

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

2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT'İN FARE BÖBREĞİ
GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ, MALAT DEHİDROGENAZ
VE HEKSOKİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE İN VİVO ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERGÜN PINARBAŞI

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF.DR. AHMET ÇOLAK

SİVAS 1988

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi



**Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun
5.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen tez
yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.**

TEŐEKKÖR

Tezin konusunun seçiminde, planlanmasında ve değerlendirilmesinde yapıcı eleştirilerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a bölümümüz öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. İlhan SEZGİN'e, çalışmalarım sırasında tüm laboratuvar olanaklarını ve değerli katkılarını esirgemeyen C.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Atilla ATALAY'a bütün kalbimle teşekkür ederim.

İstatistik ve İngilizce özet konusunda yardımcı olan Öğretim Görevlileri Ziyet ÇINAR ve Sedat TÜREL'e ve bu tezin hazırlanmasında emeği geçen arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
Gereç ve Yöntemler	12
Bulgular	21
Tartışma ve Sonuç	28
Özet	39
Summary	41
Kaynaklar	43

TEZDE YER ALAN TABLOLAR

	<u>Sayfa No</u>
TABLO I : Bazı Klorofenoksi Bileşikler ve Açık Formülleri	4
TABLO II : Türkiye'de 1974-1982 Yılları Arasında Gerçekleşen 2,4-D Tüketim Değerleri	5
TABLO III : 2,4-D'nin Çeşitli Canlılarda Oral LD ₅₀ Değerleri	6
TABLO IV : Biüret Yöntemi	19
TABLO V : Değişik Dozlarda i.p. Olarak 2,4-D Verilen Gruplarda Ölü ve Canlı Fare Sayıları	21
TABLO VI : Böbrek Glukoz-6-Fosfat Dehid- rogenaz Enziminin Kontrol ve Deney Grubundaki Farelerde, Özgül Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı	22
TABLO VII : Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Özgül Aktivitesiyle İlgili Olarak Elde Edilen İstatis- tiksel Değerler	23
TABLO VIII: Böbrek Malat Dehidrogenaz En- ziminin Kontrol ve Deney Gru- bundaki Farelerde Özgül	

	Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı	24
TABLO IX	: Malat Dehidrogenaz zgl Aktivitesiyle İlgili Ola- rak Elde Edilen İstatis- tiksel Değerler	25
TABLO X	: Böbrek Heksokinaz Enzimi- nin Kontrol ve Deney Gru- bundaki Farelerde zgl Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı	26
TABLO XI	: Heksokinaz zgl Aktivite- siyle İlgili Olarak Elde Edilen İstatistiksel De- ęerler	27

TEZDE YER ALAN ŐEKİLLER

Sayfa No

ŞEKİL I	: Malat-Aspartat Döngüsü	11
ŞEKİL II	: Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde Glukoz-6-Fosfat Dehid- rogenaz Özgöl Aktivite- sinin Zamana Bağlı Deği- şimi	23
ŞEKİL III	: Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde Malat Dehidrogenaz Öz- göl Aktivitesinin Za- mana Bağlı Değişimi	25
ŞEKİL IV	: Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde Heksokinaz Özgöl Akti- vitesinin Zamana Bağlı Değişimi	27

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya nüfusunun hızla artması karşısında, besin kaynaklarında verimin artırılması için öncelikle tarımsal ürünlerde kayıplara neden olan zararlılarla savaşım gerekmiştir. Bu amaçla "Pestisit" olarak tanımlanan kimyasallar (insektisitler: böcek öldürücüler, Fungusitler: mantar öldürücüler, Herbisitler: ot öldürücüler vb.) tarımsal ürünlere uygulanmaya başlanmıştır.

Tarımsal savaşta etkin sonuçları alınan pestisitlerin, insanlarda karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve allerjik etkilere neden olduğu, kısırlık ve zeka geriliği yaptığı (1), çeşitli enzimlerin düzeylerinde değişimlere neden olduğu, rat ve hamsterlerin karaciğer hücrelerinde karışık işlevli oksidaz düzeyini artırdığı ve peroksizom çoğalmasına neden olduğu (2,3) bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Vietnam savaşı sırasında 2,4-Diklorofenoksiasetik asit'e maruz kalan askerlerde kromozomal bozukluklar görüldüğü bildirilmektedir (4).

İnsan fibroblast kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, 2,4-Diklorofenoksiasetik asit'in

düzensiz DNA sentezini artırdığı (5), hamster ovaryumlarında mutajenik etki yaptığı (6), insan lenfosit kültürlerinde kromozomal bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (7).

2,4-Diklorofenoksiasetik asit'in kas laktat dehidrogenaz ve kreatin fosfokinaz enzim aktivitelerini artırdığı bulunmuştur (8,9).

Bu sonuçlara varıldıkça, herbisitlerin kullanımını birçok ülkede kısıtlanmış ya da bütünüyle yasaklanmıştır. Ancak insan sağlığına yeterince önem vermeyen ya da kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerine olumsuz yanlarını kavrayamamış çoğu gelişmekte olan ülkelerde, ilgili bileşikler verimi artırmada şimdilerde bile umut olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, doğada yaygın kullanım alanı olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit adlı herbisit'in, fare böbreği glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PDH), malat dehidrogenaz (MDH) ve heksokinaz (HK) enzimlerinin aktiviteleri üzerine in vivo etkisi araştırılarak, konu ile ilgili çalışmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

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

2,4-D klorofenoksi bileşikler grubundandır. Bu herbisitlerin çeşitli biçimleri vardır. Bunlardan bazılarının adları ve açık formülleri Tablo I'de verilmiştir (10).

II.1.1. 2,4-D'nin Fiziksel Özellikleri (11)

Moleküler Formülü : $C_8H_6Cl_2O_3$

Molekül Ağırlığı : 221

Erime Noktası : 140-141 °C

25 °C'de PKa : 2,64-3,31

Buhar Basıncı : 160 °C'de 52 Pa

Suda Çözünürlüğü : Az Çözünür

Organik Çözücülerde Çözünürlüğü : İyi Çözünür

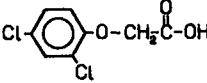
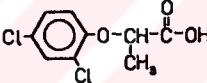
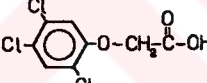
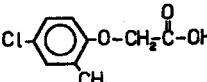
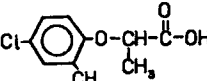
II.1.2. 2,4-D'nin Sentezi

Herbisit, monokloroasetik asitle diklorofenol arasında gerçekleşen tepkimeyle sentezlenir. Ayrıca fenoksiasetik asitin klorlanmasıyla da sentezlenebilir (12,13).

II.1.3. 2,4-D'nin Kullanım Alanları

Herbisitin alkali, amin tuzları ve esterleri golf alanlarında, dinlenme bölgelerindeki çimenlerde

Tablo I : Bazı Klorofenoksi Bileşikler ve Açık Formülleri

Genel Adı	IUPAC Sistemine Göre Adı [Sinonimi]	Yapısal, Moleküler Formülü ve Molekül Ağırlığı
2,4-D	(2,4-Diklorofenoksi)- asetik asit [2,4-D asit]	 $C_8H_6Cl_2O_3$ 221,04
2,4-DP	2-(2,4-Diklorofenoksi)- propiyonik asit [Dikloroprop]	 $C_9H_8Cl_2O_3$ 235,05
2,4,5-T	(2,4,5-Triklorofenoksi)- asetik asit	 $C_8H_5Cl_3O_3$ 255,49
MCPA	(4-Kloro-orto-toliloksi) asetik asit [Agroksen, Metaksen]	 $C_9H_9ClO_3$ 200,63
MCPP	2-(4-Kloro-orto-toliloksi) propiyonik asit [Makoprop]	 $C_{10}H_{11}ClO_3$ 214,60

çayırlarda ve tahıl ürünlerinde verimi artırmak, yabancı otları yoketmek amacıyla kullanılmıştır. Emülsifiye ya da organik çözücülerde çözünmüş biçimi tarım ve ormanlarda kullanılırken, su herbisiti olarak da kanal, göl ve havuzlarda büyük miktarlarda kullanılmıştır (14,15,16).

II.1.4. 2,4-D'nin Tüketimi

Herbisit dünyanın birçok ülkesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişmiş ülkelerde kullanım değerlerinin azalmasına karşın, gelişmekte olan ülkelerde büyük oranlarda tüketilmektedir (10).

2,4-D'nin Türkiye'de 1974-1982 yılları arasında gerçekleşen tüketim değerleri Tablo II'de verilmiştir (10). Ayrıca Sivas ilimizde 1986 yılında 51 ton, 1987 yılında 68 ton 2,4-D kullanılmıştır (17).

Tablo II : Türkiye'de 1974-1982 Yılları Arasında Gerçekleşen 2,4-D Tüketim Değerleri

Yıllar	Tüketim Değeri (ton)
1974-76	1478
1980	1297
1981	848
1982	890

II.1.5. 2,4-D'nin Çeşitli Canlılardaki Oral LD₅₀ Değerleri

Herhangi bir kimyasal maddenin, denek olarak kullanılan canlıların % 50'sini öldüren dozu LD₅₀ (tamamını öldüren dozun yarısı) olarak adlandırılır. Herbisitinin çeşitli canlılardaki oral LD₅₀ değerleri Tablo III'de verilmiştir (18,19,20).

Tablo III : 2,4-D'nin Çeşitli Canlılardaki Oral LD₅₀ Değerleri

Canlı Türü	LD ₅₀ Değeri (mg/kg vücutağırlığı)
Fare	368-375
Rat	375-666
Kobay	469-1000
Tavşan	800

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

İnsanların klorofenoksi bileşikleri alması en-çok solunum, deri ya da yutma sonucu olmaktadır (21). 2,4-D insanların bazı dokularında birikmektedir. En yüksek değerde birikim yaptığı organların karaciğer, böbrek, kalp ve dalak olduğu belirlenmiştir (22).

Herbisitin % 80 i idrarla değişmeden atılmak-

tadır. Kalan bölümü, aside bağımlı olarak değişen birleşimlerdir (23). Gastrointestinal eliminasyonunun yarı zamanı 33 saat, dağılma hacmi 0,1 lt/kg dır (24).

Oral ve damardan verilmesinden sonra idrarda 2,4-D atımı gecikmekte (25), tüm atım bir haftada tamamlanmaktadır (23).

2,4-D kan plazma proteinlerinden albüminlerin palmitik asit ve tiroksin bağlama bölgelerine dönüşümlü biçimde bağlanarak, bu bölgelere bağlanacak bileşiklerle yarışa girmektedir (26,27,28).

Saf olarak 5 mg/kg 2,4-D verilen gönüllü bireylerin plazmalarında 7-24 saat sonra 10-45 mg/lt 2,4-D bulunmuştur. Plazmada 335 mg/lt değeri zehirlenme belirtileri yaparken, genel olarak akut öldürücü düzeyinin 447-826 mg/lt plazma olduğu bildirilmiştir (29).

Diyetle 2,4-D atılması arasında önemli bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır. Proteince fakir diyetle beslenenlerde plazmadan 2,4-D'nin temizlenmesi % 20-50 azalmaktadır (30).

II.1.7. 2,4-D'nin Canlılar Üzerine Etkileriyle

İlgili Çeşitli Çalışmalar ve Sonuçları

Gebe memelilerde herbisitinin tek dozunun % 17 si plasentayı geçerek, embriyo ya da fötüslere erişebilmektedir (31). 124 mg/kg dozda 2,4-D'nin gebe

ratlara hergün uygulanması sonucu yarık damak oluşturduğu belirtilerek, bileşiğin teratojenik olduğu sonucuna varılmıştır (32). Aynı görüş Casey ve Collie tarafından da paylaşılmıştır. Bu araştırmacılar, ana ve babası uzun süre 2,4-D'ye maruz kalmış, herbisitle anasının etkileşimi gebeliği sırasında da sürmüş bir çocukta, şiddetli gelişim azlığı ve diğer kalıtsal sendromlara uymayan fenotipik özellikler gözlemişlerdir. Sonuç olarak çoklu malformasyon ve şiddetli zeka geriliğinin, uzun süreli 2,4-D'ye maruz kalmaktan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (33).

Uzun yıllar 2,4-D ile etkileşimi olan bireylerde yumuşak doku sarkomlarının ortaya çıkma olasılığının arttığı gözlenmiştir. Kansereleşme oranının mide, pankreas, akciğer, deri ve idrar kesesi gibi organlarda yüksek olduğu bulunmuştur (34,35,36,37).

Herbisitle intihar eden bireylerde, Merkezi Sinir Sistemi'nde düzenlenme zayıflaması, dış uyarılara yanıtın azalması, beyin gangliyon hücrelerinin bozulması, bilinç kaybı, koma ve sonuçta ölüm gözlenmiştir (38).

2,4-D rat ve hamsterlerin karaciğer hücrelerinde, aktif oksijen radikalleri oluşturarak kalıtsal materyal üzerinde dolaylı etki yapmaktadır (39,40).

Herbisit, arka bacaklarda lokal ya da tam felç yapmaktadır. Bu durum herbisitin miyotoksik olduğunu açığa çıkarmıştır (41,42).

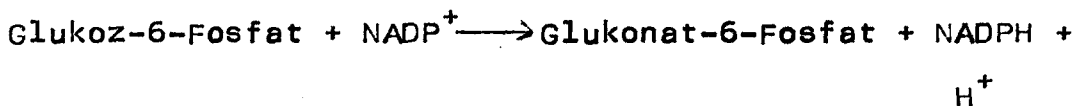
Üç ay süresince, ortalama 100-150 mg/kg dozda 2,4-D ratlara verildiğinde kan serum alkalın fosfataz, kan serum laktat dehidrogenaz enzim düzeylerinde düşmeye neden olmuş, karaciğer alkalın fosfataz ve kan kolinesteraz enzim düzeylerinde değişim yapmamıştır (43).

2,4-D ve 2,4,5-T'nin rat karaciğeri peroksizom enzimlerine etkisi araştırılmıştır (44). Sonuçta serum trigliserit derişiminin ve siyanide duyarsız palmitoyl-koenzim A oksidasyonunun düştüğü, katalaz ile karnitin asetil transferaz enzimlerinin arttığı bulunmuştur.

Herbisit, rat karaciğerinde dimerik bir enzim olan glutatıyon-s-transferazın bazı formlarını bütünüyle inhibe ederken, bazı formlarını az oranda inhibe etmiştir (45).

II.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi

G-6-PDH (D-Glukoz-6-Fosfat: NADP⁺ Oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49), karbohidrat metabolizmasının ikincil yolu olan Pentoz Fosfat (Fosfoglukonat) metabolik yolunun ilk enzimidir ve aşağıdaki tepkimeyi katalizler.



K⁺, Na⁺ ve NH₄⁺ katyonları enzimi inhibe ederken, Cl⁻ ve SO₄⁼ anyonları enzimi aktive etmektedir (46).

Mg^{++} iyonları 5-10 mM derişimde enzimi aktive etmektedir. NADPH, nükleosid monofosfatlar ve bazı nükleosid di ve trifosfatlar (ADP, ATP, GTP, UTP) enzimi inaktive etmektedir. Fosfat enzimi inaktive ederken $NADP^+$ inhibisyonu ortadan kaldırır (47).

II.3. Malat Dehidrogenaz Enzimi

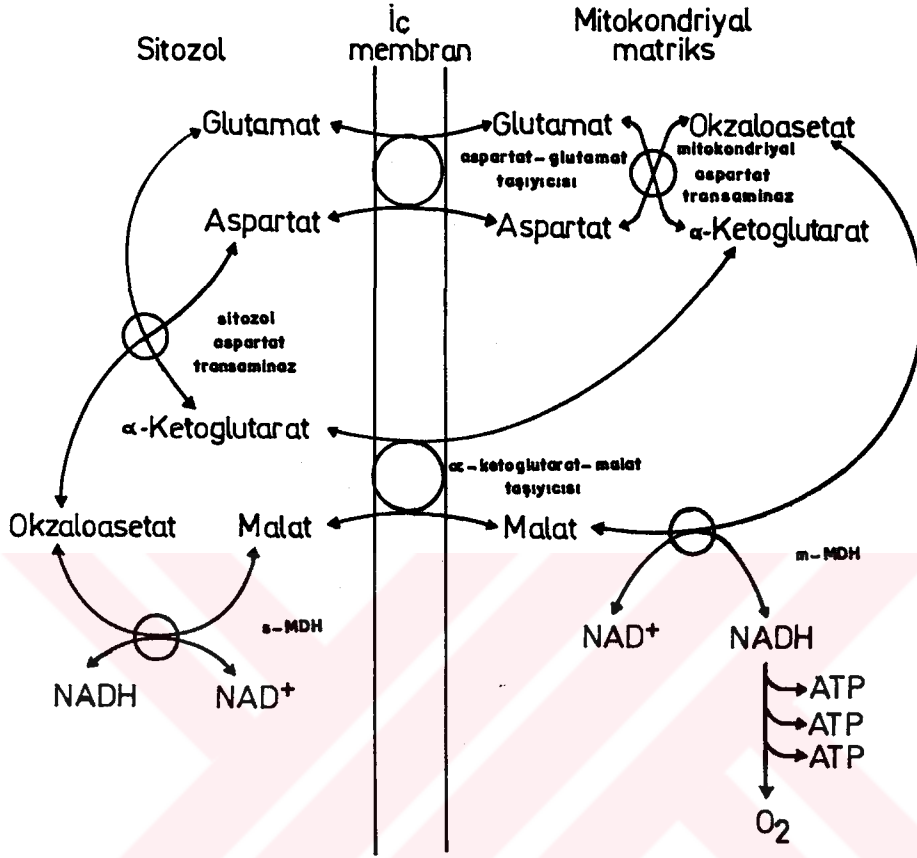
MDH enzimi (L-Malat: NAD Oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.37) koenzim olarak NAD'yi kullanır. L-malatin oksaloasetata dönüşümünü katalizler. Tepkime dönüşümlüdür.



MDH enziminin tüm ökaryotik hücrelerde iki izozim biçimi bulunur; mitokondriyal MDH (m-MDH) ve sitoplazmik MDH (s-MDH). (48).

Fosfat, arsenat ve çinko enzimin aktivatörleridir. Oksaloasetat, fenoller, 8-hidroksikuinolin ve sülfid enzimin inhibitörleridir. Nikotinik asit amid adenin, ATP ve AMP NAD'nin bağlanmasını önleyerek enzimi inhibe ederler. Tiroksin ve Triiyodotironin tarafından inhibisyon dönüşümlüdür (49,50).

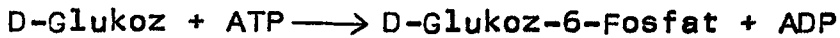
Karaciğer ve kalpte malat-aspartat işlergesi denen çift yönlü bir oluşum vardır. Bu döngü s-MDH, m-MDH ve aspartat-glutamat transaminaz tarafından başarılır. Döngü malat, alfa-ketoglutarat, aspartat ve glutamat için mitokondriyal membran transportudur. Bu döngü Şekil I'de verilmiştir (51).



Şekil I : Malat-Aspartat Döngüsü

II.4. Heksokinaz Enzimi

HK enzimi (ATP: D-Heksoz-6-Fosfotransferaz, E.C. 2.7.11) ATP'den bir fosfat biriminin, glukozun 6. karbonu üzerindeki -OH grubuna aktarılmasını katalizler.



EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) -SH grubunu bloke eden maddeler, sorboz-1-fosfat, polifosfat, 6-deoksi-6-floroglukoz, liksoz ve 2-C-hidroksi-metilglukoz enzimin inhibitörleridir. Kateşolaminler ve Mg⁺⁺ ise enzimin aktivatörleridir (49,52).

III. GEREÇ ve YÖNTEMLER

III.1. DeneY Hayvanlarının Sağlanması ve DeneY Hazırlanması

Çalışmalar, Ankara Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü DeneY Hayvanları Laboratuvarı'nda yetiştirilip üretilen Albino musmusculus fareleriyle yapıldı. Farelerin, 25-35 gr ağırlıkta ve erkek olmalarına özen gösterildi. Enjeksiyondan önceki 24 saat aç bırakılan fareler, standart fare yemi ile beslendi. Su serbest olarak verildi.

III.2. Uygulanan 2,4-D

2,4-D, suda çözünürlüğünün az olması nedeniyle etanolde çözülerek kullanıldı. Belirli yoğunlukları içeren 2,4-D çözeltisi, farelere intraperitoneal (periton içi: i.p.) yolla enjekte edildi. Enjeksiyon 1 ml lik plastik enjektörlerle yapıldı. Enjeksiyon işleminde kullanılan tüm araçlar steril edildi.

III.3. Farelerde 2,4-D İçin Doz Tarama İşlemleri

Hayvanlara verilecek 2,4-D dozunun belirlenmesi amacıyla LD₅₀ çalışması yapıldı. Bu çalışma sonunda LD₃₀ değeri belirlendi. DeneY grubundaki farelere

bu doz uygulandı. Kontrol grubuna ise etanol enjekte edildi.

Doz tarama işlemlerinde her doz için 8 erkek fare kullanıldı. 2,4-D'nin gerekli seyreltmeleri etanolde yapılarak, 5 ayrı doz farelere i.p. olarak verildi. Farelere enjekte edilen çözücü ve 2,4-D çözeltilerinin oranı 30 gr fare için 0,1 ml olacak biçimde uygulandı. Farelerin ağırlıkları değiştikçe uygulanacak hacim, değişen ağırlığa göre hesaplanarak enjekte edildi.

Çalışmalarda 3 grup fare kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve üzerlerinde herhangi bir işlem yapılmadı. İkinci gruba etanol enjekte edildi. Üçüncü gruba ise etanolde çözülmüş 5 ayrı doz 2,4-D enjekte edildi. Enjeksiyonu izleyen 72 saat sonundaki bulgular değerlendirildi. Gerekli hesaplama işlemleri aşağıdaki formül yardımıyla yapılarak, 2,4-D'nin i.p. LD₅₀ ve LD₃₀ değerleri belirlendi (53').

$$\text{Log LD}_{50} = \text{Log } D_n + \frac{50 - D_n \text{'deki ölüm \% si}}{D_v \text{'deki ölüm \% si} - D_n \text{'deki ölüm \% si}} \times \text{Log SF}$$

D_n : % 50 den az ölümün olduğu derişim

D_v : % 50 den fazla ölümün olduğu derişim

SF : Sulandırma Faktörü

$$\text{Log LD}_{30} = \text{Log D}_n + \frac{30 - D_n \text{'deki ölüm \% si}}{D_v \text{'deki ölüm \% si} - D_n \text{'deki ölüm \% si}} \times \text{Log SF}$$

D_n : % 30 dan az ölümün olduğu derişim

D_v : % 30 dan fazla ölümün olduğu derişim

III.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2,4-D (saf), Okzaloasetik asit, NADP, ATP, Glukoz-6-fosfat, G-6-PDH Sigma'dan, NADH ve çalışmada adı geçen diğer kimyasal maddeler Merck firmasından sağlandı.

III.5. Kullanılan Aletler

Homojenizatör (B.Braun), Elektrikli ısı düzenleyicili Spektrofotometre (Beckman Model 26), Spektrofotometre (Perkin-Elmer 35), Soğutmalı Santrifüj (J 2-21, JA 20 Başlığı), Terazî (Bosch 2000) çalışmada kullanılmıştır.

III.6. Fare Böbreklerinin Üzütlenmesi (Homojenizasyon)

Servikal dislokasyon yoluyla öldürülen farelerin karın kısmı açılarak böbrekleri çıkarıldı. Yaklaşık 0,3-0,5 gr ağırlıktaki böbrekler, küçük parçalar halinde kesildi. Birkaç kez 0,15 M KCl ile yıkandıktan sonra fazla suyu kurutma kağıdı ile alındı. Üzütleme işlemi için 1/3 ağırlık/hacim olacak

şekilde, 0,15 M KCl ile özütleyici tüpüne alınan böbrekler, özütleyicinin 1400 devir/dakika hız durumunda 3 vuruşta özütlendi.

III.7. Santrifügasyon İşlemleri

Özütler orijinal Beckman santrifüj tüplerine aktarıldı. Özütleme ve santrifügasyon işlemleri 0-4 °C de gerçekleştirildi. Santrifüj tüplerine aktarılan özütler, 16.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. 0,5-1 ml dökelti alınarak, buz içerisine oturtulmuş deney tüplerine konuldu. Dökelti, enzim aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere korundu.

III.8. 2,4-D Uygulanan Farelerde, Etanol Uygulanan Kontrol Grubuna Karşı Yapılan Enzim Üzgül Aktivite Çalışmaları

Enzimatik çalışmalarda, etanol uygulanan kontrol grubu ve etanolde çözünmüş 2,4-D uygulanan deney grubu olmak üzere iki grup fare incelendi. Enjeksiyon işleminden 0,2,4,8,16,32,64 saat sonra fareler servikal dislokasyonla öldürülerek böbrekleri çıkarıldı ve gerekli çalışmalara geçildi. En az iki kez yinelenen tüm enzimatik çalışmalarda, dökeltinin dondurulmamasına özen gösterildi.

III.8.1. G-6-PDH Enzimiyle İlgili Üzgül Aktivite Çalışmaları

G-6-PDH aktivitesi, glukoz-6-fosfatın (G-6-P)

6-fosfoglukonolaktone dönüştürülmesi sırasında oluşan NADPH'nin 340 nm de, 5 dakika süresince artan absorbansı kaydedilerek, başlangıç hızının doğrusal kısmından elde edilen ΔA değerlerinden belirlendi.

Çözeltiler:

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

0,1 M $MgCl_2$

11 mM NADP (taze hazırlandı)

35 mM G-6-P

III.8.1.1. Yöntem

Deney karışımı;

TEA : 2,5 ml

NADP : 0,1 ml

G-6-P : 0,1 ml

$MgCl_2$: 0,2 ml

Enzim (böbrek dökeltisi) : 0,1 ml

Karışıma en son böbrek dökeltisi eklenerek 340 nm de, 5 dakika absorbans okundu. ΔA değerleri hesaplanarak, özgül aktivite aşağıdaki formül yardımı ile belirlendi (47).

$$\text{Volüm Aktivite (V.A) U/ml} = \frac{3,00}{E. 1.0,1} \times \Delta A \text{ dan}$$

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

Özgül aktivitenin belirlenmesi için, böbrek ö-zütlerinin total protein oranı belirlendi. Bundan sonra aşağıdaki formülle sonuçlar U/mg.protein olarak bildirildi.

$$\text{Özgül Aktivite U/mg.protein} = \frac{\text{V.A}}{\text{Protein Derişimi (mg/ml)}}$$

III.8.2. MDH Enzimiyle İlgili Özgül Aktivite Çalışmaları

MDH aktivitesi, oksaloasetatin malik asite dönüştürülmesi sırasında oksitlenen NADH'ın, 340 nm de 5 dakika süresince azalan absorbansı kaydedilerek, elde edilen ΔA değerlerinden hesaplandı.

Çözeltiler :

0,1 M Fosfat Tamponu pH: 7,5

15 mM Oksaloasetik Asit (taze hazırlandı)

12 mM NADH (taze hazırlandı)

III.8.2.1. Yöntem

Deney karışımı:

Fosfat Tamponu : 2,8 ml

Oksaloasetik asit : 0,1 ml

NADH : 0,05 ml

Enzim (böbrek dökeltisi) : 0,05 ml

Fare böbrek dökeltisi 80 kez sulandırılarak kullanıldı. 25 °C de, 340 nm de, 5 dakika absorbans izlendi. Özgül aktivitenin belirlenmesinde G-6-PDH enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan formülden yararlanıldı (50).

III.8.3. HK'la İlgili Özgül Aktivite Çalışmaları

HK aktivitesi, glukozdan G-6-P oluşması ve

G-6-P ın da G-6-PDH enzimiyle glukonat-6-fosfata dönüştürülmesi sırasında oluşan NADPH'ın 340 nm de, 5 dakika süresince artan absorbanı kaydedilerek, başlangıç hızının doğrusal kısmından elde edilen ΔA değerlerinden belirlendi.

Çözeltiler :

0,1 M TEA pH :7,6

0,1 M $MgCl_2$

81 mM ATP

11 mM NADP (taze hazırlandı)

140 U/mg G-6-PDH

0,55 M D-Glukoz

III.8.3.1. Yöntem

Deney karışımı ;

TEA : 1,19 ml

$MgCl_2$: 0,2 ml

ATP : 0,1 ml

NADP : 0,2 ml

D-Glukoz Çözeltisi : 1,20 ml

G-6-PDH : 0,01 ml

Enzim (böbrek dökeltisi) : 0,1 ml

25 °C de, 340 nm de, 5 dakika absorbanı izlendi. ΔA değerleri hesaplandı. Özgül aktivite, G-6-PDH özgül aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan formülle hesaplandı(52).

III.9. Total Protein Oranının Belirlenmesi

Biüret yöntemi kullanılarak yapıldı (Tablo IV).

Çözeltiler;

Biüret Çözeltisi

Standart Sığır Serum Albümin Çözeltisi (BSA, 2 mg/ml)

Sodyum Deoksikolat (10 gr/dl)

Serum Fizyolojik

Tablo IV : Biüret Yöntemi

D.T	BSA	SeF	SD	BÇ	EK
1	-	1,4	0,1	1,5	-
2	0,1	1,3	0,1	1,5	-
3	0,2	1,2	0,1	1,5	-
4	0,5	0,9	0,1	1,5	-
5	1,0	0,4	0,1	1,5	-
6	1,4	-	0,1	1,5	-
Örnek	-	1,3	0,1	1,5	0,1

D.T : Deney Tüpleri

SeF : Serum Fizyolojik

SD : Sodyum Deoksikolat

BÇ : Biüret Çözeltisi

EK : Enzim Kaynağı

TabloIV deki tüpler hazırlandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra kör tüpüne

karşı 540 nm de spektrofotometrede okundu. BSA derişimlerine karşı gelen absorbanlar grafiğe aktarılarak, standart protein eğrisi elde edildi. Örneklerin protein değerlerinin derişimleri bu standart eğri yardımıyla belirlendi (54).

İstatistiksel çalışmalarda, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulandı (55).



IV. BULGULAR

IV.1. 2,4-D'nin LD₅₀ ve LD₃₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Enjeksiyondan 72 saat sonra etanol uygulanan grupta, kontrol grubunda olduğu gibi hiçbir farenin ölmediği ancak ilk saatlerde halsiz oldukları, sonraki saatlerde ise düzeldikleri gözlemlendi. Üçüncü grupta ise dozlara bağlı olarak ölen fare sayıları Tablo V de verildi.

Tablo V : Değişik Dozlarda i.p. Olarak 2,4-D Verilen Gruplarda Ölüm ve Canlı Fare Sayıları

Doz (mg/kg)	CS	ÖS	TC	TÖ	C+Ö	% Ölüm
75	8	0	25	0	25	00,0
150	7	1	17	1	18	05,5
300	6	2	10	3	13	23,0
600	4	4	4	7	11	63,6
1200	0	8	0	15	15	100,0

CS : Canlı Sayısı, TC : Toplam Canlı, TÖ : Toplam Ölüm,
ÖS : Ölüm Sayısı, C+Ö : Canlı + Ölüm

Çalışmamızda i.p. olarak belirlenen LD₅₀ ve

LD₃₀ değerleri sırasıyla 475 ve 338 mg/kg vücut-ağır-
lığıdır.

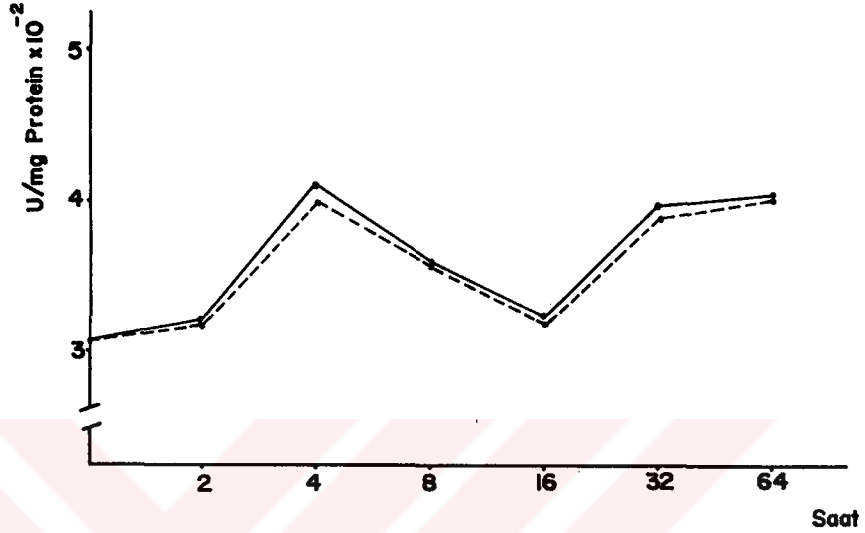
IV.2. 2,4-D'nin G-6-PDH Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Etanol verilen kontrol grubu (KG) ve LD₃₀ 2,4-D uygulanan deney grubunda (DG) elde edilen özgül aktivite değerleri Tablo VI'da, 2,4-D'nin G-6-PDH enzimi üzerine etkisi Şekil II'de verilmiştir. Bu değerler gözönüne alındığında, 4. ve 32. saatlerde enzimin yaklaşık % 2 oranında inhibe olduğu gözlenmektedir. Ancak kontrol grubu ve deney grubundaki tüm aktivite değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, iki grup arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Elde edilen istatistiksel değerler Tablo VII'de verilmiştir.

Tablo VI : Böbrek Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin, Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde, Özgül Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı

Enjeksiyondan sonraki süre (saat)	KG (U/mg.protein)	DG	% İnhibisyon
0	0,0309	0,0309	0,0
2	0,0322	0,0319	0,9
4	0,0411	0,0400	2,7
8	0,0361	0,0359	0,9
16	0,0324	0,0320	1,2
32	0,0397	0,0389	2,0
64	0,0406	0,0401	1,2

KG: Kontrol Grubu, DG: Deney Grubu



Şekil II : Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Fare-
lerde Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Özgül
Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi
(—— ; Kontrol Grubu, - - - - ; Deney Grubu)

Tablo VII : Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Özgül Akti-
vitesiyle İlgili Olarak Elde Edilen İsta-
tistiksel Değerler

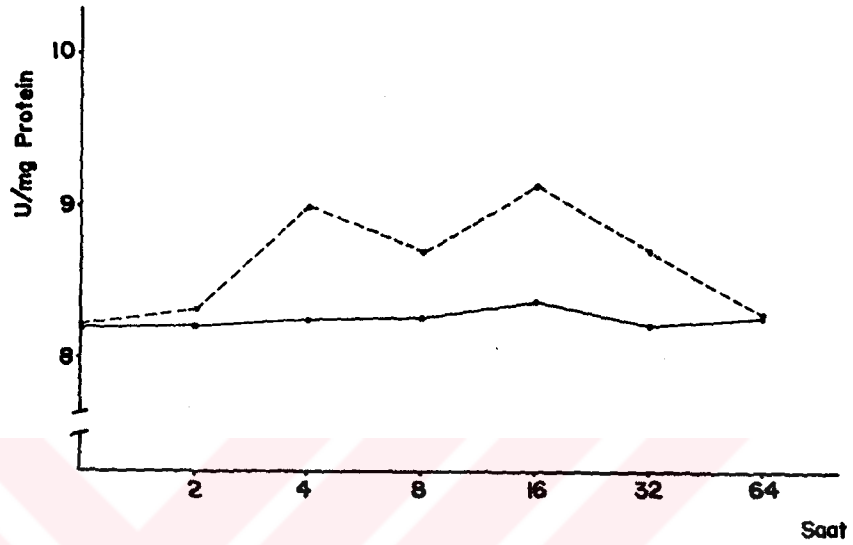
	\bar{X}	S	$\bar{X} \pm S$	Karar
KG	0,0359	0,0358	0,0359 \pm 0,0358	t= 0 p>0,05 Önemsiz
DG	0,0359	0,0057	0,0359 \pm 0,0057	

IV.3. 2,4-D'nin MDH Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Etanol verilen kontrol grubu ve deney grubunda elde edilen özgül aktivite değerleri Tablo VIII'de 2,4-D'nin malat dehidrogenaz enzimi üzerine etkisi Şekil III'de verilmiştir. Bu değerler gözönüne alındığında, 4. ve 16. saatlerde enzimin yaklaşık % 9 oranında aktive olduğu gözlenmektedir. Ancak gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, iki grup arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). İstatistiksel değerler Tablo IX'da verilmiştir.

Tablo VIII: Böbrek Malat Dehidrogenaz Enziminin Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde, Özgül Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı

Enjeksiyondan sonraki süre (saat)	KG (U/mg.protein)	DG	% Aktivasyon
0	8,207	8,213	0,0
2	8,220	8,233	0,1
4	8,256	9,026	9,3
8	8,271	8,719	5,4
16	8,397	9,152	8,9
32	8,223	8,715	5,9
64	8,270	8,310	0,4



Şekil III : Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde Malat Dehidrogenaz Özgül Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi
(——— ; Kontrol Grubu, - - - - - ; Deney Grubu)

Tablo IX : Malat Dehidrogenaz Özgül Aktivitesiyle İlgili Olarak Elde Edilen İstatistiksel Değerler

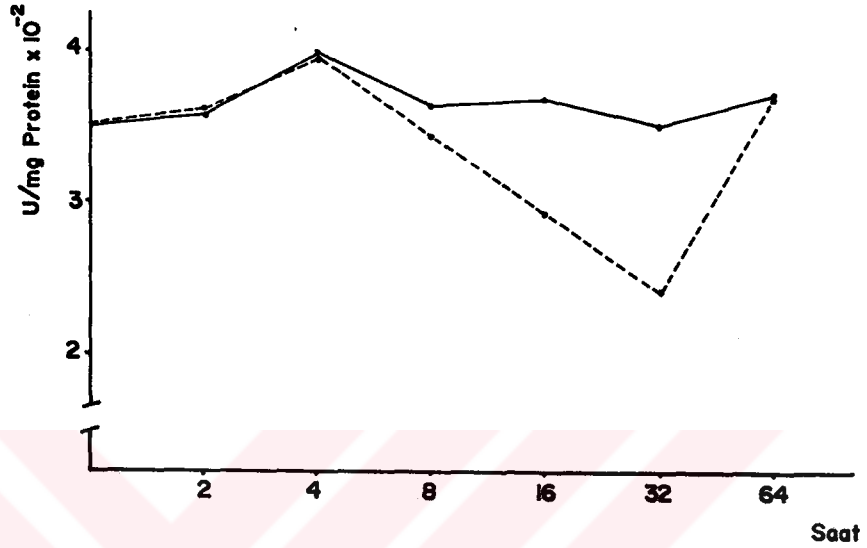
	\bar{X}	S	$\bar{X} + S$	Karar
KG	8,325	0,479	8,325 \pm 0,479	t= 1,87 p > 0,05
DG	8,724	0,973	8,724 \pm 0,973	Önemsiz

IV.4. 2,4-D'nin HK Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kontrol grubu ve deney grubunda elde edilen özgül aktivite değerleri Tablo X'da, 2,4-D'nin heksokinaz enzimi üzerine etkisi Şekil IV'de verilmiştir. Değerler gözönüne alındığında, 32. saatte en fazla inhibisyon değeri % 31 olarak bulunmuştur. Gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yukarıdaki inhibisyon doğrulanmakta ve iki grup arasındaki fark önemli bulunmaktadır ($p < 0,05$). İstatistiksel değerler Tablo XI'de verilmiştir.

Tablo X : Böbrek Heksokinaz Enziminin Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde, Özgül Aktivite Değerlerinin Saatlere Göre Dağılımı

Enjeksiyondan sonraki süre (saat)	KG (U/mg.protein)	DG	% İnhibisyon
0	0,0351	0,0354	-
2	0,0357	0,0362	-
4	0,0403	0,0396	1,7
8	0,0364	0,0344	5,4
16	0,0369	0,0292	20,8
32	0,0350	0,0241	31,1
64	0,0372	0,0368	1,0



Şekil IV : Kontrol Grubu ve Deney Grubundaki Farelerde Heksokinaz Özgül Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

(———; Kontrol Grubu, - - - - -; Deney Grubu)

Tablo XI : Heksokinaz Özgül Aktivitesiyle İlgili Olarak Elde Edilen İstatistiksel Değerler

	\bar{X}	S	$\bar{X} \pm S$	Karar
KG	0,0370	0,0029	0,0370 \pm 0,0029	t= 3,2 p < 0,05
DG	0,0338	0,0055	0,0338 \pm 0,0055	Önemli

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Artan dünya nüfusu, yanısıra beslenme sorununu da gündeme getirmiştir. Birçok ülkede zararlı etkilerine karşın pestisit kullanmak, tahıl ürünlerinde verimi artırmada günümüzde bile umut olarak görülmektedir. Doğada hemen her alanda kullanılan 2,4-D, bilinen birçok zararlı etken arasında gösterilmektedir. Herbisitin özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde, normal kullanım değerinin çok üzerinde kullanılması, doğada kirliliğe, bunun sonucu olarakta doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır.

2,4-D'nin üretimi sırasında düzensizce doğaya salınan atıklar toprak ve havanın kirlenmesine neden olmuştur. Bu kirlilikte en büyük etken ise, üretim sırasında diklorofenol, kloroasetik asit ve ürenin atmosfere karışmasıdır (12). İnsanların kirli atmosferin havasını solması ve topraktaki kirlilikten besinler aracılığıyla etkilenmesi konuya ayrı bir önem kazandırmaktadır.

Herbisitin kanal, göl ve havuz gibi su ortamlarında kullanılması, bu çevreleri kirletebileceğini

ve suda yaşamını sürdüren canlıları, özellikle balıkları, besin zinciri yoluyla insanları etkileyebileceğini düşündürmektedir (15,16). Balıkların iyi bir protein kaynağı olması ve dünyanın hemen her yerinde büyük oranlarda tüketilmesi, insanla herbisit arasındaki etkileşimi artırmaktadır.

Vietnam savaşı sırasında yörenin bitki örtüsünü kurutmak amacıyla, Amerika Birleşik Devletleri'nin 2,4-D ve 2,4,5-T kullanmaları, herbisitlere değişik bir boyut kazandırmıştır. Kullanılan herbisit değerleri düşünüldüğünde (25 milyon kg 2,4-D, 21 milyon kg 2,4,5-T) ve orada savaşan askerlerde kanserleşme oranının arttığını belirleyen çalışmalar gözönüne alındığında, herbisitlerin ne kadar zararlı oldukları daha iyi anlaşılacaktır (56).

Bugüne kadar klorofenoksi herbisitlerin birçok türleri ile yapılan çalışmalarda, biyokimyasal etki işlergeleri araştırılmış olmasına karşın, tartışmaya açık kalmış noktalar bulunmaktadır. Özellikle herbisitlerin enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerinin nedeni bütünüyle aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda, 2,4-D'nin enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin açıklanmasına katkıda bulunmak amacıyla, 2,4-D'nin böbrekte G-6-PDH, MDH ve HK enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Ayrıca bu herbisitinin LD₅₀ ve LD₃₀ değerleri belirlenmiştir.

LD₅₀ çalışması sırasında, 2,4-D uygulanan farelerin arka bacak kaslarının tutulmasına bağlı olarak yürüme güçlüğü çektikleri gözlemlendi. Herbisitinin arka bacaklarda lokal ya da tam felç yaptığı ve miyotoksik etkisinin olduğu Iyer ve Senges adlı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (41,42). Çalıştığımız farelerdeki yürüme güçlüğü, büyük bir olasılıkla herbisitinin miyotoksik etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda i.p. olarak belirlenen LD₅₀ değerinin, oral olarak belirlenen değerden daha yüksek olduğu görülmüştür. 2,4-D'nin oral LD₅₀ değerleri farelerde 368-375, ratlarda 375-666, kobaylarda ise 469-1000 mg/kg olarak bildirilmiştir (18,19,20). Yukarıda adı geçen kaynaklarda farelerin türleri ve eşeyleri verilmemiştir. Çalışmamızda kullanılan farelerin tür ve eşeyleri, LD₅₀ değeri 368-375 mg/kg olarak belirlenen farelerden farklı olabilir. Beslenme koşulları, yetiştirilme ortamı ve eşey etkenleri de gözönünde bulundurulursa bulduğumuz LD₅₀ değerinin (475 mg/kg) farklı olması doğal karşılanmalıdır.

Rat ve kobaylardaki oral LD₅₀ değerleri büyük farklılıklar göstermektedir. Bu canlılarda belirlenen LD₅₀ değerleri arasındaki büyük farklılık, oral LD₅₀

çalışmalarının kararsızlığını ortaya koymaktadır.

Herhangi bir kimyasal maddenin canlıları etkileme süreci ve oranı beslenme koşulları, yetiştirilme ortamı gibi birçok etken tarafından değişebilir. Bu nedenle ciddi bir çalışma gerçekleştirmek istenildiğinde, LD₅₀ değeri yeniden belirlenmelidir. Tüm bu sorunlara karşın i.p. olarak belirlediğimiz LD₅₀ ve LD₃₀ değerlerinin önemli olduğu kanısındayız.

Enzim özgül aktivitelerinin çalışılması sırasında karşılaşılan önemli bir sorun da böbrek dökeltilerinin hemolizli olmasıydı. Bunu gidermek için böbrekler çıkarıldığında, küçük parçalar halinde kesilerek, 0,15 M KCl ile üç kez yıkandı. Ayrıca böbrek dökeltilerinin dondurulmamasına özen gösterildi. Bunun nedeni dondurulup çözülen dökeltinin enzim aktivitesinde değişimler gözlenmesindedir.

Enzim özgül aktivite çalışmaları sonucu, G-6-PDH ve MDH enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim gözlenmezken, HK enzimi herbisit tarafından 16. saatte % 20, 32. saatte % 31 oranında inhibisyona uğratılmıştır. Bu inhibisyonun önemli olduğunu (tüm grupların aktivite değerleri gözönüne alındığında) istatistiksel çalışmalar da desteklemiştir ($p < 0,05$). MDH enzim aktivitesinin 4. ve 16. saatlerde yaklaşık % 9 luk aktivasyonu, G-6-PDH enzim

aktivitesinin ise, 4. ve 32. saatlerde % 2 lik inhibisyonu yapılan istatistiksel çalışmaların sonucuna göre önemsiz çıkmıştır ($p > 0,05$). Herbisitin bu iki enzimin aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır.

2,4-D enjeksiyonundan sonra enzim aktivitele-
rinde oluşan kararlılığın ve inhibisyonun nedenini
bu konuda önceden yapılan çalışmaların ışığı altın-
da birkaç aşamada tartışabiliriz.

Ahmed ve arkadaşları herbisitinin mutajenik ol-
duğunu, 0,00022 mg/ml 2,4-D uygulanan insan fibro-
blast kültürlerinde düzensiz DNA sentezine neden ol-
duğunu bulmuşlardır (5).

Rasmuson ve arkadaşları 0,025 mg/ml 2,4-D'nin
Drosophila melanogaster'in larval döneminde, X'e bağı-
lı resesif mutasyonlara neden olduğunu (57), Magnus-
son ise bir hafta süresince 1 mg/ml 2,4-D uygulanan
Drosophila melanogaster'de X'e bağlı letal mutasyon-
ları artırdığını bulmuştur. Ayrıca 0,1 mg/ml herbi-
sitinin aynı canlının larval döneminde, ayrılammaya
(nondisjunction) bağlı olarak XO ve XXY bireylerinin
oluşumuna neden olduğunu gözlemiştir (58).

Pilinskaya, oral olarak farelerde 100 mg/kg ve
daha yüksek dozlarda 2,4-D'nin kemik iliği hücrele-
rinde sitogenetik bozukluklar yaptığını bulmuştur (59).

İnsan lenfosit kültüründe yapılan çoğu araştırmada ise, herbisitın kromozomlarda kırık ve gap'lar (aralık) oluşturduğu bildirilmiştir (60).

Değişik araştırmacılarca yapılan yukarıdaki çalışmalar, 2,4-D'nin kalıtsal materyal üzerinde etkin olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda 2,4-D'nin fare böbreği HK enzimini 32. saatte % 31 oranında inhibe etmesi, herbisitın DNA'nın bu enzimle ilgili bölgelerinde değişimlere neden olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan kaynak taramasında 2,4-D'nin fare böbreği G-6-PDH, MDH ve HK enzim aktiviteleri üzerine in vivo etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamasına karşın, çeşitli dokularda herbisitın enzimler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (44,45,61).

İşcan ve arkadaşları, üç gün süresince 200 mg/kg 2,4,5-T izooktil esterini i.p. olarak kobaylara enjekte etmişler ve karaciğer, akciğer ve böbrekte mikrozomal anilin 4-hidroksilaz, etilmorfin N-demetilaz benzo-a-pyrenhidroksilaz ve NADPH-sitokrom c redüktaz düzeylerine etkisini araştırmışlardır. Sonuçta, herbisitın yalnızca karaciğer anilin 4-hidroksilazda % 50, akciğer etilmorfin N-demetilazda % 61 aktiviteye neden olduğunu, diğer enzimlerin aktivitelerinde bir değişim yapmadığını bulmuşlar ve bu iki enzimdeki aktivasyonun tam nedenini açıklayamamışlardır.

Enzimlerin herbisitten etkilenmemelerini onların kararlı yapılarına bağlamışlardır (61).

Çalışmamızda G-6-PDH ve MDH aktivitelerinde gözlenen kararlılık, işcan ve arkadaşlarının çalışmalarında bulunan sonuçların bazılarına uygunluk göstermektedir.

Yapılan başka bir araştırmada 2,4-D ve 2,4,5-T'nin rat karaciğeri glutatyon-S-transferaz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. 2,4-D enzimin bazı formlarında % 37 inhibisyon yaparken, bazı formlarında aktivasyona neden olmuştur. Transferaz enzimleri bazı elektrofilik toksinleri metabolize ederek canlıyı korumaktadırlar. 2,4-D uygulanan ratlarda enzimin bazı formları inhibe olduğundan, enzimlerin bu yetenekleri azalmaktadır. Bu tip toksinlerle 2,4-D arasında benzer bir toksiklik var denilmekte ve inhibisyonun tam nedeni açıklanmamaktadır. Ancak bu tip inhibitörlerin enzimin aktif merkezi dışında bir bölgeye bağlanarak enzimin yapısını değiştirebileceği ve enzimi inhibe edebileceği yorumlanmaktadır (45).

HK ile ilgili olarak yaptığımız özgül aktivite çalışmalarında, enzimin % 31 oranındaki inhibisyonu bu yorumu destekler görünümündedir.

Kawashima ve arkadaşları, 2,4-D ve 2,4,5,T verilen ratlarda karaciğer peroksizomal enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Herbisit peroksizom artı-

şına bağılı olarak hipolipidemiye neden olmuştur. Karaciğer palmitoyl-koenzim A oksidasyonundaki artışı, peroksizom enzimlerindeki artışa bağlamışlar ve klorofenolik asit gibi güçlü peroksizom artırıcılarına yapısal olarak benzeyen 2,4-D ve 2,4,5-T'nin peroksizomların artmasına neden olmasının doğal olduğunu belirtmişlerdir (44).

2,4-D rat ve hamsterlerin karaciğer hücrelerinde peroksizomları artırarak, aktif oksijen radikalleri oluşturur. Bu radikaller de DNA üzerinde dolaylı etkiler yaparlar. Aktif oksijen radikalleri güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgelere bağlanmaktadır (39,40).

HK enziminin inhibisyonunda oksijen radikallerinin etkisi olabilir. Ancak 2,4-D'nin bu kadar kısa sürede peroksizomları artırarak oksijen radikalleri oluşturabilme süreci ve bu oksijen radikallerinin de DNA'yı etkileme süreci tartışılabilir.

Klorofenoksiasitlerin proteinlere iki yolla bağlandıkları belirlenmiştir. Bunlardan birincisi amino asit üzerindeki aromatik grupla benzen halkası arasında olmaktadır (belkide tek triptofan birimiyle). Bu bağlanma hidrofobiktir. İkincisi, albüminin uç arjininin guanidin grubu ile klorofenoksiasitlerin karboksilik asitleri arasında olmaktadır (62).

Bulgularımızdaki HK enziminin inhibisyonu herbisit'in yukarıdaki bağlanma biçimlerinden biriyle enzime bağlanarak onu inhibe etmesi biçiminde de yorumlanabilir. Ayrıca protein sentezi sırasında, ileride enzimi oluşturacak proteine 2,4-D'nin bağlanabileceği ve bu yoldan enzimi inhibe edebileceği de düşünülebilir.

Pestisitlerin enzimlerin aktivitelerini artırıcı ya da azaltıcı etkileri, enzimlere bağlanarak onları daha kararlı duruma getirmeleri, üçüncül yapılarını değiştirmeleri ya da DNA'ya bağlanarak enzim sentezini etkilemeleriyle açıklanabilir (5,6).

Koenzimlerin ve değişik etkenlerin protein yapısını kararlı kıldığı çalışılmıştır. Proteinler koruyucu etkilerini önceden inhibitöre bağlanıp, enzim aktif bölgelerini serbest bırakarak göstermektedirler (63).

Sonuç olarak çalışmamızda, 2,4-D'nin fare böbreği G-6-PDH ve MDH enzim aktivitelerine etki etmemesi, değişik etkenlerin önceden herbisite bağlanarak enzimlerin aktif bölgelerinin serbest kalmasıyla ya da bu enzimlerin yapısal olarak 2,4-D ile etkileşime girmemesiyle açıklanabilir. Ayrıca herbisit'in HK enzimini 32. saatte % 31 oranında inhibe etmesine şu yorumlar getirilebilir.

- a- Herbisit DNA üzerinde etkili olarak, enzimi inhibe etmiş olabilir.
- b- Enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanarak enzimin üçüncül yapısını değiştirmiş olabilir.
- c- Belkide 2,4-D'nin yıkım ürünü (metaboliti) hücrede glukoz-6-fosfat derişimini artırarak enzimi inhibisyona uğratmış olabilir.
- d- Protein sentezinin herhangi bir evresinde etkisini göstererek enzim sentezini etkilemiş olabilir.

Bu enzimin inhibisyonuyla ilgili yorumların sayısı artırılabilir. Ancak gerçek sonuç, bu konuda yapılacak ileri düzeydeki çalışmalarla açıklanabilecektir.

Karbohidrat metabolizması enzimlerinden heksokinazın in vivo koşullarda 32 saat gibi kısa bir sürede inhibisyonu, 2,4-D'nin inhibitör etkilerinin vurgulanması açısından önemlidir. Herbisit'in gastrointestinal eliminasyonunun yarı ömrünün 33 saat olduğu gözönüne alınırsa (24), enzimin 32. saatteki inhibisyonu 2,4-D'nin enzimler üzerindeki akut etkilerini açıklamaktadır. Bu yargıya varmamızın nedeni 32. saatteki inhibisyonun bu saatten sonra düzelme eğilimi göstermesindedir. Ancak vücutta biriken 2,4-D'nin daha sonraları enzimleri kalıcı olarak etkileyebileceği de unutulmamalıdır. Çünkü 2,4-D'nin

% 80'i değişmeden vücuttan atılmakta, geri kalan bölümü vücudun çeşitli bölgelerinde birikmektedir (23).

Hücre içerisinde özgün bir işlevi olan bu enzimin özgül aktivitesinde ortaya çıkan inhibisyon, hücresel olayların düzenini etkileyerek, çeşitli biyokimyasal bozuklukların oluşmasına neden olabilir.

Bu gruptaki tüm herbisitlerin çok sulu çözeltileri ya da az oranda toz biçimi bitkilerin gelişen yapraklarına uygulanmalıdır. Kullanımda spreylemeden kaçınılmalı, koruyucu giysiler giyilmelidir (12).

Bir tarım ülkesi olan yurdumuzda, 2,4-D'nin büyük oranlarda kullanılması konunun önemini daha da artırmaktadır. Bu nedenle "2,4-D, Etkileri ve Kullanımı" konusunda yapılacak eğitim çalışmaları, insan sağlığı ve çevre kirliliği açısından ortaya çıkabilecek olumsuz sonuçları önleyebilecektir.

VI. ÖZET

Klorofenoksi herbisitler grubundan olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), değişik amaçlarla ve büyük oranlarda dünyanın birçok ülkesinde kullanılmaktadır. Herbisitın çevre kirliliğine neden olmasına ek olarak canlılar üzerinde de birçok olumsuz etkilerinin olduğu araştırmalar sonucu belirlenmiştir. Ancak enzimler üzerine bu herbisitın etkileriyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda tartışmaya açık birçok nokta bulunmaktadır.

Bu çalışmada 2,4-D'nin enzimler üzerine etkileriyle ilgili araştırmalara katkıda bulunmak amacıyla herbisitın fare böbreğinde gluköz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PDH), malat dehidrogenaz (MDH) ve hekzokinaz (HK) enzim aktiviteleri üzerine in vivo etkisi incelenmiştir. Bu amaç için 2,4-D'nin değişik dozları farelere intraperitoneal (i.p) yolla verilmiş ve LD₅₀ değeri 475 mg/kg vücut ağırlığı, LD₃₀ değeri ise 338 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir.

Belirlenen LD₃₀ değeri farelere i.p olarak verilmiş, enjeksiyondan sonraki 0,2,4,8,16,32 ve 64. saatlerde fareler öldürülerek böbrekleri çıkartılmış-

tır. Özütleme ve santrifügasyon işlemlerinden sonra, böbrek dökeltileri elde edilmiştir.

Dökeltilerle yapılan enzim özgül aktivite çalışmaları sonucu, 2,4-D'nin G-6-PDH ve MDH enzim aktivitelerini etkilemediği görülmüştür. İstatistiksel bulgular da bu sonucu desteklemiştir ($p > 0,05$).

2,4-D, HK enzim aktivitesini ise 32. saatte % 31 oranında inhibe etmiştir. Bu inhibisyon istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

VII. SUMMARY

THE IN VIVO EFFECT OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID ON THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE, MALATE DEHYDROGENASE AND HEXOKINASE ENZYME ACTIVITIES OF THE MOUSE KIDNEY

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), a compound the chlorophenoxy herbicides group is used for various purposes on a large scale in many countries of the world. As a result of researches made, it has been established that the herbicide has adverse effects on many living things in addition to causing environmental pollution. However, in the investigations carried out about the effects of this herbicide on enzymes, many points still remain open to discussion.

In this work, in an attempt to contribute to investigations made on the effects of 2,4-D on the enzymes, the in vivo effects of the herbicide on glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and hexokinase in the mouse kidney has been investigated. Various doses of 2,4-D were administered intraperitoneally to mice for this purpose

and LD₅₀ value was determined as 475 mg/kg body-weight and LD₃₀ value as 338 mg/kg bodyweight.

The LD₃₀ value determined was administered to mice intraperitoneally, the mice were killed at hours 0,2,4,8,16,32 and 64 following the injection and their kidneys extirpated. Following homogenization and centrifugation, the supernatant of the kidneys was obtained.

As a result of enzyme specific activity experiments using the supernatant, it has been observed that 2,4-D had no effect on the glucose-6-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase enzyme activities. Statistical data also support this result ($p > 0,05$). 2,4-D inhibited the hexokinase enzyme activity by 31 % at the 32nd hour. This inhibition has also been considered to be statistically significant ($p < 0,05$).

VIII. KAYNAKLAR

1. Akbaba, G.: Gıdalarda tarımsal ilaç kalıntıları (Pestisitler) ve riskleri. *Bilim ve Teknik*.21 (242): 46-47, 1988.
2. Buslovich, S.Y., Koldobskaya, F.D., Davydenko, L.I.: The role of mixed-function oxidases in the detoxication of some herbicides: Chlorinated derivatives of phenoxyacids. *Gig. i. Sanit.* 10: 76-77, 1982.
3. Vainio, H., Nickels, J., Linnainmaa, K.:Phenoxy acid herbicides cause peroxisome proliferation in Chinese hamsters. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 8: 70-73, 1982.
4. Mulcahy, M.T.: Chromosome aberrations and "Agent Orange". *Med. J. Aust.* 15: 573-574, 1980.
5. Ahmed, F.E., Hart, R.T., Lewis, N.J.: Pesticide-induced RNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutat. Res.* 42: 161-174, 1977a.
6. Ahmed, F.E., Lewis, N.J., Hart, R.W.: Pesticide-induced ouabain resistant mutants in Chinese hamster V79 cells. *Chem-Biol. Interact.* 19:369-374, 1977b.
7. Yoder, J., Watson, M., Benson, W.W.: Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers

- during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutat. Res.* 21: 335-340, 1973.
8. Mazarean, H.H., Dux, L., Guba, F.: Changes of metabolism during experimentally induced myotonia of rats. I: Alteration in lactate and malate dehydrogenase isoenzyme activities. *Biochem. Med.* 22: 350-358, 1977a.
 9. Lukoshkina, L.P., Guseinova, R.S., Melik-Zade, T.M.; Study of certain aspects of lipid-protein-carbohydrate metabolism in workers engaged in 2,4-D production. *Trud. Azerbaid. Nauchno-Issled. Instituta. Gig. Prof. Zabol.* 5: 146-149, 1970.
 10. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Man. International Agency for Research on Cancer. Vol:15, Lyon.1977.
 11. Environmental Health Criteria 29. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). World Health Organization. Geneva, 1984.
 12. Sittig, M. ed.: Pesticide Manufacturing and Toxic Materials Control Encyclopedia. Park Ridge, NJ. USA, Noyes Data Corp. pp 229-234, 1980.
 13. Que Hee, S.S., Sutherland, R.G.: The Phenoxy-alkanoic Herbicides, Vol:I. Chemistry, Analysis and Environmental Pollution, Boca Raton, CRC Press. Inc. 321 pp, 1981.

14. National Research Council of Canada Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. Phenoxy Herbicides Their Effects on Environmental Quality. Ottawa, NRCC Publication Service, NRCC Publication No: 16075, 437 pp 1978.
15. 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.
16. 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.
17. Cengiz, S., Çolak, A., Atalay, A.: Sivas ili akarsu ve göletlerindeki balıklarda 2,4-D birikimi. Çevre 88, 4. Bilimsel ve Teknik Çevre Kongresi Vol: 2, İzmir 1988.
18. Hill, E.V., Carlisle, H.: Toxicity of 2,4-D for experimental animals. J. Ind. Hyg. Toxicol. 29 (2): 85-95, 1947.
19. Rowe, V.K., 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.

20. Drill, V.A., Hiratzka, T.: Toxicity of 2,4-D and 2,4,5-T, a report on their acute and chronic toxicity in dogs. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. 7: 61-67, 1953.
21. Prescott, I.F., Park, J., Darrien, I.: Treatment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis. Br. J. Clin. Pharmacol. 7: 111-116, 1979.
22. Fedorova, L.M., Belova, R.S.: Inclusion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in organs of animals: Paths and dynamics of its excretion. Gig. i. Sanit. 39 (2): 105-107, 1974.
23. Sauerhoff, M.W., Braun, W.H., Blau, G.E., Gehring, P.J.: The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. Toxicology. 8: 3-11, 1977.
24. Friedman, J.M.: Does Agent Orange cause birth defects? Teratology. 29: 193-221, 1984.
25. Feldman, R.J., Maibach, H.I.: Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. Toxicol. Appl. Pharmacol. 28: 126-132, 1974.
26. Kolberg, J., Helceland, K., Jonsen, J.: Binding of 2,4-dichloro and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid to bovine serum albumin. Acta. Pharmacol. Toxicol. 33 (5,6): 470-475, 1973.

27. Florsheim, W.H., Velcoff, S.M., Williams, A.D.: Some effects of 2,4-D on thyroid function in the rat: Effects on peripheral thyroxine. *Endocrinol.* 72: 327-335, 1963.
28. Mason, R.W.: Binding of some phenoxyalkanoic acids to bovine serum albumin in vitro. *Pharmacology.* 13: 177-186, 1975.
29. Curry, A.S.: Twenty-one uncommon cases of poisoning. *Br. Med. J.* 7: 687-689, 1962.
30. Örberg, J.: Effects of low protein consumption on renal clearance of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in goats. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 46: 138-140, 1980b.
31. Lindquist, N.G., Ullberg, S.: Distribution of the herbicides 2,4,5-T and 2,4-D in pregnant mice. Accumulation in the yolk sac epithelium. *Experientia.* 27: 1439-1441, 1971.
32. Courtney, K.D.: Prenatal effects of herbicides: Evaluation by the prenatal development index. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 6: 33-46, 1977.
33. Casey, P.H., Collie, W.R.: Severe mental retardation and multiple congenital anomalies of uncertain cause after extreme parental exposure to 2,4-D. *J. Pediatr.* 104 (2): 313-315, 1984.
34. Sarma, P.R., Jacobs, J.: Thoracic soft-tissue sarcoma in Viet Nam veterans exposed to Agent

- Orange. Engl. J. Med. 306: 1109, 1982.
35. Olsson, H., Brandt, L.: Non-Hodgkin's lymphoma of the skin and occupational exposure to herbicides. Lancet. 2: 579, 1981.
 36. Axelson, O., Sundell, L., Andersson, K.: Herbicide exposure and tumor mortality: An updated epidemiological investigation on Swedish railroad workers. Scand. J. Work. Environ. Health. 6: 73-79, 1980.
 37. Högstedt, C., Westerlund, B.: Cohort studies of cause forest workers with and without exposure to phenoxy preparations. Lakatidningen. 77 (19): 1828-1831, 1980.
 38. Nielsen, K., Kaempe, B., Jensen-Holm, J.: Fatal poisoning in man by 2,4-D: Determination of the agent in forensic materials. Acta. Pharmacol. Toxicol. 22: 224-234, 1965.
 39. Gray, T.J.B., Lake, B.G., Beamand, J.A.: Peroxisome proliferation in primary cultures of rat hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 67: 15-25, 1983.
 40. Reddy, J.K., Qureshi, S.A., Lalwani, N.D.: Induction by ciprofibrate of hepatic peroxisome proliferation in rats, pigeons, chickens, cats and rhesus monkeys. Fed. Proc. 41: 1741, 1982a.
 41. Iyer, V., Whiting, M.: Neural influence in experimental myotonia. Neurology. 26: 384, 1976.

42. Senges, J., Rüdell, R.: Experimental myotonia in mammalian skeletal muscle: Changes in contractile properties. *Pflueger. Arch.* 331: 315-323, 1972.
43. Campel, M.: Studies on enzyme activities in rats intoxicated with 2,4-D. *Bromatol. Chem. Toxicol.* 19 (2): 91-94, 1986.
44. Kawashima, J., Kato, H., Nakajima, S., (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.
45. Wessey, D.A., Boyer, T.D.: Differential activation and inhibition of different forms of rat liver Glutathione-S-transferase by the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 492-499, 1984.
46. Pontremoli, S., Grazi, E.: Hexose-monophosphate oxidation. *Comprehensive Biochemistry*. Ed. by Florkin and Statz, 17, 163, 1969.
47. *Biochemical Information*, Boehringer Mannheim. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. 99-100, 1973.
48. Thorne, C.J.R.: Properties of mitochondrial MDH. *Biochem. Biophys. Acta.* 59: 624, 1962.
49. *Worthington Enzymes and Related Biochemicals*, Worthington Biochemical Corp. Freehold, New Jersey USA, 1978.

50. Biochemical Information, Bohringer Mannheim, Malate Dehydrogenase. 124-125, 1973.
51. Lehninger, A.L.: Biochemistry. Worth Publishers Inc. New York, 535, 1975.
52. Biochemical Information, Bohringer Mannheim, Hexokinase, 113-114, 1973.
53. Keleti, G., Lederer, W.H.: Handbook of Micro-Methods for the Biological Sciences. Van Nostrand Reinhold Co. London, 124-125, 1974.
54. Varley, H., Gowenlock, A.H., Bell, M. : Practical Clinical Biochemistry, Vol: 1-5 Ed; William Heinemann Med-Books-Ltd. London, 1980.
55. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. Çağ Matbaası, 63-64, 1987.
56. Westing, A.H.: Ecological effects of military defoliation on the forests of South Viet Nam. Bioscience. 21: 893-898, 1971.
57. Rasmuson, B., Svahlin, H.: Mutagenicity tests of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in genetically stable and unstable strains of Drosophila melanogaster. Ecol. Bull. 27: 190-192, 1978.
58. Magnusson, J., Ramel, C., Eriksson, A.: Mutagenic effects of chlorinated phenoxyacetic acids in Drosophila melanogaster. Hereditas. 87: 121-123 1977.

59. Pilinskaya, M.A.: Cytogenetic effect of the herbicide 2,4-D on human and animal chromosomes. Tsitol. Genet. 8: 202-206, 1974.
60. Korte, C., Jalal, S.M.: 2,4-D induced clastogenicity and elevated rates of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. J. Hered. 73: 224-226, 1982.
61. İşcan, M., Arınç, E., Vural, N., İşcan, M.: In vivo effects of 3-methylcholanthrene, phenobarbital, pyrethrum and 2,4,5-T isooctilester on liver, lung and kidney microsomal mixed-function oxidase system of guinea-pig: A comparative study. Comp. Biochem. Physiol. Vol: 77C, No: 1, 177-190, 1984.
62. David, K., Edwards, G.: Progress in Biochemical Pharmacology: Drugs and the Kidney. Vol: 9, 274, 1974.
63. Atalay, A.: Nitrosolu bileşiklerin sıçan karaciğer laktat dehidrogenaz enzimine in vitro etkileri. C.Ü. Tıp Fak. Der. 3 (3,4): 208-214, 1981.

ÖZGEÇMİŞİM

1964 yılında Sivas'ta doğdum. İlköğrenimimi Sivas'ta,Ortaöğrenimimi Antalya'da tamamladım.

1986 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen aynı görevi yürütmekteyim.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi