Laboratory, and Oregon State Univ. Dept. of Fisheries & Wildlife, Corvallis, OR.

Mihok, S., Descoteaux, J.P., Lawton, T., Lobreau, A., Schwartz, B., 1986, The azurocyte: a new kind of leucocyte from wild voles (*Microtus*), Can. J. Zool., 65: 54-62.

Mills, J.A., 1973, Some observations on the effects of field applications of fensulfothion and parathion on bird and mammal populations, Proc. New Zealand Ecological Soc., 20: 65-71.

Mineau, P., (Ed)., 1991, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and Environment, Elsevier Pub., 348 pp.

Molecular Devices, 1988, Cytotoxicity Assays that may

be run on Molecular Devices Kinetic Microplate Readers, Application Bull. no:012-A.

Molecular Devices, 1990, Measuring Superoxide Production by Monitoring Cytochrome c Reduction Using a Microplate for Multiple Assay Capability and a thermomax Microplate Reader for spectrophotometric Performance, Maxline Appl. Notes, Cell Biol. Series, no:3

Moore, G.D., Devonshire, A.L., Denholm, I., 1988, A Microtiter plate Assay for Characterizing insensitive Acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects, Bull. Entom. Res., 78: 537-544.

Murphy, S.P., 1966, Liver Metabolism and Toxicity of Thiophosphate Insecticides in Mammalian, Avian and Piscine Species, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123: 392-398.

Namba, T., 1971, Cholinesterase Inhibition by Organophosphate Compounds and its Clinical effects, Bull. World Health Organization, 44: 289-307.

National Research Council, 1989, Biological Markers in Reproductive Toxicology, National Academy Press, Washington D.C., 359 pp.

Oikari, A., Lonn, B.E., Castren, M., Nakari, T., Snikars-Nikinmaa, B., Bister, H., Virtanen, E., 1983, Toxicological effects of dehydroabietic acid (DHAA) on the trout (*Salmo gairdneri*) in fresh water, Water Res., 17: 81-89.

Pasquet, T., Mazuret, A., Fournel, J., Koenig, F.H., 1976, Acute oral and percutaneous toxicity of phosalone in rat; in comparison with azinphosmethyl and parathion, Toxicol. Appl. Pharmacol., 37: 85-92.

Pearson, O.P., 1985, Biology of New World Microtus: Predation, R.H. Tamarin (Ed), The American Society of



Mammalogists, no:8, 535-566.

Peterson, R.G., 1985, Design and Analysis of Experiments, Marcel Dekker Pub., 429 pp.

Pope, C.N., Charracborti, T.K., 1992, Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures, Toxicology, 73: 35-43.

Ratliffe, D.A., 1969, Population trends of the peregrine falcon in Great Britain. In peregrine falcon populations: Their Biology and decline, Hickey, J.J.(Ed), Univ. Wisconsin Press, Madison, pp 239-269.

Rattner, B.A., Michael, S.D., Altland, P.D., 1983, Age-related responses to mild restraint in the rat, J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol., 55(5): 1408-1412.

Rattner, B.A., Hoffman, D.J., 1984, Comparative Toxicity of Acephate in Laboratory Mice, White-footed Mice and Meadow Voles, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13: 483-491.

Rattner, B.A., Fairbrother, A., 1991, Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity; Cholinesterase Inhibiting Insecticides, P.Mineau (Ed)., Elsevier Pub. 89-107.

Reiter, L., Talens, G., Woolley, D., 1972, Acute and Subacute Parathion Treatment: Effects on Cholinesterase Activities and Learning in Mice, Toxicol. Appl. Pharmacol., 25: 582-588.

Reynolds, P.S., 1992, White blood cell profiles as a means of evaluating transmitter-implant surgery in small mammals, J.Mammal., 73(1): 178-185.

Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975,

Veterinary Hematology, 3rd Ed., Lea & Febiger Pub. Co., Philadelphia, 807 pp.

Short, R.D., Minor, J.L., Lee, C.C., Chernoff, N., Baron, R.L., 1980, Developmental Toxicity of Guthion in Rats and Mice, Arch. Toxicol., 43: 177-186.

Sigma, Creatin Kinase (CK) Manual, Sigma Chemical Co., USA, 13 pp.

Sigma Procedure, 1986, Isocitrate Dehydrogenase Reagent Manual, Sigma Chemical Co., USA, 9 pp.

Silber, P.M., Gandolfi, A.J., Brendel, K., 1986, Adaptation of a Glutamyl Transpeptidase Assay to Microtiter Plates, Analytical Biochem., 158: 68-71.

Somlyay, I.M., Varnagy, L.E., 1989, Changes in blood plasma chemistry of chicken embryos to various pesticide formulations, Acta Veterinaria Hungarica, 37: 179-183.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., DiGuilio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., VanVeld, P.A., 1992, Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure effect; Biomarkers: Eds. Hugget et al., Lewis Pub., 235-336.

Stone, S.H., 1954, Method for obtaining venous blood from the orbital sinus of the rat or mouse, Science, 119: 100.

Strayer, L., 1988, Biochemistry, W.H. Freeman Pub., New York, 1089 pp.

Tietz, N.W., 1987, Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Pub., Philadelphia, 1010 pp.

Trust, K.A., 1992, Effects of Chemicals on the Immune System of European Starlings (*Sturnus vulgaris*) with Concomitant investigations of Mixed-Function Oxygenase Activity, Master of Science Thesis, Graduate School of

Clemson University, USA, 56 pp.

U.S. EPA, 1990, Report of Office of Pesticides, HED, SACB, p 11.

Versteeg, D.J., 1985, Lysosomal membrane stability, histopathology and serum enzyme activities as sublethal bioindicators of xenobiotic exposure in the bluegill sunfish, PhD Thesis, Michigan State University, 153 pp.

WHO, 1986, Environmental Health Criteria for Organophosphorus insecticides: A General Introduction, World Health Organization, 139 pp.

Worden, A.N., Wheldon, G.H., Noel, P.R.B., Nawdesley-Thomas, L.E., 1973, Toxicity of Guthion for Rat and Dog, Toxicol. Appl. Pharmacol., 24: 405-412.

Worthing, C.R., 1979, The pesticide Manual: A world compendium, The British Crop Protection Council, Glasshouse Crops Research Institute, 6th Ed., p 24.

York, J.L., 1986, Enzymes; Classification, Kinetics and Control: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, T.M. Devlin (ed)., John Wiley & Sons Pub., New York, pp 117-175.

Zinkl, J.G., Roberts, R.B., Henny, C.J., Lenhart, D.J., 1980, Inhibition of brain cholinesterase activity in forest birds and Squirrels exposed to aerially applied acephate, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24: 676-683.

## **ÖZGEÇMİŞ :**

1962 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini takiben, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1984 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldu.

1985 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans (Master) öğrenimine başladı. 1987 yılında Bilim Uzmanı ünvanı alarak mezun oldu. Aynı yıl içinde Doktora eğitime başladı. 1991-1993 yılları arasında iki yıl süre ile Amerika Birleşik Devletleri'nde U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory'de (Corvallis, OREGON) görevlendirilerek, Misafir Araştırmacı sıfatı ile proje ve araştırmalara katıldı. Halen İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesindeki görevini sürdürmektedir.

Evli ve bir çocuk babasıdır.

## **BİLİMSEL ESERLERİ:**

1) Özmen, M., Yürekli, M., Bozcuk, A.N., 1988, Bazı Malatya Merkez İlkokulu Öğrencilerinde *Enterobius vermicularis* Yayılışına Çevresel Faktörlerin Etkisi, IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-23 Eylül, Sivas, Zool. Hidrob. Seks., Cilt 2: 27-36.

2) Yürekli, M., Özmen, M., Gözükara, E.M., Bozcuk, A.N., *Enterobius vermicularis*'in Bazı Malatya Merkez İlkokulu Öğrencilerinde yayılışına Ailesel Faktörlerin Etkisi, IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-23 Eylül, Sivas, Zool. Hidrob. Seks., Cilt 2: 37-44.

3) Üstün, H., Tecimer, T., Özmen, M., Bozcuk, A.N., Topcuoğlu, Ş.F., 1992, Gibberellic Asit ve Benzpiren'in Fareler Üzerine Etkileri: Histopatolojik Değerlendirme, Ank. Patoloji Bült., 9(1): 36-40.

4) Dominguez, S.E., Buchholz, P.S., Özmen, M., Shiroyama, T., Fix, M.A., Fairbrother, A., 1993, Biomarkers of Exposure in Grey-tailed Voles exposed to an Organophosphorus Insecticide, Soc. Environ. Toxicol. Chem. (SETAC) Annual Meeting, Nov. 16-18, Houston, Texas, USA.

5) Dominguez, S., Buchholz, P.S., Shiroyama, T., Fix, M.A., Özmen, M., Fairbrother, A., Biomarkers of Exposure in Grey-tailed Voles (*M. canicaudus*) Exposed to an Organophosphorus Pesticide, Azinphosmethyl, Environ. Toxicol. Chem. (in press).

6) Özmen, M., Bazı Malatya Merkez İlkokulu Öğrencilerinde *Enterobius vermicularis* (Kıl kurdu) Yayılışına Çevresel Faktörlerin Etkisi, İnönü Üniversitesi Fen Bil. Enst., Bilim Uzmanlığı Tezi, Eylül 1987.

7) Topcuoğlu, F., Özmen, M., Bozcuk, A.N., Bozcuk, S., Bitki Büyüme Regülatörlerinden Gibberellic Asit ve Absisik Asit'in Fare (*Mus musculus*)'de Etkileri üzerine Biyolojik Araştırmalar, İ.Ü. Araşt. Fonu, Proje, no:İ.Ü.A.F. 89/11 (Proje tamamlanmış olup rapor aşamasındadır).