

44169

T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**KSENObİYOTİK OLARAK 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit)'nin  
PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İzzet YELKOVAN**

SİVAS - 1995

T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**KSENOBİYOTİK OLARAK 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit)'nin  
PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**


**DOKTORA TEZİ**

**İzzet YELKOVAN**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**1995-SİVAS**



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 sayılı kararı ile kabul edilen "Tez Yazma" yönergesine göre hazırlanmıştır.

## **TEŞEKKÜR**

Çalışmamın gerçekleşmesinde değerli katkılarından dolayı danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a, bölümümüz hocalarından Sayın Prof. Dr. İlhan SEZGİN'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Atila ATALAY'a, gösterdiği özveriden dolayı eşim Asuman YELKOVAN'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca İngilizce özetin düzeltilmesindeki katkılarından dolayı Sayın Dr. Sedat TÖREL'e ve Biyoistatistik uygulamalardaki emeklerinden dolayı Sayın Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	6
1. 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) .....	6
1.1 Kimyasal Özellikleri.....	7
1.2 Fiziksel Özellikleri .....	8
2. Üretimi ve Tüketimi .....	9
3. Doğada İzlediği Yol .....	9
4. Metabolizması ve Canlılar İle Etkileşimi .....	10
5. Toksikokinetik Yaklaşım .....	13
5.1 Deneysel Toksikokinetik Bulgular .....	15
6. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-P DH) .....	16
7. Malat Dehidrogenaz (MDH) .....	17
<b>GEREÇ ve YÖNTEMLER</b> .....	18
1. Organ ve Dokuların Hazırlanmaları .....	19
2. Sitoplazmik Fraksiyonun Eldesi .....	20
3. G-6-P DH Aktivitesinin İzlenmesi .....	21
4. MDH Aktivitesinin İzlenmesi.....	22
5. Örneklerin Protein Derişim Değerlerinin İzlenmesi.....	23
6. Enzim Özgül Aktivitelerinin Hesaplanması .....	24
7. Organ ve Dokularda 2,4-D Miktarlarının Bulunması	24
8. Toksikokinetik Model ve Uygulaması .....	25

<b>BULGULAR</b> .....	27
1 - 2,4-D'nin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri .....	27
1.1 2,4-D'nin G-6-P DH Aktivitelerine Etkisi .....	27
1.2 2,4-D'nin MDH Aktivitelerine Etkisi .....	34
2. Bazı Organlarda ve Plazmada 2,4-D Değişim Değerleri .....	39
3. Tek Bölümlü Toksikokinetik Modelin 2,4-D'ye Uygulanması .....	40
<b>TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b> .....	42
<b>ÖZET</b> .....	52
<b>SUMMARY</b> .....	53
<b>KAYNAKLAR</b> .....	54

## ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1 2,4-D'yi enerji ve karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerde olası metabolik yol	11
Şekil 2 Merkez bölüm ile periferal bölüm arasında ksenobiyotik madde akışı	14
Şekil 3. Deney Grubu Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değişimleri	33
Şekil 4. Deney Grubu Organ ve Doku MDH Aktivite Değişimleri	38
Şekil 5. Plazma, Karaciğer ve Kas 2,4-D Derişim Değişimleri	40

## TABLolar

	Sayfa
Tablo 1. Bazı Fenoksi Asit Herbisitler	8
Tablo 2. Grupların 2 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	28
Tablo 3. Grupların 8 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	29
Tablo 4. Grupların 16 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	30
Tablo 5. Grupların 24 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	31
Tablo 6. Deney Grubunun Peryodlara Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	32
Tablo 7. Etanol Grubunun Peryotlara Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri	33
Tablo 8. Grupların 2 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	34
Tablo 9. Grupların 8 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	35
Tablo 10. Grupların 16 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	36
Tablo 11. Grupların 24 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	36
Tablo 12. Deney Grubunun Peryotlara Göre Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	37
Tablo 13. Etanol Grubunun Peryotlara Göre Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri	38
Tablo 14. Plazma, Karaciğer ve Kas 2,4-D Derişim Değerlerinin Peryotlara Dağılımı	39



## GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlar ile diğler bazı canlıların besin edinme savaşı çakıştığından, insanlar bu canlılara karşı ağırlıklı olarak toksik kimyasal maddeler ile tarımsal savaş uygulamaktadır. İster hammadde ister yiyecek olsun besin maddesine zarar veren ya da paylaşan canlılar bu yolla etkisiz kılınmaya çalışılmaktadır.

Tarımsal üretim sırasında, hangi aşamada olursa olsun ürün üretimine etki eden tarımsal zararlılar, *pestisitler* denilen kimyasal ksenobiyotikler ile yok edilir ve bitkisel zararlılara karşı da *herbisitler (bitki öldürücüler)* kullanılır. 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) de herbisitler grubundan fenoksi asittir (1-3).

Sentez edilme aşamasından, hedef organizmaya ulaştığı ve çeşitli etkenlerle bozulmaya uğratılıp tüm etkisi ortadan kalktığı ana kadar, herbisit 2,4-D ve türevleri ve bunların metabolitleri, pekçok canlıya ulaşır ve biyobirikime neden olurlar (4,5). Organizmada oluşan metabolitler asıl bileşikten çok daha zararlı olabilir (4,6).

Herbisit 2,4-D ile etkileştirilen yabancı, evcil ve deney hayvanlarında akut, subakut, kronik ve subkronik toksisitesi, teratojenitesi ve karsinojenik, mutajenik ve üreme üzerine etkileri bir çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (4).

Uzun süreli peryotlar halinde çalışıldığında bazı deney hayvanlarında yumuşak doku sarkomalarında ve hepatik karsinomda artış gözlenmiştir (1,4,6)

Herbisit 2,4-D'nin 5 mg/kg vücut ağırlığı (va) dozu, oral yolla insanlara verildiğinde, plazma derişimi 20 mg/L, plazma yarılanma süresi 12 ve idrar yarılanma süresi 18 saat olduğu, dozun % 82' nin değişmeden ve % 16' sının konjuge bileşik olarak atıldığı, plazma temizlenme süresinin 120 saati bulduğu, ardışık dozlarda ise plazma yarılanma süresinin 42 saat olduğu bulunmuştur (7). Bir başka araştırmada ise, 447-826 mg/L plazma düzeyinin öldürücü doz olduğu bildirilmiştir (8). Buna ek olarak, diğer bir araştırmada 2,4-D asit için idrar yarılanma süresi yaklaşık 40 saat, 2,4-D' nin dimetilamin tuzu için 59 saat olduğu rapor edilmiştir. (9).

Bazı mikroorganizmaların 2,4-D'yi karbon kaynağı olarak kullandıkları bildirilirken, bazılarının yüksek dozlarda özellikle esterleri ile yapılan uygulamalarda üretkenliklerinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca azot fiksedenden mikroorganizmalar da 2,4-D' ye duyarlıdır (10).

Herbisit 2,4-D'nin 200 mg/kg gün dozunda erkek ratların anilin hidroksilaz aktivitesini artırdığı (11), 1 mM 2,4-D ile 7 gün süreyle etkileştirilen kobay ovaryum hücre kültürlerinde propilamin transferaz ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini % 15 azalttığı, G<sub>1</sub>/S fazındaki hücre sayısını artırdığı ve hücre büyümesini, DNA ve protein sentezini inhibe ettiği bulunmuştur (12). 2,4-D'nin 0,6 g/kg dozu ile etkileştirilen ratlarda laktat dehidrogenaz, alkalın fosfataz ve kreatinin serum düzeyleri 5, 8 ve 24 saat peryotlarında 1-4 kat arttığı, aspartat ve alanin aminotransferaz

serum düzeylerinin 8. ve 24. saatlerde yükseldiği, amilaz düzeyinin 8. saatte arttığı ve sonra normale döndüğü ve glukoz ile total protein serum düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (13). 2,4-D oral olarak ratlara 2,6 mg/kg va verildiğinde, idrar ile atılımının 20,5 saatte pik değerine ulaştığı ve etilmorfin N-demetilaz aktivitesini hafifce yükseltirken etoksiresofurin O-deetilaz aktivitesini 2 kat artırdığı bulunmuştur (14). Uteruslarına 50-100 mg/kg 2,4-D verilen gebe ratların yavrularında beyin kateşolamin derişiminde artış olmuştur (15). Köpeklerde elektromiyografi ve elektroensefalografi değerlerini değiştirmiştir (16). Fare karaciğerinde peroksizom artışına neden olduğu, karnitin asetiltransferaz, katalaz ve mikrozomal epoksid hidroksilaz aktivitesini önemli ölçüde yükseltirken, sitosolik glutasyon transferaz aktivitesini daha az yükselttiği ve sitosolik epoksid hidrolaz miktarını düşürdüğü kaydedilmiştir (17). Değişik formülasyonlarının uygulandığı yumurtalardan çıkan embryo ya da civcivlerde karın ve iskelet kası DNA içeriğinde bir azalış ve serebrum, serebellum ve glial hücre DNA içeriğinde bir artış ile serebrum, kalp ve böbrek protein düzeylerinde azalışlar bildirilmiştir (18,19). Beyin esteraz aktivitesinde de % 20 düzeylerinde artışın olmasına dikkat çekilmektedir (20). Embryonik mortalitenin 5 mg/yumurta dozunda ortaya çıktığı not edilmiştir (21). Ticari 2,4-D fomulasyonları derişimleri olan 0,125-1,250 mM'lık dozlarda in vitro olarak insan lenfosit kültürlerinde kromozom aberasyonları sayısını önemli ölçüde artırdığı ileri sürülmüştür (22-24).

Herbisit 2,4-D'nin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-P DH) ve malat dehidrogenaz (MDH) aktivitesi farklı canlılarda ve dokularda incelenmişse de (25-29), toksikokinetik bir çalışma ile enzimatik aktivite

çalışmaları peryotlu olarak birlikte yürütülen araştırmalara pek rastlanmamıştır.

Ancak, Sivas çevresi göl ve akarsularında 7 değişik tür balıkta 2,4-D birikimi ve Hekzokinaz (HK), G-6-P DH ve MDH aktivitesi üzerine yapılan araştırmada, kas dokusu 2,4-D birikim değerleri 1,77-6,33 ppm düzeylerinde olduğu ve HK ve MDH azalan aktiviteleri ile ilişkili olduğu gösterildi (30).

Bir ksenobiyotiğin toksikokinetik tablosunun çizilmesi, onun etki mekanizmasının anlaşılmasından metabolitlerinin ve kalıntılarının (residue) yerlerinin kestirilmesine kadar biyolojik ve çevresel öneme sahip pek çok veriye anlam kazandırır (1,4,13). Daha önce tek tek yapılan araştırmaların bir pota içerisinde toplanıp ileriki araştırmalara yön vermesi için yeni bir bakış açısı kazandırması bakımından araştırmamızın özel bir öneme sahip olacağı kanısındayız.

1. Çünkü, biyomakromoleküllerden protein, lipid ve nükleik asitler ile hem 2,4-D hem de metabolitleri ya da kalıntıları etkileşir (31) ve bazı yapısal ve şekilsel değişimlere uğratırlar (32).

2. Tüm fenoksi asitler plazma proteinlerine çok hızlı yarışmalı olarak bağlanırlar ve kan dolaşımı yoluyla diğer organ ve dokulara iletilirler (33,34). Derişimin az olduğu diğer vücut sıvılarına doğru bir akışın olması kaçınılmazdır (1,4,34). Plazma derişimi diğer vücut sıvılarınınunkinden az olduğunda ise, tersine bir akış başlar ve aynı durum organ ve dokularda oluşan metabolitleri için de geçerlidir. Ksenobiyotiğin plazma proteinlerinden ayrılıp diğer organ ve dokulara geçip yeniden

başka proteinler ile bağ kurması, bu bir enzim bile olsa, belirleyici bazı kurallara uymalıdır. Bu da ksenobiyotiğin organizmadaki kinetik davranışlarını ve organizmanın ksenobiyotiğe tepkisini belirler (1).

3. Enzim aktiviteleri ile birlikte çalışılması, biyoderişim ve biyobirikim ile canlı biyokimyasına etkisi arasında paralellik kurulmasına olanak sağlar. Ksenobiyotiğin proteinlerle etkileşimi kaçınılmaz bir durum olduğuna göre, enzimlerle etkileşimi de olabilir. Bu etkileşimin boyutu ve enzimdeki bağlanma ya da tutunma yeri, bazan enzimatik aktivitenin izlenmesi ile anlaşılabilir. Bu sayede, hücrenin hangi metabolik yolunda ve fraksiyonunda ya da organelinde etkili olduğuna netlik kazandırılabilir (1,2,4).

4. Toksikokinetik modellerin verileri ile hangi organ ve dokunun hangi oranlarda ve ne kadar süre etkilendiği anlaşılır. Varsa, metabolizması ve bunun yeri ve hızı ortaya çıkartılabilir.

5. Toksikokinetik tablo sayesinde araştırılan maddenin mi yoksa metabolitlerinin mi toksik etkiye neden olduğu kanıtlanır.

6. Hedef organ ya da doku bulunur ve etki mekanizması, metabolizması ve zararsız hale getirilişi için referans noktaları elde edilir.

Bu bilgiler ışığı altında, 2,4-D'nin toksikokinetik araştırmaları ile enzim aktivitesi araştırmalarının birlikte yürütülerek, bu ksenobiyotiğin vücut içindeki kinetik davranışının izlenmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

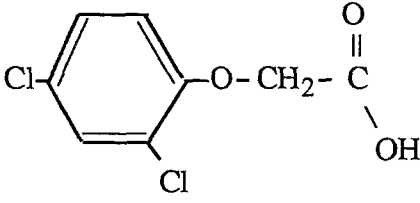
### 1 - 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D)

Biyolojik açıdan bir ksenobiyotiktir. Belirgin ve nadir herbisit özelliklere sahip olduğundan, en önemli sentetik bitki hormonu analogudur. Seçici etkisi ile bir çok geniş yapraklı bitkiye karşı toksiktir ve monokotiledon (tek çenekli) bitkilerde toksik değildir. Çoğunlukla bitki öldürücü olarak kullanılırlarsa da, bu fenoksi asitler meyvelerin erken olgunlaşmalarının önlenmesi, çekirdeksiz meyve üretimi ve bitki büyümesinin düzenlenmesi gibi özel amaçlı kullanımları da vardır (34). Gerçek bitki büyüme hormonu *indolasetik asit* gibi uyumlu büyümeyi sağlamaz, bitkinin sadece üst gövde bölümünün metabolizmasını uyararak hızlandırır ve uyumsuzlaşan metabolizma kendi hücre materyalini tüketerek bitkinin ölümüne neden olur (4,35).

İlk 1941'de tanımlanmıştır. Savaş yıllarında bu grup bileşikler hakkındaki keşiflerin çoğu askeri önemlerinden dolayı, savaş sonrasına kadar yayımlanmamıştır. Tarımsal amaçlı kullanımları ve yaygınlaşmaları sonradan olmuştur. Vietnam savaşında ağaçlık alanların yapraklarını dökmek için 1:1 oranında 2,4-D ile 2,4,5-T (2,4,5-triklorofenoksiasetik asit) karışımı (agent orange~sarı yağmur) kullanılmıştır (35).

Akut oral LD<sub>50</sub> değerleri ratlarda 2,4-D asit için 375- 666, sodyum tuzu için 805-2000, izopropil esteri için 700, butil esteri için 920-1500 mg/kg vücut ağırlığı olarak bildirilmektedir (4).

### 1.1 - Kimyasal Özellikleri



#### 2,4 D'nin açık formülü

Emülsüfiye olabilir konsantre, solüsyon, toz, sprey ve granüller halinde formülasyon tipleri vardır. Diuron, mekoprop dalapon, ioksinil, bromoksinil ve 2,4,5-T ile olan karışımları kullanılır (36). 2,4-D ve türevleri fenoksialkanoik asitler ya da fenoksi asit herbisitler olarak da anılırlar (6). Organoklorlu ve klorofenoksiler denildiğine de rastlanır. 2,4-D ve bazı fenoksi asit herbisitler Tablo 1' de verilmişlerdir (4).

Kuvvetli alkali ortamlarda monokloroasetik asit ile 2,4-diklorofenolün tepkimesi ile ya da fenoksiasetik asitin klorlanması ile sentezlenir (37,38). Alkali metal ve amin tuzları ilgili radikaller ile tepkimelerinden, esterleri ise esterleştirme teknikleri ile elde edilir. Sentezlenmeleri sırasında 2,7-diklorodibenzo-p-dioksin, 1,3,7-triklorodibenzo-p-dioksin, 1,3,6,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin ve 1,3,7,9-tetraklorodibenzo-p-dioksin yan ürünleri (dibenzo-p-dioksinler) kontaminantları da oluşur ve bu kontaminantların toksik etkileri daha fazladır (4,10,38,39).

**Tablo 1. Bazı Fenoksi Asit Herbisitler**

Herbisit Adı (UIPAC)	Moleküller Formül	Moleküler Ağırlık	Kısa Adı	Sinonimi
2,4-Diklorofenoksiasetik asit	$C_8H_6Cl_2O_3$	221,0	2,4-D	
2-(2,4-diklorofenoksi) propiyonik asit	$C_9H_8Cl_2O_3$	235,0	2,4-DP	Diklorprop
(2,4-diklorofenoksi) butirik asit	$C_9H_8Cl_2O_3$	235,1	2,4-DB	
4-kloro-2-metilfenoksi asetik asit	$C_9H_9ClO_3$	200,6	MCPA	
2,4,5-triklorofenoksiasetic asit	$C_8H_5Cl_3O_3$	225,5	2,4,5-T	
2-(2,4,5-triklorofenoksi)- propiyonik asit	$C_9H_7Cl_3O_3$	269,6	2,4,5-TP	Fenoprop
2-(2-metil-4-klorofenoksi) propiyonik asit	$C_{10}H_{12}ClO_3$	255,4	MCPA	Mekoprop

## 1.2 - Fiziksel Özellikleri

Stabil (kararlı), nonhigroskopik, renksiz, kokusuz ve ucucu olmayan kristallerdir, ancak esterleri az çok uçucudurlar. Erime derecesi asitte 140,5, dimetilamonyum tuzunda 85-87, amonyum tuzunda 179-180, dietilamin tuzunda 157-159, etanolamin tuzunda 145-147 ve trietanolamin tuzunda 142- 144°C'dir (34).

Suda % 0,089, etanolde % 129,9, etil eterde % 24,34, asetonda % 85,0, toluende % 0,67 ve ksilende % 0,58 oranlarında çözünür (34). Dimetilamonyum tuzu suda % 300 oranında çözünürken, izopropil, bütiletil, etilheksil, izooktil, metil, etil ve bütil esterleri suda çözünmezler



ve bunlar organik çözücülerde iyi çözünürler. Esterlerinin 25°C'de kısmi buhar basıncı  $0,02 - 1.1 \times 10^{-3}$  mmHg arasında değişir . 2,4-D asitin 160°C'de kısmi buhar basıncı 52,3 Pa ve 25° C'de pKa'sı 2,64-3,31 arasındadır (39).

## 2 - Üretimi ve Tüketimi

Sadece ABD'de, 1981 yılında 300 bin ton herbisit ve 1987 yılında yaklaşık 31 bin ton 2,4-D aktif maddesi tüketildiği göz önüne alınırsa, dünya herbisit üretiminin ve tüketiminin korkunç boyutlarda olduğu anlaşılacaktır. Kullanılan herbisit amaçlı maddelerin % 30'u, 2,4-D aktif maddesi ile hazırlanmıştır. Sadece 2,4-D ve türevleri olan bileşiklerden tüm dünyada her yıl 500 bin ton aktif madde tüketildiği tahmin edilmektedir (39). Her geçen gün besinsel ihtiyaçların nüfus ile orantılı olarak arttığı düşünülürse, gelişmiş ülkelerde kullanımı yasaklanmasına rağmen, gelişmesini tamamlayamamış ülkelerin katkısıyla daha da artacağı ortadadır.

İstatistiksel veriler yeterli olmamakla birlikte, yurdumuzda tüketiminin yaygın olduğu ve, sadece 1986-87 yıllarında Sivas İli'nde yaklaşık 120 ton tüketildiği iletilmektedir (40).

## 3 - Doğada İzlediği Yol

Hedef bölgeye ya da organizmaya dışarıdan uygulandıktan sonra, organizma yüzeyinde, toprak üzerinde, suda ve havada ışıkla parçalanmaya (fotodekompozisyon) uğrayarak bozulur ve sulu ortamlarda bu bozulma, karbondioksit kadar oksitlenmesi biçimindedir (41). Bundan başka bozulması, bulunduğu ortamın fiziksel ve kimyasal özellikleri ile sınırlı olarak bir kaç günden bir kaç yıla kadar değişmektedir, ancak kendili-

ğinden bozulma ile ortaya çıkan kalıntılar, metabolitleri gibi daha toksik olabilirler (39).

Göl, gölet, akarsular ve yeraltı sularında sucul ve toprakta toprak mikroorganizma faunasınca bozulmaya uğratılırlar. Ayrıca bir kısmı bitki kökleri tarafından emilerek elemine olur. Kullanıldığı alanlardan içme ve kullanım sularını da kontamine ederler. Metabolize oldukları organizmadan metabolitleri ve oluşan kalıntıları insanlara kadar ulaşabilir. Tarımsal zararlılar ile kimyasal savaşın yoğun olduğu ilkbahar ve yaz aylarında kullanıldıkları tarım havzasında fenoksi asit herbisitlerin derişimleri havada 0,00-10,45 ppm, akar sularda 8,66-47,17 ppm ve içme suyu kaynaklarında 1,23-6,82 ppm birikim değerlerine ulaşır (4,10,39).

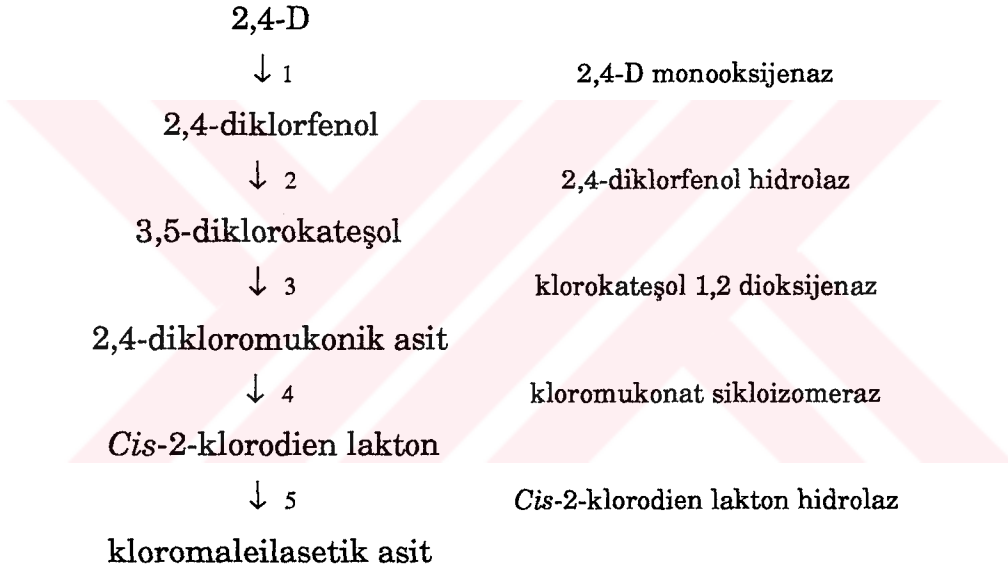
#### **4 - Metabolizması ve Canlılar İle Etkileşimi**

Bitkilerde üç değişik yoldan metabolize edilirler. I. Yan zincir indirgenmesinde yan grup asetik asit aerobik şartlarda fenil halkasından koparılır ve karbondioksite kadar metabolize edilir (10,42). II. Aromatik zincirin 4. pozisyonunda bulunan klorun 5. pozisyona kaydırılması ile yeri değiştirilir ve 4. pozisyona hidroksil grubu takılır. Oluşan ara ürün ikinci bir yer değiştirme yaparak klor, 5. pozisyondan 3'e aktarılır (4,10,39,43,44). III. Bu yolda en çok üzerinde durulan glukoz ile olan konjugasyonudur. Glukozun 1. karbonuna bağlı hidroksil grubu ile 2,4-D'nin karboksil grubu arasında bağ oluşur ve zararsız konjugat haline getirilir (10).

Pek çok mikroorganizma 2,4-D ve benzeri herbisitleri metabolize edebilir. Çok fazla sayıda olan bu mikroorganizmalardan bazıları 2,4-D'yi enerji ve karbon (C) kaynağı olarak da kullanabilir. Sandmann ve arkadaşları bu konuda yapılan araştırmaları derleyerek 1988 yılında yayınlamışlardır (10).

Toprak mikroorganizma faunasında yapılan araştırmalarda, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Hormidium*, *Palmella* ve *Ulatrix* en duyarlı cinsler iken, *Chlorella*, *Lyngbya*, *Nostoc* ve *Hantzschia* cinslerinin en dirençlileri olduğu bulundu (4,10,39).

Bazı bakteri türleri, plazmitleri (plazmit pJP4) aracılığı ile 2,4-D'yi enerji ve karbon kaynağı olarak kullandıkları metabolik yol Şekil 1'de özetlenmiştir (45).



**Şekil 1** 2,4-D'yi enerji ve karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerde olası metabolik yol.

Yeşil algler (*Scenedesmus* gibi) 220 mg/L derişiminden belirgin bir Şekilde etkilenirken (46), mavi-yeşil alglerden çoğunun ılımlı dozlarda hiç etkilenmediklerini bildiren raporlar çıkmışsa da (39), değişik 2,4-D formulasyonları ile daha sonra yapılan araştırmalarda özellikle azot (N)

fikseden bir seri mavi-yeşil algin etkilendikleri gösterildi (47).

Hayvanlarda metabolizması hakkındaki bilgiler çok sınırlıdır. 2,4-D amin ve tuzları oral yolla verildiğinde hızlı bir şekilde hidrolize uğrarlar ve barsaklardan emilirler. Omurgalılarda barsak florasınca az çok metabolize edildikleri ileri sürülmektedir (39).

Suda yaşayan omurgasızlar benzer formülasyonlara tepkide daha duyarlıdır ve üreme kapasitelerinin, düşük dozlarda bile azalması ilgi çekicidir (39).

Balıklarda etkilenme, fenoksi asit herbisit ve formülasyon çeşidine (ester, tuz vb) ve balığın duyarlılığına bağlıdır, zira bazıları için hiç etkilenmedikleri en yüksek doz 50 mg/L iken, bir çoğu için LC<sub>50</sub> değerleri esterler için gökkuşağı alabalığında (*Salmo gairdneri*) 1-40 mg/L, serbest asiti için 4,45 mg/L gün değerleri göze çarpmaktadır (48).

Balıklar ile yapılmış olan pek çok araştırmanın sonuçları gösteriyor ki, 2,4-D birikim değerleri ve etkilenme dereceleri karada yaşayan organizmalardan daha fazladır (4, 30,39,40).

Fenoksi asit herbisit uygulanan alanlarda ya da çevresinde yaşayan organizmalarda etkilenme diğer organizmalarinkine göre daha fazladır. Kullanıldıkları alanlarda değişik formülasyonları ile kontaminasyon etkilenme derecesini artırır. Herbisit ile kontamine besinlerin tüketilmesi vücuda giren miktarını belirler (4,39).

Klorlu fenoksi asit herbisitler benzer kinetik özelliklere sahiptir. Oral olarak uygulandıklarında barsaklardan çok hızlı bir şekilde tamamen emilir ve hemen plazma proteinleri ile etkileşerek onlara bağlanırlar. Kan dolaşımı sayesinde de diğer organ ve dokulara kolayca ulaşır ve

böbreklerin çok etkin süzümü ile değişime uğramadan atılırlar. Proteinlerle etkileşimlerinin fazla olması nedeniyle yüksek dozlarda emilimi, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonu değişmeler gösterir. Ancak fenoksi asit herbisitler ile canlıların etkileşme süresi uzadıkça (günler, haftalar hatta aylar boyunca 2,4-D uygulanması) karaciğer, kalp, akciğer, böbrek, dalak gibi organlarda ve kas dokusunda birikim ve kalıntı derişim değerleri artar. (4,10,49-53).

### **5 - Toksikokinetik Yaklaşım**

Albumin ve gliko, lipo ve metaloproteinler kana ulaşan kimyasal maddeler ile etkileşirler. Bu etkileşim hidrofobik olduğu kadar hidrojen, van der Waals ve iyonik bağlar şeklinde de olabilir. Özellikle plazma albumini asidik, bazik ve nötral ksenobiyotikler ile bağ kurar. Ancak, bağlı olmayan (serbest) ksenobiyotik difüzyon ile diğer organ ve dokulara geçtikçe, proteinlere bağlı olanlar çözünür ve çözünme derecesi sabit kalır. Bu süreç diğer organ ve dokulardaki serbest ksenobiyotiğin plazma sıvısındaki serbest ksenobiyotik ile denge kurulana kadar devam eder. Ksenobiyotik elimine oldukça bu denge tekrar tekrar kurulur ve vücut ksenobiyotikten tamamen arındırılana dek sürer (49,53-55).

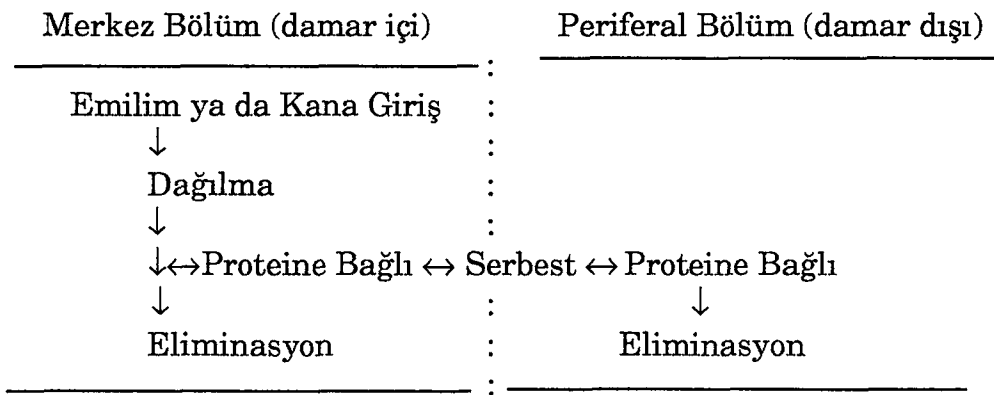
Ksenobiyotiğin yapı ve karakterine bağlı olarak albumin molekülünün farklı kısımları bağlanma bölgeleri olarak hizmet eder; kapasitesi sınırlıdır ve bu nedenle doyurulabilir. Çoğunluk, ksenobiyotikler arasında aynı bağlanma bölgesi için yarışma olur ve bağlanma ksenobiyotiklerin derişimlerine ve afinitelerine (ilgilerine) bağlıdır. Aynı durum organ ve dokulardaki proteinler için de geçerli olduğu söylenebilir (53,54).

Dağılma, kana karışan ksenobiyotik maddenin ya da metabolitlerinin vücutta dolaşması ve yayılması sürecidir. Bir ksenobiyotiğin dağılı-

mı kan debisine, difuzyon gücüne, serbest kalanların derişimine ve biyomakromoleküllerdeki bağlanma yerlerine olan afinitesine göre gerçekleşir. Ksenobiyotiğin kan derişimi doza, eliminasyon oranına ve dağılma hacmine bağlıdır. Ksenobiyotik kan düzeyi düşükse, dağılma hacmi büyüktür ve dağılma hacmi matematiksel olarak bulunan hayali bir hacimdir ve sanal hacim olarak da bilinir (53).

2,4-D ve diğer fenoksi asit herbisitler lipofilik olduklarından, hücre membranı engelini difuzyonla aşarak hücre içi sıvılara kolayca ulaşırlar ve lipofilikliğı yüksek olan ksenobiyotikler karaciğer, böbrek ve yağ dokusunda birikirler (49,53).

Toksikokinetik çalışmalarda, canlı vücudu iki bölüm olarak değerlendirilir. Kan dolaşımı ile temsil edilen damar içi bölüm, "merkez bölüm" ya da "hızlı bölüm" olarak adlandırılır. "Periferal bölüm" ya da "yavaş bölüm" denilen bölüm ise ksenobiyotiğin ulaştığı organ ve dokulardır ve damar dışı bölüm olarak adlandırılır. Serbest ksenobiyotik organ ve dokularda elimine edildikçe, periferal bölümde bağlı olanlar salınırlar ve merkez bölüme geçerler, sonra merkez bölümden eliminasyon bölgesine (ya da bölgeleri) doğru bir ksenobiyotik madde akışı gerçekleşir. Bölümler arası ksenobiyotik madde akışı şekil 2' özetlenmiştir (53).



**Şekil 2.** Merkez bölüm ile periferal bölüm arasında ksenobiyotik madde akışı

2,4-D'nin pKa'sı ortalama 3,0 olduğu için fizyolojik pH'da çok az bir kısmı nötr (proton almış) haldedir, bu nedenle dağılımı çok hızlıdır (56). Ayrıca organik anyon taşıyıcı sisteminin de fenoksi asitlerin böbrek, karaciğer, beyin ve fetusa dağılımında önemli işlevleri olabilir (49,55,56). Renal organik anyon (asit) salgı sistemi fenoksi asit herbisitlerin eliminasyonunda en önemli yoldur ve aktif bir süreçtir. Fenoksi asit herbisitler bu sistemin substratıdır ve eliminasyonları da ilk adım (first order) kinetiği ile gerçekleşir. Yüksek dozlarda ise eliminasyon süreci Michaelis-Menten kinetiklerini izler. 2,4-D uygulanmış ratlara 2,4,5-T verildiğinde, 2,4-D'yi elimine eden bu renal taşıma sistemi 2,4,5-T temizlenene kadar inhibe olur (52)

### **5.1 - Deneysel Toksikokinetik Bulgular**

Ratlar haftada 5 gün ve günde 2 saat dermal olarak 2,4-D ile etkileştirildiklerinde, % 24'lük bir dermal emilim ile birlikte, şiddetli ve ilerleyici dermaditisin geliştiği ve bu sırada plazma derişiminin 66,5 ppb'e kadar yükseldiği bildirildi (57). Dermal uygulamalarda, 2,4-D asit ile etkileştirilen insanlarda polineuritis klinik bir bulgudur ve doz arttıkça lokal irritasyonlar gelişir (53,58).

İn vitro olarak düşük plazma derişimlerinde, 2,4-D asitin yaklaşık % 97'si proteinlere bağlanmış olarak bulunur, bu değer yüksek derişimlerde % 65'e kadar düşer (55). 100 mg/kg va 2,4-D ile etkileştirilen dişi ve erkek ratlarda plazma, karaciğer, böbrek, akciğer, iskelet kası ve dışkıda en yüksek 2,4-D derişilerine 24. saat sonra ulaşıldığı ve en düşük değerini 6. saatte görüldüğü iletildi (59).

Oral olarak 5 mg/kg va 2,4-D asiti verilen insanlarda plazma pik derişimine 4-24 saat içerisinde ulaşılırken, dağılma hacminin 1010 L/kg



olduğu bulundu, bu değer aynı Şekilde etkileştirilen köpeklerde ise 2210 L/kg 'dır (58).

Bilinmeyen miktarda 2,4-D alan bir insanda yapılan araştırmada en yüksek 2,4-D derişimi karaciğerde (407,9 ppm) bulunmuŐ ve sırasıyla böbrekte (193,4 ppm), kasta (117,5 ppm), beyinde (93,4 ppm) ve kanda (57,6 ppm) değerleri tespit edilmiştir (8).

Plazma herbisit derişimi yüksek olduğunda renal organik anyon sistemi doygunluğa ulaşır; nitekim ratlarda 50-100 mg/kg va 2,4-D oral dozu bu sistemde doygunluğu sağlar (52,60-62). 40-160 mg 2,4-D/kg va dozu oral olarak verilen ratlarda beyin organik anyon taşıma sisteminin yarışmalı inhibisyonu nedeniyle 2,4-D'nin alıkonduğu ve beyindeki eliminasyonu sürecini yavaŐlattıęı sonucuna varılmıŐtır (61).

2,4-D'nin plazma yarılanma ömrü formulasyona göre ratlarda 3-6 saat, tavuklarda yaklaşık 8 saat, sığırlarda 7,5-10 saat, domuzlarda 10-12 saat olarak bulunduğu kaydedildi (55,58). Bunun yanında 2,4,5-T verilen ratlarda bu değer 4,7 saattir ve 2,4-D'nin idrar ile konjugat olarak eliminasyonu % 20'den azdır (52).

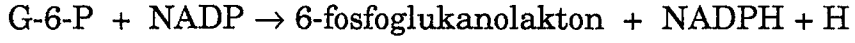
Oral olarak 6 hafta boyunca günde 15 mg/kg va 2,4-D ile beslenen ineklerin süt salgısında ne 2,4-D, ne de metabolik ürünleri bulunamadı (59).

## **6 - Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-P DH)**

D-Glukoz-6-Fosfat: NADP oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49. Enzim karbohidrat metabolizmasında aerobik glikolitik metabolik yolun (pentoz fosfat ya da fosfoglukonat) ilk tepkimesi olan glukoz-6-fosfatın (G-6-P) 6-fosfoglukanolaktone oksidasyonu ve iki elektronun NADP'ye taŐınması



tepkimesini katalizler. Tepkime aşağıdadır.

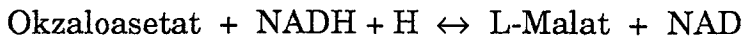


Piridin bağlı dehidrogenazlardan stereospesifik bir enzimdir. Koenzim olarak NADP'ye gereksinim duyar. Enzimin aktif bölgesine ilk NADP, sonra da G-6-P bağlanır. Tepkime sonrası kompleksten 6-fosfoglukanolakton ayrılır. Bu metabolik yoldan elde edilen NADP ve pentoz fosfat ile diğer bazı metabolik yolların gereksindikleri substratları karşılanmış olur.

Enzim karakteristik Michealis-Menten kinetiği gsterir. 67500 daltonluk iki alt birimin (subunit) dimeridir. G-6-P için  $K_m=3,6$  ve NADP için  $K_m=5,4 \mu\text{m}'\text{d}\ddot{u}\text{r}$ . Mg ve Cl iyonları ile aktive olur ve Na, K, inorganik P, ağır metaller ve bivalent metal iyonları inhibe olur. Bazı mono, di ve trinkleosidfosfatlarca inaktive edilir (63).

## 7 - Malat Dehidrogenaz (MDH)

L-Malat: NAD oksidoredüktaz, EC 1.1.1.37. Hem mitokondride hem de sitoplazmada bulunur. Malatın oksaloasetata dönüşümünü ve iki elektronun NAD'ye aktarılmasını sitoplazmada, oksaloasetatın malata dönüşümünü ve NADH+H'dan iki elektronun alınmasını mitokondride katalizler. Bu iki enzimin de fiziksel ve kinetik özellikleri farklıdır. Bir enzim molekülü iki koenzim bağlar. Yaklaşık 35000 moleküler ağırlığı olan iki alt birimden oluşur. Fosfat, arsenat ve çinko ile aktive, nikotinic asit, adenin, AMP, ATP ve fenoller ile inhibe olur (63). Tepkime aşağıdaki gibidir.



## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmamızda, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanan, daha önce başka bir amaçla üzerinde hiç bir deney yapılmamış sağlıklı Wistar albino ratlar (*Rattus norvegicus* var. albino) kullanıldı. Rat ağırlığının en az 210 g olmasına özen gösterildi ancak, herhangi bir üst sınır uygulanmadı. Ayrıca yaş ve cinsiyet farkı gözetilmedi. Ratlar, standart rat yemi ile yemlendi ve serbest su verildi.

Çalışma 2, 8, 16 ve 24 saat periyotları olarak planlandı. Her bir periyot biri deney grubu, diğeri saf 2,4-D'yi çözmek için kullanılan etanolun kontrol grubu ve ayrıca hem etanole hem de deney grubuna kontrol olması için ikinci bir kontrol grubu, yani serum fizyolojik kontrol grubu oluşturuldu. Bir periyodu oluşturan deney grubu ile etanol kontrol grubu ayrı ayrı tekrarlar şeklinde çalışılırken, serum fizyolojik grubu tek bir grup olarak ayrıca çalışılmış ve diğeri iki gruba kontrol olmuştur. Oluşturulan her bir grupta 4 adet rat kullanıldı. Diğeri bir deyişle, deney grupları için 4 periyot x 4 rat = 16, etanol kontrol grubu için 4 periyot x 4 rat = 16 ve serum fizyolojik kontrol grubu için 4 rat olmak üzere toplam 36 adet rat kullanıldı.

Yüksek derişimlere ulaşılabiliyor olması nedeniyle absolut etanol (%99,5, Delta Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.) çözücü olarak kullanıldı. Ayrıca etanolun ratlar üzerine olası etkilerini en aza indirebilmek için doz-

lama hacminin 0,1 mL/rat olmasına karar verildi. Ratları dozlamada kullanılmak üzere, 30 mg/0,1 mL olacak şekilde etanol ile 2,4-D (Sigma, D 8407) çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti uygulama anına kadar alüminyum folye ile sarılarak ışıktan korundu.

Dozlanmasına karar verilen ratlar, enjeksiyondan üç gün önce sağlık durumlarının kontrolü için yaşam ortamlarından alınarak izole edildi ve metabolik uyumun sağlanması için dozlamadan bir gün önce aç bırakıldı.

Deney grubuna 2,4-D-etanol çözeltisi, etanol kontrol grubuna serbest etanol ve serum fizyolojik kontrol grubuna serum fizyolojik 0,1 mL hacimde intra venöz (IV) olarak uygulandı.

Peryod süresi dolduktan sonra ratlar dozlanma sıralarına göre katı parafin bloklar üzerine alındı, servikal dislokasyonla hareketsizleştirildi. Hayvanın canlı kaldığı süre içinde heparinle yıkanmış 10 mL' lik enjektör ile kalbe girilerek kan alındı (yaklaşık olarak 6 mL, bazı kereler birkaç mL). Diğer doku ve organların kandan arındırılması amacıyla mümkün olduğunca çok kan çekilmeye çalışıldı. Daha sonra sırasıyla karaciğer, dalak, böbrek, kalp, kas ve beyin çıkarıldı ve 0,15 M KCl *izotonik sıvı* ile yıkandı.

Alınan *kan örnekleri* 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma 2,4-D derişimlerinin bulunmasında kullanılmak üzere örnek cam tüpleri alüminyum folye ile sarılarak korumaya alındı.

### **1 - Organ ve Dokuların Özütlenmeleri**

*İzotonik sıvı* olarak kullanılan 0,15 M KCl içine 0,25 M olacak şekilde Sukroz (% 99+, Sigma S-0389) eklenerek *özütleme sıvısı* elde edildi.

Kas dokusu ve karaciğerden 2 g'lık parçalar, diğer organlar ve her iki böbreğin tamamı özütleme için kullanıldı. Organ ve dokular, özütleme öncesi küçük parçalara bölündü ve yeniden izotonik sıvı ile yıkandı. Böylece organ ve doku içinde kalan kan uzaklaştırılmaya çalışıldı. Organ ve dokuların tuttukları izotonik sıvı kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı.

Özütleme: Beyin için 1:2, karaciğer, kalp, dalak ve böbrekler için 1:3 ve kas dokusu için 1:5, g/mL oranında özütleme sıvısı eklendi. Beyin, dalak ve böbrekler 1100, karaciğer ve kalp 1400 ve kas 1600 devir/dakika hızla dönen teflon-cam özütleyicide (B.Braun) ve karaciğer, dalak ve böbrekler en az üç, kalp dört, beyin beş ve kas dokusu yedi vuruş yapılarak özütlendi. Özütleme sırasında örnek proteinlerinin zarar görmemesi için köpüklenmemelerine dikkat edildi.

Organ ve dokulardaki 2,4-D derişimlerinin bulunmasında kullanılmak üzere özütlerden cam tüplere 1 mL ayrıldı ve korumaya alındı.

Özütleme öncesi organ ve dokuların tümü beher içerisinde, özütleme sırasında özütleyicinin cam tüpü ve özütleme sonrası korumaya alınan özüt cam tüpleri çalışmanın bitimine dek buz banyosunda ( 0°C) tutuldular.

## **2 - Sitoplazmik Fraksiyonun Eldesi**

Özütlerin daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılabilmesi için önce sitoplazmik fraksiyonlarının elde edilmesi gerekiyordu. Bu amaç için soğutmalı ve vakumlu olan Beckman Model J 2 Santrifüj ve bunun JA 21 başlığı (rotor) ve orijinal santrifüj tüpleri kullanıldı.

Sitoplazmik fraksiyonun eldesi: Özütler, 1000 g 'de 0°C ve vakum şartları altında 10 dakika çevrildiler. Sonra *dökelti sıvısı* (süpernatant)

santrifüj tüplerinden daha önce buz banyosunda bekletilen cam tüplere pipetlendi. Santrifüj tüplerinin içinde kalan çökelti (presipitant ya da pellet) üzerine özütleme sıvısından 2 mL eklendi ve Nüvemix mikser ile karıştırıldıktan sonra aynı şartlar altında yeniden santrifüj edildi. Bu dökelti de ekstre edilerek daha önce ekstre edilen dökelti sıvıları ile birleştirildi. **Ekstreler (örnekler)**, total protein değerinin bulunmasında ve enzimatik çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere korumaya alındı. Çalışmalar süresince korumaya alınan örnek tüpleri buz banyosu içerisinde tutuldu.

Örneklerde enzim özgül aktiviteleri ve total protein değerleri Shimadzu UV-1201, UV -Vis Spectrophotometer ve buna bağlı olarak çalıştırılan Nüve BM 101 benmari ataşmanı ile yapıldı.

Enzim aktiviteleri 340 nm'de, total protein değerleri 650 nm'de 3 mL hacimli ve 1 cm ışık yolu olan quarz küvetler ile 37° C izlenmiştir.

### **3 - G-6-P DH Aktivitesinin İzlenmesi**

G-6-P DH aktivitesinin izlenmesi için enzim kaynağı olarak organ ve doku örnekleri kullanıldı. Aktivitenin izlenmesinde aşağıdaki çözeltilerden faydalanıldı.

A - Trietanolamin tamponu (0,1 M, pH=7,6),

B - MgCl (0,1 M),

C - Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP, 11 mM)  
(Sigma, N 0505) ve

D - Glukoz-6-fosfat (G-6-P, 35 mM) (Sigma, G 7879)

**Tepkime karışımı** ise, aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı.

Trietanolamin tamponu ....	2,575 mL (kas için 2,590 mL)
NADP .....	0,100 mL
G-6-P .....	0,100 mL
MgCl .....	0,200 mL
Örnek .....	0,025 mL (kas için 0,010 mL)

Karışım, bir süre **okuma odasında** ısıtıldı. Tepkime karışımına en son enzim kaynağı eklenerek tepkime başlatıldı. Dakikada bir absorbans değerleri not edildi. Absorbans değerlerinin farkı alınarak, bir dakikadaki absorbans değişimi ( $\Delta A$ ) bulundu.

Volüm aktivite (VA) değerleri;

$$\text{Volüm Aktivite (U/mL)} = 3,00 \times \Delta A / E_{340} \times 1 \times \ddot{O}$$

$$E_{340} = 6,22 \text{ cm}^2 / \text{mol}$$

$\ddot{O}$  = tepkimeyi başlatan

örnek miktarı (mL)

formülü yardımıyla hesaplandı (63).

#### 4 - MDH Aktivitesinin İzlenmesi

Örneklerde MDH aktivitesinin izlenmesinde aşağıda sıralanan çözeltiler kullanıldı.

A - Fosfat tamponu (0,1 M, pH=7,5),

B - Oksaloasetik asit (15 mM) ve,

C - Nikotinamid adenin dinükleotid, indirgenmiş formu  
(NADH, 12 mM) (Sigma, N 8129)

Örnekler, enzim kaynağı olarak kullanılmadan önce fosfat tampo-  
nu ile 50 kat sulandırıldı. Tepkime karışımı ise, şu şekilde hazırlandı:

Fosfat tamponu .....	2,85 mL,
NADH .....	0,05 mL,
Oksaloasetik asit .....	0,10 mL ve
Örnek .....	0,01 mL

Tepkime karışımı okuma odasında bir süre ısınmaya bırakıldı ve en son örnek eklenerek tepkime başlatıldı ve absorbanları dakikada bir kaydedildi. Bundan önce olduğu gibi  $\Delta A$  değerleri hesaplandı.

MDH volüm aktivite değerleri de daha önce verilen formül ile hesaplandı (63).

### 5 - Protein Derişim Değerlerinin Bulunması

Örneklerin protein derişim değerleri "Lowry Yöntemi" ile bulunmuştur (64).

Çözeltileri,

A - 0,5 g beş sulu bakır sülfat ve 1g sodyum sitrat 100 mL suda,

B - 20 g sodyum karbonat ile 4 g sodyum hidroksit 1 L suda eritildi,

C - 50 mL çözelti B ile 1 mL çözelti A kullanım öncesi karıştırıldı,

D - 10 mL Folin Ciocalteu's Phenol, 2 N (Sigma, F- 9252) üzerine  
10 mL su eklendi ve

E - Standart protein olarak sığır serum albumini (2 mg/mL)  
kullanıldı.

Yöntem: 0,5 mL örnek ile 2,25 mL çözelti C karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında kendi haline bırakıldı. Sonra 0,25 mL çözelti D'den eklendi ve

çalkalandı. 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 650 nm'de absorpsiyon okundu. Standart protein eğrisinden yararlanılarak örneklerin protein derişim değerleri hesaplandı.

### 6 - Enzim Özgöl Aktivitelerinin Hesaplanması

Organ ve doku örneklerinin enzim özgöl aktiviteleri (SA), daha önceki aşamalarda kaydedilen volüm aktivite değerleri ile protein derişim değerleri kullanılarak;

$$\text{Özgöl Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{VA}}{\text{protein derişimi}} \times \frac{1}{\text{(mL inkübasyon karışımındaki mg protein)}}$$

formülü ile hesaplandı (63).

### 7 - Organ ve Dokularda 2,4-D Miktarlarının Bulunması

Araştırmanın öndeki deneysel aşamalarında, plazma ile organ ve dokulardaki 2,4-D derişimlerinin bulunması gerekçesiyle cam tüplerde korumaya alınan plazma örnekleri ve diğer organ ve doku özütlerinin tamamı bu amaç için kullanıldı.

1. Öncelikle, kan plazması örneklerinin hacimleri pipetleme yapılarak bulundu.

2. Özüt ve örnek tüplerine, içlerinde bulunan özüt ve örnek hacminin iki katı kadar dietileter (min. % 99,5, Merck) eklendi. Tüpler, plastik bir tıkaçla tıkanarak yüksek çalkalama hızında Nüvemix mikser ile bir kaç dakika çalkalandı ve masa santrifüjünde 2000 rpm'de 5 dakika çevrildi. Bu aşamada, dietileter berrak bir tabaka halinde üst kısımda toplanmaktadır. Elde edilen bu *ilk eter fazı*, puvar takılı pastör pipeti ile çekilerek ekstre edildi ve küçük hacimli cam tüplere aktarıldı. Tekrar,



özüt ve örnek tüplerine bu kez özüt ve örnek hacimleri kadar dietileter eklendi ve izleyen diğer işlemler yinelendi. *İkinci eter fazları* ait oldukları özüt ve örnek dikkate alınarak ilk eter fazı ile karıştırıldı.

3. Eter fazlarının bulunduğu tüpler, içlerindeki tüm eter uçana kadar çeker ocakta tutuldu, üstleri parafilm ile kapatıldı ve aliminyum folye içinde spektrofotometrik izleme için kullanılabilecek kadar serin bir ortamda korundu.

Her tüpe 3 mL etanol eklendi, çalkalandı ve en az 10 dakika kendi haline bırakıldı. Sonra 240-310 nm dalgaboyları arasında spektrum absorbans değerleri izlendi.

Standart örnek olarak 2,4-D asit kullanıldı. Organ ve doku örneklerindeki 2,4-D miktarlarının bulunması için iki ayrı standart grafik oluşturuldu. Küçük derişimler için absorbansa karşı 0~100 µg 2,4-D grafiği ve normal derişimler için absorbansa karşı 100~1000 µg 2,4-D grafikleri çizildi ve örnek 2,4-D miktarları grafiklerdeki standart 2,4-D eğrilerinden orantılama yöntemiyle hesaplandı.

## 8 - Toksikokinetik Model ve Uygulanması

2,4-D'nin ratlardaki toksikokinetik modeli *doza bağlı olmayan kinetiklerden tek bölümlü tek doz kinetiği* uygulaması ile yapılmıştır. Bu modellerde spektrofotometrik olarak izlenen ve standart 2,4-D grafiği üzerinden orantılama ile hesaplanan organ ve doku 2,4-D miktarları kullanıldı.

Tek bir İV dozdan sonra organizmadaki ksenobiyotiğin zamana bağlı olarak, miktarındaki değişim ilk adım (first order) eliminasyon kinetikleri ile tanımlanmaktadır. Buna göre, ksenobiyotiğin dağılıma hacmi

( $V_D$ ) ile plazma derişimi (C) arasındaki ilişki eşitlik 1 ile kuruldu.

$$C = X/V_D \text{ ya da } V_D = X/C = X_0 / C_0 \quad 1$$

$V_D$  gerçek bir hacim değildir, ancak madde verildikten sonra her hangi bir t zamanında vücuttaki ksenobiyotiğin toplam miktarı ile plazma derişimi arasındaki oranı ifade eder. Ksenobiyotiğin zamana bağlı plazma derişimi değişimleri ise 2. eşitlik ile bulundu.

$$\log C - \log C_0 = -k_e \times t / 2,303 \quad 2$$

Doğrusal faz diye anılan çizginin eğimi  $\log C_2 - \log C_1 / t_2 - t_1$  olarak ifade edilir ve  $-k_e / 2,303$  ifadesine eşittir. Bu iki bağıntıdan eliminasyon yarı ömrü olan  $t_{1/2}$ , aşağıdaki formül ile bulundu.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e = 0,693 / k_e \quad 3$$

Tüm eliminasyon sürecinde, ortalama plazma temizlenme süresi ( $Cl_t$ ), bileşiğin birim zamanda tamamen temizlendiği plazma hacimi olarak 4. eşitlikten hesaplandı (53).

$$Cl_t = k_e \times V_D \quad 4$$

İstatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve Tukey Testi ile yapılmıştır (65).

## BULGULAR

Araştırmamızda, 120 mg 2,4-D asit/kg vücut ağırlığı dozu ile intravenöz (İV) olarak etkileştirilen ratlar dozlamayı izleyen 2, 8, 16 ve 24 saat sonra karaciğer, kalp, dalak, böbrekler, beyin ve femoral kasta G-6-P DH ve MDH özgül aktiviteleri ile adı geçen organ ve dokularda 2,4-D değişim değerleri ölçüldü.

Gruplar ve peryotlar arasında enzim özgül aktivitelerinde değişimler olduğu saptandı. Organ ve dokuların bazılarında görülen 2,4-D'nin kantitatif miktarlarından yararlanılarak toksikokinetik parametreler hesaplandı.

### 1 - 2,4-D'nin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Deney grubu (D grubu), etanol kontrol grubu (E grubu) ve serum fizyolojik kontrol grubu (S grubu) ile organ ve dokuların enzim aktivite değerleri, ve 2, 8, 16 ve 24 saat (s) peryotları ile organ ve dokuların enzim aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.

#### 1.1 - 2,4-D' nin G-6-P DH Aktivitelerine Etkisi

Peryotların D, E ve S gruplarına göre karaciğer, kas, kalp, beyin, böbrekler ve dalak G-6-P DH aktivite değerleri ayrı ayrı sınıflandırılarak değerlendirilmişlerdir.

2 saat peryodunda grupların organ ve doku G-6-P DH aktivite de-

ğerleri Tablo 2'de verilmiştir. Deney grubu ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, 2 saat peryodunda kalp, beyin ve dalak G-6-P DH, her iki kontrole göre de inhibe olmuştur. Etanol ve serum fizyolojik kontrol grupları arasında, herhangi bir değişme saptanamamıştır. Bunlara göre, 2,4-D'den ilk etkilenen organlar kalp, beyin ve dalaktır. Bu kısa peryodda, etanolün G-6-P DH aktivitesini üzerine etkisi olmadığı anlaşılmıştır, çünkü etanol grubu ile serum fizyolojik grubu arasında fark yoktur.

Bu peryotta gruplar arası enzim aktivite değerlerindeki fark karaciğer, kas ve böbreklerde önemsiz ( $p > 0,05$ ), ancak kalp, beyin ve dalakta ise bu fark önemlidir ( $p < 0,05$ ). Kalp ve dalakta gruplar arası farkın D ile E ve D ile S gruplarında önemli olduğu ( $p < 0,05$ ), ancak E ve S gruplarında önemli olmadığı ( $p > 0,05$ ), beyinde ise D ve S grupları arası fark önemli ( $p < 0,05$ ) iken, diğer gruplar arası farklar önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 2.** Grupların 2 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.ciğer	0,0360±0,0013	0,0411±0,0014	0,0361± 0,0030	KW=4,30 $p > 0,05$
Kas	0,0141±0,0005	0,0198±0,0023	0,0185±0,0530	KW=5,65 $p > 0,05$
Kalp	0,0495± 0,0047	0,0565±0,0028	0,0530±0,0050	<b>KW=6,23 <math>p &lt; 0,05</math></b>
Beyin	0,1415±0,0050	0,1660±0,0160	0,1991± 0,0090	<b>KW=6,03 <math>p &lt; 0,05</math></b>
Böbrek	0,0613±0,0065	0,0713± 0,0043	0,0703±0,0050	KW=2,34 $p > 0,05$
Dalak	0,2704±0,0100	0,3705±0,0190	0,3628±0,0240	<b>KW=7,05 <math>p &lt; 0,05</math></b>

İkinci peryotta, yani 8 saat peryodunda enzimin inhibe olduğu organlar karaciğer, kalp ve beyindir (Tablo 3). Tek doku örneğimiz olan kasda da aynı inhibisyonun başladığı gözlenmektedir. Bu peryotta bulunan inhibisyonda da her iki kontrole karşı deney grubu özgül enzim aktivitesi azalmıştır. Bu peryotta, 2 saat peryodunda dalakta gözlenen inhibisyon ortadan kalkmakta ve G-6-P DH özgül aktivitesi normale dönmektedir. 2,4-D'nin en etkili olduğu peryottur.

**Tablo 3.** Grupların 8 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.cığer	0,0321±0,0018	0,0424±0,0007	0,0361±0,0030	<b>KW=7,53 p&lt;0,05</b>
Kas	0,0142±0,0010	0,0190±0,0007	0,0185±0,0009	<b>KW=7,73 p&lt;0,05</b>
Kalp	0,0404±0,0090	0,0548±0,0020	0,0530±0,0050	<b>KW=5,21 p&lt;0,05</b>
Beyin	0,1048±0,0040	0,1828±0,0200	0,1991±0,0090	<b>KW=6,00 p&lt;0,05</b>
Böbrek	0,0611±0,0060	0,0664±0,0050	0,0703±0,0050	KW=1,07 p> 0,05
Dalak	0,3187±0,0110	0,3759±0,0078	0,3628±0,0240	KW=5,38 p>0,05

Karaciğer, kas, kalp ve beyinde gruplar arası fark irdelendiğinde gruplar arası farkın D ile E grubu ve D ile S grupları arasında önemli ( $p<0.05$ ), E ile S grupları arasında önemsiz olduğu görüldü ( $p>0.05$ ).

Tablo 4' deki değerler incelendiğinde, karaciğer ve beyindeki G-6-P DH inhibisyonu 16 saat peryodunda da sürmektedir. Kalpte 2 ve 8 saat peryotlarında gözlenen inhibisyon ve kasta 8 saat peryodunda başlayan inhibisyon, bu peryotta gözlenmemiştir. Kısaca karaciğer ve beyin hariç diğer etkilenen organ ve dokulardaki G-6-P DH üzerine 2,4-D'nin inhibitör etkisi ortadan kalkmıştır.

16 saat peryodunda ise gruplar ile organ ve dokular karşılaştırıldıklarında, enzim aktivite değerleri arasında fark karaciğerde D ile S ve beyinde hem D ile E hem de E ile S grupları arasındaki önemli ( $p < 0,05$ ), diğerlerinde önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.** Grupların 16 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.ciğer	0,0324±0,0015	0,0330±0,0017	0,0361±0,0030	<b>KW=6,90 p&lt;0,05</b>
Kas	0,0148±0,0012	0,0175±0,0013	0,0185±0,0009	<b>KW=3,35 p&lt;0,05</b>
Kalp	0,0459±0,0023	0,0480±0,0025	0,0530±0,0050	KW=3,07 p>0,05
Beyin	0,1540±0,0050	0,1946± 0,0120	0,1991±0,0090	<b>KW=6,16 p&lt;0,05</b>
Böbrek	0,0616±0,0050	0,0721±0,0030	0,0703±0,0050	KW=3,40 p>0,05
Dalak	0,3287±0,0100	0,3716±0,0120	0,3628±0,0240	KW=1,43 p>0,05

Son peryot olan 24 saat peryodunda da G-6-P DH inhibisyonu sadece karaciğer ve beyinde bulunmuştur. Karaciğerdeki inhibisyon, deney grubu ile etanol grubu arasında olduğundan ve enzim özgül aktivitesi etanol grubunda daha az bulunduğundan bir inhibisyon olarak değerlendirilmesi mümkün değildir.

Bu peryotta gruplar ile organ ve dokuların enzim aktivite değerleri karşılaştırıldığında, sadece karaciğer ve beyinde fark önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Kas, kalp, böbrek ve dalak için bir fark önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Beyin enzim aktivite değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında D ile E grubu ve E ile S grubu, diğer taraftan karaciğerde ise sadece D ile E grubu arasındaki fark önemlidir ( $p < 0,05$ ). Diğer organ ve dokularda, gruplar arasında enzim aktivitesi açısından fark önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 5.** Grupların 24 saat Peryoduna Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.cığır	0,0323±0,0023	0,0388±0,0019	0,0361±0,0030	<b>KW=6,89 p&lt;0,05</b>
Kas	0,0175±0,0013	0,0173±0,0014	0,0185±0,0009	KW=1,18 p>0,05
Kalp	0,0413±0,0023	0,0484± 0,0010	0,0510±0,0050	KW=8,42 p>0,05
Beyin	0,1710±0,0090	0,1905±0,0190	0,1991±0,0090	<b>KW=1,79 p&lt;0,05</b>
Böbrek	0,0662±0,0030	0,0683±0,0027	0,0703±0,0050	KW=3,40 p>0,05
Dalak	0,3537±0,0200	0,3651± 0,0180	0,3628±0,0240	KW=1,06 p>0,05

Bulgulardan yararlanılarak D grubu ile E grubu enzim aktiviteleri değerleri periyotlara göre düzenlenerek yapılan grup içi karşılaştırmalarda, bazı organlarda periyotlara bağlı olarak G-6-P DH aktivitelerinde değişimler gözlenmiştir.

Grup içi karşılaştırmalar incelendiğinde (Tablo 6), deney grubunda karaciğer, beyin ve dalak G-6-P DH özgül aktivitesi periyotlara göre inhibisyon değişimi izlenebilir. Karaciğerde gözlenen inhibisyon 8 saat periyodunda belirginleşmekte ve 16 ile 24 saat periyotlarında azalmaktadır. Beyindeki inhibisyon ise ilk periyotta başlamakta ve azalarak 24 saat periyodunda normale yaklaşmakla birlikte devam etmektedir. Dalakta belirlenen inhibisyon sadece 2 saat periyodundadır (Şekil 3 a ve b).

Deney grubu, periyotlar arası karşılaştırmalarda karaciğer, beyin ve dalakta enzim aktivite değerlerindeki fark önemli iken ( $p < 0,05$ ), kas, kalp ve böbrekte bu fark önemsiz ( $p > 0,05$ ) bulundu. Karaciğerde periyotlar arası karşılaştırmalarda 2 ile 16, 2 ile 24, 8 ile 16 ve 8 ile 24 saat periyotları arasındaki fark önemlidir ( $p < 0,05$ ). Buna karşın, 2 ile 8 ve 16 ile 24 saat periyotları arası karşılaştırmalarda fark önemli değildir ( $p > 0,05$ ).

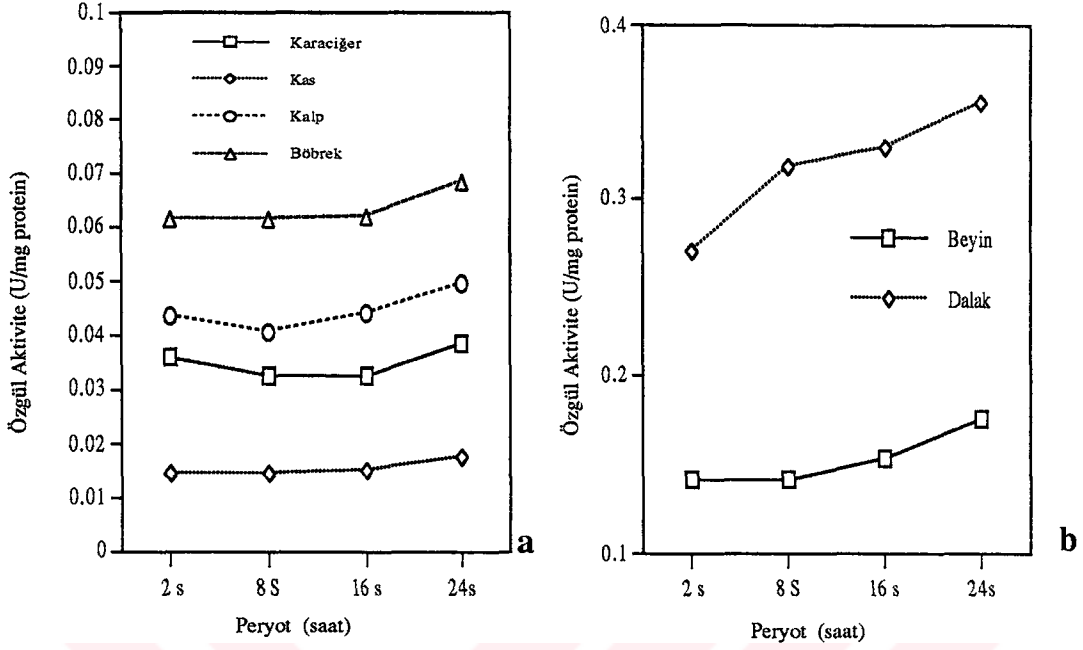
**Tablo 6.** Deney Grubunun Peryotlara Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Peryot 2 s X±Sx	Peryot 8 s X±Sx	Peryot 16 s X±Sx	Peryot 24 s X±Sx	Sonuç
Karaciğer	0,0360 ± 0,0013	0,0321 ± 0,0018	0,0324 ± 0,0007	0,0384 ± 0,0020	KW=8,39 p< 0,05
Kas	0,0141 ± 0,0055	0,0142 ± 0,0010	0,0148 ± 0,0012	0,0175 ± 0,0013	KW=4,51 p> 0,05
Kalp	0,0433 ± 0,0047	0,0404 ± 0,0009	0,0439 ± 0,0023	0,0493 ± 0,0023	KW=1,84 p> 0,05
Beyin	0,1415 ± 0,0050	0,1408 ± 0,0040	0,1540 ± 0,0050	0,1760 ± 0,0090	KW=6,58 p< 0,05
Böbrek	0,0613 ± 0,0065	0,0611 ± 0,0060	0,0616 ± 0,0050	0,0683 ± 0,0027	KW=1,32 p> 0,05
Dalak	0,2704 ± 0,0100	0,3187 ± 0,0110	0,3287 ± 0,0100	0,3537 ± 0,0200	KW=8,61 p< 0,05

Periyotlara göre etanol kontrol grubu kalp G-6-P DH aktivite değerleri dikkatle incelenirse zamanla azalan bir aktivasyon farkedilecektir (Tablo 7). Serbest olarak verilen etanol, kalp G-6-P DH'ını ilk saatlerde aktivite etmektedir.

Etanol kontrol grubunda yapılan periyotlar arası karşılaştırmalarda, fark sadece kalpte önemli olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Karaciğer, kas, beyin, böbrek ve dalakta fark önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Kalpte rastlanan periyotlar arası bu fark, 2 ile 24 ve 8 ile 24 saat periyotlarında önemli ( $p < 0,05$ ) ve 2 ile 8, 2 ile 16 ve 16 ile 24 saat periyotlarında önemsiz bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).





**Şekil 3.** Deney Grubu Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değişimleri (a ve b)

**Tablo 7.** Etanol Grubunun Peryotlara Göre Organ ve Doku G-6-P DH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Peryot 2 s	Peryot 8 s	Peryot 16 s	Peryot 24 s	Sonuç
	X±Sx	X±Sx	X±Sx	X±Sx	
Karaciğer	0,0411 ± 0,0014	0,0424 ± 0,0016	0,0380 ± 0,0026	0,0328 ± 0,0019	KW=0,18 p> 0,05
Kas	0,0198 ± 0,0023	0,0190 ± 0,0007	0,0175 ± 0,0013	0,0173 ± 0,0014	KW=1,56 p> 0,05
Kalp	0,0495 ± 0,0028	0,0448 ± 0,0020	0,0470 ± 0,0025	0,0414 ± 0,0010	KW=9,24 p< 0,05
Beyin	0,1660 ± 0,0160	0,1828 ± 0,0200	0,1946 ± 0,0200	0,1905 ± 0,0190	KW=2,10 p> 0,05
Böbrek	0,0713 ± 0,0043	0,0664 ± 0,0050	0,0721 ± 0,0030	0,0662 ± 0,0030	KW=0,86 p> 0,05
Dalak	0,3705 ± 0,0190	0,3759 ± 0,0050	0,3716 ± 0,0120	0,3651 ± 0,0180	KW=0,19 p> 0,05

## 1.2 - 2,4-D'nin MDH Aktivitelerine Etkisi

Gruplara göre peryotların karaciğer, kas, kalp, beyin, böbrekler ve dalak MDH aktiviteleri sınıflandırılarak değerlendirilmiştir. Herbisit 2,4-D'nin kalp MDH aktivitesini 2 saat periyodu hariç, diğer periyotlarda inhibe ettiği saptanmıştır.

Gruplar arası 2 saat periyodu organ ve doku MDH aktivite değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Bu periyotta, 2,4-D'nin MDH aktivitesi üzerine etki etmediği gözlemlendi. Periyodun enzim aktivite değerlerinde, gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 8.** Grupların 2 saat Periyodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.cığer	19,8 ± 1,41	19,9 ± 2,36	20,6 ± 2,05	KW=0,00 $p > 0,05$
Kas	34,7 ± 2,56	34,3 ± 2,56	33,3 ± 2,71	KW=0,28 $p > 0,05$
Kalp	281,5 ± 26,6	305,8 ± 23,7	278,5 ± 6,59	KW=2,96 $p > 0,05$
Beyin	68,8 ± 6,82	78,2 ± 6,35	76,8 ± 5,28	KW=0,89 $p > 0,05$
Böbrek	21,0 ± 1,47	21,3 ± 1,45	20,7 ± 1,22	KW=0,16 $p > 0,05$
Dalak	17,4 ± 2,34	18,6 ± 1,68	19,5 ± 2,30	KW=2,62 $p > 0,05$

Tablo 9 dikkatle incelenirse, 8 saat periyodu kalp MDH aktivite değerleri deney grubunda etanol ve serum fizyolojik gruplarına göre inhibe durumdadır. 2,4-D, ancak 8 saat sonra etkileyerek MDH aktivitesini azaltmıştır. Gruplar arası fark incelendiğinde, kalpte önemli ( $p < 0,05$ ), diğerlerinde ise önemsizdir ( $p > 0,05$ ). Kalpte, gruplar birbirleri ile karşılaştırıldıklarında, deney ve serum fizyolojik grupları arası fark önemli ( $p < 0,05$ ), ancak D ile E ve E ile S grupları arası fark önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 9.** Grupların 8 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.ciğer	19,5 ± 3,49	19,7 ± 3,64	20,6 ± 2,05	KW=0,21 p> 0,05
Kas	34,8 ± 4,68	34,9 ± 1,42	33,3 ± 2,71	KW=0,33 p> 0,05
Kalp	272,9 ± 11,1	314,7 ± 9,90	278,5 ± 6,59	<b>KW=7,01 p&lt; 0,05</b>
Beyin	75,8 ± 6,42	80,7 ± 3,00	76,8 ± 5,28	KW=0,42 p> 0,05
Böbrek	20,5 ± 1,19	21,2 ± 2,04	20,7 ± 1,22	KW=0,57 p> 0,05
Dalak	18,0 ± 1,50	17,9 ± 1,47	19,5 ± 2,30	KW=0,87 p> 0,05

Gruplar arası karşılaştırmalara göre (Tablo 10), 16 saat periyodunda 2,4-D'nin organ ve doku MDH aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi yine kalp üzerinedir. Bu periyotta da, kalp MDH aktivitesi gruplar arası fark önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Diğer organ ve doku MDH aktivitesinde gruplar arası fark önemli değildir ( $p > 0,05$ ). Gruplar arası fark karşılaştırmalarında, D ile S ve D ile E grupları arasındaki fark önemli bulunurken ( $p < 0,05$ ), E ile S grupları arasında farkın önemli olmadığı ( $p > 0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 10.** Grupların 16 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.ciğer	22,7 ± 2,38	24.1 ± 2.95	20.6 ± 2.05	KW=3,33 p> 0,05
Kas	35,2 ± 2,25	35.2 ± 2.54	33.3 ± 2.71	KW=0,16 p> 0,05
Kalp	270,8 ± 10,85	342,8 ± 20,05	278,5 ± 5,70	<b>KW=5,79 p&lt;0,05</b>
Beyin	80,7 ± 2,49	83,6 ± 4,29	76,8 ± 5,28	KW=0,89 p> 0,05
Böbrek	19,1 ± 0,81	21,7 ± 1,05	20,7 ± 1,22	KW=2,89 p> 0,05
Dalak	20,1 ± 0,50	18,9 ± 1,25	19,5 ± 2,30	KW=0,19 p> 0,05

Gruplar, 24 saat periyodunda karşılaştırıldıklarında (Tablo 11), kalp MDH aktivitesindeki inhibisyon devam etmektedir. Bundan önceki iki periyottaki gibi, 24 saat periyodu kalp MDH aktivite değerleri gruplar arası fark önemlidir (p< 0,05).

**Tablo 11.** Grupların 24 saat Peryodu Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Deney Grubu X±Sx	Etanol Grubu X±Sx	Se.Fiz.Grubu X±Sx	Sonuç
K.ciğer	23,2 ± 1,65	27,5 ± 3,22	33,3 ± 2,71	KW=3,20 p> 0,05
Kas	35,1 ± 2,31	33,5 ± 3,12	20,6 ± 2,05	KW=1,08 p> 0,05
Kalp	271,8 ± 6,47	353,9 ± 29,19	278,5 ± 5,70	<b>KW=5,60 p&lt; 0,05</b>
Beyin	80,7 ± 2,8	79,7 ± 7,20	76,8 ± 5,28	KW=0,62 p> 0,05
Böbrek	22,0 ± 1,66	20,9 ± 1,68	20,7 ± 1,22	KW=0,02 p> 0,05
Dalak	19,0 ± 1,01	19,4 ± 1,97	19,5 ± 2,30	KW=0,09 p> 0,05

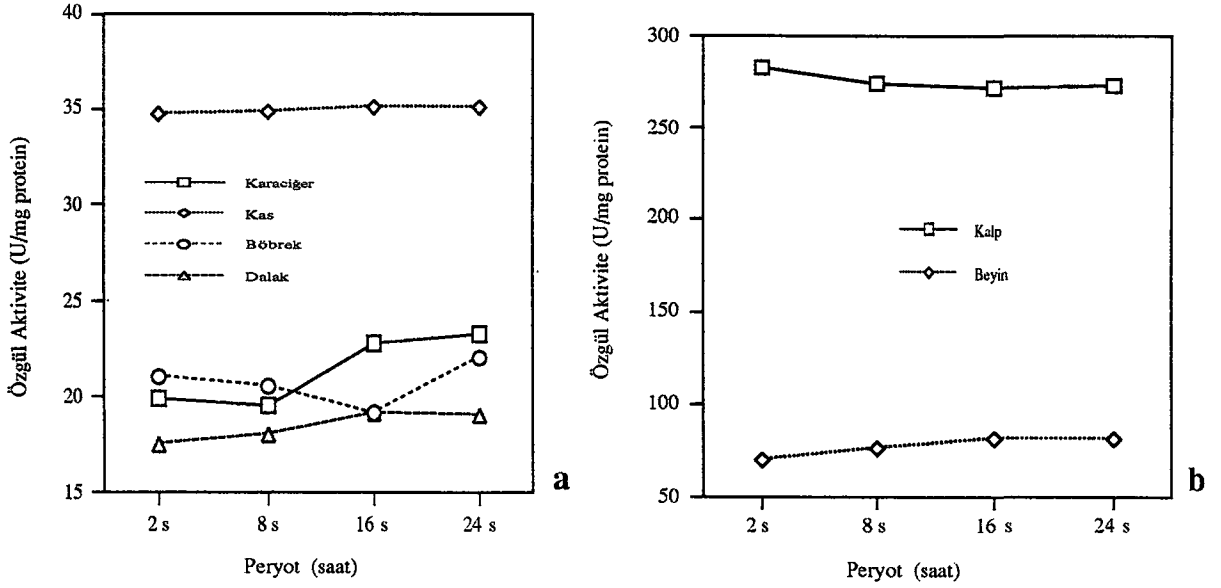
Gruplar kendi aralarında karşılaştırılınca, D ile S ve D ile E grupları arasında farkın önemli olduğu (p< 0,05) görüldü.

Deney grubunun organ ve doku enzim aktivite değerleri periyotlara göre karşılaştırıldığında, 2,4-D'nin MDH aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Aynı durum etanol grubu için de geçerlidir. Grup içi yapılan karşılaştırmalarda periyotlar arası organ ve doku MDH aktivite değerleri arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Deney grubunun periyotlara göre organ ve doku enzim aktivite değerleri Tablo 12 ve etanol grubununki ise Tablo 13' de düzenlenmiştir.

**Tablo 12.** Deney Grubunun Periyotlara Göre Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Periyot 2 s X±Sx	Periyot 8 s X±Sx	Periyot 16 s X±Sx	Periyot 24 s X±Sx	Sonuç
K.cığır	19,8 ± 1,41	19,5 ± 3,49	22,7 ± 2,25	23,2 ± 1,65	KW=0,87 p> 0,05
Kas	34,7 ± 2,56	34,8 ± 4,68	35,1 ± 2,38	35,1 ± 2,31	KW=0,18 p> 0,05
Kalp	281,5 ± 26,6	272,9 ± 11,10	270,8 ± 10,85	271,8 ± 6,47	KW=6,62 p> 0,05
Beyin	68,8 ± 6,82	75,8 ± 6,42	80,7 ± 2,49	80,7 ± 2,80	KW=1,74 p> 0,05
Böbrek	21,0 ± 1,47	20,5 ± 1,19	19,1 ± 0,81	22,0 ± 1,66	KW=1,01 p> 0,05
Dalak	17,4 ± 2,34	18,0 ± 1,50	19,1 ± 0,50	19,0 ± 1,31	KW=0,62 p> 0,05

Deney grubu organ ve doku MDH aktivite değerlerinin periyotlara göre değişimi Şekil 4'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Deney Grubu Organ ve Doku MDH Aktivite Değişimleri (a ve b)

**Tablo 13.** Etanol Grubunu Peryotlara Göre Organ ve Doku MDH Aktivite Değerleri

Organ ve Doku	Peryot 2 s	Peryot 8 s	Peryot 16 s	Peryot 24 s	Sonuç
K.ciğer	19,9 ± 2,36	19,7 ± 3,64	24,1 ± 2,95	27,5 ± 3,22	KW=4,36 p> 0,05
Kas	34,3 ± 2,56	34,9 ± 1,42	35,2 ± 2,54	33,5 ± 3,12	KW=1,04 p> 0,05
Kalp	305,8 ± 23,74	314,7 ± 9,90	342,8 ± 20,50	353,9 ± 29,19	KW=3,84 p> 0,05
Beyin	78,2 ± 6,35	80,7 ± 3,00	83,5 ± 4,29	80,7 ± 0,72	KW=0,71 p> 0,05
Böbrek	21,3 ± 1,45	21,2 ± 2,04	21,7 ± 1,05	20,9 ± 1,68	KW=0,16 p> 0,05
Dalak	18,6 ± 1,68	17,9 ± 1,47	18,9 ± 1,25	19,4 ± 1,97	KW=0,61 p> 0,05

## 2 - Bazı Organlarda ve Plazmada 2,4-D Derişim Değerleri

Organizmalarda neden olduğu değişimlere anlam katması ve aralarında bir korelasyonun olup olmadığının anlaşılabilmesi için incelediğimiz rat organ ve dokuları spektrofotometrik olarak izlendiğinde; karaciğer, kas ve plazmada değişen 2,4-D miktarları belirlendi, ancak kalp, beyin, böbrek ve dalakta 2,4-D bulunamadı.

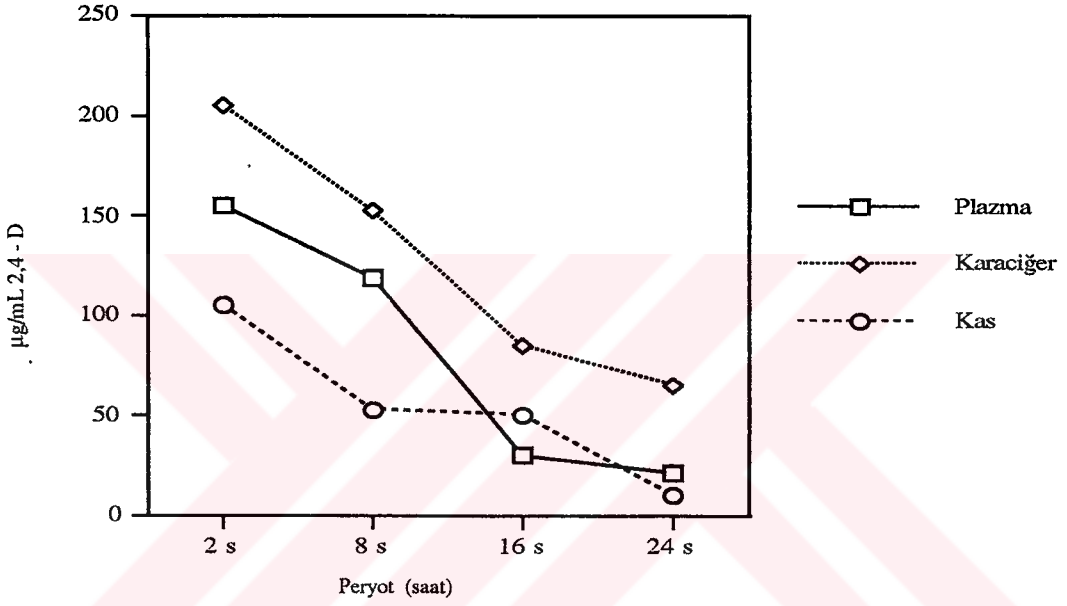
Kas, karaciğer ve plazmanın peryotlara göre 2,4-D derişim değerleri Tablo 14'de, derişim değişimleri ise Şekil 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 14.** Plazma, Karaciğer ve Kas 2,4-D Derişim Değerlerinin Peryotlara Dağılımı

Örnek	Peryot 2 s		Peryot 8 s		Peryot 16 s		Peryot 24 s		Sonuç
	X±Sx		X±Sx		X±Sx		X±Sx		
Plazma	154,5 ± 5,5		118,1 ± 10,1		30,0 ± 3,6		21,1 ± 2,1		KW=11,53 p<0,05
Karaciğer	204,2 ± 13,3		151,7 ± 6,4		84,9 ± 25,5		64,5 ± 13,7		KW=12,36 p<0,05
Kas	104,3 ± 11,5		52,5 ± 6,9		50,0 ± 10,1		9,9 ± 1,0		KW=12,12 p<0,05

Kan plazması 2,4-D derişim değerleri peryotlar arası farklar açısından incelendiğinde, 2 ile 8, 2 ile 16, 2 ile 24, 8 ile 16 ve 8 ile 24 saat peryotları arası farkların önemli olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Buna karşın, 16 ile 24 saat peryotları arasındaki fark önemsizdir ( $p>0.05$ ). Karaciğer 2,4-D derişim değerleri ile peryotlar arası farklar karşılaştırıldığında da plazma sonuçlarına benzer olarak sadece 16 ile 24 saat peryotları arasın-

daki fark önemsiz ( $p>0.05$ ), 2 ile 8, 2 ile 16, 2 ile 24, 8 ile 16 ve 8 ile 24 saat periyotları arasındaki farklar önemlidir ( $p<0.05$ ). Aynı karşılaştırmalar kas dokusu 2,4-D derişim değerleri ile periyotlar arasında yapıldığında, 2 ile 8, 2 ile 16, 2 ile 24, 8 ile 24 ve 16 ile 24 saat periyotlar arası farkların önemli ( $p<0.05$ ) ve 8 ile 16 saat periyotlar arası farkın önemsiz olduğu bulunmuştur ( $p>0.05$ ).



**Şekil 5.** Plazma, Karaciğer ve Kas 2,4-D Derişim Değişimleri

### 3 - Tek bölümlü Toksikokinetik Modelin 2,4-D'ye Uygulanması

Bulmuş olduğumuz plazma 2,4-D derişim değerleri kullanılarak toksikokinetik parametreler, Gereç ve Yöntemler kısmında verilen formül ve eşitlikler ile hesaplanmıştır.

Eşitlik 1' de organizma vücudunda (X) ve plazmasında (C) bulunan 2,4-D miktar ve derişimlerinden dağılma hacmi ( $V_D$ ) belirlenebiliyor-



du. Dağılma hacmi aynı zamanda,  $t=0$  da organizmadaki ksenobiyotik miktarını temsil eden  $X_0$  ve plazma derişimini temsil eden  $C_0$  değerleri ile de aynı sonuca ulaşılyordu. Uyguladığımız doz olan 120 mg/mL değeri plazma derişimi ile bölünerek  $V_D$  bulundu. Araştırma sonuçlarımıza göre;

$$V_D = X / C = 120 \text{ mg/kg} / 154,5 \text{ } \mu\text{g/mL} \\ = 777 \text{ mL/kg olarak belirlenmiştir.}$$

Eşitlik 2 ile ksenobiyotik eliminasyon sabiti olan  $k_e$ ;

$$\log C - \log C_0 = - k_e \times t / 2,303 \quad (C=C_0)$$

$$1 = 2,303 / k_e \times t$$

$$k_e = 2,303 / t \quad k_e = 2,303 / 24$$

$$k_e = 0,096 / \text{s} \quad (\text{s} = \text{saat})$$

olarak bulundu. Ksenobiyotik 2,4-D'nin ratlardaki yarılanma ömrü ( $t_{1/2}$ ) ise (eşitlik 3);

$$t_{1/2} = \text{Ln } 2 / k_e \quad t_{1/2} = 0,693 / 0,096$$

$$= 6,18 \text{ s} \quad (\text{s} = \text{saat})$$

olduğu ortaya çıkarıldı.

Ortalama plazma temizlenme süresi ( $Cl_t$ ) daha önce bulunan  $k_e$  ve  $V_D$  değerleri eşitlik 4 olarak işaret edilen formülde yerlerine konunca;

$$Cl_t = k_e \times V_D \quad Cl_t = 0,096 \times 777$$

$$= 74,6$$

olarak belirlenmiştir.

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İnsanlık, uygarlığını kurarken gerçekleştirdiği olumlu aşamaların ödülünü sadece kendisi almakta, fakat bu ödülün ve yaptığı hataların bedelini, doğa ve yabanıl yaşam ödemektedir. Ayrıca yabanıl yaşamlarından koparılmış olan evcil türler ve yine insanlar da bundan payını almaktadır. Gelişen teknolojilerin artıkları olarak doğaya salınan ya da, yararlı bir amaç için de olsa, çeşitli şekillerde kullanılan sentetik kimyasal maddelerin (toksikantlar, çevre kirleticiler) tehditleri her geçen gün artmaktadır. Kaynağı ne olursa olsun, doğrudan ya da dolaylı olarak insanların geleceğini, sağlığını ve yaşadığı çevreyi tehlikeye sokan bu tür maddelerin etkilerinin incelenmesi için pek çok araştırmacı emek ve zaman sarfetmektedir.

Fenoksi asit herbisit 2,4-D ile ilgili çok sayıdaki araştırmada canlıların üzerine etkisi incelenmiştir. Kullanım amaçlarının çeşitliliği, yaygın olarak tüketilmeleri ve bitkisel ve hayvansal besin kaynaklarının bu madde ile kontaminasyonu nedeniyle araştırmacıların hala ilgi odağı olmasını sağlamaktadır. Geçmişte yaşanan bazı savaşlarda kullanılmış olması ve kalıcı bazı etkilerinin görülmesi de araştırmaların önemini artırmaktadır.

Memelilerin karaciğer, böbrek, akciğerler, dalak ve kalpte, ve insanlarda karaciğer ve böbrekte etkileşim sonrası 2,4-D düzeylerinin yüksek bulunması (1,4,39), bu organlarda olası toksik etkinin ortaya çıkışını

da açıklar. Etkilenen bu organlar hedef organlar olarak kabul edilir.

Araştırmamız sonuçlarına göre, G-6-P DH ve MDH özgül aktivitelerini izlediğimiz organ ve dokuların bazılarında, grup içi ve periyotlar arası karşılaştırmalarda çeşitli derecelerde değişimler belirlenmiştir.

Peryotların tümünde, deney grubu ile etanol kontrol ve serum fizyolojik kontrol grupları karşılaştırıldıklarında, bazı organ ve dokuların G-6-P DH özgül aktivite değerlerindeki değişimler inhibisyon biçimindedir. Herbisit 2,4-D, karaciğer, kas, kalp, beyin ve dalakta G-6-P DH özgül aktivitesini azaltırken, böbrekte değiştirmemiştir (Tablo 6 ve Şekil 3).

Etanol kontrol grubunda periyotlar arasında sadece kalp G-6-P DH'ında bir aktivasyon göze çarpmaktadır (Tablo 7).

Organizmaya giren maddeler kan dolaşımı ile diğer organ ve dokulara taşınırlar. Bu nedenle etkilenme oranı kanda daha fazla olmalıdır. Paulino ve arkadaşları ratlarda 2,4-D'nin serum bileşenleri ve enzim aktiviteleri üzerine akut toksisitesini incelemek için 600 mg/kg va dozu uyguladıklarında bazı değişimler bulmuşlardır. 2,4-D'nin verilmesinden sonra, 5, 8 ve 24. saatlerde serum laktat dehidrogenaz, alkalın fosfataz ve kreatinin düzeylerinde 1-4 kat, serum aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeylerinde 8. ve 24. saatlerde yükselme bulmuşlardır. Ayrıca serum amilaz düzeyi sadece 8. saatte artış göstermiştir. Herbisitin verilmesinden sonra glukoz ve total protein serum düzeyleri 5, 8 ve 24. saatlerde azalmıştır (13). Araştırmamızda, G-6-P DH aktivitesi de zamana göre değişimler göstermiştir. Dalakta 2. saatte görülen inhibisyon daha sonra ortadan kalkarken, kas ve karaciğerde 8. saatte inhibisyon başlamıştır. Beyindeki inhibisyon sürekli iken, karaciğerdeki 8. saatten sonra süreklilik kazanmaktadır. Araştırmamıza göre, bazı organ ve dokular-

da bulduğumuz enzim aktivitesindeki değişimler yukarıda irdelenen sonuçlar ile benzeşmektedir.

G-6-P DH'ın araştırmamızda inhibe olması organ ve doku hücrelerinin glukozu edinmedeki güçlüklerinden kaynaklanabilir. Zira, insan deri fibroblast plazma membranı Na/K-ATPaz (glukoz taşıma sistemi) aktivitesi üzerine 2,4-D'nin toksik etkisi incelenmiş ve aktivite kaybına neden olduğu belirlenmiştir (66).

Herbisit 2,4-D ve benzeri herbisitler vücut proteini ile etkileşmekte ve işlevlerini değiştirmektedir. Herbisitlerin organizmaya girdikten sonra amino asit konjuge edici sistemlerle etkileşimini bulmak için Kelley ve Vessey sığır karaciğer mitokondrisi benzoiltransferaz ve fenilasetiltransferaz aktivitelerini izlemişlerdir. Herbisitlerden 2,4-D ve 2,4,5-T'nin mitokondrial ksenobiyotik konjuge edici sistemi substratları olabildiğini saptamışlardır. Fenilasetiltransferazın fenoksiasetil-CoA ve 2,4-D-CoA aktivitesi gösterdiği ve benzoiltransferazın da 2,4-D-CoA ve 2,4,5-T-CoA ile konjugat oluşturduğunu bulmuşlardır. Enzim-2,4-D konjugatını enzim kinetiğinin açısından incelediklerinde her iki enzimin de standart substratlarına ilginin ve katalitik oran sabitelerinin azaldığını bildirmişlerdir.(27,67). 2,4-D'nin asit formunun her iki enzime de substrat olarak bağlanıyor olması ve aktivitesini azaltması enzimler ile yapılan araştırmalarda bulunan enzim aktivitelerindeki değişimleri açıklayabilir.

Herbisit 2,4-D ile yürütülen bazı araştırmalarda dikkat çekici sonuçlara ulaşılmıştır. Bazı organ ve doku protein içeriklerini ve enzimlerin miktarlarını düşürmesi protein sentezi ile ilgili süreçte etkisi olduğu anlamına gelir. 2,4-D'nin serum total proteini ve serebrum, kalp ve böbrek

protein düzeylerini düşürdüğü ve sitozolik epoksit hidrolaz miktarını azalttığı ifade edilmektedir (17,18,19). Rat karaciğer mitokondrisi enerji metabolizmasını değiştirdiği ve şişmelerine neden olduğu ve kas mitokondrilerinde dejenerasyonlar yaptığı ileri sürülmüştür (68). Peroksizom proliferatörleri arasında 2,4-D'nin de yeri vardır. 2,4-D ile etkileştirilen deneklerin hemen hemen hepsinde peroksizom artışı olmuş ve peroksizom enzimlerinden sitokrom oksidazın ve sitozolik glutatyon transferaz aktivitesini artırdığı kanıtlanmıştır (17,69).

Herbisit 2,4-D'nin DNA üzerine de etkileri olabilir. Araştırmamızda bulmuş olduğumuz G-6-P DH aktivitesindeki kayıp belki de G-6-P DH geni transkripsiyonu aşamasında olan bir engellenme nedeniyle normalden daha az sentezlenmesinden olabilir. Özellikle fenoksi asit herbisitle rin sentezi sırasında yan ürün olarak ortaya çıkan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) hücre içi bir reseptör ile DNA'da özgül bir diziyeye bağlanarak bazı genlerin ifade edilmesini (sitokrom P-450 gibi) engellemektedir (70).

Bir başka araştırmacıya göre civciv iskelet kası DNA içeriği azalma gösterirken, serebrum, serebellum ve glial hücre DNA içeriği artmıştır (19). TCDD'nin etki mekanizmasına benzer olarak DNA-2,4-D arası bir etkileşim ile bazı genlerin ifade edilmesini engelliyor ya da zayıflatıyor olabilir. Mekanizması tam olarak açıklanamasa da proteinlerle etkileşimi biliniyor. Lipofilik olmaları nedeniyle hücreye kolaylıkla girdikleri gibi hücre çekirdeğine de ulaşabilirler ve DNA sentez ve tamir enzimleri ile de etkileşebilirler.

Bunlara ek olarak, çeşitli organ ve doku hücre bileşenleri miktar

ve derişimlerinin 2,4-D'nin butil esteri ile etkileşen civcivlerde değiştigi izlenmiştir. Yapılan araştırmada, civcivin bacak kası sarkoplazmik proteinerinde %15 ve derideki sarıcı (complexus) kası myofibril proteinlerinde 20 kD'luk artış kaydedilmiştir. Aynı araştırmada, bacak kaslarında sterol esterlerinde %20 , fosfatidilserinde %60 , fosfatidilkolin %11, trigliseritlerde %37 ve serbest yağ asitlerinde %448 miktar artışı belirlenirken, complexus kaslarında fosfatidiletanolamin %16, steroller %58 ve serbest yağ asitlerinde %267 değerleri tespit edilmiştir. En yüksek değer ise doymamış serbest yağ asitlerinde %700-1500 gözlenmiştir (72). Böyle bir sonuca ulaşılması 2,4-D ve benzeri maddelerin etkilerinin boyutunu çizmektedir. Biyomembranların yapıtaşlarından fosfatidilserin ve fosfatidilkolin miktarlarındaki değişimler biyomembranlara ya da biyomembran oluşum sürecine etkisini çağırıştırır. Biyomembranların yapı ve sağlamlığı üzerine ya da membran kinetiklerine etkisi varsa organizmalara verebileceği zararın boyutu genişler.

Daha önce yapılmış olan araştırmalarda görüldüğü gibi 2,4-D, pek çok enzimin aktivitesini ya da miktarını değiştirmiştir. Enzim aktivite ya da miktarındaki bu değişimler artış ya da azalış olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önce de değindiğimiz gibi enerji ve karbon kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalarda 2,4-D metabolizması enzimleri miktar ve aktivitesini, detoksifikasyonu ile ilgili enzimlerin düzeylerini ve konjuge edici sistem enzimleri aktivitelerini artırmaktadır (4,10-12,39,66,73). Buna karşın, değişik metabolik yollarda bir çok enzimin aktivitesini ya da miktarını azaltmaktadır (2,12,17,28,73).

Bilindiği gibi vücudun detoksifikasyon merkezi karaciğerdir. Bu

organın kısa peryotta etkilenmemesi belki de karaciğer G-6-P DH aktivitesinin diğer organlara göre daha az olmasından kaynaklanabilir. Tablo- lar incelendiğinde en düşük aktivite değerinin karaciğer ve kasta olduğu farkedilecektir. Daha sonraki peryotlarda gözlenen inhibisyon azalışı 2,4-D'nin eliminasyonu ile ilgili olabilir. Araştırmamızda tesbit ettiğimiz ka- raciğer 2,4-D derişim değerleri ile G-6-P DH özgül aktivitesi arasında da bir paralellik vardır.

Kasta, sadece 8 saat peryodunda G-6-P DH'da inhibisyon bulun- ması ise, hayvanın alkol ve 2,4-D'nin etkisiyle hareketsiz kalmasına ve kas metabolizmasının azalmasına bağlı olduğu şeklinde açıklanabilir. Bu dokuda 2,4-D'nin zamanla azalan derişimlerini bulduğumuz halde, enzim özgül aktivitesi ile ilişki kurulamamıştır.

Kısa peryotta kalbin ilk etkilenmesi anlamlıdır, çünkü kan dolaşı- mındaki bilinen rolü nedeniyle 2,4-D ile etkileşimi daha fazla olacaktır. 2,4-D'nin akut toksik etkisi, kalpte hemen kendisini hissettirmiştir. Kal- bin bu şekilde etkilenmesi metabolizması için gereksindiği NADPH mik- tarında azalmaya neden olabilir. Başka bir kaynaktan karşılanmıyorsa NADPH eksikliği, bazı metabolik olayların sekteye uğramasına neden olur. Kalbin vücuda kan pompalama görevini aksatabilir. 8 saat peryo- dunda da bu inhibisyonun devam etmesi 2,4-D'nin kalp üzerine baskısı- nın fazla olduğuna işarettir. Kalbin bu şekilde etkilenmesi akut 2,4-D toksisitesine duyarlı olduğunu ve hedef organlar arasında sayılabileceğini gösterir.

Beynin etkilenmesi, 2,4-D'nin beyin kan bariyerini geçtiğine işa- rettir. Peryotların tümünde G-6-P DH inhibisyonu vardır ve 2,4-D'nin en



etkili olduğu organdır. Son peryotta normal değerlere yaklaşmasına rağmen inhibisyon devam etmektedir. Beyinde yapılmış olan önceki araştırmaların bulgular ile uyumluluk söz konusudur (4,19,29,39). Beyinde 2,4-D etkisinin uzun sürmesi yüksek dozlarda ortaya çıkan zihin bulanıklığı, fiziksel hareketlerde ve sese duyarlılıkta azalma, görme ve yutma güçlüğü ve normale göre az tepki verme belirtilerini açıklayabilir (4,39). Ayrıca beyin organik anyon taşıma sisteminin yüksek dozlarda işlev kaybına uğraması ve beyin 2,4-D eliminasyon oranının düşmesine neden olabildiği bildirilmektedir (61). Buna göre, araştırmamızda bulduğumuz rat beyni G-6-P DH inhibisyonu bu açıdan anlamlıdır. Beyin 2,4-D eliminasyonunun aksaması G-6-P DH inhibisyonuna süreklilik kazandırabilir.

Böbrekte G-6-P DH özgül aktivitesinde peryotlara ve gruplara göre bir değişim izlenemediği gibi, 2,4-D birikim değeri spektrofotometrik olarak tespit edilememiştir. Daha ileri analiz teknikleri ile yapılacak bir araştırma, böbrek 2,4-D birikim miktarının bulunmasını ve organ prote-inleri ile etkileşiminin açıklanmasını sağlayabilir.

Dalak G-6-P DH'ı yalnız 2 saat peryodunda inhibe olmakta ve diğer peryotlarda normal aktivitesine dönmektedir. Dalak,2,4-D'nin yüksek dozlarından etkilenmekte, ancak düşük derişimlerden etkilenmemektedir. 2,4-D'nin ratlarda yarılanma ömrünü 6,2 saat olarak bulmamız ve 8 saat peryodunda inhibisyonun ortadan kalkması bu fikri destekler. Ayrıca 2,4-D'nin bağışıklık üzerine ılımlı dozlarda doğrudan bir etkisinin olmayacağı önerilebilir.

Araştırmada, 2,4-D'nin incelediğimiz organ ve dokularda MDH özgül aktivitesi üzerine etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Nitekim bazı



enzimlerin aktivitesini etkilememektedir (14). Bulgularımız arasında sadece kalpte, 8 saat peryodunda bir inhibisyon kaydedilmiştir. Eğer, ratlarda 2,4-D'nin bir metabolizması varsa, açığa çıkan bir metabolit, MDH'yi inhibe etmiş olabilir (4, 6, 71).

Plazma birikim değerleri IV enjeksiyondan 24 saat sonra 7 kat azalmaktadır. Herbisit 2,4-D asitin plazma proteinlerine karaciğere göre daha zayıf bağlarla bağlandığı düşünülebilir. Bundan başka, organlar ve diğer dokuların (özellikle karaciğer) plazma 2,4-D'sini absorbe ederek plazmadan uzaklaştırmaları da olasıdır; nitekim karaciğer 2,4-D birikim miktarının fazla bulunması da bunu destekler (Tablo 14 ve Şekil 5).

Karaciğerde ise eliminasyonu daha yavaştır ve 24. saatte karaciğer için bu oran 1/3 kadardır. Hedef organın karaciğer olduğu açıktır. Karaciğer detoksifikasyon merkezi olduğuna göre bu sonuç yadırganamaz. Ayrıca, araştırmamızda 2,4-D'nin karaciğer birikim değeri plazmadan daha fazla bulunmuştur. Bu da karaciğer hücre komponentlerinin 2,4-D bağladıklarını ve tuttuklarını gösterir. Karaciğer G-6-P DH'ının 8 ve 16 saatlerde inhibe olması, bir metabolik yolun 2,4-D'yi kullandığı ve oluşan bazı metabolitlerin enzimi etkilediği fikrini çağrıştırmaktadır. Belki de DNA üzerine etki ederek enzimin sentezini azaltmaktadır. Nitekim, 2,21 mM 2,4-D fare 3T3 kültür hücrelerinde DNA sentezini doza bağlı olarak %50 inhibe etmiştir (74). Beyinde bulduğumuz uzun süreli inhibisyon benzer bir mekanizma ile de olabilir. Canlılarda 2,4-D ile bazı konjugatların meydana geldiği daha önceki araştırmalarda bulunmuştur. Etkileşim belki de konjugat oluşumu ile ilgilidir (27,66).

Kasta birikim değeri karaciğer ve plazmaya göre daha azdır. Eli-

minasyonu ise daha hızlıdır. 24 saat periyoduna gelindiğinde 2 saat plazma birikim değerinin yaklaşık 1/10 kadarı kalmıştır. Ancak 8 ve 16 saat periyotları kas birikim değerleri birbirine çok yakındır. Kas 2,4-D birikiminin bu periyotlarda plato yapması kas eliminasyon kinetiği ile ilgili olabilir. 16 saat periyodunda kasta plazmadan daha fazla 2,4-D bulunmaktadır. Bunun nedeni doku proteinlerine ya da diğer komponentlere bağlanan 2,4-D'nin yeniden serbest kalması geçirmektedir. Sonuç olarak 2,4-D'nin kas dokusu tarafından 8 ve 16 saat civarlarında daha fazla alıkonduğu söylenebilir (Şekil 5). Kas dokusu proteinlerinin 2,4-D'ye afinitelerinin fazla olduğunu işaret eden bulgular vardır (68,74).

Spektrofotometrik olarak izlediğimiz ve plazma birikimi olarak değer kazanan plazma 2,4-D derişim değerleri ile dağılma hacmi bulunduğu anda, daha önce yapılan araştırmaların bulguları ile benzerlik gösterdiği ortaya çıkar (10,49-53). Ancak bu araştırmalarda 2,4-D'nin deneklere oral olarak verilmiş olması, toksikokinetik bulgularımız ile az çok farklılığa neden olabilir. Bundan başka, plazma proteinlerinin ve renal organik anyon sisteminin 2,4-D ile doygunluğa ulaşması dağılma hacmini değiştirdiği unutulmamalıdır (53). Nitekim, ratlara uygulamış olduğumuz 120 mg/kg 2,4-D IV dozu plazma proteinlerini ve renal organik anyon sistemini doygunluğa ulaştırabilecek derecede yüksektir. Herbisit 2,4-D'nin IV ve yüksek derişimlerde verildiği başka araştırmalara rastlanmaması karşılaştırma yapma olanağını kısıtlamaktadır. Bulmuş olduğumuz, ratlarda 2,4-D'nin dağılma hacmi ( $V_D=777$  mL/kg) değerinin anlamlı olduğunu sındayız.

Araştırmamızda 2,4-D'nin plazma yarılanma ömrü ( $t_{1/2}$ ) yaklaşık

6,2 saat olarak bulunmuştur. Bu sonuç 2,4-D'nin oral olarak verildiği araştırmaların sonuçları ile uyuşmaktadır (55,58). Plazmada bulunan 2,4-D, uygulandığı andan 6,2 saat sonra %50 oranında azalmıştır.

Bulduğumuz ortalama plazma temizlenme süresi ( $Cl_t$ ) ise yaklaşık olarak 75 saattir. Ratların ortalama 75 saat boyunca 2,4-D ile etkileştiğini haber veren bu bulgu oldukça uzun bir zaman dilimini ima etmektedir. Bir ksenobiyotikle bu kadar uzun süre etkileşmesi canlıda onarılması güç zararlara neden olabilir. Uzun süreli etkileşim nedeniyle, bazı kanserlerin oluşması olasılığı artabilir, nitekim 2,4-D ile etkileşmiş savaş gazilerinde non-Hodgkin's lenfoma sıklığında belirgin bir artışın olduğu ifade edilmektedir (1,35,39,66).

## ÖZET

Araştırmada, deney grubu ratlara (*Rattus norvegicus* var. albino) 120 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde 2,4-D asit-etanol çözeltisi intravenöz (İV) olarak verildi. Etanol ve serum fizyolojik kontrol grupları oluşturuldu. Gruplar 2, 8, 16 ve 24 saatlik periyotlar halinde düzenlendi ve her periyotta 4 rat kullanıldı. Ratların karaciğer, kalp, kas, beyin, böbrek ve dalagında G-6-P DH ve MDH özgül aktiviteleri izlendi ve plazma ile adı geçen organ ve dokularda 2,4-D birikim miktarları incelendi.

G-6-P DH'nin ilk periyotta kalp, beyin ve dalakta, 8 saat periyodunda karaciğer, kas, kalp ve beyinde, 16 ve 24 saat periyotlarında karaciğer ve beyinde inhibe olduğu bulundu. MDH özgül aktivitesinde ise, sadece kalpte değişme gözlemlendi.

Plazma 2,4-D birikim miktarları enjeksiyondan 2, 8, 16 ve 24 saat sonra sırasıyla 154,5 µg/mL, 118,1 µg/mL, 30,0 µg/mL ve 21,1 µg/mL, karaciğerde sırasıyla 204,2 µg/mL, 151,7 µg/mL, 84,9 µg/mL ve 64,6 µg/mL ve kas dokusunda yine sırasıyla 104,3 µg/mL, 52,5 µg/mL, 50,0 µg/mL ve 9,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Kalp, beyin, böbrek ve dalakta spektrofotometrik olarak 2,4-D asit gösterilemedi.

Plazma 2,4-D asit birikim değerlerinden, 2,4-D'nin dağılıma hacmi ( $V_D$ ) 777 mL/kg plazma yarılanma ömrü ( $t_{1/2}$ ) yaklaşık 6,2 saat ve ortalama plazma temizlenme süresi ( $Cl_t$ ) 74,6 saat olarak belirlendi.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF 2,4-D AS A XENOBIOTIC WITH PROTEINS

In this research work 2,4-D acid - ethanol solution was intravenously (IV) administered to the experimental groups of rats (*Rattus norvegicus* var. albino) per 120 mg/kg body weight. Ethanol and physiological serum control groups were used. The groups were organized for 2-, 8-, 16- and 24- hour periods and 4 rats were used every period. G-6-P DH and MDH specific activities in the livers, hearts, muscles, brains, kidneys and spleens of the rats have been followed up and the plasma and 2,4 -D concentration in the organs and tissues mentioned have been examined.

It has been observed that G-6-P DH was inhibited in the heart, brain and spleen in the first period, suffered from inhibition in the liver, muscle, heart and brain in the 8-hour period and was inhibited in the liver and brain in the 16-hour and 24-hour periods. As for the MDH specific activity, change was observed only in the heart.

Plasma 2,4-D concentrations, 2, 8, 16 and 24 hours after the injection were found to be 154.5  $\mu\text{g/mL}$ , 118.1  $\mu\text{g/mL}$ , 30.0  $\mu\text{g/mL}$  and 21.1  $\mu\text{g/mL}$ , respectively; in the liver, 204.2  $\mu\text{g/mL}$ , 151.7  $\mu\text{g/mL}$ , 84.9  $\mu\text{g/mL}$  and 64.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectively; in the muscle tissue, 104.3  $\mu\text{g/mL}$ , 52.5  $\mu\text{g/mL}$ , 50.0  $\mu\text{g/mL}$  and 9.9  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. No 2,4-D acid in the heart, brain, kidney and spleen could be displayed spectrophotometrically.

From the plasma 2,4-D concentration values, it was determined that the volume of distribution ( $V_D$ ) of 2,4-D was 777 mL/kg, the plasma half-life ( $t_{1/2}$ ) of 2,4-D about 6.2 hours and the average plasma clearance time ( $Cl_t$ ) 74.6 hours.

## KAYNAKLAR

- 1 - Sterling, T.D. and Arundel, A.V.: Health effects of phenoxy herbicides. Scand. J. Work Environ. Health 12: 161-173, 1986.
- 2 - Smith, D. A., Humphrey, M. J. and Charuel, D.: Design of toxicokinetic studies. Xenobiotica. 20(11):1187-1199, 1990.
- 3 - Şişli, M. N., Bozcuk, A. N., Bozcuk, S. ve Boşgelmez, A. : Genel Biyoloji. Milli Eğitim Gençlik ve Spor Bakanlığı Yayınları. 2. Basım,1984.
- 4 - Environmental Health Criteria 29. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). World Health Organization. Geneva, 1984.
- 5 - Blakley, B.R. and Blakley, P.M.: The effect of prenatal exposure to the n-butyl ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the immune response in mice. Teratology. 33(1):15-20,1986,
- 6 - Mattison, D. R., Blann, E. and Malek, A.: Physiological alterations during pregnancy: impact on toxicokinetics. Fundam. Appl. Toxicol. 16(2): 215 218, 1991.
- 7 - Saverhoff, M. W., Braun, W. H., Blau, G. E. and Gehring, P. J.: The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. Toxicol. 8: 3-11,1977,

- 8 - Sauerhoff, M. W., Braun, C. G., Blau, G. E. and Gehring, P. J.: The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicol.* 8:3-11, 1977.
- 9 - Harris, S. A. and Soloman, K. R.: Percutaneous penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dimethylamine salt in human volunteers. *J. Toxicol. Environ. Health.* 36(3):233-40, 1992.
- 10 - E.R.I.C. Sandmann, M. A., Loos, M. A. and van Dyk, L. P.: The microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Review Environ. Contam. Toxicol.* 101, 1988.
- 11 - Kawashima, Y.: Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on peroxisomal enzymes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 33 (2) :241-245, 1984.
- 12 - Rivarola, V. and Balegno, H.: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid effects on polyamine biosynthesis. *Toxicol.* 68(2):109-119, 1991.
- 13 - Paulino, C. A. and Palermo-Neto, J.: Effects of acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication on some rat serum components and enzyme activities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24(2):195-198, 1991.
- 14 - Knoop, D. and Shiller, F.: Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: investigation on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. *Arch. Toxicol.* 66(3):170-174, 1992.

- 15 - St. Omer, V. E. and Mohammed, F. K.: Ontogeny of swimming behavior and brain catecholamine turnover in rats prenatally exposed to a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Neuropharmacology*. 26(9): 1351-1358, 1987.
- 16 - Steiss, J. E., Braund, K. G. and Clark, E. G.: Neuromuscular effects of acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposure in dogs. *J. Neurol. Sci.* 78 (3): 295-301,1987.
- 17 - Lundgren, B., Meijer, J. and Depierre, J. W.: induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolase and proliferation of peroxysome and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to p-chlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Biochem. Pharmacol.* 36 (6): 815-821,1987.
- 18 - Duffard, R. D., Fabra de Peretti, A. I., Castro de Contarini, S. M., Mori de Moro, G. B., Arguello, J. M. and Evangelista de Duffard, A. M.: Nucleic acid content and residue determination in tissue of chicks born from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester treated eggs. *Drug. Chem. Toxicol.* 10 (3-4) :339-355,1987.
- 19 - Tyynela, K., Elo, H. A. and Ylitalo, P.: Distribution of three chlorophenoxyacetic acid herbicides into the rat brain. *Arch. Toxicol.* 64 (1):61-65, 1990.
- 20 - Castro de Contarini, S., Duffard, R. and Evangelista de Duffard, A.: Esterase activities during chick embryonic development and its relationship with the metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49(4):520-526, 1992.



- 21 - Gyro - Hansen, N. and Dalgaard - Mikkelsen, S.: The effect of phenoxyherbicides on the hatchability of eggs and the viability of the chicks. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 35:300-308, 1974.
- 22 - Mustanen, R., Kongas, J., Vuojolahti, P. and Linnainmaa, K.: Effects of phenoxyacetic acid on the induction of chromosome aberrations in vitro and in vivo. *Mutagenesis.* 1(4): 241-245, 1986.
- 23 - Adhikari, N. and Grover I. S.: Genotoxic effects of systemic pesticides: In vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 12:235-242, 1988.
- 24 - Mulcaty, M. T.: Chromosome aberrations and "agent orange". *Med. J. Aust.* 2 (10) :573-574, 1980.
- 25 - Bielenberg, G. W., Hayn, C. and Kriegstein, J.: Effects of agents on enzyme activities of rat primary cultures and rat cerebral cortex. *Biochem. Pharmacol.* 35(16): 2693- 2702, 1986.
- 26 - Inomata, N., Yashida, H., Aoki, Y., Tsunoda, M. and Yamamoto, M.: Effects of MCPA and other phenoxyacid compounds on hepatic xenobiotic metabolism in rats. *Tohoku. J. Exp. Med.* 165 (3) : 171-182, 1991.
- 27 - Kelley, M. and Vessey, D. A.: Interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T) with the acyl-CoA: amino acid N-acyltransferase enzymes of bovine liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 35 (2): 289-295, 1986.

- 28 - Yelkovan, İ.: 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik Asit)'nin fare karaciğeriindeki G-6-P DH (Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Sivas, 1989.
- 29 - Marth, E., Stunzner, D., Kack, M. and Mose, J. R.: Toxicokinetics of chlorinated hydrocarbons. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 33 (4) : 514-520, 1989.
- 30 - Çolak, A., Atalay, A. ve Cengiz, S.: Sivas yöresinde 2,4-D ester adlı herbisit balıklara biyolojik etkisinin incelenmesi. *DOĞA*, 14(1): 178-186, 1990.
- 31 - Zychlinski, L. and Zolnierowicz, S.: Comparison of uncoupling activities of chlorophenoxy herbicides in rat liver mitochondria. *Toxicol. Lett.* 52(1): 25-34, 1990.
- 32 - Aitio, A. and Jarvisalo, J.: Biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals. *Pure Appl. Chem.* 56(4):459-566, 1984.
- 33 - Chaturverdi, A. K.: Toxicological evaluation of mixtures of ten widely used pesticides. *J. Appl. Toxicol.* 13(3): 183-188, 1993.
- 34 - Feung, C. S., Hamilton, R. H. and Witham, F. H.: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by soybean cotyledon callus tissue cultures. *J. Agric. Food. Chem.* 19: 474- 479, 1971.
- 35 - Lilienfeld, D. E. and Gallo, M. A.: 2,4-D, 2,4,5-T and 2,3,7,8-TCDD: An overview. *Epidemiol. Rev.* 11: 221-234, 1989.
- 36 - The Agrochemical Handbook. Royal Society of Chemistry. Nottingham. England, 1983.

- 37 - Sitting, M. ed.: Pesticide Manufacturing and Toxic Materials Control Encyclopedia. Park Ridge, N. J. USA, Noyes Data Corp. pp 229-234, 1980.
- 38 - Que Hee, S. S. and Sutherland, R. G.: The phenoxyalkanoic herbicides, Vol: I. Chemistry, Anal. Environ. Poll., Boca Raton, CRC Press Inc, 321 pp, 1988.
- 39 - Environmental Health Criteria 84: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) - Environmental Aspects. World Health Organization, Geneva, 1989.
- 40 - Cengiz, S., Çolak, A. ve Atalay, A.: Sivas İli Akarsu ve Göletlerindeki Balıklarda 2,4-D Birikimi. Çevre 88, 4. Bilimsel ve Teknik Çevre Kongresi, Vol: 2, İzmir, 1988.
- 41 - Boval, B. and Smith, J. M.: Photodecomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Chem. Eng. Sci. 28:11661-1675, 1973.
- 42 - Loos, M. A.: Phenoxyalkanoic acids. in: Kearney, P. C. and Kaufman, D. D., ed. Degradation of Herbicides, New York, Marcel Dekker, pp 1-49, 1969.
- 43 - Fleeher, J. R. and Steen, R. H.: Hydroxylation of in several weed species. Weed Sci. 19:507- 510,1971.
- 44 - Sedlak, P., Brodiloa, J. and Lunak S.: Photochemical degradation of pesticides. Arch. Biochem. Biophys. 300 (2):738-46,1993.

- 45 - Kaphammer, B., Kukor, J. J. and Olsen, R. H.: Regulation of *tfdCDEF* gene by *tfdR* of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid *pjP4*. *J. Bacteriol.* 172 (5): 2280-2286, 1990.
- 46 - Rosenberg, A. and Alexander, M.: 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) decomposition in tropical soil and co-metabolism by bacteria. *J. Agric. Food. Chem.* 28: 705- 709, 1980.
- 47 - Kapoor, K. and Sharma, V. K.: Effect of certain herbicides on survival, growth and nitrogen fixation of blue - green alga *A. doliolum*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 20: 465-469, 1980.
- 48 - Finlayson, B. J. and Verrue, K. M.: Toxicities of butoxiethanol ester and proplene glycol butyl ether ester fomulations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) to juvenile salmonoids. *Arch. Environ. Contam.Toxicol.* 14: 153-160, 1985.
- 49 - Arnold, E. K. and Beasley, V. R.: The pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides: a literature review. *Vet. Hum. Toxicol.* 31(2):121-125, 1989.
- 50 - Kukowicz-Ratajczak, J. and Krechniak, J.: Effects of sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate on renal function in the rat. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41.815-821, 1988.
- 51 - Chernoff, R. N., Setzer, R. W., Miller, D. B., Rosen, M. B. and Rogers, J. M.: Effets of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology.* 42: 651-658, 1990.

- 52 - Gehring, P. J. and Betso, J. E.: Phenoxy acids: effects and fate in mammals. *Ecol. Bull.* 27:122-133, 1978.
- 53 - Environmental Health Criteria 57. Principles of Toxicokinetic Studies, World Health Organization, Geneva, 1986.
- 54 - Mason, R. W.: Binding of some phenoxyalkanoic acids to bovine serum albumin in vitro. *Pharmacol.* 13:177-186, 1975.
- 55 - Elo, H. A. and Ylitalo, P.: Distribution of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in male rats: Evidence for the involvement of the central nervous in their toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 51: 439-446, 1979.
- 56 - Smejtek, P. and Asekare, P. M.: Modification of ion transport in lipid bilayer membranes in the presence of 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biophys. J.* 26: 441-466, 1979.
- 57 - Mattson, J. L., Johnson, K. A. and Albee, R. R.: Lack of neuropathologic consequences of repeated dermal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 6:175-181, 1986.
- 58 - Kohli, J. D., Khanna, R. N., Gupta, B. N., Dhar, M. M., Tandon, J. S. and Sircar, K. P.: Absorption and excretion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in man. *Xenobiotica.* 4: 97-100, 1974.
- 59 - Erne, K.: Distribution and elimination of chlorinated phenoxy acids in animals. *ACTA Vet. Scand.* 7: 240-256, 1966.

- 60 - Gorzinski, S. J., Kociba, R. A., Campbell, F. A., Smith, R. J., Nolan, F. A. and Eisenbrandt.: Acute, Phamacokinetic, and Subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9:423-435, 1987.
- 61 - Kim, C. S., Keizer, R. F. and Pritchard, J. B.: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication increases its accumulation within the brain. *Brain Research.* 440:216-226, 1988.
- 62 - Ibrahim, M. A., Bond, G. G., Burke, T. A., Cole, P., Dost, F. N., Enterline, P. E., Gough, M., Greenberg, R. S., Halperin, W. E. and McConnel, E.: Weight of ten evidence on the human Carcinogenicity of 2,4-D. *Environ. Health Perspect.* 96:213-222, 1991.
- 63 - Biochemical Information, Boehringer Mannheim, 183 pp, 1973.
- 64 - Lawry, O.H., Rasebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 65 - Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. Özdemir Yayıncılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 1993.
- 66 - Hoar, S. K., Blair, A., Holmes, F. F., Boysen, C. D. and Robel, R. J.: Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. *JAMA*, 256 (9) :1141-1148, 1986.
- 67 - Cascorbi, I. and Foret, M.: Interaction of xenobiotics on ten glucose-transport system and the Na/K-ATPase of human skin fibroblasts. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 21:38-46, 1991.

- 68 - Spain, J. C. and Van Veld, P. A.: Adapation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: Effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:428-435,1983.
- 69 - Zychlinski, C. and Zolnierowicz, S.: Comparasion of uncoupling activities of chlorophenoxy herbicides in rat liver mitochondria. *Toxicol. Lett.* 52: 25-34, 1990.
- 70- Holloway, M.: "A great poison", Dioxin helps elucidate the function of genes (news). *Sci. Am.* 263 (5): 16,20. 1990.
- 71 - Dierickx, P. J.: Interaction of 1,4 - benzoquinone and 2,4 - dichlorophnoxyacetic acid with microsomal glutathione transferase from rat liver. *Arch. Int.. Phys. Biochem.* 96: 1-5, 1988.
- 72 - Duffard, R. O., Arguello, J. M. and Evangelista de Duffard , A. M.: Biochmical alterations in skeletal muscle induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic buthyl ester during chick embryonic development. *Biochem. Pharmacol.* 40 (11) :2433-2440, 1990.
- 73 - Pritchard, J. B., Krall, A. R. and Silverthorn, S. U.: Effects of anionic Xenobiotics on rat kidney. *Biochem. Pharm.* 31:149-155, 1982.
- 74 - Zhao, Y., Li, W. and Chou, N.: Cytoskeletal perturbation induced by herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). *J. Toxicol. Environ. Health.* 20:11-26, 1987.

## ÖZGEÇMİŞİM

Çorum ilinin İskilip İlçesinde 1963 yılında doğmuşum. İlk ve orta öğrenimimi aynı yerde yaptım.

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1981 yılında kazandım ve Lisans Eğitimimi 1986 yılında burada tamamladım.

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 1987 yılı Ocak ayında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım, aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans Eğitimine başladım, 1990 yılında Yüksek Lisansımı bitirdim ve aynı yerde Doktora eğitimine başladım.

Evli ve 2 çocuk babasıyım.