

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

2,4-D (2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT)'NİN
FARE KARACİĞERİNDEKİ
G-6-P DH (GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ)
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZZET YELKOVAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ : PROF. DR. AHMET ÇOLAK

SİVAS - 1989



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun
05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen tez
yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seğiminde, planlanmasında ve değerlendirilmesinde yapıcı eleştirilerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a bölümümüz öğretim üyelerinden Sayın Doğ. Dr. İlhan SEZGİN'e çalışmalarım sırasında tüm laboratuvar olanaklarını ve değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Atilla ATALAY'a bütün kalbimle teşekkür ederim.

İstatistik ve İngilizce özet konusunda bana yardımcı olan Öğretim Görevlileri Ziyet ÇINAR ve Sedat TÖREL'e ve bu tezin hazırlanmasında emeği geçen arkadaşlarıma teşekkürlerimi bir borę bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Giriş ve Amaç.....	1
Genel Bilgiler.....	4
Gereç ve Yöntemler.....	14
Bulgular.....	21
Tartışma ve Sonuç.....	26
Özet.....	32
Summary.....	33
Kaynaklar.....	34

TEZDE YER ALAN TABLOLAR

	<u>Sayfa No</u>
Tablo I : Bazı Klorofenoksi Herbisitler ve Özellikleri	5
Tablo II : 2,4-D'nin Bazı Test Hayvanla- rında LD ₅₀ Değerleri	12
Tablo III : Biüret Yöntemi Deney Karışımı	20
Tablo IV : İ.p. Verilen 2,4-D Dozlarında Ölü ve Canlı Fare Sayıları (LD ₅₀ Tablosu)	21
Tablo V : G-6-P DH Enziminin Aktivite Değerlerinin Peryodlara Göre Dağılımı	22

TEZDE YER ALAN ŐEKİLLER

		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1	: 2,4-D'nin Açık Formülü	4
Şekil 2	: 2,4-D'nin G-6-P DH Özgöl Aktivitesi Üzerine Etkisi	23
Şekil 3	: 2,4-D'nin G-6-P DH'yı İnhibisyonu % Oranları	23

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Hızla artan dünya nüfusuna, aynı hızla artmayan bitkisel besin kaynaklarının dengelenebilmesi, tarımsal üretimde kayıplara neden olan zararlılarla savaşıma da bağlıdır. Çeşitli yöntemler denenmekle birlikte; tarım sektörü, günümüzün en geçerli yöntemi olan "Kimyasal Savaş"ı kullanarak sonuca ulaşmayı amaçlamaktadır. Bu doğrultuda, tarımsal zararlılardan böceklere karşı "İnsektisitler", bitkilere karşı "Herbisitler", mantarlara karşı "Fungusitler", bakterilere karşı da "Antibiyotikler" kullanılmaktadır. Kısaca "Pestisitler" adı altında toplanan bu kimyasallar, tarımsal kültür alanlarına, yeşillendirme ve ağaçlandırma sahalarına yaygın olarak uygulanmaktadır.

Kullanıldıklarında ürün artışı sağlayan organoklor (organik klorit) ve organofosfor (organik fosfat) yapısındaki geniş spekturumlu bu maddeler, çok toksik olmakla birlikte; doğrudan olan etkilerinin yanında, dolaylı olarak da besin zincirinde üst basamaklarda yer alan etcil hayvanlar yoluyla insanlarda birikimi sorununu doğurmaktadır (1).

Çevre kirlenmesinde pestisitlerin payı göz ardı edilemeyecek boyutlarda olduğundan toksik, allerjik,

karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri araştırılmış ve deney hayvanlarında, insanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmaların çoğunda defalarca gösterilmiştir (2).

Pestisitler ve diğer çeşitli çevre kirletici bileşiklerin memeli karaciğer endoplazmik retikulumu membranına bağlı karışık işlevli oksidaz (monooksijenaz) sistemi tarafından metabolize edildiği (3-4) ve değişik organlarda stimülasyonuna ve inhibisyonuna rastlandığı belirtilmektedir (5-6).

Oksin analogu olan herbisit 2,4-Diklorofenoksiasetik asit'in rat karaciğerinde peroksizom artışına neden olduğu, hipolipidemik etki yaptığı, palmitoil-CoA oksidasyonunu, katalaz ve karnitin asetiltransferaz aktivitesini artırdığı rapor edilmektedir (7).

Bitkilerde ATPaz ve ATP kullanan fosfatazların aktivitesini artırdığı, fosfotidat fosfotaz aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (8). İnsan fibroblast kültür hücrelerinde düzensiz RNA sentezine neden olduğu (9), bira mayasında ve hamster ovaryum kültür hücrelerinde mutajen olduğu bildirilmektedir (10).

Benzeri araştırmaların ışığında, gelişmiş ülkelerde üretim ve kullanımı en aza indirilirken, gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde bu tür kimyasallar ürün kaybını önlemede yaygın bir önlem olarak kullanılmaktadır.

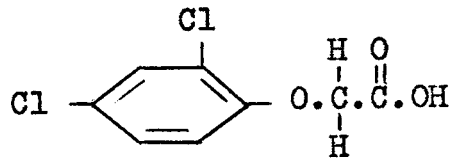
Bu çalışmada, tarımda ürünü artırmak için yaygın bir biçimde kullanılan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit'in organizmalarda enzimatik yapıya olumsuz etkileri gözönünde tutularak, fare karaciğeri Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz özgül aktivitesi üzerine in vivo etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D)

2,4-D, organoklorlu bileşiklerden klorofenoksi-
ler grubu içinde incelenen bir fenoksi asittir. Biyo-
lojik etkisi dikkate alındığında "Ksenobiyotikler"
(Xenobiotic = Yabancı Biyolojik Etkililer) grubunda
incelenir (11). Ayrıca, bu herbisit Portakal Ajansı
(Agent Orange) olarak da isimlendirilir (12). Herbisit
2,4-D'nin açık formülü Şekil 1'de, 2,4-D ve benzeri
bileşiklerin bazı özellikleri Tablo I'de verilmiştir
(2).



Şekil 1. 2,4-D'nin Açık Formülü

2,4-D, sentetik bir oksin (auxin)'dir ve, çift
genekli bitki metabolizmasının çok etkin bir uyarıcı-
sıdır, ancak doğal bitki büyüme hormonu İndolasetik
Asit gibi uyumlu büyümeyi sağlamayıp, sadece bitkinin
üst-gövde bölümünü etkileyerek, metabolizmasının çok
hızlanmasına ve kendi hücre materyalini kullanan bit-
kinin ölümüne yol açar (13).

Tablo I : Bazı Klorofenoksi Herbisitler ve Özellikleri

(IUPAC' A GÖRE)	Kısa	Molekül	Molekül	Sinonimi
Adı	Adı	Formülü	Ağırlığı	
2,4-Diklorofenoksiasetik asit	2,4-D	$C_8H_6Cl_2O_3$	221,0	-
2,4,5-Triklorofenoksiasetik asit	2,4,5-T	$C_8H_5Cl_3O_3$	225,5	-
4-Kloro-2-Metilfenoksi-asetik asit	MCPA	$C_9H_9ClO_3$	200,6	-
2-(2,4-Diklorofenoksi)-propiyonik asit	2,4-DP	$C_9H_8Cl_2O_3$	235,0	Diklorprop
2-(2,4,5-Triklorofenoksi)-propiyonik asit	2,4,5-TP	$C_9H_7Cl_3O_3$	269,6	Fenoprop
2-(2,4-Diklorofenoksi)-bütirik asit	2,4-DB	$C_9H_8Cl_2O_3$	235,1	-

II.1.1. 2,4-D'nin Fiziksel Özellikleri

Molekül formülü	: $C_8H_6Cl_2O_3$
Molekül ağırlığı	: 221,0
Erime noktası	: 140 - 141 C°
Buhar basıncı	: 160 C°'de 52,3 Pa
pKa (25 C°)	: 2,64 - 3,31

2,4-D'nin en iyi çözücüleri organik çözücülerdir. Suda az çözünür (2).

II.1.2. 2,4-D'nin Sentezi

2,4-D sentez yöntemlerinden biri, kuvvetli alkali bir ortamda monokloroasetik asit ve 2,4-diklorofenolün ılımlı sıcaklıklarda birleştirme tepkimesi esasına, bir diğeri ise fenoksiasetik asitin klorlanması esasına dayanır (14-15). Alkali metal ve amin tuzları ilgili radikallerin 2,4-D ile tepkimelerinden, esterleri ise iki farklı esterleştirme yönteminden elde edilir (15). Daha az uçucu oldukları için alkali ve amin tuzları tercih edilenlerdir (16). Yüksek sıcaklıklarda üretimi, yan ürünlerle kirlenmesini artırır (17).

II.1.3. 2,4-D'nin Üretimi ve Tüketimi

Dünyanın her yerinde yaygın olarak kullanılan herbisitlerin tüketim miktarları, her tarafta mümkün toksik etkilerinin artması nedeniyle, gelişmiş ülkelerde azaltılırken, diğer ülkelerde ekonomik tercihler sonucu kullanımı büyük boyutlara ulaşmaktadır.

Otuz bin ton olarak tahmin edilen dünyanın yıllık 2,4-D tüketimi, tüketilen toplam herbisitinde onda biridir. İngiltere'de 1975 yılında üretilen 2,4-D miktarı beş bin tona ulaşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, sadece 1981 yılında üç yüz bin ton herbisit tüketilmiştir. Yıllara göre artış ürkütücüdür (19).

Ülkemizde kullanımı da fazladır. Kayıtlara göre sadece Sivas'ta 1986-1987 yıllarında yaklaşık 120 ton 2,4-D tüketilmiştir (19).

II.1.4. 2,4-D'nin Kullanımı

2,4-D, amin tuzları, alkali metal tuzları ya da esterleri çeşitli biçimlerde meralarda, çimlendirme ve golf alanlarında, parklarda ve hububat ekili yerlerde zararlı-geniş yapraklı otlara karşı öldürme, orman ve ağaçlandırma bölgelerinde zararlı bitkileri, çalılırları ve sağlıklı ağaçları baskılama amacıyla kullanılmaktadır. Granüler 2,4-D su herbisiti olarak göllere, havuzlara ve sulama kanallarına uygulanmaktadır. Çok küçük dozlarda bahçecilikte büyüme düzenleyicisi olarak yararlanılmaktadır (18, 20-21). Vietnam savaşı sırasında yaprak dökücü olarak savaş bölgesinde ağaçlık alanlarda kullanılmıştır (12).

II.1.5. 2,4-D'nin Doğada İzlediği Yol

2,4-D havada, suda, toprak üzerinde ve bitki yüzeylerinde fotolizis sonucu bozulmaya uğrar (22).

Topraktaki 2,4-D, hızlı bir şekilde hidroliz ol-

makla birlikte (23) ; plazmitler aracılığı ile olduğu kanıtlanan mikrobik yıkımı da artık bilinen bir gerçektir (24).

Suda dört aya kadar bozulmadan kalabilen 2,4-D burada en çok fotolizis ile bozulmakta ve anaerobik şartlarda mikrobik yıkıma uğradığı ileri sürülmektedir (25). 2,4-D'nin sulu çözeltileri fotodekompozisyona uğradığı zaman son oksidasyon ürünü karbondioksittir (22).

2,4-D'nin bitkilerdeki metabolizması ; yan zincirin indirgenmesi (26), aromatik zincirin hidroksilasyonu (27) ve bitkinin kendi bileşenleri ile konjugasyonu (28) biçiminde üç mekanizma ile olur.

II.1.6. 2,4-D'nin Alınması, Birikimi ve Atılması

Herbisit 2,4-D ve türevleri ve bunların kalıntılarının az çok buharlaşabilir olmaları hava yoluyla, topraktan filtre olabilmeleri su yoluyla, kirlenme, birikim ve bulaşma ile de besin kaynakları yoluyla insanlara ulaşması mümkündür. Ayrıca temas ile deriden, kaza ya da kasten yutma, içme ya da ile gastrointestinal sistemden vücuda alınmaları da olasıdır (26).

Hem insanlarda hem de hayvanlarda birikim değerlerine çoğunlukla kan plazmasında, akciğerlerde, dalakta ve kalpte rastlanmasına karşın (29), en yüksek birikim değerleri karaciğer ve böbrekte ölçülmüştür (30-31).

İnsanlar üzerinde yapılan bir araştırmaya göre 5 mg/kg vücut ağırlığına oral olarak verildiğinde, 2,4-D plazma derişimi ortalama 20 mg/litre, plazma ve idrardaki düzeyinin yarılanma süresi ortalama 12 ve 18 saat olarak bulunmuş ve dozun % 82'si değişmeden, ortalama % 16'sı konjuge bileşik olarak atılmıştır. Tümünün atılması ise 120 saati bulmaktadır (32).

2,4-D'nin kan plazma proteinlerindeki palmitik asit ve tiroksinin bağlanma yerlerine yarışmalı olarak dönüşümlü bağlandığı ileri sürülmektedir (33).

II.1.7. 2,4-D'nin İnsanda Biyolojik Yarı Ömrü

Bireysel farklılıklar yanında, çok çeşitli çevresel faktörler de 2,4-D'nin vücutta alıkonmasını etkiler. 2,4-D'nin tek oral dozları için, kan plazmasındaki biyolojik yarı ömrü yaklaşık bir gün olarak, ardeşik dozlarda ise ortalama 42 saat olarak bulunmuştur (32).

II.1.8. 2,4-D'nin Canlılar Üzerine Etkileri

Belirli peryodlarda kuyrukları 2,4-D türevi kimyasal bileşiklerin çözeltilerine batırılan fareler ölmüşlerdir ; bu da oldukça etkili bir dermal emilimini işaret eder (34).

2,4-D'nin 335 mg/litre plazma düzeyi insanlarda hiç bir zehirlenme belirtisi göstermezken, genel olarak 447-826 mg/litre plazma düzeyi arasında öldürücü

olduğu haber verilmektedir (35).

Bu kimyasalın yüksek derişimlerinin ratlarda düşük vücut ağırlığına neden olduğu, ayrıca gebe memelilerde yapılan tek doz denemelerinde, azımsanamayacak bir oranda plasentayı geçerek fetüse ya da embriyoya ulaştığı belirtilmiştir (29).

Bu herbisit ile şiddetli zehirlenmiş hayvanlarda beyin kan bariyerinin kısmen bozulduğu ve birikimine bağlı olarak depresyona neden olduğu ileri sürülmektedir. Arka bacaklarda gözlenen yarı-felç durumu myotoksik etkisine işarettir (36).

2,4-D herbisiti verilen evcil memelilerin kan ve kemik iliği hücrelerinde sayısal ve şekilsel, hemoglobin düzeyinde değişmelerden söz edilmektedir (37).

Bazı hayvanların akciğer kılcallarının tıkanmasına ve ödeme, karaciğerlerinde morfolojik değişikliklere ve hastalıklara, böbreklerde histolojik anormalliklere ve tiroid bezinde şişme ve tıkanıklığa neden olduğu rapor edilmektedir (38).

Gebe farelere 124 mg 2,4-D/kg vücut ağırlığı dozu hergün verilirse yavrularda yarı damaga neden olur ayrıca 1 mM/kg vücut ağırlığı dozu fetal ağırlığı azaltırken, fetus ölümünü de artırır (39). Bu bulgular teratojenik ya da fetotoksik olduğunu destekler görünmektedir.

Karaciğer böbrek ve üreme sisteminde işlevsel bozukluklar, periferel sinir sisteminde ve dolaşım sis-

teminde anormallikler, merkezi sinir sisteminde elektroensefalografik değişmeler, şuuruzluk ile birlikte özğün belirtiler (symptom) 2,4-D ile etkileşen bireylerde rastlanmıştır (40).

Zorunlu ya da rastlantı ile uzun süre herbisit- le karşı karşıya kalan insanlarda istatistiksel olarak yumuşak doku sarkomlarının ve karın bölgesi kanserlerinin görülme oranının arttığı bulunmuştur. Ayrıca kromozomal bozukluklar görüldüğü de belirtilmektedir (41).

2,4-D ve diğer bazı çevre kirleticilerin, memeli hayvanların değişik organ ve dokularında monooksijenaz enzim sistemini etkiledikleri bildirilmektedir (5-6).

Herbisit 2,4-D'nin kas laktat dehidrogenaz enzim aktivitesini artırırken (42), kan serum alkalın fosfat ve laktat dehidrogenaz enzimleri düzeyinde azalışa neden olmaktadır (43).

2,4-D, rat karaciğerinde peroksizom artışına paralel olarak katalaz ve asetiltransferaz enzimleri aktivitesini artırırken, kan lipid düzeyini düşürmektedir (7).

Aynı grup herbisitlenden 2,4,5-Triklorofenoksisetik asit, kobay karaciğer mikrozomu anilin 4-hidroksilaz ve akciğer mikrozomu etilmorfin N-demetilaz enzim aktivitelerini anlamlı bir şekilde artırmıştır (6). Ayrıca bu maddenin rat karaciğerinde benzo(a)pren hidroksilaz enzimi aktivatörü olduğu da iletilen bilgiler arasındadır (44).

II.1.9. 2,4-D'nin LD₅₀ Değerleri

Bir kimyasalın test edilecek canlının yarısını (yani % 50'sini) öldüren dozuna, o kimyasalın kısaca LD₅₀'si denir, ve mg/kg canlı vücut ağırlığı olacak biçimde hesaplanır. Bazı deney hayvanlarında 2,4-D'nin LD₅₀ değerleri Tablo II'de verilmiştir (45-46).

Tablo II : 2,4-D'nin Bazı Test Hayvanlarında LD₅₀ Değerleri

Canlı Türü	LD ₅₀ Değerleri (mg/kg vücut ağırlığı)
Fare	368 - 375
Rat (Sıçan)	375 - 666
Kobay	469 - 1000
Tavşan	800

II.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

(G-6-P DH)

D-Glukoz-6-Fosfat : NADP⁺ Oksidoredüktaz,

E.C. 1.1.1.49

Karbohidrat metabolizmasında aerobik glikolitik metabolik yolun (Pentoz Fosfat ya da Fosfoglukonat da denir) ilk basamağı olan Glukoz-6-Fosfat (G-6-P)'ın Glukonat-6-Fosfat'a oksidasyonunu ve iki elektronun NADP'ye taşınmasını katalizleyen enzimidir. Tepkime, G-6-P + NADP — Glukonat-6-Fosfat + NADPH + H⁺ biçimindedir (47).

G-6-P DH elektron transferi yapan, koenzim olarak NADP'ye gereksinim duyan, Piridin-Bağlı Dehidrogenaz'lar grubundan stereospesifik bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesine önce NADP⁺ sonra da G-6-P bağlanır. İlk ayrılan glukonat-6-fosfattır. Oluşan NADPH + H⁺ diğer oksidasyon-redüksiyon tepkimelerine kaynaktır. Enzim, karakteristik Michaelis-Menten davranışı gösterir (47).

Dehidrogenaz, 67.500 daltonluk alt-birimin (sub-
unit) dimeridir. G-6-P için Km = 3,6 mikromol, NADP
için Km = 5,4 mikromol'dür (48).

Enzim, SO₄²⁻, Cl⁻ ve Mg⁺⁺ iyonlarınca aktive edilirken, K⁺, Na⁺, inorganik fosfat, ağır metaller ve bivalent metal iyonları tarafından inhibe edilmektedir. Bazı di ve tri nükleosid fosfatlar, NADPH ve nükleosid monofosfatlar dehidrogenazı inaktive eder (49-50).

İnsanlarda olduğu gibi farelerde de X'e bağlı olarak kalıtılan bir enzimdir (51).

III. GEREÇ VE YÖNTEMLER

III.1. Deney Hayvanları

Ankara Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları biriminden sağlanan Albino Mus Musculus fareleri ile çalışılmıştır. Araştırmada, 25-35 gram ağırlığında olan sağlıklı erkek fareler tercih edilmiştir. Denemelere başlayana kadar standart fare yemi ile beslenen fareler, deneyler başlamadan 24 saat önce aç bırakılmışlar ve enjeksiyon sonrası yine aynı yem ile beslenmişlerdir. Su, sınırsız ve serbest olarak verilmiştir.

III.2. 2,4-D'nin Hazırlanması ve Uygulanması

Suda az çözünüyor olması nedeniyle, çözücü olarak ticari etanol kullanıldı. Enjekte edilecek çözeltiler amaca uygun yoğunluklarda hazırlanarak, kullanım öncesi ısıdan ve ışıktan korundu.

Tüm denemelerde, deney gruplarına 2,4-D-etanol çözeltisi, kontrol gruplarına da sadece serbest etanol uygulandı. Uygun yoğunluklardaki 2,4-D çözeltisi intraperitoneal olarak (i.p.), 1 ml'lik steril plastik penisilin enjektörü ile deneklere enjekte edildi.

III.3. Enjekte Edilecek Dozun Belirlenmesi

Bu amaç için öncelikle LD₅₀ değerinin saptanmasına çalışıldı. mg/kg vücut ağırlığı esasına uygun 30 gram fare ağırlığına 0,1 ml çözelti ya da çözücü kurallı benimsenerek, değişen ağırlık oranınca i.p. enjeksiyon miktarı da oransal olarak değiştirildi.

Her bir doz için 8 erkek fareden oluşan 7 adet grup ile çalışıldı. Birinci grup fareler kontrol grubu olarak ayrıldı ve 0,1 ml serum fizyolojik i.p. olarak verildi. İkinci grup farelere ise i.p. olarak 0,1 ml serbest etanol verildi ve çözücü etanolün kontrol grubu olarak kabul edildi. Arta kalan beş fare grubuna beş ayrı derişimdeki 2,4-D-etanol çözeltisi aynı yolla enjekte edildi. Her grup 72 saat boyunca izlendi. Sürenin bitiminde veriler düzenlenerek LD₅₀ tablosuna aktarıldı. Aşağıda verilen formüller uygulanarak, 2,4-D'nin i.p. LD₅₀ ve LD₃₀ değerleri hesaplandı (52).

$$\text{Log LD}_{50} = \text{Log Dn} + \frac{50 - \text{Dn'de ölenler \% 'si}}{\text{Dv'de ölenler \% 'si} - \text{Dn'de ölenler \% 'si}} \times \text{Log S.F.}$$

Dn = Ölümün % 50'den az olduğu derişim

Dv = Ölümün % 50'den fazla olduğu derişim

S.F. = Sulandırma Faktörü

LD₃₀ değeri bulunurken LD₅₀ için düzenlenen tablo değerlerinden yararlanılmıştır.

$$\text{Log LD}_{30} = \text{Log Dn} + \frac{30 - \text{Dn'de ölenler \% 'si}}{\text{Dv'de ölenler \% 'si} - \text{Dn'de ölenler \% 'si}} \times \text{Log S.F.}$$

Dn = Ölümün % 30'dan az olduğu derişim

Dv = Ölümün % 30'dan fazla olduğu derişim

S.F. = Sulandırma Faktörü

III. 4. Kullanılan Araçlar ve Aletler

Kaba Terazî

Hassas Terazî

Bosch 2000

Özütleyici (Homojenizatör)

B. Braun

Soğutmalı ve Vakümlü Santrifüj

J2-21, JA-20

Başlığı

Küveti Isıtmalı Spektrofotometre

Beckman Model-26

Kolorimetre

Perkin-Elmer 35

Kronometre (mekanik)

Otomatik Mikro Pipet Takımı

Sigma

III.5. Kullanılan Kimyasallar

2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D) (saf), NADP diNa-tuzu ve D-Glukoz-6-Fosfat maddeleri Sigma'dan alınmıştır. Çalışma boyunca kullanılan diğer kimyasal maddeler Merck'den sağlanmıştır.

III.6. Deney ve Kontrol Grubu Farelerde

Deney Peryodları

Enzim aktivitesi çalışmalarında, her deney grubu beş erkek fareden ve kontrolleri de üç erkek fareden oluşturularak çalışıldı. 2,4-D-etanol çözeltisi uygula-

nan deneygrubu fareler ile sadece etanol uygulanan kontrol grubu fareler, enjeksiyondan 0, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 saat sonra öldürülerek araştırmanın izleyen aşamalarına geçildi. Her peryod iki kez çalışılmıştır.

III.7. Karaciğerin Homojenizasyonu

(Özütlenmesi)

Enselerine pens ile bastırılan farelerin kuyrukları kopma sesi duyulana kadar kuvvetlice çekilerek , omurların ayrılması ve omuriliğin hasarı sonucu spinal hale getirilen (servikal dislokasyon) farelerin karın kısmı açılarak karaciğerleri çıkarıldı. Küçük parçalara ayrılan organ, yıkama suyunun rengi normale yaklaşıncaya kadar bir kaç kez izotonik sıvı 0,15 M KCl çözeltisi ile yıkandı. Organ parçalarının tuttuğu fazla su, katlanmış kurutma kağıdı arasında alındı. Organ parçalarından 1 gram karaciğere karşılık 3 ml 0,15 M KCl izotoniği ile birlikte homojenizasyon tüpüne alındı. 1400 devir/dakika hızla dönen homojenizatörde köpüklenmemesine dikkat edilerek, buz banyosu (0 °C) içinde üç vuruşta homojenize edildi.

III.8. Karaciğerlerin Santrifüjlenmesi

Homojenize karaciğerler (homojenatlar), zaman geçirilmeden buz banyosuna oturtulmuş orijinal Beckman santrifüj tüplerine aktarıldı ve daha sonra 15 dakika 16.500 rpm'de santrifüj edildi. Önceden buz banyosuna yerleştirilmiş deney tüplerine, otomatik pipet yardımıyla 1 ml kadar süpernatant (dökelti) ekstre

edildi. Ekstrakt tüpleri aktivite ve protein çalışmalarında kullanılmak üzere stok olarak yine buz banyosu içinde korundu.

III.9. Enzim Aktivitesi İle İlgili Çalışmalar

NADPH 340 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermektedir. Enzimin katalizi sayesinde G-6-P'tan uzaklaştırılan hidrojen (elektron), NADP^+ tarafından tutulmakta ve redüksiyona uğrayarak NADPH'ya dönüşmektedir. Bu dönüşüm miktarının hızı dehidrogenaza bağlı olduğundan, artan NADPH absorbandsının kaydedilmesi, G-6-P DH'in aktivitesinin bulunması için en önemli veridir.

Enzimatik çalışmaların tümü 25°C 'de gerçekleştirildi. Absorbans değerleri en az beş dakika boyunca, her dakika başı kaydedildi. Absorbans artışının en hızlı olduğu dakikaların ortalamasından bulunan A değeri ile de enzimin özgül aktivite değerleri hesaplandı.

Çözeltiler

0,1 M Trietanolamin Tamponu (T.T.) pH : 7,6

0,1 M MgCl_2

11 mM NADP diNa-tuzu (taze çözeltisi kullanıldı)

35 mM G-6-P (taze çözeltisi kullanıldı)

Çözeltilerin tümü bidistile su ile hazırlandı.

Çalışmanın bütününde otomatik mikro-pipet takımı kullanıldı.

Tepkime karışımı ;

T.T.	: 2,45 ml
NADP diNa-tuzu	: 0,10 ml
G-6-P	: 0,10 ml
MgCl ₂	: 0,20 ml
Ekstrakt	: 0,05 ml şeklinde hazır-

landı.

Tepkime karışımına en son enzim kaynağı olan ekstrakt eklenerek tepkime başlatıldı.

ΔA değeri bulunarak aşağıdaki formül ile volüm aktiviteleri hesaplandı.

$$(V.A) \text{ Volüm Aktivite} = \frac{3,00}{E \times l \times 0,05} \times \Delta A$$

(U/ml)

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

Volüm aktiviteden özgül (spesifik) aktivitenin bulunması ekstraktın total protein değerinin biüret yöntemi ile saptanmasından sonra aşağıdaki formül yardımı ile ortaya çıkar.

$$\text{Özgül Aktivite} = \frac{V.A}{\text{Total Protein}} \text{ U/mg protein}$$

(mg/ml)

III.10. Protein Değerlerinin Bulunması

Bunun için biüret çözeltisi, standart sığır serum albumin çözeltisi (S.S.A.Ç.)(2 mg/ml), sodyum deoksikolat (Na-Deoksikolat)(1 g/10 ml) ve serum fizyolojik kullanıldı. Yöntemin karışımı Tablo III'de gösterilmektedir.

Tablo III : Biüret Yöntemi Deney Karışımı

Çözelti	1	2	3	4	5	Örnek
S.S.A.Ç.	-	0,2	0,5	1,0	1,4	-
Na-Deoksikolat	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
S.Fizyolojik	1,4	1,2	0,9	0,4	-	1,3
Biüret Çöz.	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Ekstrakt	-	-	-	-	-	0,1

Tablodaki karışım tüpleri hazırlandıktan sonra bir dakika kuvvetle çalkalanarak, 30 dakika oda sıcaklığında (25 °C) inkubasyona bırakıldı. Kolorimetre, proteinlerin maksimum absorbanans gösterdiği 540 nm'de iken, kör tüpüne (1 numaralı tüp) göre sıfır ayarı yapılarak diğer tüplerin absorbanansları okundu. Standart protein çözeltisi ile çalışılan tüplerin absorbanans değerleri kullanılarak standart protein eğrisi çizildi. Bu eğri yardımıyla da örneklerin total protein değerleri belirlendi.

Çalışmanın sonunda, her periyod ayrı ayrı ele alınarak, deney grubunun enzim özgül (spesifik) aktivite değerleri ortalaması ile kontrol grubunun enzim özgül aktivite değerleri ortalaması arasında "iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi" uygulanarak istatistiksel değerler bulundu (54).

IV. BULGULAR

IV.1. 2,4-D'nin İntraperitoneal (i.p.) LD₅₀ ve LD₃₀ Değerleri Araştırması

Enjeksiyondan 72 saat sonra serum fizyolojik uygulanan birinci kontrol grubu ile serbest etanol verilen ikinci kontrol grubu farelerde ölüm gözlenmemiştir. 2,4-D-etanol verilen deneme grubu farelerde, artan dozlar ile birlikte gözlenen, çeşitli ölüm oranları Tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV : i.p. Verilen 2,4-D Dozlarında Ölü ve Canlı Fare Sayıları (LD₅₀ Tablosu)

Doz (mg/kg)	Canlı Sayısı	Ölü Sayısı	Toplam Canlı	Toplam Ölü	Canlı + Ölü	% Ölüm
75	8	0	25	0	25	00,0
150	7	1	17	1	18	5,6
300	6	2	10	3	13	23,1
600	4	4	4	7	11	63,6
1200	0	8	0	15	15	100,0

Gereç ve yöntemler bölümünde verilen formüller yardımıyla intraperitoneal (i.p.) olarak 2,4-D'nin farelerdeki LD₅₀ değeri 475 mg/kg ve LD₃₀ değeri 338 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde bulundu.

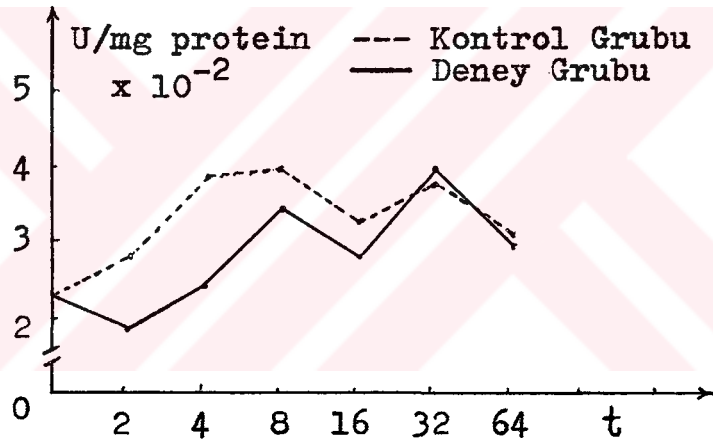
IV.2. 2,4-D'nin G-6-P DH Aktivitesine
Etkileri

i.p. olarak serbest etanol uygulanan kontrol grubu ile 2,4-D'nin LD₃₀ dozu verilen deney grubu fare karaciğerlerinde belirlenen enzim özgül aktivite değerleri Tablo V'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, tüm periyodların enzim özgül aktivitesinde değişimler vardır. 0 saat periyodunda % 1,3 inhibisyon bulunması yanında, özellikle 2 ve 4 saat periyodlarında % 34 ve % 38'lik değerler ile dikkat çekici bir inhibisyon bulunmuştur. 8, 16 ve 64 saat periyodlarında da sırası ile % 12,5, % 14,9 ve % 1,6 inhibisyon belirlenmişken, 32 saat periyodunda % 4,0 oranında bir aktivasyon gözlenmiştir.

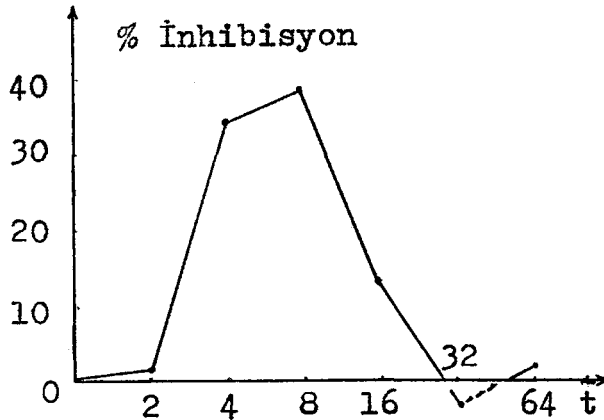
Tablo V : G-6-P DH Enziminin Aktivite Değerlerinin
Peryodlara Göre Dağılımı

Peryod (saat)	Deney Grubu (U / mg Protein)	Kontrol Grubu	İnhibisyon %
0	0,0226	0,0229	1,3
2	0,0186	0,0282	34,0
4	0,0240	0,0387	38,0
8	0,0342	0,0391	12,5
16	0,0275	0,0323	14,9
32	0,0390	0,0375	(-) 4,0
64	0,0296	0,0301	1,6

Her peryodun deney ve kontrol grubu ortalamaları o peryod için bulunan tüm değerlerin ortalamalarıdır. Herbir peryod için deney grubu sütününde bulunan ortalama, kontrol grubu sütünü ortalaması ile oranlanarak % inhibisyon değerleri bulunmuştur. Kontrol sütünü ortalamalarına karşılık deney grubu sütünü ortalamaları arasında, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanarak, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 2. 2,4-D'nin G-6-P DH Özgül Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 3. 2,4-D'nin G-6-P DH'ı İnhibisyonu % Oranları

IV.3. 2.4-D'nin Canlı Farelerde Gözlenen Etkileri

2,4-D, tüm deney grubu farelerde çeşitli davranış değişikliklerine neden olurken, etanol verilen kontrol grubu farelerde sarhoşluk benzeri belirtiler gözlenmiştir.

Etanol verilen kontrol grubu farelerde, alkol etkisi enjeksiyondan yaklaşık 7-12 dakika sonra kendisini gösterdi. Reflekslerde ve normal hareketlerde yavaşlama, dengeyi koruyamama, beslenmeme ve halsizlik gibi gözlenen belirtiler, 6-8 saat sonra hafifleyerek etkisini kaybetti.

2,4-D-etanol verilen deney grubu farelerde, kontrol grubu farelerde gözlenen benzer belirtilere ek olarak, huzursuzluk, sinirlilik, saldırganlık belirtilerine rastlanmıştır. Bazı farelerde kuyruğa dokunulduğunda tepki alınmadığı ve kulak ve kuyruk doğal kırmızılığının azaldığı farkedildi. Sadece 32 saat periyodunda bir ölüm meydana geldi.

LD₅₀ deneme grubu farelerde değişik ölüm oranlarının haricinde, diğer gruplarda sözü edilen belirtilerin daha şiddetlisi gözlenirken, düzensiz ve amaçsız hareketler, görme güçlüğü, sese karşı tepkisizlik, nefeste önce hızlanma sonra azalma, ve kulak, kuyruk ve ayaklarda soğuma ile birlikte hissizlik (felç) gibi hayatta kalanlarda zamanla etkisini kaybeden belirtiler kaydedilmiştir.

Servikal dislokasyona uğratılan farelerin karnları açıldığında tümünün kalbinin uzun süre attığı görülmüşse de, gruplar arasında bir fark bulunmamıştır. Fakat barsak hareketlerinin 2,4-D uygulanan farelerde daha yavaş olduğu gözlenmiştir.



V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımsal zararlılara karşı kimyasal maddelerin kullanılması, besin üretiminin artan dünya nüfusuna dengelenmesi için zorunlu gibi görünmektedir. Yaygınlaşan tarımsal kültür alanları her geçen gün daha da dirençli soyları ortaya çıkan zararlıları da beraberinde taşımaktadır. Bu nedenle çok toksik ve çoğu kalıcı bu tür kimyasalları hem daha çok kullanma gereği doğmakta hem de daha öldürücüleri yapılmaktadır.

Yıllar önce DDT bir mucize kurtarıcı olarak görülmüş, uzun yıllar düşüncesizce kullanılmıştı. Kutup buzları arasında dahi kalıntılarına rastlanması, kimyasal maddelerle kirlenmenin ileride nelere mal olabileceğinin bir göstergesidir.

Azımsanmayacak sayıdaki araştırma, bu kimyasalların ekosistemlerin tümünde iç karartan tablolarını çizmektedir. Canlılar üzerine etkileri araştırıldıkça, geç kalınmadan acil önlemlerin alınması gerektiği ortaya çıkmakta, bir çok canlı türünün yok olmakta olduğu gerçeği ve bozulan doğal dengeler olgusu konuya ayrı bir önem kazandırmaktadır (1).

Uzun süre 2,4-D ve 2,4,5-T ile karşı karşıya

kalan insanlarda hastalanma ve kanserden ölüm oranında önemli ölçüde artışın olması (41,55) dikkat çekicidir.

Her ne kadar araştırmalar hızlanarak devam etse de, herbisitlerin etkileri hakkında karanlıkta kalan noktalar oldukça fazladır. Özellikle 2,4-D'nin canlıların işlevsel birimlerine (kan ve dokular biyokimyası gibi) etkisi yeterince araştırılmamış konulardır. 2,4-D ve benzeri kimyasalların doku ve organlarda enzim aktiviteleri üzerine etkileri hakkında araştırma çok azdır. Bu tür araştırmalara katkıda bulunmak düşüncesi ile 2,4-D'nin fare karaciğer G-6-P DH enzim aktivitesi üzerine olası etkileri araştırılmak istenmiş ve uygulanacak dozun (LD₃₀) belirlenmesi için LD₅₀ tablosu oluşturularak LD₃₀ değeri 338 mg/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur.

LD₅₀ tablo çalışmalarında deney grubu farelerin arka bacaklarında gözlenen kısmi felç belirtileri 2,4-D'nin myotoksik olabileceğini düşündürmektedir (36).

Görme kaybı, düzensiz ve yavaşlamış hareketler ve işitme kaybı nörotoksik bir etkiyi çağrıştırmaktadır.

Farelerin doğal kuyruk ve kulak kırmızılığının kaybolması dolaşım sistemi ve/veya kılcal damarlar üzerine etkisinden kaynaklanabilir.

Barsak hareketlerini yavaşlatması 2,4-D'nin barsak sindirimini etkilediğini işaret eder niteliktedir.

Önce hızlanan sonra yavaşlayan nefes alma, akciğerlerin üzerine belirgin bir baskısının olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada bulduğumuz fare intraperitoneal (i.p) LD₅₀ değeri daha önce bildirilen (Tablo II ve 45-46) 2,4-D oral 368-375 LD₅₀ değerlerinden oldukça yüksektir. Bulmuş olduğumuz i.p. LD₅₀ değerinin (475 mg/kg v.a.) farklı olması verilmiş tekniğine, ırka, eşeyssel farka, beslenme koşullarına, yetiştirme ve deneyin uygulama ortamına bağlı olduğu düşünülebilir. Diğer deney hayvanlarının LD₅₀ değerleri arasında (Tablo II) büyük farklar vardır. Bu da, bu tür çalışmalarda çeşitli değişkenlerin etkisi altında LD₅₀ değerlerinin değişebileceğini vurgular niteliktedir. LD₅₀ değerlerindeki bu belirsizlik, bir çalışma yapılacağı zaman deney ortam ve koşullarında yeniden belirlenmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda karşılaşılan en önemli sorun, bazı fare karaciğerlerinin kistli olmasıydı. Kistler, delinmeden ve parçalanmadan temizlenmiştir. Karaciğer ağırlığı bir gramın altına düşmesi durumunda 1 / 3 oranı esas alınarak izotonik sıvı miktarı ayarlandı.

Deneysel çalışmaların sonunda elde edilen inhibisyonun nedeninin ve mekanizmasının henüz bilinmediği yapılan kaynak taramasından anlaşılmaktadır. 2,4-D'nin fare karaciğeri G-6-P DH'sı üzerine in vivo etkisi hakkında araştırma ve bilgiye ulaşılammıştır. Fakat bazı canlı doku ve organlarda 2,4-D ile ilgili enzimetik çalışmalar vardır.

Ratlarda yapılan bir araştırmada 2,4-D ve 2,4,5-T'nin karaciğer peroksizomal enzim aktivitelelerini artırdığı bulunmuştur. Bu artışın nedenini de peroksizom artışına bağlamışlardır. Ayrıca buna bağlı olarak hipolipidemik etki gözlemişlerdir. Kullanılan kimyasalların peroksizom artırıcı olduğu kararına varmışlardır (7).

2,4-D'nin rat ve hamster karaciğer hücrelerinde peroksizom sayı ve aktivitesini artırarak sonuçta aktif oksijen radikalleri oluşturduğu ileri sürülmektedir. Bu kuvvetli oksitleyici ajanlar ikincil olarak yoğun elektron içeren bölgelerde etkili olacaklardır. Bu tür oksitleyicilerin DNA üzerine de etkileri vardır (39). G-6-P DH'da gözlediğimiz inhibisyon belki de oksijen radikallerinin elektrona ilgisi sonucudur. Enzime bağlanarak aktivitesini azaltmış ya da durdurmuş olabilir. Radikallerin guanine bağlanıyor olması, RNA ve/veya DNA'ya bağlanarak enzimin yapımını engelleyebileceğini düşündürmektedir. Bu haliyle, bulgularımızı destekler niteliktedir.

Günther ve arkadaşları bitki membranı ATP az, fosfataz ve fosfotidat fosfataz enzimlerine 2,4-D'nin in vivo sistemlerde etkisini araştırmışlardır. ATP'yi kullanan fosfatazın 2,4-D tarafından uyarıldığını, nanomolar ve mikromolar derişimlerde ATP az aktivitesinin % 20-30 artırdığını bulmuşlardır. Fosfotidat fosfatazın % 15-25 inhibi olmasını fosfataz aktivitesinin artmasına bağlamışlardır. Fakat ATP az ve fosfataz aktivitesinin artış nedenini açıklayamamışlardır (8). Çalışmamızda ulaştığımız inhibisyonun nedeni 2,4-D'nin G-6-P DH'ya doğrudan değil Günther ve arkadaşlarının ulaştığı sonuçtaki gibi dolaylı olabilir. G-6-P DH'nın katalizlediği tepkime basamağı dışında meydana gelen bir etki neden olabilir.

Fenoksialkonoik asitler ve 2,4-D kan plazma proteinlerine özellikle globulinlerdeki palmitik asit ve tiroksinin tutunma bölgelerine dönüşümlü olarak bağlandığı Mason tarafından ileri sürülmüştür (33). Bu etkileşim proteinlere genelleştirilirse, 2,4-D, benzeri bir bağlanma ile enzimlerin aktivitelerini etkileyebilir. Hatta DNA, RNA ve protein sentez enzimlerini etkilemesi ve bazı enzim ve proteinlerin yapımını engellemesi mümkündür.

Bu tür yorumlar daha da genişletilebilir.

Bu çalışmada, hücrelerin karbohidrat metabolizmasından pentoz fosfat metabolik yolu ile diğer metabolik yollarda gereksindiği NADPH + H⁺'ın sağlanmasında

önemli bir yeri olan G-6-P DH enzimi özgül aktivitesi üzerine in vivo sistemde 2,4-D'nin inhibitör etkisinin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

0 ve 64 saat peryodlarındaki inhibisyon değerleri istatistiksel olarak desteklenmediğinden önemsenmemiştir ($p > 0,05$). 2 ve 4 saat peryodlarında gözlenen % 34 ve % 38'lik inhibisyon oranı gerçekten yüksek değerlerdir. Deneme grubu farelerdeki ölümün nedenini açıklayabilir. 8 ve 16 saat peryodlarında nisbeten inhibisyonda bir düzelme görülse de (% 12,5 ve % 14,9), istatistiksel olarak anlamlı değerlerdir. İnhibisyon 64 saat sonra % 1,6 gibi bir değerle kontrole yaklaşmaktadır, bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir. 32 saat peryodunda diğer bulgulara zıt olarak % 4,0 aktivasyon gözlenmiştir. Üç kez çalışılan bu peryotta hep aktivasyon değeri bulunduğundan anlamlı kabul edilmiştir.

2,4-D'nin G-6-P DH enzimi üzerine olan etkisi diğer enzimlere de olabilir. Ayrıca vücutta birikimleri kaçınılmaz olduğundan hücre işlevlerini etkiliyerek biyokimyasının bozulmasına neden olacaktır.

İnsan ve çevre sağlığı açısından bu tür kimyasalların kontrolü ve bilinçli kullanılmaları ve acil önlemlerin alınması gerektiği yadsınmaz bir gerçektir.

VI. ÖZET

Bu araştırmada, 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)'nin fare karaciğeri Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-P DH) enzim aktivitesi üzerine *in vivo* etkisi incelenmiştir.

İntraperitonal (i.p.) olarak yapılan 2,4-D enjeksiyonunda LD₅₀ ve LD₃₀ değerleri sırasıyla 475 ve 338 mg/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur.

2,4-D'nin 0 ve 64 saat peryodlarında fare karaciğeri G-6-P DH enzimi özgül aktivitesini % 1,3 ve % 1,6 oranında inhibe ettiği bulunmuşsa da, istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0,05$), 2, 4, 8 ve 16 saat peryodlarında ise sırasıyla, % 34,0, % 38,0, % 12,5 ve % 14,9 oranında inhibe ve 32 saat peryodunda % 4,0 oranında aktive ettiği ve sonuçların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$),

VII. SUMMARY

Investigation on the effect of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) on the mouse liver G-6-P DH (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase) enzyme activity.

In this research, the *in vivo* effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the mouse liver Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-P DH) activity has been investigated.

Upon intraperitoneal (i.p.) injection of 2,4-D LD₅₀ and LD₃₀ values have been determined to be 475 and 338 mg/kg body weight, respectively.

Although it was found that 2,4-D inhibited the mouse liver G-6-P DH enzyme specific activity by 1,3 % and 1,6 % at hour 0 and hour 64, respectively, this considered to be insignificant statistically ($p > 0,05$). On the other hand, an inhibition of 34,0 %, 38,0 %, 12,5 % and 14,9 % at hours 2, 4, 8 and 16, respectively, and an activation of 4,0 % at hour 32 were determined and these results were considered to be significant statistically ($p < 0,05$).

VII. KAYNAKLAR

1. Şişli, M.N.: Ekoloji. Hacettepe Üniversitesi Yayınları/A 31, Ankara. 198, 1980.
2. Environmental Health Criteria 29. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). World Health Organization. Geneva, 1984.
3. Bend, J.R., Hook, G.E.R., Easterling, R.E., Gram, T.E. and Fouts, J.R.: A comparative study of the hepatic and pulmonary microsomal mixed-function oxidase systems in the rabbit. J. Pharmac. exp. Ther. 183, 206-216, 1972.
4. Kupfer D. and Orrenius S.: Characterist of guinea-pig liver adrenal monooxygenase systems. Molec. Pharmac. 6, 221-230, 1970.
5. Conney, A.H. and Burns, J.J.: Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs. Science. 178, 576-586, 1972.
6. İşcan, M., Arınç, E., Vural, N. and İşcan, M.Y.: In vivo effect of 3-Methylcholonthrene, Phenobarbital, Pyrethrum and 2,4,5-T Isooctylester on liver, lung and kinney microsomal mixed-function oxidase system of guinea-pig: A comparative study. Comp. Biochem. Physiol. 77 C (4), 177-190, 1984.
7. Kawashima, Y., et.al: Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid on peroxisomal enzymes in rat liver. Biochem. Pharmacol. 33(2), 241-245, 1984.

8. Günther F.E., Scherer and D. James Morre: Invitro stimulation by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid of an ATP ase inhibition of Phosphotidate Phosphatase of plant membranes, Biochem. Biophy. Research Com.; 84(1): 238-247, 1978.
9. Ahmed F.E., Hart, R.W., and Levis, N.J.:Pesticide-induced RNA damage and its repair in cultured human cells. Mutat. Res., 42; 161-174, 1977.
10. Ahmed, F.E., Lewis, N.J., Hort, R.W.,:Pesticide-induced auabain resistant mutonts in chinese hamster V 79 cells, Chem- Biol. Interact, 19: 369-374, 1977 b.
11. Lewis, D.L., et al. Effect of microbial community interactions on transformation rates of xenobiotic chemicals. App Environ Microbial; 48(3): 561-565, 1984.
12. Mortelmans, K., Haworth, S., Speck, W., and Zeiger E.: Mutagenicity Testing of Agent Orange Components and Related chemicals. Toksikol and App Pharmacol. 75, 137-146, 1984.
13. Şişli, M.N., Bozcuk, A.N., Bozcuk, S. ve Boşgelmez A.: Genel Biyoloji, Milli Eğitim Gençlik ve Spor Bakanlığı Yayınları 240, 2. Basım,1984.
14. Sitting, M. ed.: Pesticide Manufacturing and Toxic Moterials Control Encyclopedia. Park Ridge, N.J. USA, Noyes Data Corp. pp 229-234, 1980.
15. Que Hee, S.S., Sutherland, R.G.: The Phenoxy alko-

- noic Herbicides, Vol:I. Chemistry, Analysis and Environmental Pollution, Boca Raton, CRC Press Inc. 321 pp, 1981.
16. Grover, R.: Relative volatilities of ester and amin forms of 2,4-D. *Weed Sci.*, 24: 26-28, 1976.
 17. Horner, J., Que Hee, S.S., and Sutherland, R.G.: Esterification of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, a quantitative comparison of esterification techniques. *Anal. Chem.*, 46: 110-112, 1974.
 18. Bovey, R.W. and Young, A.L., ed: *The science of 2,4,5-T and associated phenoxy herbicides*, New York Chichester, Brisbane, Toronto, John Willey and Sons 462 pp, 1980.
 19. Cengiz, S., Çolak, A., Atalay, A.: Sivas İli Akarsu ve Göletlerindeki Balıklarda 2,4-D Birikimi. *Çevre 88*, 4. Bilimsel ve Teknik Çevre Kongresi, Vol: 2, İzmir, 1988.
 20. Palmova, I.V., Galuzova, L.V.: Maximum permissible concentration of sodium salt and butyl ester formulations of 2,4-D in water. *Gig. i. Sanit.* 28(7): 11-13, 1963.
 21. Smith, G.E., Isom, B.G.: Investigation of effects of large-scale application of 2,4-D on aquatic fauna and water quality. *Pestic. Monitoring J.* 1(3): 16-21, 1967.
 22. Boval, B. and Smith, J.M.: Photodecomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chem. Eng. Sci.*,

- 28: 1661-1675, 1973.
23. Cripps, R.E. and Roberts, T.: Microbial degradation of herbicides. In: Hill, I.R. and Wright, S.J. L., ed: Pesticide microbiology-Microbial aspects of pesticide behaviour in the environment, London, New York, San Francisco, Academic Press, pp 669-730, 1978.
 24. Pemberton, J.M.: Pesticide degrading plasmids: a biological answers to environmental pollution by phenoxy-herbicides. *Ambio*, 8: 202-205, 1966.
 25. Crosby, D.G. and Tutass, H.O.: Photodecomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. agric. Food Chem.*, 14: 596, 1966.
 26. 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.
 27. Fleeher, J.R. and Steen, R.: Hydroxylation of 2,4-D in several weed species. *Weed Sci.*, 19: 507-510, 1971.
 28. 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.
 29. Federova, L.M. and Belova, R.S.: Inclusion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in organs of animals. *Gig. i. Sanit.*, 39(2): 105-107, 1974.
 30. Clark, D.E., Palmer, J.S., Radeleff, R.D., Crook-

- shank, H.R. and Farr, F.M.: Residue of chlorophenoxy acid herbicides and their phenolic metabolites in sheep and cattle. *J. agric. Food Chem.*, 23(3): 573-578, 1975.
31. Erne, K. and Sperber, I. : Renal tubular transfer of phenoxyacetic acid in the chicken. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 35: 233-241, 1974.
 32. Sauerhoff, 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. *Toxicology*, 8: 3-11, 1977.
 33. Mason, R.W.: Binding of some phenoxyalkanoic acids to bovine serum albumin in vitro. *Pharmacology*, 13: 177-186, 1975.
 34. Fetisov, M.I.: Occupational hygiene in the application of herbicides of the 2,4-D group. *Hyg. Sanit.*, 31 (7-9): 383-386, 1966.
 35. Prescott, I.F., Park, J. and Darrien, I.: Treatment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis. *Br. J. clin. Pharmacol.*, 7: 111-116, 1979.
 36. Gorzinski, S.J.: Acute pharmacokinetic and subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 9(3): 423-435, 1987.
 37. Halliop, J., Tocman, A. and Latalski, M.: (Ultrastructural investigations and myeloperoxidase de-

- terminations in rat neutrophils in acut poisoning with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.) Acta haematol. Pol., 11(4): 249-257, 1980.
38. Palmer, J.S.: Toxicity of 45 organic herbicides to cattle, sheep and chickens. In: Production Research Report, Washington, DC, Agricultural Research Service, pp 1-38, 1972.
39. Courtney, K.D.: Prenatal effect of herbicides: Evaluation by the prenatal development index. Arch. environ. Contamin. Toxicol., 6: 33-46, 1977.
40. Andreasik, Z., Kolon, S. and Smolik, R.: Health status evaluation in workers packaging the herbicide "Pielik" (Cholorophenol). Arch. Hig. Rad. Toksikol, 30: 599-602, 1979.
41. Stauber, D.J.: Vietnam vet exposure to Agent Orange (letter). J. Occup. Med., 29(9): 726, 1987.
42. Mazarean, H.H., Dux, L., Guba, F.: Changes of metabolism during experimentally induced myotonia of rats. I: Alteration in lactate and malate dehydrogenase isoenzim activities. Biochem. Med., 22: 350-358, 1977a.
43. Campel, M.: Studies on enzyme activities in rat intoxicated with 2,4-D. Bromatol. Chem. Toxicol., 19(2): 91-94, 1986.
44. Manis, J. and Kim, G.: Effect of polyhalogenated aromatic hidrocarbons on benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the intestine and liver. Life Sci,

- 26: 1431-1439, 1980.
45. Hill, E.V. and Carlisle, H.: Toxicity of 2,4-D for experimental animals. *J. ind. Hyg. Toxicol.*, 29(2): 85-95, 1947.
46. Rowe, V.K. and Hymas, T.A.: Summary of toxicological information on 2,4-D and 2,4,5-T type herbicides and an evaluation of the hazards to livestock associated with their use. *Am. J. vet Res.*, 15: 622-629, 1954.
47. Lehninger, A.L.: *Biochemistry. Second Edition*, Worth Publishers Inc., New York, pp 481-485, 1975.
48. White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R.: *Principles of Biochemistry. Sixth Edition*, pp 466, 1978.
49. Harold, B., Anstall, M.D. and Jose M. Trujillo M.D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathology*, 47(3): 296-302, 1967.
50. *Biochemical Information*, Bohringer Mannheim. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. 99-100, 1973.
51. Griffiths, D.F.R., Davies, S.J., Williams, G.T., Williams D. and Williams, E.D.: Demonstration of somatic mutation and clonic crypt clonality by X-linked enzyme histochemistry. *Nature*, 333(2): 461-463, 1988.
52. Keleti, G. and Lederer, W.H.: *Handbook of Micro-Methods for the Biological Sciences*. Van Nostrand Reinhold Co., London, pp 124-125, 1974.

53. Varley, H., Gowenlock, A.H. and Bell, M.: Practical Clinical Biochemistry. Vol: 1-5 ed; William Heineman Med-Books Ltd., London, 1980.
54. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. Çağ Matbaası, pp 63- 64, 1987.
55. Axelson, O. and Sundell, L.: Herbicide exposure, mortality and tumor incidence. An epidemiological investigation on Swedish railroad workers. Scand. J.Work Environ. Health, 11: 21-28, 1974.