



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACİĞER  
DOKUSUNDAKİ BAZI ENZİM AKTİVİTELERİ  
ÜZERİNE DİNİTROCRESOL VE DİCHLORVOS'UN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hakan TOSUNOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA 2007



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACİĞER  
DOKUSUNDAKİ BAZI ENZİM AKTİVİTELERİ  
ÜZERİNE DİNİTROCRESOL VE DİCHLORVOS'UN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hakan TOSUNOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA 2007

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACİĞER DOKUSUNDAKİ BAZI ENZİM  
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE DİNİTROCRE SOL VE DİCHLORVOS'UN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hakan TOSUNOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 10/08/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
Danışman

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

Yrd. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ

  
.....  
  
.....  
  
.....

**ÖZET**

Bu çalışmada ülkemiz tarımında sıklıkla kullanılan pestisitlerden, dichlorvos ve dinitroresolun sıçanların karaciğer dokusunda hegzokinaz ve laktat dehidrogenaz enzim aktivitelerine olan etkileri araştırılmıştır. Dinitroresolun  $2.8 \text{ mg.kg}^{-1}$  ve dichlorvosun  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  dozu sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Uygulamadan 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 72 saat sonra servikal dislokasyon yoluyla öldürülen sıçanların karaciğer dokusunda enzim aktiviteleri araştırılmıştır.

Sonuç olarak her iki cinsiyette, dichlorvosun enzim aktivitelerini arttırdığı, dinitroresolun ise genel olarak her iki enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Deney gruplarını kontrol gruplarıyla karşılaştırdığımızda, dichlorvos'un meydana getirdiği aktivite farklılığının, dinitroresole grubundan daha fazla olduğu dikkati çekmiştir.

Araştırma sonuçları her iki pestisit de karaciğer dokularında hegzokinaz ve laktat dehidrogenaz aktivitesini etkilediğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler: Dichlorvos, Dinitroresol, Hegzokinaz, Laktat Dehidrogenaz, Sıçan, Karaciğer, Enzim aktivitesi.**

**ABSTRACT**

In this study, the effects of dichlorvos and dinitroresol which are the common using pesticides in agriculture of our country, on hexokinase and lactate dehydrogenase enzymes in liver tissue were investigated.  $2.8 \text{ mg.kg}^{-1}$  of dinitroresol and  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  of dichlorvos dose were applied to rats by using intraperitoneally injection. Also, serum physiologic was injected to control group. Enzyme activities were investigated in liver tissue of rats which killed by cervical dislocation on 0, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 hours after the application.

Results of this study showed that, dichlorvos increases and dinitroresol generally decreases both enzyme activities in both sexes. Comparing the activity differences of experimental groups with control group, more activity differences call attention in the dichlorvos applied group than the dinitroresol group.

In conclusion study results expose that, both pesticides effects hexokinase and lactate dehydrogenase activities in liver tissue.

**Keywords: Dichlorvos, Dinitroresol, Hexokinase, Lactate Dehydrogenase, Rat, Liver, Enzyme activity.**

**İÇİNDEKİLER****SAYFA**

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ .....	1
<b>1. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>3</b>
1.1. Dichlorvos.....	3
1.1.1. Dichlorvosun genel özellikleri.....	3
1.1.2. Dichlorvosun kullanım alanları ve etkileri.....	4
1.1.3. Kinetiği ve metabolizması.....	13
1.1.4. Çevreye yayılması ve yıkılması.....	15
1.2. Dinitrocresol.....	17
1.2.1. Dinitrocresol'un genel özellikleri.....	17
1.2.2. Dinitrocresol'un kullanım alanları ve etkileri.....	18
1.2.3. Kinetiği ve metabolizması.....	23
1.2.4. Çevreye yayılması ve yıkılması.....	26
1.3. Hekzokinaz (EC 2.7.1.1.).....	28
1.4. Laktat Dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27).....	33
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>39</b>
2.1. Materyal.....	39
2.1.1. Kullanılan deney hayvanları.....	39
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Hekzokinaz aktivitesinin belirlenmesi.....	40
2.2.2. Laktat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi.....	41
2.2.3. Dokularda protein tayini.....	42
2.2.4. Spesifik aktivite tayini.....	42
2.2.5. İstatistiksel analiz.....	43
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....</b>	<b>44</b>
3.1. Hekzokinaz Aktivitesi.....	44
3.2. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi.....	46
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
KAYNAKLAR.....	57
TEŞEKKÜRLER.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	74

**KISALTMALAR DİZİNİ**

3-ANSA	- 3-amino-5-nitro-salisikasit
4-ANOC	- 4-amino-6-nitro-o-cresol
6-AcANOC	- 6-asetoamid-4-nitro-o-cresol
6-ANOC	- 6-amino-4-nitro-o-cresol
ACGIH	- American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADP	- Adenozin Difosfat
ALP	- Alkali Fosfataz
ALT	- Alanin Transaminaz
AMP	- Adenozin mono fosfat
AMPA	- Aminometilfosfonik asit
ANOVA	- Varyans analizi
Arg	- Arjinin
Asp	- Aspartik asit
AST	- Aspartat Transaminaz
ATP	- Adenozin Trifosfat
ATPaz	- Adenozin Trifosfataz
ATSDR	- Agency for Toxic Substances and Disease Registry
cAMP	- Siklik adenozin monofosfat
ChE	- Kolinesteraz
DAcAOC	- 4,6-diacetamido-o-cresol
DCA	- Dikloroasetaldehit
DDT	- Diklorodifeniltrikloroetan
DDVP	- Dichlorvos
DFP	- Diizopropil florofosfat
DHYAM	- Denev Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi
DNHMP	- 4,6-dinitro-2-hidroksimetilfenol
DNOC	- Dinitrocresol
FAO	- Food and Agricultural Organization
G6F	- Glikoz 6-fosfat
G6PDH	- Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz

Gly	- Glisin
GTZ	- German Agency for Technical Cooperation
H6F	- Hekzoz 6-Fosfat
His	- Histidin
HK	- Hekzokinaz
HSDB	- Hazardous Substance Data Bank
IPO-62	- Bromfenvinfos
IPO-63	- Metilbromfenvinfos
LD <sub>50</sub>	- Canlıların %50'sini Öldüren Letal Doz
LDH	- Laktat Dehidrogenaz
NAC	- N-asetilsistein
NAD	- Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	- Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Ort	- Ortalama
SH	- Standart hata
SPSS	- Statistical Package for the Social Sciences
TCA	- Trikarboksilik asit
U.S. EPA	- U.S. Environmental Protection Agency
UNEP	- United Nations Environment Programme
WHO	- World Health Organization



**ÇİZELGELER DİZİNİ****SAYFA**

<b>Çizelge 2.1.</b> Hekzokinaz aktivitesi tayini için deney karışımı.....	40
<b>Çizelge 2.2.</b> Laktat dehidrogenaz aktivitesi tayini için deney karışımı.....	41
<b>Çizelge 3.1.</b> Hekzokinaz enziminin spesifik aktivitesinin dişi ve erkek sıçanlarda uygulanan maddelere ve zamana bağlı olarak değişimi.....	50
<b>Çizelge 3.2.</b> Laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesinin dişi ve erkek sıçanlarda uygulanan maddelere ve zamana bağlı olarak değişimi.....	51

**ŞEKİLLER DİZİNİ****SAYFA**

<b>Şekil 1.1.</b> DDVP'nin moleküler yapısı.....	3
<b>Şekil 1.2.</b> DDVP'nin metabolizması.....	15
<b>Şekil 1.3.</b> Dinitrocresolun kimyasal yapısı.....	17
<b>Şekil 1.4.</b> Sıçanlarda ve tavşanlarda DNOC'un metabolizması.....	25
<b>Şekil 1.5.</b> HK'nın görev aldığı tepkime.....	28
<b>Şekil 1.6.</b> Glukoz metabolizmasında bulunan farklı yollar.....	29
<b>Şekil 1.7.</b> LDH'n görev aldığı tepkime.....	33
<b>Şekil 3.1.</b> Erkek sıçanlarda karaciğer HK aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.....	45
<b>Şekil 3.2.</b> Dişi sıçanlarda karaciğer HK aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.....	46
<b>Şekil 3.3.</b> Erkek sıçanlarda karaciğer LDH aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.....	47
<b>Şekil 3.4.</b> Dişi sıçanlarda karaciğer LDH aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.....	48

**SİMGELER DİZİNİ**

%	- Yüzde Orantı
°C	- Santigrat derece
cm <sup>3</sup>	- Santimetre küp
C <sub>protein</sub>	- Enzimin derişimi (mg/ml)
D	- Işık yolu
ε	- Molar Soğurma Katsayısı
gr	- Gram
kg	- Kilogram
L	- Litre
M	- Molar
m <sup>3</sup>	- Metreküp
mg	- Miligram
mg.kg <sup>-1</sup>	- Miligram.kilogram <sup>-1</sup>
ml	- Mililitre
mM	- Milimolar
mmHg	- Milimetre civa
mmol	- Milimol
ppm	- Milyonda bir kısım
U	- Ünite
v	- Kullanılan enzimin hacmi
V	- Son hacim
α	- Alfa
ΔE/Δt	- Birim zamanda (1 dk.) absorbsiyon farkı
μl	- Mikrolitre
μM	- Mikromolar
β	- Beta

## GİRİŞ

Evsel ve tarımsal pestisit kullanımı dünyada yaygın şekilde görülmektedir. Pestisitlerin geniş alanda ve düzensiz kullanımı, buna ek olarak temel hedeflerinden farklı olarak, biyolojik sistemlerle de ilişki halinde bulunmaları, pestisitleri hem insan hem de hayvan sağlığı açısından tehlikeli hale getirmiştir. Pestisitlerin toksik etkileri metabolizmada, üremede, gelişimde değişimleri, kanser oluşumunu ve nörotoksiteyi içerir (Kupfer 1975, Hodgson ve Levi 1996, Peter ve Cherian 2000).

Pestisitlerdeki değişim yüzyıllar boyunca devam etmiştir. Kükürdün milattan önce 1000 yıllarından itibaren böceklerin yol açtığı hastalıklara karşı kullanıldığı bilinmektedir. 16. yüzyılda ise Çinliler insektisit olarak arsenik kullanımını geliştirmişlerdir. 17. yüzyılda ilk doğal insektisit olan nikotin üretilmiştir. Bu sınırlı sayıdaki koruyucuların başarısı diğer kimyasal pestisitlerin araştırılma sürecini hızlandırmıştır (Horsfall 1956). 1930'larda sentetik organik pestisitlerin modern çağı başlamıştır. Bu gelişimi, dünya çapında artan nüfus karşısında tarımda büyüme ihtiyacı sağlamıştır. 1939 yılında güçlü insektisit diklorodifeniltrikloroetan'ın (DDT) başarılı üretimi sağlanmıştır ve DDT dünyada en geniş alanda kullanılan pestisit olmuştur. Günümüzde ise DDT potansiyel karsinogenetik etkisi, hedef böceklerde bağışıklılığının artması ve çevrede yaptığı birikim nedeniyle, birçok gelişmiş ülke tarafından yasaklanmıştır. Bununla birlikte DDT hala gelişmekte olan ülkeler tarafından kullanılmaktadır. Bu kullanım diğerlerine oranla ucuz olması, çok etkili olması ve gelişmekte olan ülkelerde yerini alabilecek uygun bir maddenin olmamasından kaynaklanmaktadır (Ware 1983).

Organofosfat içerikli kimyasallar 2. Dünya savaşından önce kimyasal silah olarak geliştirilmiş olmalarına rağmen, günümüzde temel olarak insektisitlerin bir çeşidi olarak kullanılmaktadırlar (Akgür ve ark. 1999). Günümüzde, organofosfatlı pestisitler, tüm pestisitler içinde en geniş grubu oluşturmaktadır. Organofosfatlı pestisitlerin önemli bir avantajı, uygulamadan sonra genellikle hızlı bir şekilde zehirli olmayan maddelere

yıkılmasıdır. Bu nedenle çevrede ve besin zincirinde birikim göstermezler (Cremlyn 1991).

Organofosfat içerikli pestisitler her ne kadar çevrede ve besin zincirinde birikim göstermese de zehirlenmelerde diğer pestisit sınıflarına göre daha sorumludurlar. Buna rağmen kullanımları geçen otuz yıl içinde 10 katına çıkmıştır (Rosenstock ve ark. 1991, Sultatos 1994). Pek çok araştırma organofosfatlı pestisitlerin, organiklorlu pestisitler gibi karbohidrat metabolizmasını etkilediğini ve hiperglisemiye neden olduğunu ileri sürmektedir ( Hayes ve ark. 1980, Teichert-Kuliszenwska ve ark. 1981, Seifert 2001).

Dichlorvos (2,2-dichlorovinil dimetilfosfat, DDVP) tüm dünyada geniş şekilde kullanılan bir insektisittir. Ticaretinin başladığı 1961 yılından beri pek çok ülkede geniş bir şekilde kullanılmaktadır Çiftlik hayvanları ve ev hayvanlarının iç veya dış parazitlerinin kontrolünde, evlerin ve açık alanların böcek kontrolünde önemli yararlar sağlamaktadır (ATSDR 1997). DDVP'nin dünya çapında yıllık satışı 2003 yılında 40 milyon amerikan doları civarındadır. Türkiye'de 2002 yılı tüketimi ise 182044 kg (veya litre) olarak belirlenmiş ve bu tüketim ile tüm insektisit tüketiminin %8.8'ini oluşturmuştur (Delen ve ark. 2005).

Üretimi ve kullanımı yapılan 18 adet farklı dinitrocresol bileşiği bulunmaktadır. Dinitrocresoller çevrede doğal olarak bulunmayan kimyasallardır. Ticari olarak en önemli dinitrocresol 4,6-dinitro-o-cresol (DNOC)'dür. DNOC sarı renkte kokusuz bir bileşiktir ve temel olarak tarım ürünlerinin korunmasında insektisit olarak kullanılır. Antinonin, Detal, Dinitrol gibi farklı ticari isimleri bulunmaktadır. DNOC 1930'larda zayıflama ilacı olarak da kullanılmış fakat daha sonra yan etkileri nedeniyle bu şekilde kullanımı yasaklanmıştır. İnsanların DNOC ile etkilenmesi hava, su ve yiyecekler yolu ile olabilmektedir (ATSDR 1995).

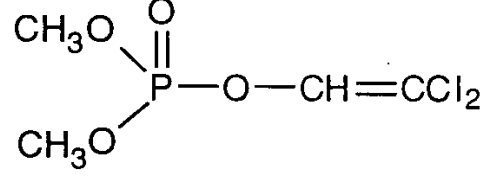
Bu tez çalışmasında DDVP ve DNOC'un karaciğer dokusunda glikolitik yolun anahtar enzimleri olan heksokinaz ve laktat dehidrogenaz enzimleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## 1. KAYNAK ÖZETLERİ

### 1.1. Dichlorvos

#### 1.1.1. Dichlorvosun genel özellikleri

Moleküler yapısı:



Şekil 1.1. DDVP'nin moleküler yapısı

Kimyasal formülü:  $C_4H_7Cl_2O_4P$

Kimyasal adı: 2,2-dichlorovinil dimetilfosfat

Fiziksel formu: Amber renginde, aromatik kokulu bir sıvıdır

Molekül kütlesi:  $220.98 \text{ g.mol}^{-1}$ 'dir

Kaynama noktası:  $74 \text{ }^\circ\text{C}$  (1 mmHg basıçta)

Erime ve donma noktası: veri yok

Yoğunluk:  $1.415 \text{ g.ml}^{-1}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Sudaki çözünürlük:  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Yarılanma ömrü: 5 saat (pH 7)

Buhar basıncı:  $1.2 \times 10^{-2}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Tutuşma sınırı: Yanıcı değildir

Patlama noktası:  $>79 \text{ }^\circ\text{C}$

Oral  $LD_{50}$  (sıçanda): Erkek:  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Dişi:  $56 \text{ mg.kg}^{-1}$

Dermal  $LD_{50}$  (sıçanda): Erkek  $107 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Dişi:  $75 \text{ mg.kg}^{-1}$

İntraperitoneal  $LD_{50}$  (sıçanda):  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$

(Worthing 1983, Latif ve ark. 1984, Merc 1989, HSDB 1996)

Bir organofosfat pestisiti olan DDVP, 1961 yılından beri trimetil fosfitin klor ile tepkimesiyle ticari olarak üretilmektedir (Melnikov 1971, Hayes 1982) (Şekil 1.1).

DDVP sıcaklığa dayanıklıdır, fakat sulu çözeltilerinde çözünürler. Sulu çözeltilerinde bozulma oranı günde %3, yarılanma ömrü ise yaklaşık 23 gündür. Alkali ve yüksek asit ortamlarda hızla parçalanmaktadır, pH=1'de oda sıcaklığında tamamen parçalanması 50 dakika sürmektedir. Buhar halinde havaya karışan DDVP, nemli ortamlarda hızla parçalanır. İlk yıkım ürünlerinin dimetil fosforik asit ve dikloroasetaldehit olduğu düşünülmektedir. Daha sonra havanın etkisiyle oksitlenerek dikloroasetik asite dönüşür (FAO 1965, WHO 1989).

Nemli havada, toprakta ve suda biyotik ve abiyotik yollarla hızla parçalanırken ahşap yüzeylerde uzun süre kalabilir. Temel olarak dikloroasetikasit, dimetilfosfat, dikloroetanol, dikloroasetaldehit (DCA) ve diklorofosforik asit gibi suda çözünebilen bileşiklere yıkılabilir (WHO 1989).

### **1.1.2. Dichlorvosun kullanım alanları ve etkileri**

Organofosfat pestisitleri dünya çapında en geniş şekilde uygulanan toksik tarımsal pestisitlerdir (Reigart ve Roberts 1999). DDVP pestisit olarak; tarımsal ürünlerin saklanması ve yetiştirilmesinde (temel olarak seralarda), evlerin, binaların, hava taşıtlarının ve dış ortamların böcek kontrolünde (sıvı spreyleyler, emdirilmiş şeritler ve aerosoller olarak) kullanılır. Bunun yanında DDVP çiftlik hayvanlarının iç ve dış parazitlerinin kontrolünde (DDVP emdirilmiş reçine granülleri şeklinde), evcil hayvanların dış parazitlerinin kontrolünde (pire tasma) ve özellikle balık çiftliklerinde parazit kontrolünde kullanılmaktadır (WHO 1989).

DDVP'nin tarımsal kullanımı sonucunda besin ya da içme suları ile DDVP'nin etkisine maruz kalınma derecesi önemsiz sayılabilir. Besinlerdeki DDVP atıkları genellikle düşük ve üretim süresi sırasında yok edilmeye hazır şekildedir. İngiltere ve Amerika'da ki toplam diyet çalışmaları hazır besinlerde çok az DDVP bulunduğunu ya da hiç DDVP bulunmadığını ortaya koymuştur. Bununla beraber DDVP ile etkilenme riski dermal emilim ve solunum yolu ile etkilenme sonucunda yüksek oranda artmaktadır (WHO 1989). DDVP hızla buharlaşır ve solunum yoluyla etkisini göstererek havalandırılmamış ya da çok az havalandırılmış alanlarda insanlarda zehirlenmelere neden olur (FAO/UNEP 1992).

DDVP ile etkilenme sonrasında görülen rahatsızlıklar etkilenmenin çeşidine bağlı olarak farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Hava ile DDVP'ye maruz kalındığında göz ve solunumda çeşitli rahatsızlıklar ortaya çıkabilir. Dermal absorpsiyon sonucunda etkilenmenin olduğu bölgede, ısınma ve absorpsiyon sonucu DDVP'nin yayıldığı bölgelerde istemsiz kas kasılmaları ortaya çıkar. Eğer yoğun bir şekilde etkilenme meydana gelmişse kaslarda zayıflama, kasılma, kas seğirmeleri ve belki de felç oluşabilir. Solunum kaslarında felç oluşumu ölüme neden olabilir. Kalbin durmasını da içeren atım düzensizlikleri oluşabilir (Hathaway ve ark. 1991). DDVP çabuk buharlaşması nedeniyle deri, sindirim ve solunum yoluyla kolayca absorbe edilebilir (Parmeggiani 1983). Bu pestisit karaciğer tarafından hızla inaktive edilir. DDVP'nin toksik etkilerine maruz kalan kişiler normal kişilere göre karaciğer hastalıklarına karşı daha az toleranslıdır (Gosselin 1984).

DDVP birincil toksik etkisini, asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek gösterir. Enzim inhibisyonu sonucunda kolinerjik reseptör bölgelerinde anormal asetilkolin birikmesi oluşur (Harlin ve Dellinger 1993). Bunun sonucunda tükürük salgısında artış, terleme ve göz yaşarması, kas kasılmaları, göz bebeğinde daralma, kalp ritminde hasar, kusma, ishal ve merkezi sinir sistemi hasarları sonucunda baş dönmesi, baş ağrısı, halsizlik, kıvrınma ve koma hali durumları ortaya çıkar.

Modak ve ark. (1975) çalışmalarında DDVP uygulamasından 15 dakika sonra beyinde kolin miktarında artış olduğunu kaydetmiştir. Bununla birlikte uygulamadan 3 saat sonra kolin içeriğinde azalma meydana gelmiş ve 24 saat sonra kolin içeriği normal seviyesine dönmüştür.

Teichert-Kuliszenwska ve ark. (1976), DDVP'nin sıçanların beyin kolinerjik değerlerine akut ve kronik etkilerini çalışmışlardır. Araştırma sonucunda, DDVP'nin oral LD<sub>50</sub> dozunun sıçanlara uygulanmasından 1 saat sonra beyin asetilkolinesteraz aktivitesini %70 oranında azalttığını görmüşlerdir. LD<sub>50</sub> dozunun %5'inin 14 gün süre ile uygulanması sonucunda ise %45'lik bir aktivite kaybı gözlenmiştir.



Boyer ve ark.(1976), insan deneklere 21 gün boyunca günde üç kere yemekle birlikte 0.9 mg DDVP uygulamış ve kolinesteraz aktivitesini araştırmışlardır. Plazma asetilkolinesteraz aktivitesi haricinde diğer değerlerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Plazma kolinesteraz aktivitesinde ise %64 oranında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Plazma kolinesteraz aktivitesinin yerine gelme periyodunun yarı ömrü ise 13.7 gün olarak bulunmuştur.

Gajewski (1980), bazı organofosfat bileşikleri ile tekrarlanan zehirlenmeler sonrasında çeşitli karaciğer hücre fraksiyonlarında asetilkolinesteraz aktivitesini araştırmıştır. Yapılan çalışmada ortalama 6 yaşında ve 150 gr ağırlığındaki dişi Wistar sıçanlarına 28 gün boyunca subkutan olarak 1/10 LD<sub>50</sub> dozunda organofosfatlı bileşikler (DFP, DDVP, Chlorfeninphos, IPO-62, IPO-63 ve Phospholine) verilmiştir. 28. günde hayvanlar öldürülmüş, karaciğer homojenatı ve karaciğer hücrelerinin mikrozomal, mitokondriyal ve çözünür bölümlerinde asetilkolinesteraz aktivitesi araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında asetilkolinesteraz aktivitesinde; karaciğer homojenatında %49.7 (DFP) ve %75.6 (IPO-63), mikrozomal bölümde %33.0 (DFP) ve %63.8 (IPO-63), mitokondriyal bölümde %45.5 (DFP) ve %72.9 (IPO-63), çözünür bölümde %52.8 (DFP) ve %80.5 (DDVP) oranında aktivite kayıpları bulunmuştur.

Rath ve Misra (1981), bir balık türü olan *Tilapia mossambica*'da beyin ve karaciğer asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine DDVP'nin etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda DDVP uygulanan grupta asetilkolinesteraz aktivitesinin beyin ve karaciğerde anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte araştırmacılar bu azalmaların DDVP'nin dozu ve uygulama süresi ile ters orantı gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada dikkat çeken diğer önemli bir noktada DDVP uygulanan balıkların yaşı küçüldükçe uygulama sonrası iyileşme zamanlarının azalmasıdır.

Khaan ve ark. (1988) çalışmalarında, DDVP'nin in-vivo ve in-vitro da kan kolinesteraz değerlerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar doza ve zamana bağlı olarak eritrosit asetilkolinesteraz ve plazma kolinesteraz aktivitesini ölçmüşlerdir. İn-vitro çalışmada DDVP derişiminin %50 oranında arttırılması ile enzim aktivasyonlarında azalma meydana gelmiştir. DDVP içeren spreylerin sığırlara perkutan

olarak uygulanması sonucunda in-vivo olarak da plazma kolinesteraz ve eritrosit asetilkolinesteraz aktivitelerinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada araştırmacılar köpeklere 52 hafta boyunca içinde 0, 0.1, 1.0 ve 3.0 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DDVP bulunan kapsülleri uygulamışlardır. Çalışma sonucunda 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> dozu uygulanan dişi ve erkek köpeklerde 2. haftada plazma kolinesteraz aktivitesinin sırasıyla %21.1 ve %27.5 oranında düştüğü, 1.0 mg.kg<sup>-1</sup> doz uygulanan köpeklerde bu düşüşün sırasıyla %39.1-59.2 ve %41-56.7 oranlarında olduğunu bulunmuştur. 3.0 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DDVP uygulanan grupta ise plazma kolinesteraz aktivitesinin erkek köpeklerde %65.1-74.3, dişi köpeklerde ise %61.1-74.2 oranında düştüğü görülmüştür. Yine aynı çalışmada beyin kolinesteraz aktivitesinin DDVP uygulanan gruplarda erkek köpeklerde 1.0 ve 3.0 mg.kg<sup>-1</sup> dozlarında sırasıyla %22 ve %47 oranında azaldığı görülmüştür (AMVAC Chemical Corp. 1990).

Raina ve ark. 1990a yılında, DDVP'nin bufalolarda bazı serum değerlerine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışma sırasında hayvanlara 28 gün boyunca DDVP'nin farklı iki dozu uygulamıştır (4 ve 8 mg.kg<sup>-1</sup>). Sonuçta DDVP'nin kan esterazlarını hem zamana hem de doza bağlı olarak inaktive ettiği gözlenmiştir. Plazma kolinesteraz ve karboksilesteraz değerlerinde en fazla inhibisyon 28. günde görülmüştür (Sırasıyla %87-94, %51-67). Bunun yanında kan glukoz ve toplam protein değerlerinde de bir artış meydana gelmiş, fakat bu değerler DDVP uygulaması kesildikten 7 gün sonra normal seviyelerine gerilemiştir. Aynı araştırmacılar yaptıkları diğer (1990b) bir çalışmada %1 ve %2 derişimlerinde DDVP'yi bufalolara püskürtme yöntemiyle 28 gün boyunca günlük olarak uygulamışlardır. %1'lik uygulamalar sonucunda 4. hafta boyunca zehirlenmenin klinik belirtileri görülmüştür. %2'lik uygulama sonucunda ise hayvanların üçte birinde ölüm gözlenmiştir. Her iki derişimde de DDVP uygulaması sonucunda eritrosit kolinesteraz (%15-21), plazma kolinesteraz (%17-20) ve serum karboksilesteraz (%5-10) değerlerinde üç gün içinde inaktivasyon ortaya çıkmıştır. Deney periyodunun sonunda günlük olarak uygulanan DDVP sonucunda parametrelerdeki inhibisyon en üst seviyesine çıkmış ve inhibisyon değerleri eritrosit kolinesterazında %80-89, plazma kolinesterazında %81-91 ve serum karboksilesterazında %33-54 oranında gerçekleşmiştir. Bunun yanında her iki derişimde

uygulama sonucunda serum aspartat amino transferaz, asit fosfataz ve alkalin fosfataz değerleri yükselmiştir. Son DDVP uygulamasından 14 gün sonra tüm değerler normal seviyelerine dönmüştür.

ACGIH'nin (1991) bildirdiğine göre gönüllü insan denekleri 14 gün boyunca solunum yoluyla günde 10 saat/saatte 30 dakika olmak üzere  $0.14-0.33 \text{ mg.m}^{-3}$  dozunda DDVP ile etkilenmişler, bunun sonucunda kolinesteraz aktivitesi yada görmede herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bunun yanında derişim  $1 \text{ mg.m}^{-3}$ 'e çıkarıldığına gönüllü deneklerin kolinesteraz aktivitesinde %20-25 azalma meydana gelmiştir.

Hathaway ve ark. (1991) çalışmalarında yılın bir bölümünde ortalama  $0.7 \text{ mgm}^{-3}$  dozunda DDVP ile etkilenen 30 tarım işçisinde alyuvar ve plazma kolinesteraz aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda alyuvar ve plazma kolinesteraz aktivitesinde sırasıyla %35 ve %60 oranında düşüş meydana geldiği görülmüştür.

Harlin ve Dellinger (1993) kedilerde DDVP ile yaptıkları çalışmada DDVP uygulamasından önce alınan değerlerle karşılaştırıldığında kan kolinesteraz aktivitesinin %16.8, eritrosit kolinesteraz aktivitesinin %33 ve plazma kolinesteraz aktivitesinin %19 oranında düştüğünü bulmuşlardır. Aynı çalışmada beyin ve retinal kolinesteraz aktivitesinde de ortalama %44 oranında azalma görülmüştür.

Kaltner ve ark. 1993 yılındaki çalışmalarında DDVP'nin japon bıldırcını embriolarında kolinesteraz aktivitelerine ve embriyo gelişimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada ilk olarak embriyolarda bu enzimin yumurta sarısı ve embriyonik sıvıda bulunduğu, fakat yumurta beyazı içerisinde bulunmadığı belirlenmiştir Embriyoda temel olarak asetilkolinesteraz enzimi bulunmuş, bunun yanında yumurta sarısı ve subembriyonik sıvıda bütirilkolinesteraz enzimi de bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına bakıldığında her iki enziminde DDVP ile inhibe olduğu görülmüştür. Bununla birlikte embriyonik enzim aktivitesi 8 saat içinde normal seviyesine geri dönerken subembriyonik enzim aktivitesi 72 saat sonra yenilenebilmiştir. Araştırmacılar enzim inhibisyonunun, gelişimde yavaşlama,

subembriyonik sıvıda, aminoasit ve glukoz depolanmasında azalma ve sonuçta embriyonun ölümüne neden olan olayların başlatıcısı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

McHenery ve ark. 1996 yılında  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  dozunda DDVP ile etkilenen ıstakoz larvalarında asetilkolinesteraz aktivitesinin hem 1 hem de 6 saatlik deney saatlerinde azaldığını göstermişlerdir.

Hinz ve ark. (1996) çalışmalarında oral DDVP uygulamasının sıçan beyin ve kan kolinesteraz aktivitelerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 3 aylık sıçanlara  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  dozunda DDVP uygulanmış ve uygulamadan sonra kolinesteraz inhibisyonun beyinde 15-45 dakika eritrosit ve plazmada ise 10-30 dakika sonra en ileri seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Beyin ve eritrositlerde kolinesteraz aktivitesi en ileri inhibisyondan hemen sonra hızla kendine gelmiş fakat aradan 24 saat geçmesine rağmen kontrol değerlerine ulaşamamıştır. Plazma kolinesteraz aktivitesi ise bunların tersine DDVP uygulanmasından 12 saat sonra kontrol değerlerine ulaşmıştır.

Sarin ve Gill (1997), kronik DDVP etkisi sonucunda yetişkin sıçanlarda biyokimyasal ve davranışsal bozuklukları incelemişlerdir. Yapılan çalışmada sıçanlar sekiz hafta boyunca  $6 \text{ mg.kg}^{-1}$  dozunda DDVP ile etkilenmişlerdir. Araştırmacılar, asetilkolinesteraz aktivitesinin DDVP ile etkilenmenin ardından önemli derecede azaldığını ileri sürmüşlerdir.

Parveen ve Kumar 2001 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında DDVP'nin sıçanların kalp kasında histolojik etkilerini araştırmışlardır. İki subletal doz olan 1 ve 3  $\text{mg.kg}^{-1}$  dozları uygulandığında sinu-atriyal, atrio-ventriküler düğümler ve his demetlerinde önemli histopatolojik değişimler gözlenmiştir. Yine bu dozda kalp kaslarında bulunan asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelmiştir. Araştırmacılar dozun artmasına paralel olarak aktivite kaybının arttığını ve DDVP'nin kalp için güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörü olduğunu vurgulamışlardır.

Varo ve ark. (2003), DDVP'nin Avrupa deniz levreklerinde kolinesteraz (ChE) aktivitesine in-vitro ve in-vivo etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın ilk aşamasında

ChE karakterizasyonunu ve etkilenmemiş balıklarda kolinesterazın normal değerlerini bulmuşlardır. Kas ve beyinde yapılan ölçümler için asetiltiyokolin iyodidi substrat olarak seçmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda hem in-vitro hem de in-vivo uygulamalarda DDVP'nin asetilkolinesteraz aktivitesini önemli derecede azalttığını göstermişlerdir.

Lucic ve ark. 2002 yılında DDVP'nin sıçanlarda butirilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkilerini ve bu etkilerin lipit ve lipoprotein metabolizması açısından sonuçlarını araştırmışlardır. Deneylede her iki cinsiyetten sıçanlara 8 mg.kg<sup>-1</sup> vücut ağırlığı dozunda DDVP tek ve çoklu dozlar şeklinde verilmiştir. Butirilkolinesteraz aktivitesi, plazma, karaciğer ve yağ dokularında incelenmiştir. Çalışma sonunda erkek ve dişi sıçanlarda DDVP'nin plazma butirilkolinesteraz aktivitesini önemli derecede azalttığı (%40-60) bunun yanında trigliserit (%60-600) ve toplam kolesterol miktarlarını (%35-70) önemli derecede arttırdığı görülmüştür. Araştırmacılar butirilkolinesteraz aktivitesinin lipit ve lipoprotein metabolizmasında rol oynayabileceği hipotezini desteklemişlerdir.

DDVP vücuda giren ksenobiyotiklerin etkisiz hale getirilmesinde önemli bir rol oynayan antioksidant sistemi de etkilemektedir. Bu etkinin temel nedeni ise DDVP'nin detoksifikasyonunun antioksidant sistemde önemli bir enzim olan glutayon S-transferaz'a bağımlı olarak yapılmasıdır (Wright ve ark. 1979).

Julka ve ark. 1992 yılındaki çalışmalarında 5 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DDVP ile etkilenen sıçanlarda merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde lipit peroksidasyon ve antioksidant savunma sisteminde ki değişimleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivitesinde artış gözlenirken, lipit peroksidasyon aktivitesinde bir azalma meydana gelmiştir. DDVP etkilenmesi aynı zamanda glutayon peroksidaz aktivitesinde de önemli bir azalmaya neden olmuştur.

Organofosfat içerikli bileşikler kolinesterazları geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Buna ek olarak muskuronik, nikotinik ve merkezi sinir sistemine etkileri nedeniyle bazı organofosfatlı insektisitler eritrositlerde lipit peroksidasyonu ve süperoksit dismutaz ile katalaz enzim seviyelerini arttırarak oksidatif strese neden

olabilirler. Cankayalı ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada bir antioksidant olan N-asetilsistein (NAC)'in organofosfat zehirlenmelerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada sıçanlara 70 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DDVP intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Daha sonra sıçanlar iki gruba ayrılmış, birinci gruba %0,9'luk NaCl verilirken, ikinci gruba 150 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda NAC intravenöz olarak uygulanmıştır. Kan örneklerinde yapılan araştırma sonucunda birinci grupta süperoksit dismutaz ve malondialdehit seviyeleri anlamlı derecede artarken, ikinci grupta anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Hai ve arkadaşları (1997), DDVP'nin balık dokularında antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında sazan (*Cyprinus carpio*) ve kedi balığını (*Ictalurus nebulosus*) kullanmış ve bu hayvanların dokularında süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz aktivitelerini araştırmışlar ve DDVP'nin çalışılan parametrelerin oksidatif stresi oluşturacak şekilde değiştirdiğini ortaya koymuşlardır.

Yarsan ve Çakır 2006 yılındaki çalışmalarında subakut ve subkronik DDVP uygulamalarının farelerde lipit peroksidasyonuna etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada Swiss Albino erkek farelerine içme suyu ile birlikte 10, 20 ve 40 mg.kg<sup>-1</sup> olmak üzere üç dozda DDVP uygulanmıştır. Lipit peroksidasyon plazma malondialdehit, eritrosit süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri belirlenerek saptanmıştır. Analizlerin yapılacağı kan örnekleri 15 ve 45. günde toplanmıştır. Sonuçlar malondialdehit seviyesinin DDVP ile etkilenen gruplarda arttığını göstermiştir. DDVP ile etkilenen gruplarda hem subakut hem de subkronik periyotta eritrositlerdeki katalaz aktivitesi azalmıştır. Subakut ve subkronik periyotlar birbirleri ile karşılaştırıldığında süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin subkronik periyotta daha fazla yükseldiği görülmüştür.

Gromov ve ark. (1993), DDVP ve deltametrinin dişi sıçanlarda hafıza mekanizmasına ve antioksidant enzimler olan süperoksit dismutaz ile katalaz aktivitelerine olan etkilerini çalışmışlardır. Pestisitlerin hayvanlara uygulanmasından 3 saat sonra süperoksit dismutaz aktivitesinin deltametrin ile %25, DDVP ile %21

oranında azaldığını bulmuşlardır. Kan örneklerinde ise süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Tülüce ve Çelik (2002), deltamethrin, pyrazophos, chlorpyrifos-metil, dimethoat, metamidophos, DDVP, diazinon, captan ve malathion pestisitlerinin in-vitroda insan ve sığır karbonikanhidraz enzimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. DDVP'nin de dahil olduğu tüm kimyasallar enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Aktivite kayıplarına bakıldığında insan ve sığır karbonikanhidraz enzimini en fazla inhibe eden kimyasalın deltamethrin olduğu, insanda en az inhibisyonun metamidophos, sığırdaki en az inhibisyonun DDVP uygulanmasında ortaya çıktığı görülmüştür.

Singh ve ark. (2006), DDVP'nin de içinde bulunduğu organofosfatlı pestisitlerin eritrosit antioksidant enzimlerine etkilerini araştırmışlardır. Eritrositlerin organofosfat pestisitlerle etkilenmesi sonucunda eritrosit glikoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığını, bununla beraber glutatyon S-transferaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin arttığını bulmuşlardır. Membrana bağımlı enzimlerden asetilkolinesteraz, Na-K-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinde azaldığı görülmüştür. Bu enzim aktivitelerindeki değişimler ve glutatyon seviyesinde oluşan azalma ile araştırmacılar organofosfatlı pestisitlerin eritrositlerde oksidatif stres yarattığını öne sürmüşlerdir.

Dunier ve ark. (1991) çalışmalarında DDVP'nin in-vitro koşullarda lenfosit oluşumuna ve fagositoza olan etkilerini araştırmışlardır. Sazan balıklarının pronefrozlarından alınan hücrelere trichlorfon ya da DDVP uygulanmış bunun sonucunda da doza bağlı olarak lenfosit oluşumunda ve miyeloid hücrelerin aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir.

Wozniak ve Grabarczyk (1992), DDVP'nin in-vitro koşullarda eritrositler üzerine olan etkisini araştırmışlardır. 100 µM DDVP uygulanan eritrositlerde, uygulamanın üzerinden 24 saat geçtikten sonra yapılan incelemede methemoglobin ve denatüre hemoglobin seviyelerinde artış ile birlikte glutatyon seviyesinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir.

Podstawka 1994 yılındaki çalışmasında DDVP ile in-vitro etkilenme sonucunda insan nötrofil hücrelerinin fagositik aktivitesi ve bakterisidal fonksiyonlarındaki değişimleri araştırmıştır. 70 ve 100 µM dozlarında DDVP, 1 ve 2 saatlik inkubasyon süreleriyle uygulanmıştır. Çalışma sonunda her iki dozda ve her iki saatte de fagositik olmayan nötrofil seviyesinin kontrol grubuyla benzer olarak kaldığı görülmüştür. Bakterisidal aktiviteye bakıldığında ise 1 saatlik inkubasyon süresinde her iki derişimde de bir değişiklik gözlenmemiş 2 saatlik süre sonucunda her iki derişimde de DDVP'nin anlamlı bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur.

### 1.1.3. Kinetiği ve metabolizması

DDVP sıvılarda çözünebilen küçük bir molekül olduğu için; akciğer, sindirim kanalı ya da deri yoluyla kolaylıkla pasif difüzyon ile absorbe edilebilir. DDVP'nin pulmonar absorpsiyonu ile ilgili oldukça az bilgi bulunmaktadır. DDVP özellikle karaciğer ve serumda bulunan doku esterazları tarafından hızla yıkılır. Laws 1966 yılında DDVP'nin oral alımından sonra birincil olarak hepatik portal vene katıldığını ve ilk metabolizmasının karaciğerde gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

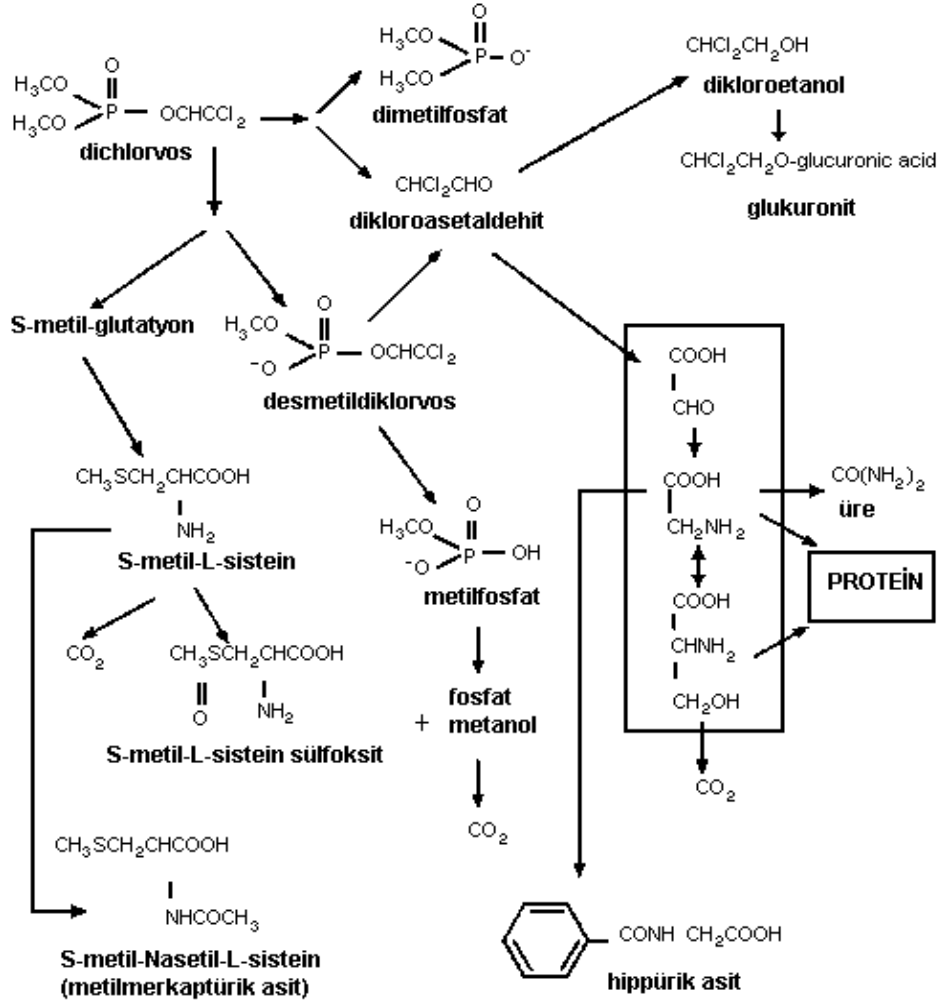
DDVP hızlı metabolize olduğu için dokulara dağılımı hakkında bilgi sahibi olmak oldukça güçtür (ATSDR 1997). Garcia-Repetto ve ark. (1995) oral etkilenme sonrası DDVP'nin tokso kinetiğini merkezi ve çevresel olmak üzere iki bölüme ayırmışlardır. Merkezi kısımda kan, çevresel kısımda ise karaciğer, yağ ve kas dokularından oluşmaktadır. DDVP oral alınımından sonra karaciğerde metabolize edilir. <sup>32</sup>P-DDVP'nin oral yolla alımından bir saat sonra karaciğer, böbrekler, mide ve bağırsaklarda maksimum radyoaktivite bulunmuştur. Kemikte ise inorganik fosfatın organizmanın fosfat havuzuna girmesine paralel olarak artış yavaş şekilde olmaktadır. Domuzlara oral yolla, <sup>14</sup>C ile işaretlenmiş DDVP verildiğinde, tüm dokularda radyoaktivite gözlenir Ancak bu radyoaktivite iki gün sonunda karaciğerde en yüksek seviyesine ulaşırken beyinde en düşük seviyededir.

DDVP temel olarak karaciğerde iki metabolik yol kullanılarak metabolize edilir. Bir tanesinin sonucunda glutatyon bağımlı olarak desmetildichlorvos oluşurken,



diğerinin sonucunda dimetilfosfat ve dikloroasetaldehit (DCA) oluşur. Desmetildichlorvos, metiloksijen-fosfat bağının hidrolizi sonucunda oluşmaktadır ve bundan sonra monometilfosfat ve dimetilfosfata yıkılmaktadır (Casida ve ark. 1962, Hodgson ve Casida 1962, Bradway ve ark. 1977). S-metil-glutasyon, desmetildichlorvos ile birlikte oluşmaktadır ve metilmerkaptürik asite yıkılarak idrarla birlikte atılır. DDVP'nin vinil kısmının metabolizması dichloroethanol glukuronid ve hippürik asit, üre, karbondioksit ve diğer biyokimyasal moleküller olmak üzere iki yol üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 1.2). Her iki yolun da insanda gerçekleştiği bu metabolitlerin idrarda bulunması ile gösterilmiştir (Hutson ve Hoadley 1972a). Laboratuar hayvanlarında radyoaktivite çalışmaları ile DDVP'nin vinil karbon atomunun dokularda glisin, serin ve diğer doğal vücut bileşenlerinin yapısına katıldığı gösterilmiştir. Fosfor içeriğinin vücuttan uzaklaştırılmasında temel metabolik yol idrar ile olmaktadır bu yolda hava ile uzaklaştırma daha az önemlidir. Bununla birlikte vinil, temel olarak havayla uzaklaştırılırken idrar daha az öneme sahiptir (Hutson ve ark. 1971, Page ve ark. 1971, Hutson ve Hoadley 1972b, Loeffler ve ark. 1976). DDVP'nin ya da potansiyel toksik metabolitlerinin vücutta birikmesi ile ilgili herhangi bir kanıt bulunmamaktadır.

DDVP metabolizmasının hızı, taze karaciğer dokusu kullanılarak yapılan in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir. 1 mg DDVP ile 1 g karaciğer dokusunun karıştırılmasından 10 dakika sonra DDVP'nin %50'si, 123 dakika sonra ise sadece %0.4'ü kalmıştır (Majewski ve ark. 1979). Bununla birlikte DDVP sadece karaciğerde metabolize olmamaktadır. <sup>32</sup>P-DDVP ile yapılan çalışmalarda akciğer, böbrek ve dalak dokularında da DDVP'nin temel olarak dimetilfosfata metabolize olduğu görülmüştür. 50 mg.l<sup>-1</sup> dozunda DDVP ile etkilenen sıçanların böbrek dokusunda DDVP'nin yarılanma ömrü 13.5 dakika olarak bulunmuştur (Gallo 1991). Blair ve ark. 1975 yılında yaptıkları çalışmada 5 µmol.l<sup>-1</sup> DDVP'nin sıçan, tavşan ve insan kanında yarılanma ömrünü sırasıyla 12-30 dakika, 2 dakika ve 10 dakika olarak bulmuşlardır. Genellikle farklı türlerdeki DDVP metabolizması benzer şekilde gerçekleşmektedir ve bulunan farklılıklar metabolitlerin cinsinden çok, oluşan metabolitlerin oranları ile ilişkilidir.



Şekil 1.2. DDVP'nin metabolizması (WHO 1989).

#### 1.1.4. Çevreye yayılması ve yıkılması

DDVP taşınması ve kullanılması sırasında hava, su ve toprağa karışabilir. DDVP özellikle arazide kullanımı sırasında doğaya karışabilmektedir. DDVP aynı zamanda taşınması sırasında meydana gelen kazalar sırasında ya da kullanılmış boş şişelerin doğaya atılması ile de çevreye bulaşabilir. DDVP üretim ya da hazırlanma aşamalarında havaya karışabileceği gibi pestisit olarak kullanımı sırasında da havaya karışabilir.

20 °C'de buhar basıncının  $1.2 \times 10^{-2}$  mmHg olması nedeniyle, düşük nem bulunması durumunda binalarda ya da tarım alanlarında kullanılan DDVP'nin büyük bir kısmı buharlaşarak havaya karışabilmektedir (ATSDR 1997). DDVP atmosferde direkt

olarak fotoliz ile parçalanmamaktadır (Gore ve ark. 1971). Havada ilk olarak havanın buharıyla kırılabilir ve DDVP'nin atmosferdeki temel yıkım yolu buhar fazının fotokimyasallar ile tepkimeye girmesiyle gerçekleşebilir. Yüksek sıcaklık ve yüksek nemlilik ortamlarında DDVP yüksek bir hızla yıkılır. Seralarda ve besin saklama alanlarında yapılan deneylerde uygulanan DDVP'nin %90'ının 3-6 saat içinde kaybolduğu görülmüştür. DDVP'nin yıkılmasıyla dimetil fosfat ve dikloroasetalehit olarak adlandırılan iki kimyasal oluşmaktadır. Oluşan bu kimyasallar DDVP'den daha az zararlıdır ve bu metabolitlerin insanda sağlık açısından etkisi olduğu düşünülmemektedir. DDVP'nin atmosferdeki yarılanma ömrü 2 günden az olarak hesaplanmıştır (Howard 1991, Kelly ve ark. 1994).

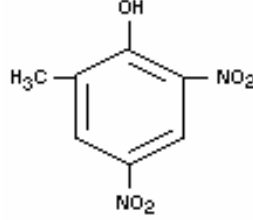
DDVP havadan yağmur yoluyla da uzaklaşabilir. DDVP, üretimi sırasında oluşan atık suların çevreye bırakılması ve çeşitli şekillerde kullanımı sonucunda, yüzey sularına bulaşabilmektedir. DDVP'nin özellikle balık çiftliklerinde balıkların dış parazitlerine karşı kullanımı da suya bulaşmasını sağlayan bir diğer etmendir. Dökülme ya da diğer kazasal durumlarda DDVP'nin suya karışmasını sağlayabilir (ATSDR 1997). DDVP göl ya da nehirlerle karışırsa, su içinde çözünür. Çözünen DDVP'nin bir kısmı buhar yoluyla havaya karışabilirken büyük bir kısmı suyla karıştığında temel olarak hidroliz ile yıkılmaktadır. DDVP'nin sudaki yarılanma ömrü pH ve sıcaklığa bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterebilir (Faust ve Suffet 1966, Lamoreaux ve Newland 1978, Latif ve ark. 1984, Lartiges ve Garrigues 1995).

DDVP toprağa bağlanamaz, DDVP havaya ve suya oranla toprakta daha yavaş yıkılmaktadır. Laboratuvar çalışmalarında 200 ppm dozunda DDVP uygulanan toprakta 3 gün sonra uygulanan DDVP'nin sadece %37'sinin kaldığı görülmüştür. DDVP kontrolsüz kullanımı, dökülmesi ya da farklı formüllerinin atık olarak toprağa gömülmesi ile toprağa karışabilir (ATSDR 1997). DDVP kuru ve asidik topraklarda uzun süre kalabilmektedir. Toprakta bulunan bakteriler ve diğer mikroorganizmalarda toprakta DDVP'nin yıkılmasına yardımcı olmaktadır. Toprağa bırakılan DDVP'nin yıkımının %70'i hidroliz ve diğer biyolojik olmayan yollarla gerçekleşmektedir bakteriyel yıkım ise %30 oranında kalmaktadır (Lamoreaux ve Newland 1978). Menzie 1972 yılında DDVP'nin topraktaki yarılanma ömrünün 17 gün olduğunu göstermiştir.

## 1.2. Dinitrocresol

### 1.2.1. Dinitrocresol'un genel özellikleri

Molekül yapısı:



**Şekil 1.3.** Dinitrocresolun kimyasal yapısı (WHO 2000).

Kimyasal formülü	: C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Kimyasal adı	: 4,6-dinitro-ortho-cresol
Fiziksel formu	: Sarı renkli kristal, katı
Molekül kütlesi	: 198,13 gr.mol <sup>-1</sup>
Kaynama noktası	: 312 °C
Erime ve Donma noktası	: 88,2–89,8 °C
Yoğunluk	: 1.58 g.ml <sup>-1</sup> ( 20°C )
Sudaki çözünürlük	: 6.94 gr.lt <sup>-1</sup> (20°C ve pH:7'de)
Buhar basıncı	: 1.6 x10 <sup>-2</sup> (25°C)
Tutuşma sınırı	: 400 °C'nin altında kendiliğinden yanmaz.
Patlama noktası	: Bilgi yoktur.
Oral LD <sub>50</sub> (sıçanda)	: 25 mg.kg <sup>-1</sup>
Dermal LD <sub>50</sub> (sıçanda)	: 200 mg.kg <sup>-1</sup>
İntraperitoneal LD <sub>50</sub> (sıçanda)	: 29 mg.kg <sup>-1</sup>

(Jongerius ve Jongeneelen 1991, Hope ve ark. 1995, Howarth ve ark. 1995, Tomlin 1997).

DNOC, *o*-cresol'un doymuş sülfürik asitle 80-100 °C' de tepkimeye girmesi ve daha sonra nitrik asit- asetik asit yada nitrik asit-sülfürik asit karışımları ile nitritlenmesi sonucunda oluşur (Harvey 1953).

### 1.2.2. Dinitrocresol'un kullanım alanları ve etkileri

Dinitrocresol (4,6-dinitro-*ortho*-cresol, DNOC) ilk sentetik organik pestisitlerden birisidir. DNOC kullanımı ilk olarak 1890'lerde Tussock güve tırtıllarının kontrolü için geliştirilmesiyle başlamıştır. 1932 yılında ise herbisit özellikleri keşfedilmiş ve tarımsal alanlarda geniş yapraklı yabancı bitkilerin kontrolünde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise birçok ülkede, meyve bahçelerinde akarisit, larvasit ve ovisit olarak zararlı böceklerin uyku formlarına karşı kış boyunca kullanılmaktadır. Tarımda ayrıca patates ve baklagil tohumlarının hasattan önce kurutulması işlemi için de kullanılmaktadır. DNOC 1930'lu yıllarda hap şeklinde kilo kaybetmek amacıyla kullanılmış fakat daha sonra bu şekilde ki kullanımı yasaklanmıştır (ATSDR 1995, WHO 2000, Hollingworth 2001). DNOC ayrıca plastik endüstrisinde stiren ve vinil aromatik bileşiklerin polimerizasyon inhibitörü olarak da kullanılmaktadır (Hawley 1981, US EPA 1988).

DNOC'un pestisit olarak kullanımı, zararlı etkileri göz önüne alınarak azaltılmış hatta bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde ise halen önemli miktarlarda DNOC stok edilmekte ve kullanılmaktadır. Zambiya'da 14 tondan fazla DNOC depolarda bulunmaktadır (GTZ 1997). Kanada'da ise yıllık DNOC tüketimi 100-1000 ton arasındadır (Environment Canada 2001). Türkiye'de DNOC tüketimine bakıldığında 2002 yılında 60646 kg (veya litre) olduğu saptanmıştır (Delen ve ark. 2005). DNOC'un kullanımının devam ettiği ülkelerde, tüketiminin hemen hemen aynı oranlarda olduğu tahmin edilmektedir (WHO 2000).

Genelde insanlar DNOC'u, DNOC bulaşmış meyvelerin yenmesi ya da suların içilmesi ile ağız yoluyla alırlar. Bununla beraber insanlar DNOC'un pestisit olarak uygulanması esnasında solunum yoluyla da etkilenebilirler. Ayrıca DNOC yapıldığı ya da kullanıldığı çalışma yerlerinde deri ve solunum yoluyla insanları etkileyebilmektedir. DNOC bulaştığı yerlere dokunulması sonucunda deri yoluyla da vücuda girebilmektedir (WHO 2000).

DNOC'un etkileri, solunması, deri teması ve yutulması sonrasında ortaya çıkabilir. DNOC, bazal metabolizma hızını, nabız ve kalp atışını artırır ve aşırı

terlemeyle birlikte yüksek ateş durumunu ortaya çıkarır. Bu etkilerin yanında DNOC, solunum zorluğu, baş ağrısı, uykusuzluk, baş dönmesi ve kilo kaybına da neden olur. DNOC, göz ve deride sararmalara yol açar, mide, böbrek ve karaciğerde hasarlara neden olur. Uzun dönem DNOC ile temas eden kişilerde gözde katarakt ve deride isilikler meydana gelir (WHO 2000).

DNOC vücuda girdikten sonra birincil etkisini metabolizma üzerinde göstermektedir. DNOC'un metabolizma hızını arttırmasındaki ilk basamak fosforilasyonu engellemesinden kaynaklanmaktadır. Elektron taşıma sistemi ve fosforilasyon birbirine çok sıkı şekilde bağlıdır ve hücrede enerji oluşumu için bu bağlılık önemli bir rol oynar. DNOC, oksidasyonu, solunumun fosforilasyon zincirinden ayırarak elektron transferini engeller. Bunun sonucunda ADP'nin ATP'ye dönüşümü engellenmiş olur. Dolayısıyla hücreler için gerekli olan ATP ihtiyacı karşılanmamış olur. Kalp kası gibi kritik organlarda ATP eksikliği nedeniyle fonksiyon kaybı görülür. Bunun yanında ATP'ye dönüştürülemeyen enerji ısı şeklinde açığa çıkarak vücut ısısının artmasına ve bunun sonucunda hipertermiye neden olur. Metabolizmadaki hızlanmanın diğer bir sonucu da oksijen tüketiminin artması şeklinde görülmektedir (Judah 1952, Ilivicky ve Casida 1969, Moreland 1980). Solunum yoluyla akut olarak DNOC'a maruz kalan bir tarım işçisinin ölümünden yarım saat sonra vücut sıcaklığı 44 °C olarak ölçülmüştür (van Noort ve ark. 1960). Diğer bir çalışmada 17 gün boyunca DNOC tozuna maruz kalan bir işçide vücut sıcaklığının yükseldiği, bazal metabolizmasının %80 oranında arttığı gözlenmiştir (Hunter 1950). 5 hafta boyunca DNOC püskürtmesi yapan bir tarım işçisinde de diğer çalışmalara benzer şekilde vücut sıcaklığında (38.9 °C) ve bazal metabolizma hızında artış gözlenmiştir (Pollard ve Filbee 1951).

Castillo ve ark. 1997 yılında, DNOC'un oksidatif fosforilasyona bağlı olmaksızın membran geçirgenliğine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda DNOC'un mitokondriyal solunumu arttırdığını ve membran geçirgenliğinde bir azaltma yarattığını bulmuşlardır.

DNOC'un farmakolojik etkisini incelemek üzere yapılan diğer bir çalışmada, Gasiewicz (1991), DNOC uygulanması sonucunda lipogenezin azaldığını, glikolizis ile glikojenolizisin ise arttığını bulmuştur.

Vicente ve ark. 1998 yılında, DNOC ve kimyasal benzeri olan dinitrofenol (DNP)'un patates yumru mitokondrisi üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. Düşük derişim uygulamalarında (<100 µM) DNOC'un mitokondride süksinat destekli solunumu arttırdığı ve DNP ile karşılaştırıldığında mitokondri mebranınin elektrik potansiyelini etkili bir şekilde bozduğu görülmüştür. Membranda meydana gelen bu bozulmanın protonlara karşı daha geçirgen bir hal alması şeklinde olduğu belirtilmiştir. DNOC yüksek derişimlerde uygulandığında ise solunumu yavaşlatıcı bir etki göstermiştir.

Kreczko ve ark. (1974), 30 gün boyunca haftada 8 kez olmak üzere hamsterlara 1/3 LD<sub>50</sub> dozunda DNOC uygulamışlardır. Çalışma sonucunda serum ve karaciğerde amino şeker ve sialik asit seviyelerinin anlamlı derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada albüminin α<sub>2</sub>-globulin bölümünde bulunan glikoprotein içeriğinde azalma gözlenirken, serum α<sub>1</sub>-globulin ve γ-globulin bölümlerindeki glikoprotein içeriğinde bir artış görülmüştür. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak DNOC'un glikolizis hızını arttırarak glikoproteinlerde bulunan şeker moleküllerinin biyosentezini hızlandırdığını ileri sürmüşlerdir.

Burkatskaya 1965 yılında yaptığı çalışmada solunum yoluyla 36 mg/m<sup>3</sup> DNOC tozuna maruz kalan kedilerde kan glukoz seviyesinin %20-48 oranında arttığını, bunun yanında vücut sıcaklığında 0.6-1.4 °C'lik artışın gözlendiğini belirtmiştir. Aynı çalışmada kan glukoz seviyesinin 2-3 ay boyunca 2 mg/m<sup>3</sup> dozunda DNOC buharıyla etkilenen kedilerde de arttığı ve bu artışların ilk olarak 2. haftadan itibaren başladığı belirtilmiştir.

Paulino ve ark.'nın (1996), DNOC'un kimyasal benzeri olan 2,4-D'nin, sıçanlarda akut, subkronik ve kronik toksisitesini, klinik, laboratuvar ve histopatolojik metotlarla araştırdıkları bir başka çalışmada ise; akut uygulamadan sonra, lokomotor

aktivitelerde düşüş, kaslarda zayıflama, nefes darlığı ve sakinleşme belirlenmiştir. AST, ALT, LDH, ALP ve amilaz aktiviteleri ve kreatinin seviyesinde artış saptanmıştır. glukoz ve total protein seviyelerinde düşüş, hematokrit değerlerinde artış saptanmıştır. 2,4-D'nin kronik ve subkronik uygulamalarında ise klinik belirtilerde herhangi bir değişim saptanmamıştır.

1988 yılında Broadmeadow sıçanlara 6 hafta boyunca besinle birlikte 0 (kontrol), 5, 13, 32, 80 ve 200 mg DNOC vermiştir. Uygulamanın 6. haftasında hematolojik, biyokimyasal ve üriner değerler ölçülerek hesaplanmıştır. Deney periyodunun sonunda DNOC uygulanan hayvanlarda ölümlerle karşılaşılması. Vücut ağırlığı değerlerine bakıldığında, sadece dişilerde en yüksek iki dozun uygulandığı hayvanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir kilo kaybı görülmüştür. 80 ve 200 mg dozunda DNOC'la etkilenen hayvanlarda ALT aktivitesinde küçük ama istatistiki açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bunun yanında en yüksek iki dozun uygulandığı dişi sıçanlarda kan üre seviyesi anlamlı olarak artmıştır.

DNOC'un insanlarda hipertroidizm benzeri bir duruma yol açtığı bildirilmiş olmasına rağmen (Dodds ve Robertson 1933), 1991 yılında van de Berg ve ark. in-vitroda DNOC'un bir plazma proteini olan ve vitamin A, T<sub>4</sub> gibi bazı hormonların kanda taşınmasını sağlayan transthyretin'in tiroksin bağlanma bölgesi ile yarış içinde olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar DNOC'un kan plazmasında tiroid hormonu seviyesini ve tiroid fonksiyonlarını etkilediğini belirtmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak Kelly 1995 yılında 0, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DNOC ile etkilenen farelerde T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> seviyelerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda 5 ve 10 mg.kg<sup>-1</sup> dozlarının uygulandığı hayvanlarda T<sub>4</sub> seviyesinin çarpıcı bir şekilde azaldığı görülmüş bunun yanında kanda T<sub>3</sub> seviyesinin ise dişi farelerde düştüğü belirtilmiştir.

Den Tonkelaar (1983), yüksek dozda DNOC uygulamasında, yalnızca bir dişi ve bir erkek sıçanda ALT aktivitesinde artış gözlemiştir. Her iki cinste glukoz ve üre seviyesinin arttığını, doza bağlı olarak pirüvat, T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> seviyelerinde azalma olduğunu, kan laktat seviyesi ile organ ağırlıklarında değişim olmadığını gözlemiştir.



Takahashi ve ark. (2003) çeşitli çalışmalarla DNOC'un üreme hücreleri üzerine olan etkilerini göstermişlerdir. Araştırmalarında DNOC'un sertoli-germ hücreleri üzerine olan etkileri üzerine çalışmışlardır. DNOC yüksek derişimde uygulandığında, eşey ve sertoli hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu ve spermatositlerin fagositoz ile dejenere olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile DNOC'un testislerdeki toksik etkisi in-vitro olarak gösterilmiştir. Mart 2004'te sıçanlarda dinitrofenolik bileşiklerin spermatospermiyogenezise etkilerini incelemiştirler. Sıçanlara DNBP (7.5 mg.kg<sup>-1</sup>), DNOC (15 mg.kg<sup>-1</sup>) ve DNP (30 mg.kg<sup>-1</sup>) uygulamış ve sırasıyla 1, 5 ve 0 ölüm görülmüştür. Bunun yanı sıra vücut ağırlıklarında azalma kaydedilmiştir. DNOC 7.5 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda uygulanmasına kadar erkek sıçanların üreme organlarına ve spermelerine etki etmemiştir. Bununla birlikte 15 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda uygulandığında sperm canlılığında önemli oranda azalma, kuyruksuz sperm sayısında artış ve 5-12 arasında erkek sıçanın öldüğü görülmüştür. Araştırmacılar özellikle sperm sayısında azalma ve oluşan morfolojik bozukluklardan dolayı DNOC'un spermatotoksik etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada DNOC'un erkek sıçanlarda sperm toksisitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. 5 gün boyunca oral yolla 0, 10, 15 mg.kg<sup>-1</sup> dozlarında DNOC uygulamasının ardından sperm sayımı yapılmış ve faz-kontrat ve elektron mikroskobunda sperm morfolojileri araştırılmıştır. Anormal sperm sayısında en yüksek artış 15 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DNOC uygulamasıyla görülmüştür. DNOC, erkek sıçanlarda spermatidlerin uzamasına, kısmi olarak mitokondri kınının kaybolmasına ve kuyruksuz sperm oluşumuna neden olmuştur.

Deneyisel çalışmalar DNOC'un kanda diğer dokulara oranla daha yüksek derişimlerde bulunduğunu göstermektedir. 1951 yılında Parker ve ark., kanda bulunan DNOC'un %90'dan fazlasının plazmada olduğunu belirlemiştir. Bu nedenle DNOC kan hücreleri ve molekülleri üzerinde de etkili olmaktadır.

Spencer ve ark. 1948 yılında yaptıkları bir çalışmada sıçanlara DNOC'un 1-25 mg.kg<sup>-1</sup>.gün<sup>-1</sup> dozunda oral yolla uygulanması sonucunda eritrosit içeriği, hemoglobin derişimi, toplam lökosit sayısı gibi hematolojik değerler açısından bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde 3 hafta boyunca 1.25-20 mg.kg<sup>-1</sup>.gün<sup>-1</sup> dozunda DNOC uygulanan sıçanlarda lökosit içeriğinde herhangi bir değişim

gözlenmemiştir (Vos ve ark. 1983). Diğer bir yönden 1983 yılında den Tonkelaar ve ark. Sıçanlara oral yolla, benzer dozda DNOC uygulamış ve DNOC'un hematokrit, hemoglobin, eritrosit ve lökosit içeriği gibi değerlerin değişmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada DNOC'un kediler tarafından akut ya da orta sürede solunması sonucunda eritrosit miktarında ve hemoglobin içeriğinde azalmalara yol açtığı, bunun yanında eritrosit sedimentasyon hızını ve lökosit içeriğini arttırdığı belirtilmiştir (Burkatskaya 1965). 1970 yılında Froslic ve Karlong ve 1973 yılında Froslic geniş getiren hayvanlarda (sığırlarda) DNOC'un intra-ruminal uygulanması sonucunda methemoglobinemiyeye neden olduğunu göstermişlerdir. Luk'ianchuk 1983 yılında yaptığı çalışmada ise DNOC'un insan serum albümini ile etkileşimini araştırmış ve albümin üzerinde 2 sınıf bağlanma bölgesi olduğunu göstermiştir. Araştırmacı bağlanma sonucunda albümin molekülünün yapısının tesadüfi olarak değiştiğini öne sürmüştür.

Yapılan bir çalışmada 90 gün boyunca 16 erkek 16 dişi köpek oral yolla 4, 20 ve 100 mg.kg<sup>-1</sup> dozlarında DNOC'la etkilenmiştir. Deney periyodunun sonunda dişi köpeklerde daha göze çarpan bir şekilde kilo kaybı gözlenmiştir. Çalışmanın 49. gününde protrombin zamanında bir azalma meydana geldiği, fakat bu azalmanın kontrol grubundaki değişimler göz önüne alındığında önemsiz kaldığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada kontrol edilen karaciğer, böbrek fonksiyon testlerinde ve histopatolojik bulgularda herhangi bir anormallik gözlenmediği bildirilmiştir (Til 1980).

### 1.2.3. Kinetiği ve metabolizması

DNOC'un insanlarda ve hayvanlardaki toksokinetiği fizikokimyasal özelliklerine ve metabolizmasına bağlıdır. DNOC kısmen nonpolar olmasından dolayı solunum yoluyla, oral yolla ve dermal yolla kolaylıkla vücuda girebilir. DNOC vücuda girdikten sonra akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, beyin, dalak ve kaslara dağılabilir.

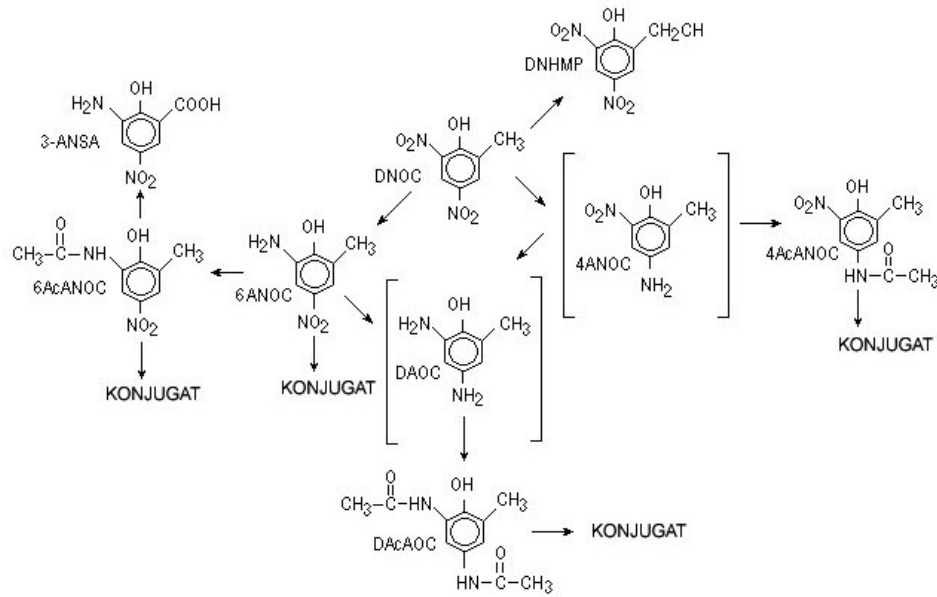
1993 yılında Fabrequettes, derisi tıraş edilen erkek ve dişi sıçanlarda tek doz su bazlı ve yağ bazlı olmak üzere iki formülasyonda DNOC uygulaması yapmış ve derideki absorpsiyonu incelemiştir. Bu çalışma için sıçanların derileri tıraşlanmış ve 8 saat boyunca 18.1 mg.kg<sup>-1</sup> dozunda DNOC ile muamele edilmiştir. Uygulama

sonrasında 15 dak, 30 dak, 1, 2, 4, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra kan örnekleri alınmış ve kanda DNOC seviyesi belirlenmiştir. Sonuçlar, dişilerde 24 saat ve erkek sıçanlarda 48 saat sonunda plazmadaki DNOC derişiminde sadece %2.5'luk ( $14-17 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanda) bir artış meydana getirdiğini ve uygulanan DNOC'un %50'sinin kana geçmesi için gerekli zamanın erkekler için 15 ve dişiler için 13 saat olduğunu göstermiştir. Kandaki DNOC derişiminin %50'ye düşmesi için gerekli zaman ise 24 saattir. 96 saat sonra %1'den daha az miktarda kalır. Yağda hazırlanan DNOC aynı şartlarda uygulandığında erkeklerde 8 saat ve dişilerde 24 saat sonra plazma derişiminin sırasıyla %5.0 ve %5.8 ( $38-45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanda) oranında olduğu görülmüştür. Uygulanan DNOC'un %50'sinin kana geçmesi için gerekli zaman 2.8 saat ve kandaki DNOC derişiminin %50'ye düşmesi için gerekli zaman 34 saat olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda araştırmacılar bu değerlere dayanarak, DNOC'un yağ ile verildiğinde, suyla verilmesine oranla deriden daha çabuk absorbe olduğunu ve plazma derişiminde daha hızlı yükseldiğini ileri sürmüşlerdir.

Deneyisel çalışmalarda DNOC'un kanda diğer dokulara oranla daha yüksek derişimlerde bulunduğu gösterilmiştir. 1951 yılında Parker ve ark., kanda bulunan DNOC'un %90'dan fazlasının plazmada olduğunu belirlemiştir.<sup>14</sup>C ile işaretlenmiş DNOC  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dozunda iki sıçana verildiğinde dokulara dağılımı şu şekilde gerçekleşmiştir: İlk sıçanda uygulamadan 24 saat sonra DNOC'un %15'i kanda, %6.6'sı sindirim kanalında, %5'i karaciğerde, %0.08'i dalakta, %0.94'ü böbreklerde ve %28'i ise diğer vücut bölgelerinde bulunmuştur. Dışkı radyoaktivitenin %10.1'ini içerirken idrarda %28.7 olmuştur. Diğer sıçan ise uygulamadan 72 saat sonra araştırılmış ve kan ile böbrek hariç diğer dokularda bu değerlerin yarıya indiği görülmüştür (Leegwater ve ark. 1982).

DNOC ve diğer serbest dinitrofenoller gibi indirgenme yolu ile metabolize olurlar ve böylece daha az toksik aminonitrofenoller oluşur. Başlıca metabolik yolda DNOC; 6-amino-4-nitro-o-cresol'e (6-ANOC) indirgenir (Şekil 1.4). 6-ANOC, DNOC'tan 20 kat daha az toksik etkili bir maddedir. Daha az miktarda 4-amino-6-nitro-o-cresol (4-ANOC) oluşur. 6-ANOC, üriner içerikte uygulanan dozun %11-12'si kadar bulunur. Daha küçük miktarlarda diğer metabolitler 4-ANOC ve oksidatif yolla oluşan

3-amino-5-nitro-salisikasıit (3-ANSA) idrar ile dışarı atılır (Smith ve ark. 1963). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu metabolitlere ilaveten iki yeni metabolit daha bulunmuştur. Sıçan ve tavşanlara tek oral doz uygulaması yapıldığında, idrarlarında 4,6-diasetamido-o-cresol (DAcAOC) ve 4,6-dinitro-2-hidroksimetilfenol (DNHMP) tespit edilmiştir (Leegwater ve ark. 1982, van der Greef ve Leegwater 1983).



**Şekil 1.4.** Sıçanlarda ve tavşanlarda DNOC'un metabolizması (Leegwater 1982).

DNOC idrarda serbest DNOC, asetillenmiş konjuge 6-ANOC ve konjuge 6-asetoamid-4-nitro-o-cresol (6-AcANOC) halinde atılır (WHO 1982). Sıçanlara 0.4 veya 6.0 mg.kg<sup>-1</sup> dozlarında <sup>14</sup>C-DNOC oral yolla verilip metabolize olması beklendikten sonra idrarda görülen DNOC metabolitleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda idrarda; DNOC (%3-4), 6-ANOC (%2-3), 3,5-dinitro-2-hidrobenzil alkol (%4-5), DAcAOC (%18), 4-asetamido-6-nitro-o-cresol (%1-2) ve tanımlanamayan metabolitler ile konjugatlar görülmüştür (ATSDR 1995). DNOC'un vücuttan uzaklaştırılması idrar ile olabildiği gibi dışkı ile de gerçekleşebildiği <sup>14</sup>C ile yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Leegwater ve ark. 1982). İnsanlarda tekrarlı doz uygulamalarından sonra kandaki DNOC seviyesindeki artış laboratuvar hayvanlarından daha fazla gerçekleşmektedir.

Bunun nedeni DNOC'un vücuttan uzaklaştırılmasının diğer hayvanlara oranla daha uzun sürmesidir (Pollard ve Fillbe 1951; van Noort ve ark. 1960).

#### 1.2.4. Çevreye yayılması ve yıkılması

DNOC tarımsal olarak uygulanması sırasında çevreye yayılabileceği gibi, kimyasal kullanımı sonucunda atık sular yoluyla da çevreye bulaşabilir. DNOC'un uygulanması ya da saklanması sırasında oluşabilecek sızıntılar ve kazalarda DNOC'un çevreye yayılmasına neden olur. Özellikle taşıma şişelerinin ve kullanım malzemelerinin kullanımı bittikten sonra kontrolsüz şekilde bırakılması nedeniyle de DNOC ekolojik sisteme karışabilmektedir.

DNOC, pestisit olarak hazırlanması ve bitkiler yada toprak üzerine uygulanması sırasında havaya karışabilmektedir (Leuenberger ve ark. 1988). ATSDR (1995) tarafından aktarılan bilgiye göre 1990 yılında, üretimi ve kullanımı sırasında 14.9 kg DNOC havaya karışmıştır. Tolüen ve 2-metilfenolün NO ve OH radikalleri ile tepkimeye girmesi yoluyla atmosferde ikincil olarak da oluşabilmektedir ve bu tepkime atmosferdeki DNOC kaynağı açısından pestisit olarak kullanılmasından daha önemli olabilir (Leuenberger ve ark. 1988, Tremp ve ark. 1986). Atmosferde değişik fazlarda (yağmur, sis, kar) 100 µg.l<sup>-1</sup>'ye kadar DNOC olabilir (Tremp ve ark. 1993). DNOC'un havadan uzaklaştırılmasında hidroksil ve nitrat radikalleri ile tepkimesi olmak üzere iki yol bulunmaktadır. Bu tepkimeler içinde fenol ve cresolün NO<sub>3</sub> radikalleri ile olan tepkimesi havadaki önemli yoludur (Atkinson ve ark. 1992). DNOC'un fotolizi havadaki yıkımı için diğer önemli bir tepkime olabilmekte ve atmosferik DNOC güneş ışığını absorbe ederek N grubunun bir OH grubuyla yer değiştirmesi şeklinde bir tepkimeye uğrayabilmektedir. DNOC'un yapısal benzeri olan dinoseb (o-metil grubunda sek-bütül grubu bulunur) hidroksilasyona ya da bütül grubundan hidrojen kaybına uğrayabilir (Kaufman 1976). DNOC ayrıca yağmur ve kar yağışı esnasında yağışla birlikte havadan uzaklaşabilmektedir (Leuenberger ve ark. 1988, Alber ve ark. 1989). 1997-2001 yılları arasında Flemish Çevre Ajansı (FEA), Belçika'da yağmur sularındaki pestisitleri incelemek amaçlı başlattığı çalışmada, α ve β-endosülfan, endosülfan sülfat, lindan, DDVP, atrazin, diuron, DNOC, AMPA ve isoproturan gibi pestisitlerin yüksek oranda bulunduğunu tespit etmiştir (Quaghebeur ve ark. 2004).

Dinitrocresoller pestisit ve nitrotolüen üretimi sırasında suya karışabilmektedirler. DNOC'un atık sularla birlikte suya bırakıldığı, Amerika birleşik devletlerinde 2224 kg DNOC'un kullanımı sırasında buna ek olarak 9 kg DNOC'un da atık sularla suya karıştığı bildirilmiştir (ATSDR 1995). Bunun yanında sudaki DNOC'un az bir miktarı da atmosfer kaynaklıdır (Leuenberger ve ark. 1988, Tremp ve ark. 1986). DNOC'un suda bulunma ise ilgili yapılan çalışmalarda; Kaliforniya'da 5 yeraltı suyu örneğinde maksimum  $35 \mu\text{gL}^{-1}$ , Danimarka'da belirlenen bir alanda gölcükler, dereler ve yeraltı sularından alınan 37 yer altı suyu örneğinde  $0.05 \mu\text{gL}^{-1}$ , 9 göl suyu örneğinde ikisi hariç diğerlerinde  $0.12-0.18 \mu\text{gL}^{-1}$  derişimlerinde bulunmuştur (Mogensen ve Spliid 1995). DNOC'un yüzey sularında yarılanma ömrü 3-5 hafta olarak hesaplanmıştır (Vonk ve van der Hoven 1981). DNOC'un N grubunun fotokimyasal yükseltgenmesi suda bulunan askorbik asit ya da demir iyonları tarafından gerçekleştirilmektedir (EPA 1979). Bunun yanında DNOC sedimentte bulunan mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak da parçalanabilmektedir. *Corynebacterium simplex* (Jensen ve Gundersen 1955, Gundersen ve Jensen 1956), *Rhizobium leguminosarum* (Hamdi ve Tewfik 1970), *Veillonella alkalescens* (McCormick ve ark. 1976), *Pseudomonas* sp. (Chambers ve Kabler 1964, Tewfik ve Evans 1966) ve *Azotobacter* sp. (Wallnoefer ve ark. 1978) gibi mikroorganizmalar DNOC'u biyolojik olarak yıkabilmektedir.

DNOC toprağa temel olarak tarımsal kullanımı sırasında geçmektedir. Topraktaki DNOC'un az bir kısmı da yağmur sularıyla toprağa karışan atmosferik DNOC'tur. 1990 yılında yapılan araştırmaya göre Amerika Birleşik Devletlerinde 3590 kg DNOC olduğu tahmin edilmektedir (ATSDR 1995). Toprakta bulunan DNOC'un yıkılmasında temel yol biyolojik yıkımdır.

1966 yılında Tewfik ve Evans topraktaki bir *Pseudomonas* türünün DNOC'u parçalayabildiğini bildirmişlerdir. DNOC ayrıca *Rhizobium*'un 31 türü ve *Azotobacter*'in 5 türü tarafından parçalanabilir. *Azotobacter* türü bakteriler DNOC'u azot ve karbon kaynağı olarak kullanmaktadırlar ve bu mikrofloranın nitrojen fiksasyonu açısından önemli olmaktadır. Hamdi ve Tewfik (1970) DNOC'un *Rhizobium* ve *Azotobacter ssp.* tarafından degregasyonunu incelenmişlerdir. DNOC'un parçalanma

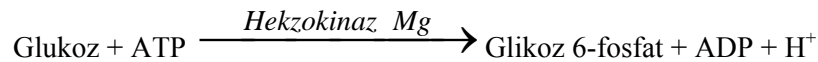
ürünü olarak başlıca 3-amino-5-nitro-o-cresol'ün oluştuğunu ve DNOC'un; *Rhizobium* tarafından indirgenme yoluyla parçalandığını belirtmişlerdir.

Hurle ve Rademacher 1970 yılında topraktaki DNOC'un yarısının parçalanması için geçen süreyi 15 gün olarak hesaplamışlardır. Benzer şekilde Kincannon ve Lin 1985 yılında yaptıkları deneylerde DNOC'un topraktaki yarılanma ömrünün 14 gün olduğunu bulmuşlardır. Çeşitli araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında DNOC'un topraktaki yarılanma ömrü 14 gün ile 30 gün arasında değişmektedir (ATSDR 1995).

1995 yılında Bieber 3 değişik standart toprak içinde DNOC'un bozunmasını incelemiştir. Araştırmacı 20 °C'de toprağa 409 mg <sup>14</sup>C işaretli DNOC/kg (kuru ağırlık) vermiş ve toprağı karanlıkta bırakarak incelemiştir. Çalışma sonucunda uygulanan radyoaktivitenin %39'unun CO<sub>2</sub> şeklinde topraktan ayrıldığını ve asıl uçucu olmayan metabolit olan 2-metil-4-nitrofenol'un, uygulanan radyokarbonun %40'ını gösterdiğini belirtmiştir.

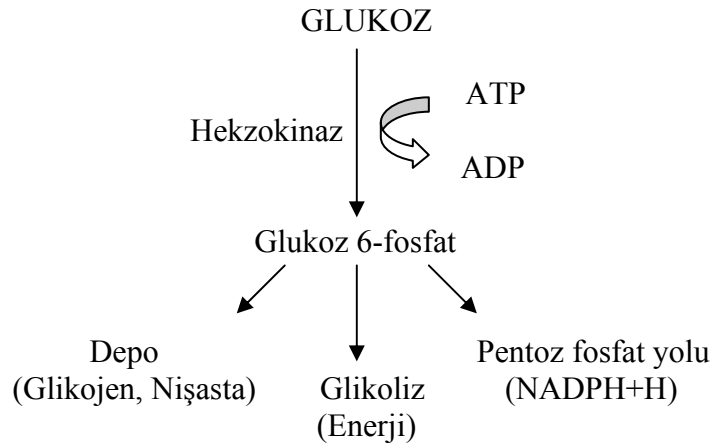
### 1.3. Hekzokinaz (EC 2.7.1.1.)

Glukoz, bakterilerden insanlara kadar tüm organizmalarda, yaşam için temel metabolik öneme sahiptir. Glikolitik metabolizma, enerji (ATP) üretiminin temel yoludur ve glikolitik ara ürünler diğer hücresel yapıların biyosentezinde de kullanılır. Hekzokinaz (HK) (ATP: D-Hekzos 6-fosfotransferaz) ATP'ye bağlı olarak aldo- ve keto- hekzoz şekerlerini hekzoz 6-fosfata dönüştüren önemli bir enzimdir. Bu enzim glikolizin birinci basamağında glukozun fosforlanıp, glukoz 6-fosfata (G6F) dönüştürülmesini sağlamaktadır. HK; glukoz, fruktoz, sorbitol ve glikozamin ile de bu tepkimeyi gerçekleştirebilir (Griffin ve ark. 1991) (Şekil 1.5).



**Şekil 1.5.** HK'nın görev aldığı tepkime (Kuser ve ark. 2000).

Glukoz metabolizması enerji üretiminin yanında, pentoz fosfat yolu boyunca NADPH+H ve anabolik yolun gerekli öncüllerini oluşturur. Glukoz, birçok organizmada karbohidratların saklanması için gerekli polimerik formlara da dönüştürülebilir. Memelilerde bu ve diğer yolların özel dokularda ya da dokularda ki belli hücre tiplerinde gerçekleşmesi önemlidir. Fakat glukoz metabolizması farklı yollar ile memeli hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda gerçekleşir (Griffin ve ark. 1991) (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6.** Glukoz metabolizmasında bulunan farklı yollar (Wilson 2003).

HK her zincirinde 920 aminoasit bulunan homodimer yapıdadır. Enzim birçok  $\alpha$  heliks ve  $\beta$  levha katlanmalarından oluşmuştur.  $\alpha$  heliks katlanmaları heliks döngü heliks yapısını oluştururlar,  $\beta$  yapılarına bakıldığında ise bunların açık  $\alpha/\beta$  levha şeklinde düzenlendiği görülür.

HK iki liganda bağlanabilme yeteneğindedir. Bunlardan biri glukoz iken diğeri G6F'tır. Eğer glikoliz meydana gelecekse glukoz HK'a bağlanır, G6F ise allosterik inhibitör olarak HK'a bağlanır. HK'ın C terminal bölgesi katalitik olarak aktiftir, bunun yanında N terminal bölgesi katalitik olarak aktif değildir, fakat fosfat tarafından gerçekleştirilen inhibisyon için gereklidir. Enzimin N terminal bölgesinde fosfat ve glukoz bağlanması için tek bir bölge bulunmaktadır. Glukoz ve fosfat N- terminal bölgesinin kapalı bir şekilde kalmasını sağlar. Bunun yanında N-terminal bölgesinde G6F'a zayıf bir şekilde bağlı diğer bir bölge daha bulunmaktadır Bunun aksine glukoz C-terminal bölgesine zayıf bir şekilde bağlanır ve kapalı şeklin oluşmasında bir rol



oynamaz. C-terminal bölgesinin kapanmasında glukozla birlikte ATP ya da G6F bulunması etkilidir (Aleshin ve ark. 1998). G6F ve glukoz, HK'a sinerjik olarak bağlanır. Fosfat normal solunum sürecinde HK'ın kontrolünde küçük bir rol oynar, bunun yanında HK'ın hızı glukoz miktarıyla sınırlıdır (McDonald 1979).

ATP, glukozu glikoz 6-fosfata fosfatladığında serbest Gibbs enerjisi -31 KJ'den 14 KJ'e yükselir. Hücre dışı glukoz derişimi yaklaşık 5 mM olduğunda glikolitik yol %100 kapasiteye ulaşır. Bunun sonucunda beyindeki glukoz taşıyıcıları hücre içi glukoz derişimini 50 kat artırır ve dengeleyici bir mekanizma HK aktivitesini azaltır. Bir molekül glukoz, enzimin C terminal bölgesine sıkıca bağlanır. Bununla birlikte dengeli bağlanma çalışmalarında glukozun yüksek bir ilgi ile N terminal bölgesine bağlandığı görülmektedir. Bu durum N terminal bölgesinde ki bir tuz bağının kapalı durumla karşılaştırıldığında açık durumda bir kararsızlık yarattığını düşündürmektedir. Katalitik bölgenin ATP gibi ikinci bir bağlantılı moleküle ihtiyaç duyduğu ve glukozla ATP'nin birlikte bağlanmasının, yapısal değişikliği sağladığını düşündürmektedir (Aleshin ve ark. 1998).

HK ilk olarak Schulze ve ark. tarafından 1969 yılında mayalardan P-I ve P-II olarak adlandırılan iki formla izole edilmiştir. Ökaryotların geniş kısmında HK enzimi bulunmaktadır. Mayalarda HK'ın P-I, P-II ve glukokinaz olmak üzere üç izoenzimi vardır ve tüm izoenzimler iki bölge içerirler. Bu izoenzimlerden P-I ve P-II hem aldohem de keto-şekerleri fosforlarken glikokinaz aldo-hekzozlara özeldir. Maya HK'ı ile yapılan yüzey çalışmalarında ATP ve hekzoza bağlanan ve ATP'nin fosfatını şekere aktarılmasını sağlayan katalitik cep detaylı şekilde analiz edilmiştir (Kuser ve ark. 2000).

Omurgalı hayvanlar HK'ın I den IV e kadar numaralanmış dört izoenzimini içerirler. Maya HK'ında hem N- hem de C- terminalleri yarım şekilde hekzoz ve hekzoz 6-fosfata (H6F) bağlı olmasına rağmen HK I ve HK III izoenzimlerinde sadece C-terminal katalizde kısmen görev alır, N-terminal ise düzenleyici bölge olarak görev yapar. HK II izoenziminde ise her iki bölgede katalizi destekler. HK IV ise maya enzimine benzer şekilde sadece iki bölge içerir ve glukokinaz olarak da adlandırılır.

Atasal HK enzimi 50 KDa olmasına karşın HK I-III izoenzimleri 100 KDa moleküllerdir. Bu enzimler sekans tekrarı gösterirler ve N- ile C terminal bölgeleri arasında büyük sekans benzerliği vardır. HK ailesine ait diğer enzimler ise 50 kDa olarak gözükürler (Bork ve ark. 1993, Wilson 1995, Cardenas ve ark. 1998). Omurgalılarda bulunan izoenzimlerin katalizi, bulunduğu yer ve düzenlenmesi, değişik dokularda glukoz metabolizmasının farklı aşamalarına katıldıklarından dolayı birbirine benzememektedir. HK I-III birçok hekzoz şekerini fosforlar ve G6F ile inhibe olur fakat HK IV sadece glukozu özeldir ve G6F ile inhibe olmaz. HK I, glikolizdeki enerji üretimi sırasında H6F üreterek katabolik bir fonksiyona sahip olabilir ve glikoliz ile TCA döngüsünün koordinasyonunu sağlamak için mitokondri zarına bağlanır. Enzimin mitokondriye bağlandığı bölüm N terminalde bulunan 15 aminoasitlik hidrofobik sıradır. HK II ve HK III glikojen ya da yağ sentezinde kullanılmak üzere H6F ürettiği için anabolik bir fonksiyona sahiptir.

Wilson 1997 yılında bu izoenzimlerin varlığı konusunda üç adet iyi neden öne sürmüştür;

- 1- İzoenzimler; özel metabolik rollerine uygunluğu bakımından, katalitik ve düzenlenme yönünden birbirinden farklı olabilirler.
- 2- İzoenzimlerin transkripsiyonel düzenlenmesindeki farklılıklar, buldukları farklı dokuların metabolik durumları ile oluşabilir.
- 3- İzoenzimlerin hücre içi yerleşimlerdeki farklılıklar, glukoz metabolizmasının hücrede farklı bölgelerde gerçekleşmesinin bir sonucu olabilir.

HK I-III ve HK IV aynı tepkimede görev olsa da farklı özelliklere sahiptirler. HK I-III allosterik enzimlerdir, ortamda G6F miktarının artmasıyla inhibe olur ve aynı zamanda glukozu yüksek ilgi gösterirler ( $K_m$  değeri  $5 \times 10^{-5}$  M). HK IV ise allosterik özellik göstermez. HK IV'ün glukozu ilgisi HK I-III'e oranla daha düşüktür ( $K_m$  değeri  $2 \times 10^{-2}$  M). Glukozu karşı bu şekilde farklı ilginin olması kan glukozunun dengede kalmasını sağlar. Normal kan glukozu seviyesinde HK I-III  $V_{max}$ 'a yakın çalışır bu sayede beyin kendisi için gerekli olan glukozu kullanabilir. HK IV ise  $V_{max}$  değerinin çok altında çalışmaktadır. Eğer kan glukozu önemli derecede yükselirse HK I-III hızlanmaya başlayabilir fakat HK IV hızla çalışmaya başlar. Bu yolla kan glukozu

karaciğer tarafından alınır ve glikojenle yağa dönüştürülür. Eğer kan glukozu normalin altına inerse HK I-III Vmax seviyesinde çalışmaya devam ederken, HK IV inaktive olur. Bu sayede kan glukozu devamlı belirli bir seviyede kalır ve beynin kullanımı için gerekli glukoz sağlanmış olur (Woster 2000).

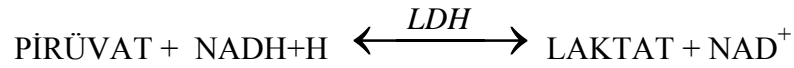
HK IV 40 yıl önce Grossbard ve Schimke tarafından keşfedilmiştir. HK IV karaciğerde ve pankreatik beta hücrelerinde bulunur ve insülin (aktivasyon) ile glukagon (inhibisyon) tarafından kontrol edilir. Pankreatik beta hücrelerinde HK IV enzimi insülin miktarını düzenlemek üzere glukoz belirleyicisi olarak görev alır. HK IV’de oluşacak mutasyonlar şeker hastalığı ile birlikte görülür (Wilson 2003). Glukozun  $\beta$  hücrelerindeki fosforilasyonu insülin salınımıyla sıkı bir ilişki içindedir. HK IV’ in bu eşsiz kinetiğinin temelinde bu hücrelerin plazma şeker derişimindeki artış ve azalmalara duyarlı olması vardır. Bu nedenle Meglasson ve Matschinsky (1984) HK IV’ü  $\beta$  hücrelerinin glukoz sensörü olarak adlandırmıştır. HK IV’deki küçük değişiklikler bile glukozla bağlı insülin miktarını etkilemesinden dolayı fizyolojik olarak önemli olabilir.

Son yıllarda insan, hayvan modellerinde ve izole edilmiş hepatositlerde yapılan çalışmalarda HK IV’ün, glukoz kullanımı ve glikojen sentezinden güçlü şekilde etkilendiği kanıtlanmıştır. Transgenik farelerde HK IV üretimindeki küçük değişimler kan glukoz derişimini ölçülebilir şekilde etkilemektedir (Ferre ve ark. 1996, Hariharan ve ark. 1997). Buna ilaveten tamamlayıcı çalışmalarda hepatositlerde HK IV’ün fazla üretiminin intraselüler glikoliz ve glikojen sentezinde bir artışa neden olarak G6F seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Aiston ve ark. 1999). Karaciğerde metabolizmadaki değişikler birçok temel yolda meydana gelen değişimleri yansıtmaktadır. Bu yoldaki enzimler geniş bir şekilde glukoz metabolizmasının transkripsiyonel seviyesi ile düzenlenmektedir (Girard 1997). Karaciğerde HK IV’ün gen transkripsiyonu cAMP aktivasyonu ile insülinle artarken glukagonla azalır. Bu nedenle HK IV, karaciğerde glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bunun yanında HK IV’ün kaybı ölümcül olmamaktadır. Gerçekte, bu kaybın plazma glukoz derişimine küçük etkileri bulunmaktadır. Buna ilaveten glikojen derişimi, birçok plazma ve karaciğer metaboliti bu hayvanlarda bazal metabolizmada normal düzeydedir. HK IV’ün kaybı sadece hiperglisemik durumlarda görülür hale gelmektedir. Bu durumda

glukoz kullanımında, glikojen sentezinde ve insülin salınmasında bozukluklar görülmektedir. Farklı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda hepatik ve pankreatik HK'da oluşan mutasyonların karaciğer glukoz düzenlenmesini ve glikojen sentezini bozduğunu bildirmişlerdir (Velho ve ark. 1996, Tappy ve ark. 1997). HK IV'ün fonksiyonunun arttırılması ve azaltılması çalışmaları bir arada ele alındığında HK'ın glukoz dengesinin temel belirleyicisi olduğu görülmektedir.

#### 1.4. Laktat Dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27)

Laktat dehidrogenaz (LDH) laktatın pirüvata ve pirüvatin laktata dönüşümünü katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** LDH'nin görev aldığı tepkime (Kuznetsov ve Gnaiger 2003).

LDH dört alt üniteden oluşur ve bunların ikisi M (kas) diğer ikisi de H (kalp) olarak adlandırılır. Bu alt birimlerin molekül ağırlıkları 35000'dir ve tetramer yapıdan dolayı enzimin molekül ağırlığı pek çok türde 140000 olarak bulunmuştur. H ve M alt birimleri farklı aminoasit dizilişlerine sahiptirler ve her türde bulunurlar. Alt birimlerin her iki tipi farklı genler tarafından kontrol edilmektedir ve her iki alt birimde yalnız başına katalitik olarak inaktiftir fakat aynı ya da farklı alt birimler birleşerek aktif tetramerik yapıyı oluştururlar (Palmer 1990).

Memeli LDH'ı 5 tetramerik izomer bulundurmaktadır ve bu izomerler iki farklı alt ünitenin farklı şekillerde bir araya gelmesi ile oluşmuşlardır. İzoenzimler katalitik, fiziksel ve immünolojik yapıları bakımından farklıdırlar. Pirüvatin aerobik oksidasyonunda görev yapan H alt birimi kalp kası LDH'ında baskınken, anaerobik metabolizma ve pirüvat indirgenmesinden sorumlu M alt birimi çizgili kaslarda baskındır (Fritz 1965). Bu izoenzimlerin yanında testis ve spermatozoalara özgü olan ve izoenzim X olarak adlandırılan altıncı bir izoenzim daha bulunmaktadır (Zinkham ve ark. 1964; Stambaugh ve Buckley 1967). Bu izoenzim immünolojik ve enzimatik açıdan

LDH 1-5 izoenzimlerinden farklıdır (Spielmann ve ark. 1973). LDH izoenzimleri ve içerdikleri alt üniteler şöyledir;

- LDH-1 (H<sub>4</sub>)
- LDH-2 (H<sub>3</sub>M)
- LDH-3 (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>)
- LDH-4 (HM<sub>3</sub>)
- LDH-5 (M<sub>4</sub>)

LDH izoenzimleri elektroforeze tabi tutulduklarında üç bölgede kümelenme olduğu görülmüştür. Elektroforez sonucunda LDH-1 ve LDH-2'nin anot bölgesinde, LDH-4 ve LDH-5'in katot bölgesinde son olarak da LDH-3'ün orta bölgede toplandığı görülmüştür (McKenzie ve Henderson 1983).

LDH'nin 3 boyutlu yapısı ilk olarak omurgasızlarda bulunan L-LDH'nin apo ve ligand formlarında belirlenmiştir (Clarke ve ark. 1988, Holbrook ve ark. 1975). Omurgalı L-LDH'ı heterotetramer yapıda bulunabilmesine rağmen eğer diğeri ile tam anlamıyla uyumlu ise in vivo ve in vitroda farklı izoenzimlerin alt birimleri arasında bir ilişki kurulabileceği gösterilmiştir (Mayr ve ark. 1980). LDH alt birimleri genellikle 310-350 amino asitten meydana gelmektedir. Bu alt birimler NAD<sup>+</sup> bağlanma ve katalitik olmak üzere benzer büyüklükte iki bölümden oluşmaktadır. NAD<sup>+</sup> bağlanma bölgesi enzimin birincil yapısında N terminalde yer almaktadır ve NAD<sup>+</sup> bağımlı dehidrogenazlar arasında oldukça korunmuş bir bölgedir. Enzimin katalitik bölgesi ise C terminalinde yer almaktadır (Eventoff ve ark. 1977). Bilinen tüm L-LDH'ların benzer protein yapısında olmalarına rağmen LDH'nin birincil yapısı farklı tür ve dokularda çok çeşitlidir. Omurgalı izoenzimleri genellikle %70'den fazla aminoasit benzerliği gösterirler, fakat bakteri LDH'ları türler arasında birbirleriyle daha az amino asit benzerliği taşırlar ve omurgalı LDH'ları ile benzerlikleri %40'ın altındadır (Griffin ve ark. 1992, Tsoi ve Li 1994).

Vücudun tüm hücrelerinde LDH aktivitesi bulunmakla beraber LDH hücre içinde sadece sitoplazmada bulunmaktadır. Fakat farklı LDH izoenzimleri sitoplazma içinde farklı bölgelerde kümelenebilirler. Smith ve Kissane (1963) sıçan böbrek

hücrelerinde farklı bölgelerde LDH'nin farklı izoenzimlerini izole etmiştir. Vesell ve Bearn (1962) ördek eritrositlerinde LDH izoenzimlerinden bir tanesinin çekirdeğe yakın bölgede baskın olarak bulunduğunu göstermiştir.

Beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, lenf düğümleri, iskelet kası, dalak gibi dokularda LDH izoenzimlerinin aktivitesi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Serum değerleriyle karşılaştırıldığında farklı dokulardaki enzim seviyeleri çok yüksektir. Enzim seviyeleri karaciğer, kalp, böbrek, çizgili kas ve akciğerde sırasıyla  $9000 \text{ Ug}^{-1}$  yaş ağırlık,  $25000 \text{ Ug}^{-1}$  yaş ağırlık,  $15000 \text{ Ug}^{-1}$  yaş ağırlık,  $9000 \text{ Ug}^{-1}$  yaş ağırlık,  $9500 \text{ Ug}^{-1}$  yaş ağırlık olarak bulunmuştur. Birçok dokudaki bu yüksek enzim seviyeleri farklı izoenzim kompozisyonları tarafından oluşturulmaktadır. Kalp kasında elektroforezde hızlı ilerleyen izoenzimler olan LDH-1 ve LDH-2 baskın haldeyken, karaciğer ve çizgili kasta katoda daha yakın duran LDH-4 ve LDH-5 izoenzimleri baskın olarak bulunmaktadır. Yine vücudun farklı dokularında bu izoenzimlerin bulunma oranları da farklı olmaktadır (Drent ve ark. 1996). Örneğin akciğerlerde izoenzimlerin oranları; %10 LDH-1, %20 LDH-2, %30 LDH-3, %25 LDH-4 ve %15 LDH-5 olarak hesaplanmıştır (Lott ve Nemensanszky 1987). Bunun yanında serumda bu izoenzimlerin dağılımına bakıldığında bu oranların %19-30 LDH-1, %32-48 LDH-2, %12-22 LDH-3, %5-11 LDH-4 ve %5-13 LDH-5 olduğu görülmüştür (Moss ve Henderson 1986).

Bakteriyel ve omurgalı LDH'ları arasında özellikle N terminal bölgesi bakımından önemli farklar bulunmaktadır. Omurgalı LDH'ında N terminal bölgesi genellikle asetilenmiş olarak bulunurken bakterilerde bu bölgede serbest amino grubu bulunmaktadır. Buna ek olarak omurgalı LDH'ı N terminal bölgesinde uzun bir ilave aminoasit sırasına sahiptir (R-kolu). R-kolu (20 aminoasit)  $\text{NAD}^+$  bağlanma bölgesine kadar uzamaktadır ve bu aminoasit dizisi R-aksis alt üniteleri arasındaki ilişkiden sorumludur. Diğer taraftan bakteriyel LDH genellikle R kolunun geniş bir kısmını ya da tamamını taşımamaktadır (Iwata ve ark. 1994). L-LDH'nin tersine birçok D-LDH dimerik yapıya sahiptir fakat *Haemophilus influenza* türündeki gibi bazı D-LDH'ların tetramerik yapıya sahip olmaları olasıdır. D-LDH enzimi evrimi sırasında L-LDH'dan ayrılmıştır. D-LDH sadece  $\text{NAD}^+$  bağlanma bölgesinde Gly-X-Gly-X-X-Gly

(X: korunmamış aminoasit) gibi küçük bir lokus haricinde L-LDH ile çok küçük bir sekans benzerliği gösterir (Donicola-Seoane ve Anderson 1990).

LDH'nin kinetiği düzenli bir mekanizma gösterir. Enzime ilk olarak NADH+H (ya da NAD<sup>+</sup>) bağlanır ve sonra substrat olarak pirüvat (ya da L-laktat) enzimin aktif bölgesine bağlanır. LDH katalizi sırasında His 195'in imidazol grubu esansiyel asit/baz katalisti gibi davranır ve substrata proton aktarır. Katalitik tepkime NAD<sup>+</sup>'ın nikotinamid halkası ile His195'in imidazol grubunun pirüvatın 2 karbonil grubuna doğru ortak atağı ile gerçekleşmektedir. Pirüvat indirgenmesi sonucunda hidrit ve proton hidrojenler NADH+H'a aktarılır ve NAD<sup>+</sup> ve protonlanmamış His195 laktat oksidasyonunda laktattan hidrit ve proton hidrojen alıcısı olarak görev yapar. Asp 168'in karboksil grubu His 195'in imidazol grubunun protonlanmış formunun stabilize edilmesinde görev alır (Clarke ve ark. 1988). Enzimin iki guanidino grubu enzim katalizinde önemli bir rol oynamaktadır. Arg 171'in guanidino grubu substratın karboksil grubuyla güçlü bir ilişki halindedir ve substratın, aktif merkezin katalitik bölgesine yerleştirilmesini sağlar (Hart ve ark. 1986). Diğer guanidino grubunu bulduran Arg 109 ise enzimin aktif merkezinin üzerindeki loba yerleşmiştir ve aktif bölgeye substrat bağlandıktan sonra lopun aktif bölge üzerine kapanmasını sağlar (Clarke ve ark. 1986).

Hidrojen transferi gibi yapısal düzenlemeler LDH'nin katalitik yolunda yavaş bir adımdır. *Bacillus stearothermophilus* LDH'ında, laktat oksidasyonu sırasında hidrojen transfer aşaması hız sınırlayıcı basamağı oluşturmaktadır (Clarke ve ark. 1989). LDH aktivitesinin pH yapısı tepkimenin ileriye (laktat → pirüvat) ya da geriye (pirüvat → laktat) doğru olmasına göre farklılık göstermektedir. Bu pH değeri katalitik His bölgelerinin pK'sına bağlı olmaktadır ve bir çok LDH için 7.0 olarak hesaplanmıştır. Omurgalılarda bulunan LDH'lar yüksek derişimdeki substrat ile inhibe olmaktadır. Substrat inhibisyonu boş enzim-NAD<sup>+</sup>-pirüvat üçlü kompleksinin sonucunda gerçekleşmektedir (Everse ve Kaplan 1973). Omurgalı LDH'nin Steady-State ve geçiş kinetiklerinin detaylı bir şekilde araştırmışlardır. Omurgalı LDH'ı substrat bağlanması üzerine belli olmayan bir şekilde yardımlaşmalı etkide bulunur ve enzim aktivitesi için özel bir faktör gerekmemektedir (Everse ve Kaplan 1973, Holbrook ve ark. 1975).

Diğer taraftan bakteriyel LDH katalitik yapısında büyük çeşitlilik gösterir ve genellikle çeşitli faktörlerle allosterik olarak kontrol edilir (Garvie 1980). AMP, ADP ve ATP gibi adenin nükleotidleri genellikle enzimin  $\text{NAD}^+$  bağlanma bölgesine bağlanır ve koenzimle yarışmalı olarak LDH'ı inhibe eder. Diğer taraftan okzamat ve okzalat yapısal olarak pirüvat ve laktat analogudur ve substrat ile yarışarak LDH tepkimesini inhibe eder ve pirüvat indirgenmesini ve laktat oksidasyonunu engeller (Winer ve Schewert 1959, Novoa ve ark. 1961). Bunun aksine okzamat bazen LDH tepkimesine aktive edici etki de gösterebilir. Düşük konsantrasyonda ki okzamat, enzime bağlanabilecek substrat konsantrasyonu yeterliyse genellikle enzim tepkimesini hızlandırır.

LDH izoenzimlerinin çalışma şekilleri hakkında Kaplan ve ark. (1964) aerobik-anaerobik hipotezi geliştirmişlerdir. Bu hipoteze göre izoenzimlerden hangisinin çalışacağı ortam şartlarının aerobik yada anaerobik olmasına göre belirlenmektedir. Aerobik koşullar altında glikoliz sonucunda oluşan pirüvatın çoğu trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girerek mümkün olan en fazla ATP oluşumu sağlanır. Böylece sabit ve yeterli oksijen kaynağı içeren dokularda çok miktarda laktat oluşumu gözlenmez. Böyle şartlar altında çalışan bir dokuda pirüvatın laktata dönüşümünü sağlayan  $\text{H}_4$  izoenziminin yoğun şekilde bulunması gerekmez. Fakat bu dokularda başka bir dokuda oluşmuş laktatın pirüvata dönüştürülmesi gerekebilir, bu durumda laktat seviyesinin artması ile pirüvatın enzim üzerine uyguladığı inhibisyon ortadan kalkar ve enzim laktattan pirüvat oluşturma yönünde çalışır.

Anaerobik koşullarda ise TCA döngüsü çalışmaz ve hücre glikolizdeki ATP üretimine bağımlı kalır. Sabit hızda  $\text{NAD}^+$  üretimi olmazsa bu üretimde kesintiye uğrayacaktır. Fakat pirüvatın LDH yardımıyla laktata dönüşmesi  $\text{NAD}^+$  düzeyinin sabit tutulmasını sağlayabilir. Bu dönüşüm için oksijen yoksulu dokularda pirüvatı laktata dönüştürme kapasitesi yüksek bir LDH izoenzimi ( $\text{M}_4$ ) gereklidir. Bu hipotez deneysel kanıtlarla tam olarak kanıtlanamamıştır; örneğin  $\text{M}_4$  izoenzimi her ne kadar pirüvatın laktata dönüşümü için  $\text{H}_4$ 'ten daha yüksek dönüşüm sayısına ( $k_{\text{cat}}$ ) sahipse de substrat için  $\text{H}_4$ 'ten daha düşük bir ilgiye sahip olduğu görülür. Yine de karaciğerde baskın



izoenzimin M<sub>4</sub> (LDH-5) olduğu görülmüştür, fakat bunun yanında karaciğerde HM<sub>3</sub> (LDH-4) izoenzimi de bulunmaktadır (Palmer 1990).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan deney hayvanları

Deneylerde kullanılan erkek ve dişi beyaz sıçanlar (*Rattus norvegicus*), Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi (DHYAM)'nde inbreed yöntemiyle (kardeşler arasında çiftleşmelerle soyların elde edilmesi) yetiştirilmiştir. Deneylerde aynı deney periyodunda eşit sayıda erkek ve dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar deney süresi boyunca plastik kafeslerde yeterli alan sağlanarak tutulmuş ve beslenmelerinde taze su ve hazır yem kullanılmıştır.

Bu çalışmada, kontrol grubu için 4, deney grupları için 16 (8 adet DDVP, 8 adet DNOC grubu için) olmak üzere toplam 160 adet sıçan deneye alınmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- DNOC (Acros)
- DDVP (Sigma)
- KCl (Merc)
- Triethanolamin (Merc)
- Glukoz (Merc)
- MgCl<sub>2</sub> (Merc)
- ATP (Sigma)
- NADP (Sigma)
- G6PDH (Sigma)
- Sodyum pirüvat (Sigma)
- NADH (Serva)
- Fosfat tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merc)
- Bidistile Su

## 2.2. Yöntem

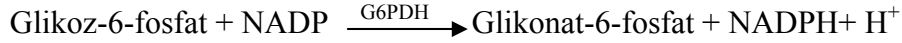
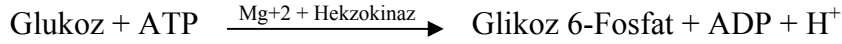
Deneylemizde 250-300 gr ağırlığında sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar deney aşamasından önce DDVP, DNOC ve kontrol olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. DNOC grubuna  $2.8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (sudaki çözünürlüğü  $6.94 \text{ gr lt}^{-1}$ ), DDVP grubuna  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  (sudaki çözünürlüğü  $10 \text{ g lt}^{-1}$ ) dozunda intraperitoneal yolla madde uygulanırken, kontrol grubuna ise aynı yolla 1ml'lik steril enjektör yardımıyla serum fizyolojik uygulanmıştır. Enjeksiyondan önce sıçanlar metabolizmalarının eşitlenmesi amacıyla yemek ve sudan kesilip, 24 saat aç bırakılmıştır. Enjeksiyondan hemen sonra kafeslerine geri konan sıçanlara su ve yemek serbest olarak verilerek, metabolizmanın harekete geçmesi sağlanmıştır. Enjeksiyon işleminden 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 72 saat sonra, sıçanlar servikal dislokasyon yolu ile öldürülerek karaciğerleri çıkarılmıştır. Karaciğer dokusu alındıktan sonra 0.15 M KCl tamponunda yıkanarak, homojenat elde etmek için 1/3 ağırlık/hacim olacak şekilde soğuk KCl ile ayrı ayrı özütleyici tüplerine alınmış ve homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenatlar ultrasantrifüjde (RC-5 SuperSpeed Refrigerated Centrifuge)  $48000\text{g}^{\circ}$ de 30 dakika çevrilmiş, elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Özütleme ve santrifüj işlemlerinin 0-4 °C sıcaklıkta yapılmasına özen gösterilmiştir.

### 2.2.1. Hekzokinaz aktivitesinin belirlenmesi

Deney Karışımı		
pH:7.6 10mM	Trietanolamin tamponu	1.27 ml
55 mM	Glukoz solüsyonu	1.20 ml
0.1 M	MgCl <sub>2</sub> solüsyonu	0.20 ml
11 mM	NADP solüsyonu	0.20 ml
81 mM	ATP solüsyonu	0,10 ml
140 U.mg <sup>-1</sup>	G6PDH solüsyonu	0.01 ml
Örnek		0.02 ml
TOPLAM		3 ml

**Çizelge 2.1.** Hekzokinaz aktivitesi tayini için deney karışımı.

Deney karışımı çizelge 2.1'deki gibi hazırlandıktan sonra kuvars tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır. Enzim kaynağı olarak doku homojenatları kullanılmıştır. Hekzokinaz enzim aktivitesi;



tepkimleri sonucunda oluşan NADPH+H<sup>+</sup>'in artan absorpsiyonunun CECIL 5000 Spektrofotomotrede 340 nm. dalga boyunda, 25 °C'de 5 dakika izlenmesi ile tayin edilmiştir (Boehringer Mannheim 1973).

### 2.2.2. Laktat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

Deney Karışımı		
10 mM	pH: 7.0 10 mM Fosfat tamponu	2.83 ml
23 mM	Sodyum pirüvat solüsyonu	0.10 ml
12 mM	NADH solüsyonu	0.05 ml
Örnek		0.02 ml
TOPLAM		3 ml

**Çizelge 2.2.** Laktat dehidrogenaz aktivitesi tayini için deney karışımı.

Deney karışımı çizelge 2.2'deki gibi hazırlandıktan sonra kuvars tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır. Enzim kaynağı olarak doku homojenatları kullanılmıştır. Laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi; Pirüvat + NADH+H<sup>+</sup>  $\xleftarrow{\text{LDH}}$  Laktat + NAD<sup>+</sup>

tepkimesi sonucunda azalan NADH+H<sup>+</sup>'in azalan absorpsiyonunun CECIL 5000 spektrofotomotrede 340 nm. dalga boyunda, 25 °C'de 5 dakika izlenmesi ile tayin edilmiştir (Boehringer Mannheim 1973).

Spektrofotometrede ilk okuma tepkimenin dengeye ulaşması için 1 dakika sonra yapılmıştır ve daha sonra, 1'er dakika aralıklarla 5 dakika boyunca her dakika

sonundaki absorbands değeri kaydedilmiştir. Elde edilen verilerden her bir enzim için  $\Delta E/\Delta t$  (IU) değeri bulunmuştur (Hannig ve ark. 2004).

### 2.2.3. Dokularda protein tayini

Çalışmamızda karaciğer dokusundaki protein tayini için Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır.

### 2.2.4. Spesifik aktivite tayini

Aktivite tayini için en uygun ölçüm süresi, enzim katalizli tepkimenin en yüksek düzeyde gerçekleştiği ve dengelendiği ana kadar olan süredir. Bu süre birçok enzim katalizli tepkime için, genellikle 5 dakikadır.

Bir ünite enzim; 340 nm'de 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NADP}^{+}$ 'yi ( $\text{NAD}^{+}$ 'ı) 1 dakikada  $\text{NADPH}$ 'a ( $\text{NADH}$ 'a) (molar soğurma katsayısı  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) değiştiren enzim miktarı olarak tanımlanırken, spesifik aktivite mg protein başına düşen internasyonal ünite olarak tanımlanmıştır.

Bradford yöntemi kullanılarak elde edilen  $C_{\text{protein}}$  değeri ve okumalarda elde edilen  $\Delta E/\Delta t$  değerleri, enzim aktivite tayini için aşağıdaki formülde kullanılmıştır.

$$\text{Volüm Aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E/\Delta t \qquad \text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{volüm aktivite}}{C_{\text{protein}}}$$

V : Son hacim

$\epsilon$  : Molar Soğurma Katsayısı ( $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )

d : Işık yolu (cm)

v : Kullanılan enzimin hacmi

$\Delta E/\Delta t$  : Birim zamanda (1 dk.) absorpsiyon farkı

$C_{\text{protein}}$  : Enzimin derişimi (mg/ml)

### 2.2.5. İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde, SPSS paket programı (11.0 versiyonu) kullanılarak, serum fizyolojik, DNOC ve DDVP değerlerinin karşılaştırmalarında ANOVA (one-way) testi yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (Ort  $\pm$  SH) şeklinde verilmiştir. Analizler sonucu değerlendirmede  $p < 0.05$  olasılık değerleri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **3. ARAşTIRMA SONUÇLARI**

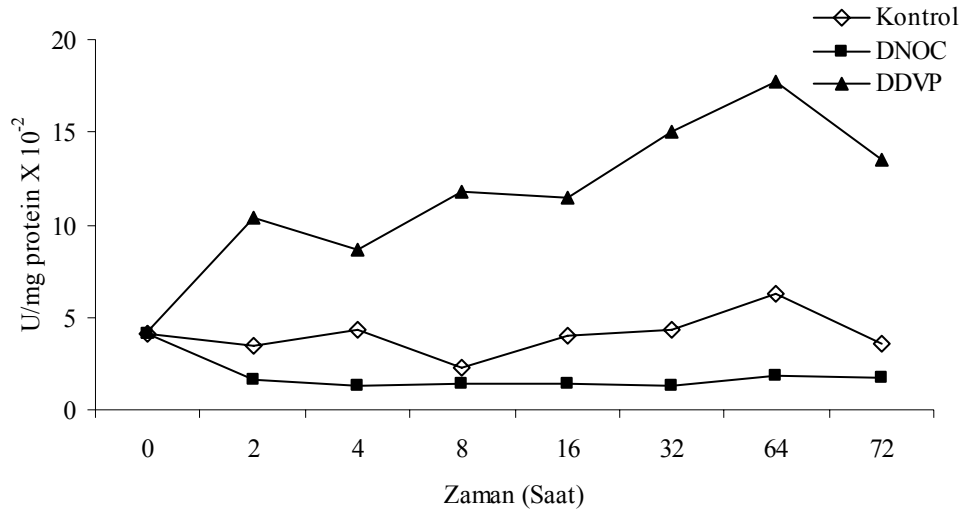
### 3.1. Hekzokinaz Aktivitesi

DNOC ve DDVP uygulamalarının erkek sıçanların karaciğer HK aktivitesi üzerine olan etkileri şekil 3.1’de gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çalışılan bütün saatlerde, HK aktivitesinin DDVP uygulanan erkek sıçanlarda arttığı, bunun yanında DNOC uygulananlarda ise azaldığı görülmüştür. Bu iki maddenin aktivite üzerindeki etkileri dikkat çekici olmuştur. DNOC aktiviteyi ortalama 2 kat azaltırken, DDVP 3 kat artırmıştır (Şekil 3.1).

Bu üç gruptan elde edilen aktivite değerlerinin istatistiksel açıdan karşılaştırılması çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0.saat hariç diğer tüm deney saatlerinde DDVP uygulanan gruptaki aktivite değişimleri anlamlı olarak bulunmuştur. DNOC uygulanan hayvanlarda ise 0. ve 8. saatler haricinde anlamlı bir aktivite kaybı meydana gelmiştir. DNOC ve DDVP uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise tüm saatlerde DDVP uygulanan gruptaki HK aktivitesinin DNOC uygulanan gruptaki aktiviteden anlamlı şekilde farklı olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). DDVP uygulanan grupta oluşan aktivite değerleri, DNOC grubuyla karşılaştırıldığında en düşük farkın 2. saatte, en yüksek farkın ise 32. saatte ortaya çıktığı gözlenmiştir.

DDVP uygulamasının HK aktivitesi üzerine olan etkisinin zamana bağlı olarak değişimine bakıldığında, 2. saatte anlamlı şekilde artan aktivitenin 32. saate kadar anlamsız değişimler gösterdiği saptanmıştır. 32. saatte ise enzim aktivitesi, anlamlı şekilde artarak deney periyodunun sonuna kadar anlamsız değişimler göstermiştir. Erkek bireylerde en yüksek HK aktivitesi 64. saatte DDVP uygulanan grupta görülmüştür. Bu saatteki HK aktivitesi; kontrol grubunun yaklaşık 2.8 katı, DNOC grubunun ise yaklaşık 9.5 katı olmuştur.

DNOC uygulanan grupta ise 2. saatte meydana gelen anlamlı azalmadan sonra deney periyodunun sonuna kadar istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ) (Çizelge 3.1).



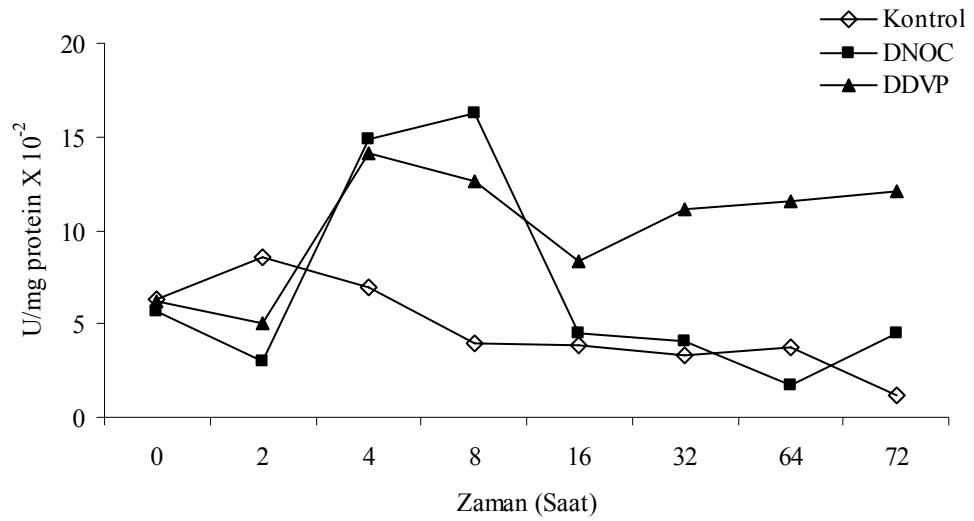
**Şekil 3.1.** Erkek sıçanlarda karaciğer HK aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.

Dişi sıçanlarda zamana ve uygulanan maddelere bağlı olarak meydana gelen değişim şekil 3.2’de gösterilmiştir. Her iki pestisit de HK aktivitesini 8. saate kadar benzer bir şekilde değiştirdiği görülmüştür. 8. saatten sonra ise DNOC uygulanan grupta aktivitenin azaldığı, bunun yanında DDVP uygulanan grupta aktivitelerin yüksek değerlerde kaldığı görülmüştür. DDVP uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki HK aktivitesinin 2. saat hariç diğer tüm saatlerde DDVP uygulananlardan düşük olduğu görülmüştür. DNOC uygulanan grupta ise aktivite 0., 2. ve 64. saatlerde kontrol grubundan daha düşük değerlerde bulunmuştur. Dişi sıçanlarda HK aktivitesi en yüksek seviyesine, 8. saatte DNOC uygulanan grupta ulaşmıştır.

Kontrol grubuyla DNOC grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, HK aktivitesinin 0. ve 16. saatler haricinde diğer tüm deney saatlerinde anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. Kontrol grubuyla DDVP grubu karşılaştırıldığında ise 0. saat hariç tüm deney saatlerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar ortaya çıkmıştır ( $p < 0.05$ ). İki deney grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında 0., 4. ve 8. saatlerde anlamsız bulunan farklılıklar diğer tüm deney saatlerinde anlamlı olarak bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 3.2).



DDVP uygulanan grupta aktivitenin zamana bağılı olarak değişimine bakıldığında 2. saatten sonra anlamlı bir şekilde artan aktivitenin 16. saatte yeniden ilk iki periyottaki değerlerine yaklaştığı fakat 32. saatte tekrar yükseldiği ve bu saatten sonra anlamsız değişimler gösterdiği görülmüştür ( $p>0.05$ ). DNOC uygulanan grupta ise 4. ve 8. saatlerdeki enzim aktivitesinin diğer tüm saatlerde gözlenen enzim aktivitelerinden anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Diğer saatlerdeki aktivite değişiklikleri ise kendi aralarında istatistiksel olarak anlamsız kalmıştır ( $p>0.05$ ) (Çizelge 3.2).



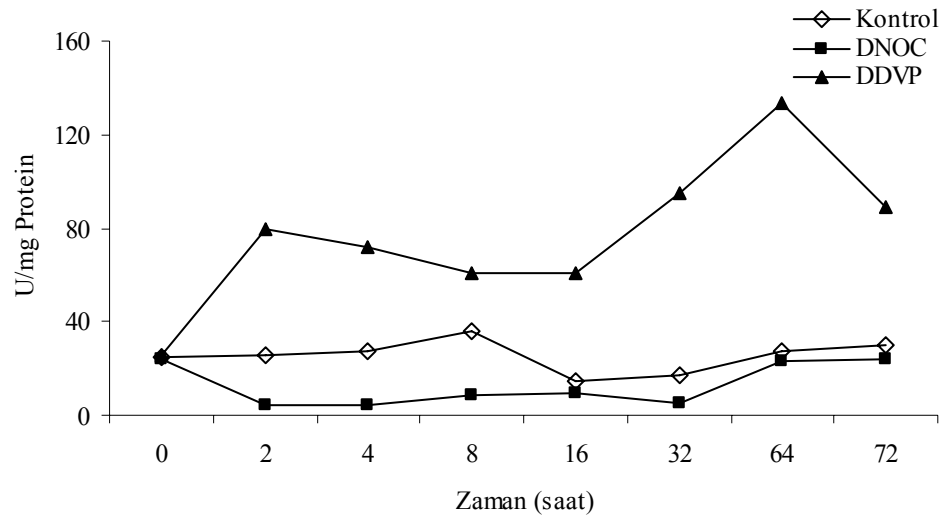
**Şekil 3.2.** Dişi sıçanlarda karaciğer HK aktivitesinin zamana ve maddelere bağılı olarak değişimi.

### 3.2. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

Erkek bireylerde 0. saat hariç diğer deney saatlerinde DDVP ile etkilenen gruptaki erkek sıçanların karaciğer LDH aktivitesinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.3). Bunun yanında DNOC ile etkilenen grupta ilk saat hariç LDH aktivitesi kontrol grubuna oranla daha düşük kalmıştır. DDVP uygulanan sıçanlarda aktivitenin 16. saate kadar belirli bir seviyede kaldığı, 16. saatten 64. saate kadar ise hızlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Erkek bireylerde LDH aktivitesi en yüksek seviyesine DDVP uygulanan grupta 64. saatte ulaşmıştır. 64. saatte DDVP uygulanan gruptaki aktivite kontrol ve DNOC grubunun yaklaşık 5 katı kadar olmuştur (Şekil 3.3).

DNOC ve kontrol grubu karşılaştırıldığında 0., 64. ve 72. saatler haricinde tüm deney saatlerinde anlamlı farklar olduğu görülmüştür. DDVP uygulanan erkek bireylerdeki aktivite ise tüm deney saatlerinde hem DNOC hem de kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 3.3).

DDVP uygulanan gruptaki bireylerin zamana bağlı olarak aktivite değişimleri değerlendirildiğinde, 64. saatte ortaya çıkan aktivitenin diğer tüm deney saatlerinde anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür. DNOC grubunda ise 0. saatten sonra anlamlı olarak azalan aktivite ( $p<0.05$ ), 64. ve 72. saate kadar anlamlı değişiklikler göstermezken ( $p>0.05$ ), bu saatlerde artış göstererek 0. saatteki değerine ulaşmıştır ( $p<0.05$ ) (Çizelge 3.2).

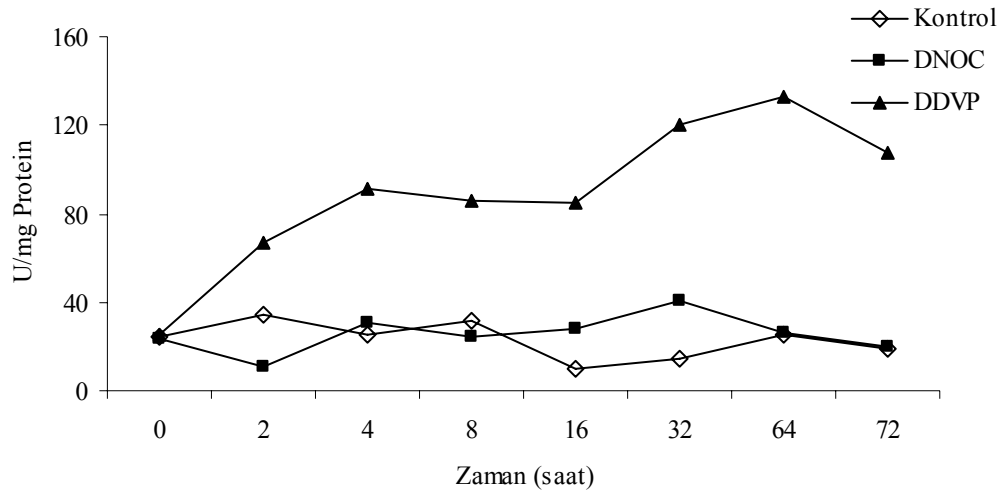


**Şekil 3.3.** Erkek sıçanlarda karaciğer LDH aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.

Dişi bireylerde karaciğer LDH aktivitesi erkek bireylere benzer şekilde bir grafik ortaya çıkarmıştır. DDVP uygulanan gruptaki sıçanlarda enzim aktivitesi 0. saat hariç tüm deney saatlerinde DNOC ve kontrol grubundan daha yüksek olarak bulunmuştur. LDH aktivitesi en üst noktasına DDVP grubunda 64. saatte ulaşmıştır. 64. saatte DDVP grubunda bulunan aktivite DNOC ve kontrol grubunun yaklaşık 5 katı olmuştur. DNOC uygulanan grupta LDH aktivitesine bakıldığında ise aktivite değerlerinin kontrol grubuna yakın olduğu görülmüştür (Şekil 3.3).

Gruplar arasında ki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DDVP uygulanan gruptaki aktivite diğer gruplardan anlamlı olarak farklı olmuştur. DNOC uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise aktiviteler arasında ki farklılıkların 2., 16. ve 32. saatlerde anlamlı olduğu, diğer deney saatlerindeki farklılıkların ise istatistiksel olarak önemsiz sayılabileceği bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Çizelge 3.2).

DDVP uygulanan gruptaki aktiviteler zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında 2. saatte anlamlı olarak artan aktivitenin 32. saate kadar anlamsız değişimler gösterdiği bulunmuştur. 32. saatte anlamlı şekilde artan aktivite deneyin sonuna kadar benzer değerlerde kalmıştır ( $p>0.05$ ). DNOC uygulanan grupta ise anlamlı değişimler ( $p<0.05$ ) olsa da deney saatlerinde bulunan aktivitelerin benzer seviyelerde kaldığı görülmüştür ( $p>0.05$ ) (Çizelge 3.2).



**Şekil 3.4.** Dişi sıçanlarda karaciğer LDH aktivitesinin zamana ve maddelere bağlı olarak değişimi.

Tüm deneysel bulgular göz önüne alındığında DDVP uygulanan bireylerdeki enzim aktivitelerinin, kontrol grubuna oranla yüksek, DNOC uygulanan grupta ise düşük olduğu görülmüştür. 0. saatler hariç DDVP grubunda aktivite değerleri kontrol

grubundan dikkat çekici biçimde farklı kaydedilirken, bu farklılıklar DNOC grubunda oluşan farklılıklara oranla daha yüksek bulunmuştur.

**Çizelge 3.1.** Hekzokinaz enziminin spesifik aktivitesinin dişi ve erkek sıçanlarda uygulanan maddelere ve zamana bağlı olarak değişimi.

Cinsiyet	Saat	0. SAAT Ort ± SH	2.SAAT Ort ± SH	4.SAAT Ort ± SH	8.SAAT Ort ± SH	16.SAAT Ort ± SH	32.SAAT Ort ± SH	64.SAAT Ort ± SH	72.SAAT Ort ± SH
	Madde								
Erkek	Kontrol	4.13 ± 0.12ab x	3.46 ± 0.003a x	4.37 ± 0.32ab x	2.27 ± 0.43a x	4.04 ± 0.35ab x	4.29 ± 0.06ab x	6.25 ± 1.18b x	3.6 ± 0.21a x
	DNOC	4.01 ± 0.01a x	1.63 ± 0.29b y	1.27 ± 0.11b y	1.41 ± 0.37b x	1.4 ± 0.16b y	1.34 ± 0.25b y	1.86 ± 0.26b y	1.71 ± 0.24b y
	DDVP	4.24 ± 0.19a x	10.42 ± 1.09bc z	8.63 ± 0.28b z	11.78 ± 0.7bd y	11.43 ± 0.29bd z	15.06 ± 1.58de z	17.74 ± 0.91e z	13.5 ± 1.74cde z
Dişi	Kontrol	6.31 ± 0.55a x	8.6 ± 0.11b x	7.00 ± 0.87ab x	3.99 ± 0.42c x	3.87 ± 0.56c x	3.34 ± 0.81cd x	3.77 ± 0.17c x	1.21 ± 0.07d x
	DNOC	5.68 ± 0.5a x	3.05 ± 0.39a y	14.89 ± 1.38b y	16.15 ± 2.07b y	4.52 ± 0.57a x	4.11 ± 0.30a y	1.71 ± 0.22a y	4.53 ± 0.53a y
	DDVP	6.23 ± 0.04a x	5.06 ± 0.65a z	14.1 ± 0.41b y	12.61 ± 0.99b y	8.32 ± 0.59ac y	11.1 ± 1.03bc z	11.55 ± 1.26bc z	12.06 ± 1.30bc z

Tablodaki HK değerleri U/mg protein x 10<sup>-2</sup> olarak spesifik aktiviteyi göstermektedir.

Ort: Ortalama

SH: Standart hata

Farklı harfler aynı satırdaki istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir (abcd) (p<0.05).

Farklı harfler aynı cinsiyette ve aynı sütündeki istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir (xyz) (p<0.05).

**Çizelge 3.2.** Laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivitesinin dişi ve erkek sıçanlarda uygulanan maddelere ve zamana bağlı olarak değişimi.

Cinsiyet	Saat	0. SAAT Ort ± SH	2.SAAT Ort ± SH	4.SAAT Ort ± SH	8.SAAT Ort ± SH	16.SAAT Ort ± SH	32.SAAT Ort ± SH	64.SAAT Ort ± SH	72.SAAT Ort ± SH
	Madde								
Erkek	Kontrol	24.76±0.003abcd x	25.84± 2.2ae x	27.59± 2.64ae x	35.87± 1.40e x	14.66± 0.02b x	16.83± 0.86abc x	27.35± 0.48bce x	29.92± 5.04de x
	DNOC	23.90± 0.02a x	4.31± 0.94b y	4.7± 1.17b y	8.35± 1.74b y	9.44± 0.03b y	5.33± 1.19b y	23.35± 1.67a x	24.02± 0.79a x
	DDVP	23.35± 0.57a x	79.56± 2.57bc z	72.18± 0.61bd z	61.05± 2.53d z	60.89± 3.39d z	94.67± 3.64e z	133.90± 7.42f y	89.08± 0.60ec y
Dişi	Kontrol	24.72± 1.96ab x	34.79± 5.41a x	25.71± 3.86ab x	31.72±0.58ac x	10.19± 0.04d x	14.77± 0.02bd x	24.98± 2.27ab x	19.36±0.19bcd x
	DNOC	23.81± 0.34ab x	10.93± 2.30b y	31.08± 3.67ac x	24.41± 4.09ab x	28.46± 6.00ab y	40.93± 6.88c y	26.73± 2.97ab x	19.65± 3.21bc x
	DDVP	25.25± 0.5a x	67.18±5.12b z	91.74± 11.21bcd y	85.69±7.46bc y	85.00± 7.74bc z	120.26± 7.83d z	133.23± 7.98d y	107.7± 4.85cd y

Tablodaki LDH değerleri U/mg protein olarak spesifik aktiviteyi göstermektedir.

Ort: Ortalama

SH: Standart hata

Farklı harfler aynı satırdaki istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir (abcd) (p<0.05).

Farklı harfler aynı cinsiyette ve aynı sütundaki istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir (xyz) (p<0.05).

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Artan nüfusa paralel olarak besin ihtiyacındaki artış, dünyanın en önemli problemi. Tarımsal alanlar; şehirleşme, endüstrileşme ve erozyon nedeniyle giderek azalmaktadır. Bu nedenle birim alanda en fazla üretimi sağlayabilmek için yüksek miktarda pestisit temel olarak tarım alanları ve çayırlara olmak üzere çevreye bırakılır (Kaya ve ark. 2000). Tarımsal kullanım için çevreye bırakılan pestisitler, içme suları besin ve hava yoluyla biyolojik sistemlere dahil olabilmekte ve birincil hedeflerinin yanında diğer canlıları da etkilemektedir.

Kimyasalların canlılarda meydana getirdikleri etkileri, çeşitli enzimlerde meydana gelen aktivite değişiklikleri araştırılarak belirlenebilir. Özellikle bu maddelerin detoksifikasyonunun gerçekleştiği karaciğerde oluşacak değişiklikler, bu maddelerin organizma üzerine olan etkileri hakkında bilgi verecektir.

Çalışmamızda DDVP'nin etkisi hem erkek hem de dişi sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer HK aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar DDVP'nin karaciğer hücrelerine glukoz girişini ve kullanımını arttırdığını düşündürmektedir. Detoksifikasyon genel olarak yüksek enerji gerektiren bir iştir ve bu enerji hücresel solunumdan sağlanmaktadır. DDVP uygulamasının çeşitli canlılarda oksidatif strese neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Oluşan bu durumun ortadan kaldırılabilmesi için vücutta bulunan detoksifikasyon mekanizmalarının hızla çalışması gerekmektedir. Bu işin yapıldığı temel organ karaciğerdir ve detoksifikasyon işlemleri sonucunda artacak enerji ihtiyacının karşılanması gerekmektedir. Hücrelerde enerji glukozun yıkımı üzerinden sağlanmaktadır ve HK enziminin glukoz metabolizmasının birinci basamağında olduğu düşünüldüğünde artan enerji ihtiyacı ile birlikte enzim aktivitesinde artış meydana gelmesi beklenebilir bir sonuç olmaktadır.

Romero-Navarro ve ark. (2006) DDVP'nin karaciğer hücrelerinde HK'nin izoenzimlerinden olan HK IV (Glikokinaz) aktivitesi üzerine olan etkisini araştırmışlar

ve DDVP uygulamasına bağlı olarak HK IV aktivitesinde bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuca benzer şekilde Lowes ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada alkole bağlı siroz görülen karaciğer ile kontrol karaciğerini karşılaştırdıklarında, benzer şekilde HK IV aktivitesinde %10 düzeyinde azalma meydana geldiğini bulmuşlardır. Bunun yanında aynı çalışmada HK'nın diğer izoenzimleri de araştırılmış ve HK I aktivitesinde 3, HK II aktivitesinde ise 7 katlık bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında DDVP'nin HK IV'in aktivitesinde kayıplara neden olmasının yanında, diğer izoenzimlerdeki artışla toplam HK aktivitesinde bir artış oluşturabileceği düşünölebilmektedir. Çalışmamızda araştırılan HK aktivitesi izoenzimlerin toplam aktivitesi olduğundan bulunduğumuz aktivite artışları bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

DDVP'nin karbohidrat metabolizması üzerine olan etkileri Teichert-Kuliszenwska ve Szymczyk. (1978) tarafından da araştırılmış ve DDVP uygulanması sonucunda sıçanlarda hiperglisemi ve insölin seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde Pournourmohammadi ve ark. 2005 yılında organofosfat bir pestisit olan malathion ile yaptıkları çalışmada artan dozlarda malathion uygulamasına paralel olarak plazma insölin seviyesinde artış gözlemişlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalarda insölin seviyesinde meydana gelen artışın nedenleri araştırılmıştır. Çalışmalar sonunda asetilkolinin hem insölin hem de glukagon için potansiyel salgı etkileyicisi olduğü ve DDVP'nin kolinerjik etkisinin insölin/glukagon dengesinde bozulmalara yol açabileceği ve bunun da glukoz metabolizmasında değişikliklere neden olabileceği ileri sürölmüştür (Teichert-Kuliszenwska ve ark. 1981, Gilon ve Henquin 2001, Duttaroy ve ark. 2004). Plazmada insölin seviyesinin artışı karaciğer hücrelerine glukoz girişini hızlandırmaktadır. Hücrelere giren glukozun hücrede muhafaza edilmesi için fosforlanması gerekmekte ve bu tepkime HK enzimi tarafından katalizlenmektedir. Dolayısıyla plazmada artan insölin seviyesi hücrelerde HK aktivitesinin artışının diğer bir nedeni olabilir. Bunun yanında HK enzimi üzerine paraquat, malathion, endosölfan gibi farklı pestisitlerin de aktive edici bir etki göstermesi bu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Dere ve ark. 1995a,b, Dere ve Polat 2001).



Pestisitlerin etkisiyle hücrelerde meydana gelen değişimler organizmada metabolik değişimlere neden olmaktadır. DDVP ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada NK-92Cl hücrelerinde perforin, granzim A ve granulosin seviyelerinde önemli azalmalar gözlenmiştir (Li ve ark. 2002). DDVP akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve dalakta histopatolojik değişimlere neden olmaktadır (Luty ve ark. 1998). DDVP'nin meydana getirdiği bu gibi değişimler hücrede enzim aktivitelerini etkileyerek artış ve azalmalara neden olabilir.

mRNA seviyesindeki artışlar hücrede bulunan enzimlerin aktivasyonlarında değişimlere neden olabilmektedir. HK enziminin kodlandığı mRNA'larda meydana gelebilecek değişimler enzim aktivitesindeki artışın nedeni olabilir (Niswender ve ark. 1997). Yine DDVP'nin gen düzeyinde yaptığı etkilerde aktivite farklılıklarını oluşturabilir. Rishi ve Sunita (1995) balık böbrek hücrelerinde kromozomlara DDVP'nin genotoksik etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kromatit boşlukları, kromatitler arası boşluklar, sentromerik boşluklar, kromatitlerin erken ayrılması ve poliploidi gibi bozukluklar görülmüştür. Bu gibi geniş kromozom bozuklukları hücrede çeşitli değişimlere ve çeşitli enzimlerin aktivitelerinde artış ya da azalmalara neden olabilir. Çalışmamızda görülen aktivite artışı bu şekilde meydana gelen kromozom bozukluklarının bir sonucu olarak da ortaya çıkmış olabilir.

DNOC uygulanan grupta ise hem erkek hem de dişi bireylerde HK aktivitesi genel olarak azalma göstermiştir. Bu sonuçlar temel olarak karaciğer hücrelerinde solunumun DNOC uygulamasına bağlı olarak yavaşladığını düşündürmektedir. Vicente ve ark. (1998) DNOC uygulamasının doz farkına bağlı olarak farklı şekillerde solunumu etkilediğini ve yüksek dozda DNOC uygulamasının solunumu yavaşlattığını belirtmişlerdir. Bu şekilde solunumun yavaşlaması sonucunda solunumun ilk basamağında görev yapan HK enzim aktivitesinde de bir azalmanın meydana gelmesi olası bir sonuç olacaktır.

DNOC'un organizma üzerine etkilerinden biri de endokrin sistem üzerine olmaktadır. 1991 yılında Van den Berk ve ark. DNOC'un tiroid hormonu

fonksiyonlarını etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar DNOC'un bu etkisinin kanda hormonun taşınmasını sağlayan transthyretin proteinine tiroksin ile yarışmalı olarak bağlanmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde Kelly 1995 yılında DNOC ile etkilenen farelerde T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> hormon seviyelerinin azaldığını bulmuştur. Yarışmalı bağlanma nedeniyle kanda tiroksin hormonunun taşınmaması ve hormon seviyelerindeki düşüşler sonucunda tiroksin hormonunun fonksiyonunu tam olarak yerine getirememesi hücrelerde metabolizma hızının, dolayısıyla HK aktivitesinin azalmasına neden olabilir.

DNOC, solunumunda oksidasyonu fosforilasyondan ayırarak elektron transferini engeller. Bunun sonucunda ADP'nin ATP'ye dönüşümü engellenmiş olur. ATP'ye dönüştürülemeyen enerji ısı şeklinde açığa çıkarak hücrede ısısının artmasına ve bunun sonucunda hipertermiye neden olur (Judah 1952, Ilivicky ve Casida 1969, Moreland 1980). Hücrenin ısısız dengesinin bozulması ile hücrede faaliyet gösteren birçok enzim etkilenecektir. Ortam sıcaklığı enzimin optimum çalışma sıcaklığından yüksek olduğu durumlarda enzimlerde aktivite kayıplarının gözlenmesi beklenebilir bir sonuç olacaktır. Bu durumda artan hücre sıcaklığı HK gibi hücrede görevli birçok enzimde aktivite kayıplarına neden olabilir. HK enziminin çalışmasına bakıldığında enzimin işlevini yerine getirebilmesi için ortamdaki ATP derişiminin yeterli düzeyde olması gerektiği görülür. HK enzime substrat bağlanması için enzimin katalitik bölgesine glukozla birlikte ATP molekülünün bağlanması gereklidir (Aleshin ve ark. 1998). Bu nedenle ATP üretimindeki azalma HK enziminin aktivitesinde kayıplara yol açabilir.

DNOC kromozomlar üzerine etkili olabilmekte ve hücrenin genetik içeriğine zarar verebilmektedir. Hrelia ve ark. (1994) DNOC'un sıçanların kemik iliği hücrelerinde yapısal kromozom hasarlarını arttırdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte DNOC DNA'da zincir kırılmalarına da neden olmaktadır (Grilli ve ark. 1991). Bunlar gibi kromozom hasarları da hücrede bazı enzimlerin transkripsiyon düzeylerinde azalmalara neden olarak aktivite kayıpları oluşturabilirler.

Den Tonkelaar ve ark. (1983) DNOC uygulaması ile yağ katabolizmasının bir belirteci olan ketonların arttığını, kan protein değerlerinin ve kan pirüvatının azaldığını

bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçların nedenlerinden birinin DNOC'un glikolizis üzerindeki inhibitör etkisi olabileceğini öne sürmüşlerdir. DNOC'un glikolizis üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olması temel olarak hücrelerde HK aktivitesinde bir azalmaya neden olacaktır.

DDVP ve DNOC uygulanan deney gruplarında LDH aktivitesine bakıldığında bu maddelerin HK üzerinde oluşturduğu etkiye benzer değişimler görülmektedir.

Hücrede meydana gelen glukoz katabolizması ortamdaki oksijen yoğunluğuna bağlı olarak iki yolla gerçekleşmektedir. Hem oksijenli hem de oksijensiz solunumun temelinde glikoliz yatmaktadır. Oksijenli solunumda glikolizden sonra oluşan pirüvat krebs döngüsü ve elektron taşıma sistemi kullanılarak enerjiye dönüştürülür. Oksijensiz solunumda ise glikoliz sonrasında oluşan pirüvat LDH enzimi yardımıyla laktata dönüştürülerek  $\text{NADH}+\text{H}^+$ 'ın yükseltgenmesi sağlanır. Çalışmamızda DNOC ile muamele edilen sıçanlarda LDH aktivitelerine bakıldığında HK enzimiyle paralel şekilde bir aktivite kaybı gözlenmiştir (Şekil 3.3, 3.4). HK enziminin tüm bu tepkimelerin en başında bulunduğu düşünüldüğünde HK enzimde oluşacak aktivite kayıplarının zincirleme bir şekilde tüm enzim aktivitelerinde azalmaya neden olması beklenebilir bir sonuç olacaktır.

DDVP uygulanan grupta ise artan HK aktivitesin paralel olarak LDH aktivitesinde de artış gözlenmiştir. DDVP'nin solunum üzerine bronş spazmı, bronş salgılarında artış, solunum düzensizlikleri ve solunum yetmezliği gibi etkileri bulunmaktadır (Ikeda ve ark. 1990, ATSDR 1997). Vücuda ve dolayısıyla hücrelere yeterli oksijenin alınamaması, hücrelerde oksijensiz solunumun hızlanması neden olacaktır. Çalışmamızda bulduğumuz LDH enzim aktivitesindeki artış yetersiz solunumdan dolayı artabilecek oksijensiz solunum hızı ile açıklanabilir. HK enziminde de meydana gelen aktivite artışı da artan oksijensiz solunum için gerekli olan substratın karşılanmasını sağlayabilir.

**KAYNAKLAR**

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1995. Toxicological Profile for Dinitrocresols. U.S. Government Printing Office, Atlanta.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1997. Toxicological Profile for Dichlorvos. U.S. Government Printing Office, Atlanta.

AISTON, S., TRINH, K.Y., LANGE, A.J., NEWGARD, C.B., AGIUS, L. 1999. Glucose-6-phosphatase Overexpression Lowers Glucose 6-phosphate and Inhibits Glycogen Synthesis and Glycolysis in Hepatocytes without Affecting Glucokinase Translocation. *J. Biol. Chem.*, 274 (35):24559-24566.

AKGÜR, S.A., ÖZTÜRK, P., SÖZMEN, E.Y., DELEN, Y., TANYALÇIN, T., EGE, B. 1999. Paraoxonase and Acetylcholinesterase Activities in Humans Exposed to Organophosphorous Compounds. *J. Toxicol. Environ. Health*, 58:469-74.

ALBER, M., BOEHM, H.B., BRODESSER, J. 1989. Determination of Nitrophenols in Rain and Snow. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 334:540-545.

ALESHIN, A., ZENG, C., BARTUNIK, H., FROMM, H., HONZATKO, R. 1998. Regulation of Hexokinase1: Crystal Structure of Recombinant Human Brain Hexokinase Complexed with Glucose and Phosphate. *Journal of Molecular Biology*, 282:345-357.

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 1991. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 6th ed. Cincinnati.

AMVAC Chemical Corporation. 1990. HED Doc. No.008178. Guideline 83-1b EPA, Washington, DC.

ATKINSON, R., ASCHMANN, S.M., AREY, J. 1992. Reactions of OH and NO<sub>3</sub> Radicals with Phenol, Cresols, and 2-nitrophenyl at 296 K. *Environ. Sci. Technol.*, 26:1397-1403.

BIEBER, W.D. 1995. Degradation and Metabolism of DNOC in Soil. SGS Natec Institut, study no.92-9633 (unpublished), Hamburg Germany..

BLAIR, D., HOADLEY, E.C., HUTSON, D.H. 1975. The Distribution of Dichlorvos in the Tissues of Mammals After its Inhalation or Intravenous Administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31:243-253.

BOEHRINGER MANNHEIM, GmbH, (1973) Biochemica Information I, Hexokinase (HK):113, Lactate Dehydrogenase (LDH): 121.

- BORK, P., SANDER, C., VALENCIA, A. 1993. Convergent Evolution of Similar Enzymatic Function on Different Protein Folds: the Hexokinase, Ribokinase, and Galactokinase Families of Sugar Kinases. *Prot. Sci.*, 2:31-40.
- BOYER, A.C., BROWN, L.J., SLOMKA, M.B., HINE, C.H. 1976. Inhibition of Human Plasma Cholinesterase by Ingested Dichlorvos: Effect of Formulation Vehicle. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 41 (2):389-394.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 50:249-253.
- BRADWAY, D.E., SHAFIK, T.M., LORES, E.M. 1977. Comparison of Cholinesterase Activity, Residue Levels, and Urinary Metabolite Excretion of Rats Exposed to Organophosphorus Pesticides. *J. Agric. Food Chem.*, 25 (6):1353-1358.
- BROADMEADOW, A. 1988. Technical DNOC: Preliminary Toxicity Study by Dietary Administration to F-344 Rats for Six Weeks (Life Science Research study no. 87/PTN 001/433). Eye, UK.
- BURKATSKAYA, E.N. 1965. Maximum Permissible Concentration of Dinitro-o-cresols in air. *Gig. Sanit.*, 30:34-37.
- CANKAYALI, I., DEMIRAG, K., ERIS, O., ERSOZ, B., MORAL, A.R. 2005. The Effects of N-acetylcysteine on Oxidative Stress in Organophosphate Poisoning Model. *Advances in Therapy*, 22:107-116.
- CÁRDENAS, M.L., CORNISH-BOWDEN, A., URETA, T. 1998. Evolution and Regulatory Role of the Hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1401:242-264.
- CASIDA, J.E., MCBRIDE, L., NIEDERMEIER, R.P. 1962. Metabolism of 2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate in Relation to Residues in Milk and Mammalian Tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 10 (5):370-377.
- CASTILLO, R.F., VICENTE A.F.J., ALICIA J., VERCESI, K.A.E. 1997. 4,6-Dinitro-o-cresol Uncouples Oxidative Phosphorylation and Induces Membrane Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29 (7):1005-1011.
- CHAMBERS, C.W., KABLER, P.W. 1964. Biodegradability of Phenols as Related to Chemical Structure. In: *Developments in Industrial Microbiology*. Vol. 5. New York: Plenum Press, (s) 85-93.
- CLARKE, A.R., ATKINSON, T., HOLBROOK J.J. 1989. From Analysis to Synthesis: New Ligand Binding Sites on the Lactate Dehydrogenase Framework. *Trends Biochem. Sci.*, 14:101-105.

CLARKE, A.R., WIGLEY, D.B., CHIA, W.N., BARSTOW, D.A., ATKINSON, T., HOLBROOK, J. 1986. Site-directed Mutagenesis Reveals Role of Mobile Arginine Residue in Lactate Dehydrogenase Catalysis. *Nature*, 324:699-702.

CLARKE, A.R., WILKS, H.M., BARSTOW, D.A., ATKINSON, T., CHIA, W.N., HOLBROOK, J.J. 1988. An Investigation into the Contribution Made by the Carboxylate Group of an Active Site Histidine- Aspartate Couple to Binding and Catalysis in Lactate Dehydrogenase. *Biochemistry*, 27:1617-1622.

CREMLYN, R.J. 1991. *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, p 105-157.

DELEN, N., DURMUŞOĞLU, E., GÜNCAN, A., GÜNGÖR, N., TURGUT, C., BURÇAK, A. 2005. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre Bildirisi. Ankara, 3-7 Ekim 2005, sayfa 629-648. Kongre Kitapçığı, Ankara.

DERE, E., BAKIR, S. ATALAY, A. 1995a. Malathion’un Fare (*Mus musculus*) Karaciğer Hekzokinaz, Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz, Malat Dehidrogenaz ve Laktat Dehidrogenaz Aktivitelerine Etkisi. *Tr. J. of Biology*, 19:19-27.

DERE, E., BAKIR, S. ATALAY, A. 1995b. Fare (*Mus musculus*) Böbrek ve İnce Bağırsak Hekzokinaz, Glukos-6-fosfat Dehidrogenaz, Malat Dehidrogenaz ve Laktat Dehidrogenaz Aktivitelerine Malathion’un Etkisi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 17 (3): 167-174.

DERE, E., POLAT, F. 2001. The Effect of Paraquat on the Activity of Some Enzymes in Different Tissues of Mice (*Mus musculus*- Swiss albino). *Turk. J. Biol*, 25:323-325.

Den TONKELAAR, E.M., van LEEUWEN, F.X.R., KUIPER, C. 1983. Semichronic Toxicity of DNOC in the Rat. *Med Fac Landbouww Rijksuniv.*, 48 (4):1015-1022.

DODDS, E.C., ROBERTSON, J.D. 1933. The Clinical Applications of Dinitro-o-cresol. *Lancet*, 2:1137-1139.

DONICOLA-SEOANE, A., ANDERSON, B.M. 1990. Purification and Characterization of Haemophilus Influenzae D-Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 265:3691-3696.

DRENT, M., COBBEN, N.A.M., HENDERSON, R.F., WOUTERS, E.F.M., van DIEIJEN-VISSER, M. 1996. Usefulness of Lactate Dehydrogenase and its Isoenzymes as Indicators of Lung Damage or Inflammation. *Eur. Respir. J.*, 9:1736-1742.

DUNIER, M., SIWICKI, A.K., DEMAEL, A. 1991. In Vitro Effects on Lymphocyte Proliferation and Phagocytosis and in Vivo Effects on Humoral Response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22 (1): 79-87.

DUTTARROY, A., ZIMLIKI, C.L., GAUTAM, D., CUI, Y., MEARS, D., WESS, J. 2004. Muscarinic Stimulation of Pancreatic Insulin and Glucagon Release is Abolished in M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Deficient Mice. *Diabetes*, 53: 1714-1720.

Environmental Canada. 2001. State of the Science Report for a Screening Health Assessment 4,6-Dinitro-o-cresol. Cas No: 534-52-1.

EPA. 1979. Water-related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants. Vol. II: Halogenated Aliphatic Hydrocarbons, Halogenated Ethers, Monocyclic Aromatics, Phthalate Esters, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Nitrosamines, Miscellaneous Compounds. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA-440/4-79-029B.

EVENTOFF, W., ROSSMANN, M.G., TAYLOR, S.S. 1977. Structural Adaptations of Lactate Dehydrogenase Isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:2677-2681.

EVERSE, J., KAPLAN, N.O. 1973. Lactate Dehydrogenases: Structure and Function. *Adv. Enzymol.*, 28:61-133.

FABREQUETTES, C. 1993. Pharmacokinetic Study After Single Cutaneous Applications in Rats. Centre International de Toxicologie, study no.10530/PAR. Evreux, France.

FAO Meeting Report No. PL/1965/10/1. 1965.

FAO/UNEP. 1992. Dichlorvos, Draft Decision Guidance Document. FAO/UNEP Joint Group of Experts in PIC, FAO, Rome.

FAUST, S.D., SUFFET, I.H. 1966. Recovery, Separation and Identification of Organic Pesticides From Natural and Potable Waters. *Residues Reviews*, 15:44-116.

FERRE, T., RIU, E., BOSCH, F., VALERA, A. 1996. Evidence from transgenic mice that glukokinase is rate limiting for glucoide utilization in the liver. *FASEB J.*, 10: 1213-1218.

FRITZ, P. 1965. Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase 5. A Regulatory Enzyme. *Science*, 150:364-366.

FROSLIE, A. 1973. Methaemoglobin Formation by Diamino Metabolites of DNOC and DNBP. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32:257-265.

FROSLIE, A., KARLOG, O. 1970. Ruminant Metabolism of DNOC and DNBP. *Acta Vet. Scand.*, 11:114-131.

GAJEWSKI, D. 1980. Acetylcholinesterase Activity in Several Rat Liver Cell Fractions After Repeated Poisoning with Some Organophosphates. *Acta Physiol Pol.*, 31 (5):575-580.

GALLO, M.A., LAWRYK, N.J. 1991. Organic Phosphorous Pesticides In: Hayes WJ, Laws ER eds, Handbook of Pesticide Toxicology, 2:990-1001.

GARCIA-REPETTO, R., MARTINEZ, D., and REPETTO, M. 1995. Malathion and Dichlorvos Toxicokinetics After the Oral Administration of Malathion and Trichlorfon. *Veterinary and Human Toxicology*, 37:306-309.

GARVIE, E. 1980. Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiol Rev.*, 44:106-139.

GASIEWICZ, T.A. 1991. Nitro Compounds and Related Phenolic Pesticides. In: Hayes W.J. Jr, & Laws E.R. Jr ed. Handbook of pesticide toxicology. San Diego, CA, Academic Pres, 3:1191-1269.

GILON, P., HENQUIN, J.C. 2001. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic  $\beta$ -cell Function. *Endocr. Rev.*, 22:565-604.

GIRARD, J., FERRE, P., FOUFELLE, F. 1997. Mechanisms by Which Carbohydrates Regulate Expression of Genes for Glycolytic and Lipogenic Enzymes. *Annu. Rev. Nutr.*, 17:325-352.

GORE R.C, HANNAH R.W, PATTACINI S.C. 1971. Pesticide Residues: Infrared and Ultraviolet Spectra of Seventy-six Pesticides. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 54 (5):1040-1081.

GOSSELIN, R.E., SMITH, R.P., HODGE, H.C. 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

GRIFFIN, H.G., SWINDELL, S.R., GASSON, M.J. 1992. Cloning and Sequence of the Gene Encoding L-Lactate Dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: Evolutionary Relationships Between 21 Different LDH Enzymes. *Gene*, 122:193-197.

GRIFFIN, L.D., GELB, B.D., WHEELER, D.A., DAVISON, D., ADAMS, V., McCABE, E.R. 1991. Mammalian Hexokinase 1: Evolutionary Conservation and Structure to Function Analysis. *Genomics*, 11:1014-1024.

GRILLI, S., ANCORA, G., RANI, P., VALENTI, A.M., MAZZULLO, M., COLACCI, A. 1991. In vivo Unwinding Fluorometric Assay as Evidence of the Damage Induced by Fenarimol and DNOC in rat-liver DNA. *J of Toxicol. and Environ. Health*, 34 (4):485-494.

GROMOV, L.A., SEREDI, P.I., SYROVATSKAIA, L.P., OVINOVA, G.V., FILONENKO, M.A. 1993. Free Radical Mechanisms of Memory Disorders of Toxic Origin and Experimental Therapy of the Condition. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, 4:24-26.



GTZ, German Agency for Technical Cooperation. 1997. The Work of Other Agencies and Organizations Relating to Prevention and Disposal of Obsolete and Unwanted Pesticide Stocks. In: Prevention and Disposal of Obsolete and Unwanted pesticide Stocks in Africa and the Near East. Second Consultation Meeting. FAO Pesticide Series, 5:17-21.

GUNDERSEN, K., JENSEN, H.L. 1956. A Soil Bacterium Decomposing Organic Nitro Compounds. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 6:100-114.

HAI, D.Q., VARGA, S.I., MATKOVICS, B. 1997. Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 117 (1):83-88.

HAMDI, Y.A., TEWFIK, M.S. 1970. Degradation of 3,5-dinitro-*o*-cresol by Rhizobium and Azotobacter species. *Soil Biol. Biochem.*, 2:163-166.

HANNIG, C., ATTIN, T., HANNIG, M., HENZE, E., BRINKMANN, K., ZECH, R. 2004. Immobilisation and Activity of Human  $\alpha$ -amylase in the Acquired Enamel Pellicle. *Archives of Oral Biology*, 49:469-475.

HARIHARAN, N., FARRELLY, D., HAGAN, D., HILLYER, D., ARBEENY, C., SABRAH, T., TRELOAR, A., BROWN, K., KALINOWSKI, S., MOOKTIAR, S. 1997. Expression of Human Hepatic Glucokinase in Transgenic Mice Liver Results in Decreased Glucose Levels and Reduced Body Weight. *Diabetes*, 46:11-16.

HARLIN, K.S., DELLINGER, J.A. 1993. Retina, Brain and Blood Cholinesterase Levels in Cats Treated With Oral Dichlorvos. *Vet. Hum. Toxicol.*, 35 (3):201-203.

HART, K.W., CLARKE, A.R., WIGLEY, D.B. 1986. A Strong Carboxylate-arginine Interaction is Important in Substrate Orientation and Recognition in Lactate Dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 914:294-298.

HARVEY, D.G. 1953. The Toxicity of the Dinitro-cresols: Part II: The Formation and Toxic Properties of Some Nitro Compounds Derived From Meta- and Para-Cresols. *J. Pharm. Pharmacol.*, 5:497-510.

HATHAWAY, G.J., PROCTOR, N.H., HUGHES, J.P., AND FISCHMAN M.L. 1991. Proctor and Hughes' Chemical Hazards Of The Workplace. 3rd ed., NY: Van Nostrand Reinhold, New York.

HAWLEY, G.G. 1981. The Condensed Chemical Dictionary. 10th ed. Von Nostrand Reinhold, New York.

HAYES, A.L., WISE, R.A., WEIR, F.W. 1980. Assessment of Occupational Exposure to Organophosphates in Pest Control Operators. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 41 (8):568-575.

HAYES, W.J., Jr. 1982 . Pesticide Studies in Man. Baltimore: Williams and Wilkins, s. 343-351.

HINZ, V., GREWING, S., SCHMIDT, B.H. 1996. Metrifonate and Dichlorvos: Effects of Single Oral Administration on Cholinesterase Activity in Rat Brain and Blood. *Neurochem. Res.*, 21:339-345.

HODGSON, E., CASIDA, J.E. 1962. Mammalian Enzymes Involved in the Degradation of 2,2-dichlorovinyl Dimethylphosphate. *J. Agric. Food Chem.*, 10 (3):208-214.

HODGSON, E., LEVI, P.E. 1996. Pesticides: an Important But Under Used Model for Environmental Health Sciences. *Environ. Health. Perspect.*, 104:97-106.

HOLBROOK, J.J., LILJAS, A., STEINDEL, S.J., ROSSMANN, M.G. 1975. Lactate Dehydrogenase. In: PD Boyer, ed. *The Enzymes*. 3rd ed Vol 11. New York; Academic Press, p191- 292.

HOLLINGWORTH, R.M. 2001. Inhibitors and Uncouplers of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. In: Krieger RI, editor. *Handbook of Pesticide Toxicology, Agents*. San Diego: Academic Press p. 1169–261.

HOPE, R.L., MULLEE, D.M., BARTLETT, A.J. 1995. Analytical DNOC and Technical DNOC. Determination of General Physico-Chemical Properties. Safepharm Laboratories study no. 764/001 (unpublished) Safepharm Analytical Chemistry Laboratory, Derby, UK.

HORSFALL, J.G. 1956. *Pesticides of Fungicidal Action*. Waltham, MA: Chronica Botanica Co.

HOWARD P.H. 1991. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. Vol. III. Lewis Publishers, Chelsea, MI, p 251-258.

HOWARTH, R., TREMAIN, SP., BARTLETT, AJ. 1995. Technical DNOC (batch number 547–108). Determination of Vapour Pressure. Safepharm Laboratories study no. 764/002 (unpublished) Derby, UK.

HRELIA P., VIGAGNI F., MAFFEI F., MOROTTI M., COLACCI A., PEROCCO P., GRILLI S., CANTELLI-FORTI G. 1994. Genetic Safety Evaluation of Pesticides in Different Short-term Tests. *Mutat. Res.*, 321 (4):219-228.

HSDB. 1996. Hazardous Substance Data Bank. National Library of Medicine, National Toxicology Program. Bethesda.

HUNTER, D. 1950. Dinitro-ortho-cresol. In: *Devices for the Protection of the Worker*. *Br. Med. J.*, 1:1509-512.

HURLE, K., RADEMACHER, B. 1970. Untersuchungen Ueber den Einfluss Landjaehrig Weiderholter Anwendung von DNOC und 2,4-D auf Ihren Abbau im Boden. Weed Research, 10:159-164.

HUTSON, D.H., HOADLEY, E.C. 1972a. The Comparative Metabolism of <sup>14</sup>C-vinyl-Dichlorvos in Animals and Man. Arch. Toxikol., 30:9-18.

HUTSON, D.H., BLAIR, D., HOADLEY, E.C., PICKERING, B.A. 1971. The Metabolism of <sup>14</sup>C-Vapona<sup>R</sup> in Rats After Administration by Oral and Inhalation Routes. Toxicol. Appl. Pharmacol., 19:378-379.

HUTSON, D.H., HOADLEY, E.C. 1972b. The Metabolism of <sup>14</sup>C-methyl- Dichlorvos in the Rat and Mouse. Xenobiotica, 2 (2):107-116.

IKEDA, T., KOJIMA, T., YOSHIDA, M., TAKAHASHI, H., TSUDA, S., SHIRASU, Y. 1990. Pretreatment of Rats with an Organophosphorus Insecticide, Chlorfenvinphos, Protects against Subsequent Challenge with the Same Compound. Toxicological Sciences, 14 (3): 560-567.

ILIVICKY, J., CASIDA, J.E. 1969. Uncoupling action of 2,4-dinitrophenols, 2-trifluoromethylbenimidazols and Other Pesticide Chemicals Upon Mitochondria from Different Sources and its Relation to toxicity. Biochem. Pharmacol., 18:1389-1401.

IWATA, S., KAMATA, K., MINOWA, T., OHTA, T. 1994. R States in the Crystals of Bacterial L-Lactate Dehydrogenase Reveal the Mechanism for Allosteric Control. Nat. Struct. Biol., 1:176-185.

JENSEN, H.L., GUNDERSEN, K. 1955. Biological Decomposition of Aromatic Nitro-compounds. Nature, 15 (4451):341.

JONGERIUS, O., JONGENELEN, F.J. 1991. Criteria Document for an Occupational Exposure Limit Value of 4,6-dinitro-*o*-cresol (CAS 534-52-1). Commission of the European Communities, Directorate General Employment, Industrial Relations and Social Affairs, Health and Safety Directorate, Industrial Medicine and Hygiene Unit. SEG/CDO/29.1992, Luxembourg.

JUDAH, J.D. 1952. Mode of Action of the Nitrophenols. Proc. R. Soc. Med., 45:574.

JULKA, D., PAL, R., GILL, K.D. 1992. Neurotoxicity of dichlorvos: Effect on Antioxidant Defense System in the Rat Central Nervous System. Experimental and Molecular Pathology, 56 (2):144-152.

KALTNER, H., ANDRAE, S., WITTMANN, J. 1993. Activity of Cholinesterase in the Japanese Quail Embryo. Effects of Dichlorophos on the Embryonic Development. Biochem. Pharmacol., 47 (1):87-92.

KAPLAN, N.O. 1964. Lactate Dehydrogenase Structure and Function. Brookhaven Symp. Biol., 17:131-153.

- KAYA, B., YANIKOGLU, A., CREUS, A., MARCOS, R. 2000. Genotoxicity Testing of Five Herbicides in the *Drosophila* Wing Spot Test. *Mutat. Res.*, 465:77-84.
- KAUFMAN, D.D. 1976. Phenols Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action. Volume 2. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, Inc. p 665-707.
- KELLY T.J, MUKUND R, SPICER C.W. 1994. Concentrations and Transformations of Hazardous Air Pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 28:378-387.
- KELLY, J. 1995. DNOC: 13-week Oral (Dietary Administration) Range-finding Study in the Mouse. Corning Hazelton project no. CHE 1151/8 (unpublished), Harrogate, UK.
- KHAAN, A.A., COPPOCK, R.W., SCHULER M.M., LILLIE, L.E. 1988. In Vitro and in Vivo Effects of Dichlorvos on Blood Cholinesterase Activities of Cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 49 (7):1184-1187.
- KINCANNON, D.F., LIN, Y.S. 1985. Microbial Degradation of Hazardous Wastes by Land Treatment. *Proceedings of the Industrial Waste Conference.*, 40:607-619.
- KRECZKO, S., ZWIERZ, K., JAROSZEWICZ, K. 1974. Glycoprotein Biosynthesis by the Guinea Pig Liver in Chronic 4,6-dinitro-*o*-cresol Poisoning. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 25 (3):167-171.
- KUPFER, D. 1975. Effects of Pesticides and Related Compounds on Steroidal Metabolism and Function. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 4:83-124.
- KUSER, P.R., KRAUCHENCO, S., OCTAVIO A., ANTUNES, C., POLIKARPOV, I. 2000. The High Resolution Crystal Structure of Yeast Hexokinase PII with the Correct Primary Sequence Provides New Insights into Its Mechanism of Action. *The Journal of Biological Chemistry.*, 275 (27):20814-20821.
- KUZNETSOV, A.V., GNAIGER, E. 2003. Laboratory Protocol Lactate Dehydrogenase Cytosolic Marker Enzyme. *Mitochondrial Physiology Network* 8 (18):1-7.
- LAMOREAUX R.F, NEWLAND L.W. 1978. The Fate of Dichlorvos in Soil. *Chemosphere*, 10:807-814.
- LARTIGES S., GARRIGUES P. 1995. Determination of Organophosphorus and Organonitrogen Pesticides in Water and Sediments by GC-NPD and GC-MS. *Analisis*, 21:157-165.
- LATIF, S., HAKEN, J.K., WAINWRIGHT, S. 1984. Gas Chromatographic Analysis of Insecticidal Preparations Using Carbon Dioxide Propellants. *J. Chromatogr.*, 287:77-84.
- LAWS, E.R., Jr. 1966. Route of Absorption of DDVP After Oral Administration to Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 8:193-196.

LEEGWATER, D.C., GREEF, V.D.J., BOS, K.D. 1982. Integrated Studies on the Metabolic Fate of DNOC. II. Biotransformation in Mammals. Med. Fac. Landbouww Rijksuniv Gent., 47 (1):401-408.

LEUENBERGER, C., CZUCZWA, J., TREMP, J. 1988. Nitrated Phenols in Rain: Atmospheric Occurrence of Phototoxic Pollutants. Chemosphere, 17:511-515.

LI, Q., NAGAHARA, N., TAKAHASHI H., TAKEDA, K., OKUMURA, K., MINAMI, M. 2002. Organophosphorus Pesticides Markedly Inhibit the Activities of Natural Killer, Cytotoxic T Lymphocyte and Lymphokine-Activated Killer: a Proposed Inhibiting Mechanism Via Granzyme Inhibition. Toxicology, 172 (3):181-190.

LOEFFLER, J.E., POTTER, J.C., SCORDELIS, S.L., HENDRICKSON, H.R., HUSTON, C.K., PAGE, A.C. 1976. Long-term Exposure of Swine to a <sup>14</sup>C-Dichlorvos Atmosphere. J. Agric. Food Chem., 24 (2): 367-371.

LOTT, J.A., NEMENSANSZKY, E. 1987. Lactate Dehydrogenase. Clinical Enzymology, A Caseoriented Approach. 213-244.

LOWES, W., WALKER, M., ALBERTI, K.G., AGIS, L. 1998. Hexokinase Isoenzymes in Normal and Cirrhotic Human Liver: Suppression of Glucokinase in Cirrhosis. Biochim Biophys Acta., 1379:134-142.

LUCIC, A., BRADAMANTE, V., RADIC, B., PERAICA, M., DOMIJAN, A.M., FUCHS, R., STAHLJENIĆ-RUKANIĆ, A. 2002. The Effect of Dichlorvos Treatment on Butyrylcholinesterase Activity and Lipid Metabolism in Rat. Arh. Hig. Rada. Toxicol., 53 (4):275-281.

LUK'IANCHUK, V.D. 1983. Molecular Mechanisms of Interaction Between Blood Serum Albumin and Dinitroorthocresol. Voprosy Meditsinskoi Khimii., 29 (2):8-11.

LUTY, S., LATUZYNSKA, J., HALLIOP, J., TOCHMAN, A., OBUCHOWSKA, D., PRZYLEPA, E., KORCZAK, E., BYCHAWSKI, E. 1998. Toxicity of dermally absorbed dichlorvos in rats. Ann. Agric. Environ. Med. 5:57-64.

MAJEWSKI, T., PODGORSKI, W., MICHALOWSKA, R. 1979. Retention of Dichlorvos (DDVP) in Rabbits. Pol. Arch. Weter., 21 (2):249-255.

MAYR, U., HENSEL, R., KANDLER, O. 1980. Factors Affecting the Quaternary Structure of the Allosteric L-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus curvatus* as Investigated by Hybridization and Ultracentrifugation. Eur. J. Biochem., 110:527-538.

McCORMICK, N.G., FEEHERRY, F.E., LEVINSON, H.S. 1976. Microbial Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and Other Nitroaromatic Compounds. Appl. Environ. Microbiol., 31:949-958

McDONALD, R., STEITZ, T., ENGELMAN, D. 1979. Yeast Hexokinase in Solution Exhibits a Large Conformational Change Upon Binding Glucose or Glucose 6-Phosphate. *Biochemistry*, 18:338-342.

McHENERY, J.G., FRANCIS, C., DAVIES I.M. 1996. Threshold Toxicity and Repeated Exposure Studies of Dichlorvos to the Larvae of the Common Lobster (*Homarus gammarus* L.). *Aquatic Toxicology*, 34 (3):237-251.

McKENZIE, D., HENDERSON, R.A. 1983. Elektrophoresis of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes. *Clin. Chem.*, 29:189-195.

MEGLASSON, M.D., MATSCHINSKY, F.M. 1984. New Perspectives on Pancreatic Islet Glucokinase. *Am. J. Physiol.*, 246 (1):1-13.

MELNIKOV, N.N. 1971. Chemistry of Pesticides. *Residue Rev.*, 36:310-311.

MENZIE, C.M. 1972. Fate of Pesticides in the Environment. *Ann. Rev. Entomol.*, 17:199-222.

MERCK. 1989. Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11th ed. Budavari S, ed. Merck & Co., Inc., Rahway, NJ.

MODAK, A.T., STAVINOHA, W.B., WEINTRAUB, S.T. 1975. Dichlorvos and the Cholinergic System: Effect on Cholinesterase and Acetylcholine and Choline Contents of Rat Tissues. *Arch. Int. de Pharmacodyn. Et de The.*, 217:293-301.

MOGENSEN, B.B., SPLIID, N.H. 1995. Pesticides in Danish Water Courses: Occurrence and Effects. *Chemosphere*, 31 (8):3977-3990

MORELAND, D.E 1980. Effects of Toxicants on Oxidative Phosphorylation. In: Hodgson E, Guthrie FE eds. *Introduction to Biochemical Toxicology*. New York, Elsevier, p 245-260.

MOSS, D.W., HENDERSON, A.R. 1986. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd edn. Philadelphia, Saunders Co., p 735-896.

NISWENDER, K.D., SHIOTA, M., POSTIC, C., CHERRINGTON, A.D., MAGNUSON, M.A. 1997. Effects of Increased Glucokinase gene Copy Number on Glucose Homeostasis and Hepatic Glucose Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 272 (36):22570-22575.

NOVOA, W.B., SCHWERT, G.W. 1961. Lactic Dehydrogenase. VIII. Binding of Oxamate and of Oxalate by Enzyme Coenzyme Complexes. *J. Biol. Chem.*, 236:2150-2153.

PAGE, A.C., de VRIES, D.M., YOUNG, R., LOEFFLER, J.E. 1971. Metabolic Fate of Ingested Dichlorvos in Swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30:19-27.

- PALMER, T. 1990. Tıp ve Fen Bilimleri Öğrencileri İçin Enzim Bilgisi. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul. s 100-102.
- PARKER, V.H., BARNES, J.M., DENZ, F.A. 1951. Some Observations on the Toxic Properties of 3,5-dinitro-o-cresol. Br. J. Industr. Med., 8:226-235.
- PARMEGGIANI, L. 1983. Encyclopedia of Occupational Health and Safety. Vol. 2. International Labour Organization, Geneva.
- PARVEEN, N., KUMAR, S. 2001. Effect of DDVP on the Histology and ACHE Kinetics of Heart Muscles of *Rattus norvegicus*. Int. J. Toxicol., 24 (2):79-86.
- PAULINO, C.A., GUERRA, J.L., OLIVEIRA, G.H., PALERMONETO, J. 1996. Acute, Subchronic and Chronic 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Intoxication in Rats. Veterinary and Human Toxicology, 38:348-352.
- PETER, J.V., CHERIAN, A.M. 2000. Organic Insecticides. Anaesth. Intensive Care, 28:11-21.
- PODSTAWKA, U. 1994. Toxic Effects of Dichlorvos on Neutrophils of Human Peripheral Blood in Vitro. Roczn. Panstw. Zakl. Hig., 45:119-123.
- POLLARD, A.B., FILBEE, J.F. 1951. Recovery After Poisoning with Di-nitro-ortho-cresol. Lancet, 2:618-619.
- POURNOURMOHAMMADI, S., FARZAMI, B., OSTAD, S.N., AZIZI, E., ABDOLLAHI, M. 2005. Effects of Malathion Subchronic Exposure on Rat Skeletal Muscle Glucose Metabolism. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:191-196.
- QUAGHEBEUR, D., de SMET, B., de WULF, E., STEURBAUT, W. 2004. Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997–2001. J. Environ. Monit., 6:182-190.
- RAINA, R., SRIVASTAVA, A.K., MALIK, J.K. 1990a. Effects of Repeated Topical Application of Dichlorvos on Blood Enzymes and its Toxicity in Buffalo Calves (*Bubalus bubalis*). Br. Vet. J., 146 (3):264-269.
- RAINA, R., SRIVASTAVA, A.K., MALIK, J.K. 1990b. The Influence of Repeated Oral Administration of Dichlorvos on Circulating Esterases in Buffalo Calves (*Bubalus bubalis*). Vet. Hum. Toxicol., 32(6):577-579.
- RATH, S., MISRA, B.N. 1981. Toxicological Effects of Dichlorvos (DDVP) on Brain and Liver Acetylcholinesterase (AChE) Activity of *Tilapia mossambica*, Peters. Toxicology, 19 (3):239-245.
- REIGART, J.R., ROBERTS, J.R. 1999. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. Fifth Edition. United States Environmental Protection Agency. EPA 735-R-98-003, Washington D.C., s 37-38.

RISHI, K.K., SUNITA, G. 1995. Chromosome Aberration Test for the Insecticide, Dichlorvos, on Fish Chromosomes. *Mutation Research. Genetic toxicology*, 344;1-4.

ROMERO-NAVARRO, G., LOPEZ-ACEVES, T., ROJAS-OCHOA, A., MEJIA, C.F. 2006. Effect of Dichlorvos on Hepatic and Pancreatic Glucokinase Activity and Gene Expression, and on Insulin mRNA Levels. *Life Sciences* 78;1015-1020.

ROSENSTOCK, L., KEIFER, M., DANIELL, W.E., McCONNELL, R., CLAYPOOLE, K. 1991. Chronic Central Nervous System Effects of Acute Organophosphate Pesticide Intoxication. *Lancet*, 338:223-227.

SARIN, S., GILL, KD. 1997. Biochemical and Behavioral Deficits in Adult Rat Following Chronic Dichlorvos Exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59 (4):1081-1086.

SCHULZE, I., COLOWICK, S. 1969. Modification of Yeast Hexokinases by Proteases and Its Relationship to the Dissociation of Hexokinase into Subunits. *J Biol Chem* 244: 2306-1969.

SEIFERT, J. 2001. Toxicologic Significance of the Hyperglycemia Caused by Organophosphorous Insecticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67:463-469.

SINGH, M., SANDHIR, R., KIRAN, R. 2006. Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Toxicological Evaluation of Commonly Used Organophosphate Pesticides. *Indian J. Exp. Biol.*, 44:580-583.

SMITH, C.H., KISSANE, J.M. 1963. Distribution of Forms of Lactic Dehydrogenase within the Developing Rat Kidney. *Dev. Biol.*, 19:151-164.

SPENCER, H.C., ROWE, V.K., ADAMS, E.M. 1948. Toxicological Studies on Laboratory Animals of Certain Alkyl Dinitrophenols Used in Agriculture. *J. Ind. Hygiene. Toxicol.*, 30:10-25.

SPIELMANN, H., ERICKSON, R., AND EPSTEIN, C. 1973. The Separation of Lactate Dehydrogenase X from Other Lactate Dehydrogenase Isoenzymes of Mouse Testes by Affinity Chromatography. *FEBS Lett.*, 35;19.

STAMBAUGH, R., and BUCKLEY, J. 1967. The Enzymic and Molecular Nature of the Lactic Dehydrogenase Subbands and X4 Isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 242:4053-4059.

SULTATOS, L.G. 1994. Mammalian Toxicology of Organophosphorus Pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health*, 43:271-289.

TAKAHASHI, K.L., HOJO, H., AOYAMA, H., TERAMOTO, S. 2003. Effects of Dinoseb, 4,6-dinitro-o-cresol, and 2,4-dinitrophenol on Rat Sertoli-germ Co-cultures. *Reproductive Toxicology Japan*, 17:247-252.



TAKAHASHI, K.L., HOJO, H., AOYAMA, H., TERAMOTO, S. 2004. Comparative Effects on the Spermatotoxic Effects of Dinoseb and its Structurally Related Chemicals. *Reproductive Toxicology Japan*, 18:581-588.

TAKAHASHI, K.L., HOJO, H., AOYAMA, H., TERAMOTO, S. 2006. Pathogenetic Transition in the Morphology of Abnormal Sperm in the Testes and the Caput, Corpus and Cauda Epididymis of Male Rats After Treatment with 4,6-dinitro-o-cresol. *Reproductive Toxicology Japan*, 22 (3): 501-507.

TAPPY, L., DUSSOIX, P., LYNEDJIAN, P., HENRY, S., SCHNEITER, P., ZAHND, G., JEQUIER, E., PHILIPPE J. 1997. Abnormal Regulation of Hepatic Glucose Output in Maturity-onset Diabetes of the Young Caused by a Specific Mutation of the Glucokinase Gene. *Diabetes*, 46 (2):204-208.

TEICHERT-KULISZENWSKA, K., LAWECKI, J., SZYMCZYK, T. 1981. Glycemia and Insulinemia Resulting from Dichlorvos Intoxication. *Acta Med. Pol.*, 22 (4):303-308.

TEICHERT-KULISZENWSKA, K., SZYMCZYK, T. 1978. Changes in Rat Carbohydrate Metabolism After Acute and Chronic Treatment With Dichlorvos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 37 (2): 79-83.

TEICHERT-KULISZENWSKA, K., SZYMCZYK, T., CONSOLO, S., LADINSKY, H. 1976. Effect of Acute and Chronic Treatment with Dichlorvos on Rat Brain Cholinergic Parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 35 (1):77-81.

TEWFIK, M.S., EVANS, W.C. 1966. The Metabolism of 3,5-dinitro-o-cresol (DNOC) by Soil Micro-organisms. *Biochem J.*, 99:31-32.

TIL, H.P, KENGEN, M.T.F. 1980. Subacute (8-day) Dietary LC50 Study with DNOC in Japanese Quail. CIVO-TNO study no. R 6596 (unpublished). CIVO-TNO, Zeist, The Netherlands.

TOMLIN, C. 1997. *The Pesticide Manual, a Word Compendium*. 11th ed. Farnham, UK, British Crop Protection Council.

TREMP, J., CZUCZWA, J., LEUENBERGER, C. 1986. Nitrated Phenols in Rain. *ACS Symposium Series*, 26:142-143.

TREMP, J., MATTREL, P., GIGER, W. 1993. Phenols and Nitrophenols as Tropospheric Pollutants: Emissions from Automobile Exhausts and Phase Transfer in the Atmosphere. *Water, Air, Soil Pollution*, 68:113-123.

TSOI, S.C.M., LI, S.S.L. 1994. The Nucleotide and Deduced Amino-acid Sequences of a cDNA Encoding Lactate Dehydrogenase from *Caenorhabditis elegans*: The Evolutionary Relationships of Lactate Dehydrogenases From Mammals, Birds, Amphibian, Fish, Nematode, Plants, Bacteria, Mycoplasma, And Plasmodium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205:558-564.

TÜLÜCE, Y., ÇELİK, İ. 2002. Influence of Some Commercial Pesticides on Human and Bovine Erythrocyte Carbonic Anhydrase Enzymes (in vitro). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (1):27-29.

US EPA 1988. Health and Environmental Effects Profile for Dinitrocresols. Cincinnati, OH: US Environmental Protect Agency. NTIS PB88-220769.

van de BERG, L.J., JAGM, V.R., BRAGT, P.C., NOTTEN, W.R.F. 1991. Interactions of Halogenated Industrial Chemicals with Transthyretin and Effects on Thyroid Hormone Levels in vivo. Arch Toxicol, 65:15-19.

van der GREEF, J., LEEGWATER, D.C. 1983. Urine Profile Analysis by Field Desorption Mass Spectrometry, a Technique for Detecting Metabolites of Xenobiotics: Application to 3,5-dinitro-2-hydroxytoluene. Biological Mass Spectrometry, 10 (1):1-4.

van NOORT, H.R., MANDEMA, E., CHRISTENSEN, E.K.J. 1960. Dinitro-ortho-cresol Intoxication in Sprayers. Ned Tidschr Geneesk., 104:676-684.

VARO, I., NAVARRO, J.C., AMAT, F., AND GUILHERMINO, L. 2003. Effect of Dichlorvos on Cholinesterase Activity of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 75:61-72.

VELHO, G., PETERSEN, K.F. PERSEGHIN, G., HWANG, J.H., ROTHMAN, D.L., PUEYO, M.E., CLINE, G.W., FROGUEL, P., SHULMAN, G.I. 1996. Impaired Hepatic Glycogen Synthesis in Glucokinase-deficient (MODY-2) Subjects. J. Clin. Invest., 98 (8):1755-1761.

VESELL, S.E., BEARN, G.A. 1962. Variations in the Lactic Dehydrogenase of Vertebrate Erythrocytes. The J. of Gen. Physo., 45:553-565.

VICENTE, J.A.F., SANTOS, S.M., VERCESI, A.E., MADEIRA, V.M.C. 1998. Comparative Effects of the Herbicide Dinitro-o-cresol on Mitochondrial Bioenergetics. Pestic. Sci. (Great Britain), 54:43-51.

VONK, J.W., van der HOVEN, A. 1981. Degradation and Conversion of DNOC in Water. Adsorption of DNOC to Bottom Sludge. TNO Organisch Chemisch Institut, The Netherlands.

VOS, J.G., KRAJNC, E.I., BEEKHOF, P.K. 1983. Methods for Testing Immune Effects of Toxic Chemicals: Evaluation of The Immunotoxicity of Various Pesticides in the Rat. In: Proceedings of the 5th Pesticide Chemistry: Human Welfare in the Environment International Congress, 3:497-504.

WALLNOEFER, P.R., ZIEGLER, W., ENGELHART J. 1978. Transformation of Dinitrophenol Herbicide by *Azobacter* sp. Chemosphere, 12:967-972.

WARE, G.W. 1983. Pesticides. San Francisco: WH Freeman.

World Health Organization (WHO). 1989. Environmental Health Criteria Series 79, Dichlorvos. Geneva.

World Health Organization (WHO). 2000. Environmental Health Criteria Series 220. Dinitro-o-cresol. Geneva.

WILSON, J.E. 1995. Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 126:65-198.

WILSON, J.E. 1997. An introduction to the Isoenzymes of Mammalian Hexokinase Types I-III. *Biochem. Soc. Trans.*, 25:103-108.

WILSON, J.E. 2003. Isozymes of Mammalian Hexokinase: Structure, Subcellular Localization and Metabolic Function. *The Journal of Experimental Biology*, 206:2049-2057.

WINER, A.D., SCHWERT, G.W. 1959. Lactic Dehydrogenase. VII Fluorescence Spectra of Ternary Complexes of Lactic Dehydrogenase, Reduced Diphosphopyridine Nucleotide, and Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.*, 234:1155-1161.

WORTHING, C.R. 1983. *The pesticide manual: A world compendium*. 7th ed. British Crop Protection Council.

WOSTER, P.M. 2000. *Pharmaceutical Biochemistry; Enzymes - Kinetics and Catalysis*. Chapter 9; Marks and Smith p453-468.

WOZNIAK, J., GRABARCZYK, M. 1992. Erythro-toxicity of Dichlorvos and Possibility of its Modification in Vitro. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, 43 (4):317-323.

WRIGHT, A.S., HUTSON D.H., WOODER, M.F. 1979. The Chemical and Biochemical Reactivity of Dichlorvos. *Arch. Toxicol.*, 42:1-18.

YARSAN, E., ÇAKIR, O. 2006. Effects of Dichlorvos on Lipid Peroxidation in Mice on Subacute and Subchronic Periods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 86 (2):106-109.

ZINKHAM, W., BLANCO, A., KUPCHYK, L. 1964. Lactate Dehydrogenase in Pigeon Testes: Genetic Control by Three Loci. *Science*, 144:1353-1354.

**TEŞEKKÜRLER**

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirileriyle beni daima yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

İlgi ve desteği ile her konuda ve her zaman yanımda olan Sayın Aycan BİLİŞİK'e,

Tezin deney aşamasında yardımlarını gördüğüm Sayın Araş. Gör. Ferda ÖZDİKİCİOĞLU ve Sayın Olcay BAŞ'a,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli AİLEM'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Sakarya'da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Bandırma'da tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girdi ve 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı.