

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BRODİFACOU M'UN SIÇAN KARACİĞERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Ceren GENİŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2012**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BRODIFACOUM'UN SIÇAN KARACİĞERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ceren GENİŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nursel GÜL

Bu çalışmada Wistar sıçanların karaciğeri üzerine brodifacoum'un sitolojik etkileri ışık ve elektron mikroskopunda araştırıldı. Hayvanlar, kontrol grubu, 24 saat, 4 gün ve 7 gün brodifacoum uygulamalı dört gruba ayrıldı (n=5 her grupta). Dimetil sülfoksitle hazırlanan brodifacoum gastrik gavaj ile oral yoldan tek doz (0,2 mg/kg) olarak verildi. Karaciğer örnekleri 24 saat, 4 gün ve 7 gün sonra sıçanlardan alındı. Dokular tespit edildi, dehidre edildi, propilen oksite yerleştirildi ve Araldite CY212 gömme ortamına alındı. Dokuların ultramikrotomla yarı ince ve ince kesitleri alındı.

Işık mikroskobu incelemelerinde kontrol grubu sıçan karaciğerlerinin normal hücrelere ve sinüzoid yapısına sahip olduğu gözlemlendi. 24 saatlik brodifacoum uygulanmış sıçanlarla kontrol grubu sıçanların karaciğerlerinin benzer özellik gösterdiği tespit edildi. Zaman artışına bağlı olarak (4. günden 7. güne) brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerindeki hepatositlerin sitoplazmalarında materyal kaybı, lipit damlacıkları ve yoğun madde birikiminin olduğu tespit edildi.

Elektron mikroskobu incelemelerinde 24 saatlik brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerlerinde ışık mikroskopunun aksine bazı değişiklikler tespit edildi. Hepatositlerin sitoplazmasında vakuoller, kristalleri erimiş mitokondriler ve çekirdeklerinde kromatin yığımları tespit edildi. Aynı zamanda sinüzoidlerde sitoplazmik materyali azalmış eritrositler gözlemlendi. Dört günlük brodifacoum uygulanan sıçanların karaciğerlerinde çekirdek invaginasyonu, nükleusta kromatin materyalinin çevreye yerleşmesi, mitokondriyal kristallerin erimesi ve lizozomal yapılar gibi birçok ince yapısal değişiklikler meydana geldi. Diğer sıçan gruplarına göre yedi günlük brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerinde ağır hasarlı yapısal değişiklikler tespit edildi; karaciğer hepatositlerinde çok sayıda vakuol ve lipit damlacıkları, kristalleri erimiş mitokondriler, sisternaları genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum keseleri gibi bozukluklar gözlemlendi. Ayrıca hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yığılması, morfolojik invaginasyonlar gibi çekirdek anormallikleri tespit edildi. Bunun yanı sıra hemolize olmuş eritrositler, lipit damlacıkları ve madde birikimi bu grubun karaciğer sinüzoidlerinde gözlemlendi.

Sunulan bu çalışma brodifacoum'un sıçanların karaciğerlerinde hücresel anormalliklere sebep olduğunu gösterdi.

Ekim 2012, 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Brodifacoum, Sıçan, Antikoagulant, Karaciğer

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF BRODIFACOUM ON RAT LIVER

Ceren GENİŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Nursel GÜL

In this study, cytological effects of brodifacoum on the liver of Wistar rats were investigated by light and transmission electron microscopy. Animals were divided into four groups (n=5 in each group): Control group, 24 hours Brodifacoum-treated group, 4 days Brodifacoum-treated group, and 7 days brodifacoum-treated group. Brodifacoum prepared in dimethyl sulphoxide was orally administered to rats as a single dose (0.2 mg/kg) by gastric gavage. After 24 hours, 4 days and 7 days liver tissues were obtained from sacrificed rats. The tissues were fixed, dehydrated, placed into propylene oxide and embedded in araldite CY212. Semi-thin sections and thin sections of tissues were cut by ultramicrotome.

In light microscopic observations, it was determined that control groups have normal cells and normal sinusoid structure. After 24 hours the liver of brodifacoum-treated rats have similar properties with liver of control group rats. Accumulation of condensed matter and lipid droplets, loss cytoplasmic material cytoplasm of hepatocytes were determined in brodifacoum-treated rat liver depending on the increase in time (from 4 days to 7 days).

In contrast light microscopic observations, there are several ultrastructural changes were determined in 24th hours brodifacoum-treated liver cells in electron microscopic observations. Hepatocytes had vacuoles, mitochondria with melting cristae in their cytoplasm and clumping chromatin material in their nuclei. Also, the sinusoids of 24th hours brodifacoum-treated livers had contained erythrocytes with loss cytoplasmic material. Severe structural changes were observed in liver tissues 4th days brodifacoum-treated group than that of control group. There were several ultrastructural changes of hepatocytes in 4th days brodifacoum-treated rats liver such as invaginations and peripheral localization of chromatin material in nuclei, mitochondrial cristae melting and lysosomal structures etc. Heavy damages ultrastructural changes were determined in 7th days brodifacoum-treated rats liver than the other groups rats. It was observed that the liver hepatocytes had disordered organelles which are rough endoplasmic reticulum with dilated cisternae, mitochondria with melting cristae, numerous lipid droplets and vacuoles. Also, nucleus abnormalities were determined such as morphological invaginations and chromatin clumping in hepatocytes nuclei. In additionally, hemolyzed erythrocytes, large number of lipid droplets and material deposition in sinusoids in the liver this group were seen.

Presented study showed that the brodifacoum causes cellular abnormalities of rat liver.

October 2012, 45 pages

Key Words: Brodifacoum, Rat, Anticoagulant, Liver

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bana bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nursel GÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı); tez önerisinde teori kurmamızıda bize yol gösteren Sayın Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), kesit alınmasında tez çalışmamda katkısı olan İstanbul Üniversitesinde Sayın Prof. Dr. Hüsamettin BALKIS (İstanbul Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Sayın Araş. Gör. Dr. Aslı KANDİL (İstanbul Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) hocalarıma sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında bana manevi destek sağlayan Ahmet MUHAMMED'e, Merve KÖKSAL'a, Ebru DEMİREL'e ve Mert ÖZCAN'a da teşekkür ederim. Benden manevi ve maddi desteklerini esirgemeyen aileme saygıyla teşekkür ederim.

Ayrıca doku kesitlerinin preperasyonunda kullanılan kimyasal maddelerinin ve deney hayvanlarının alımında kısmi finansal destekleri için Ankara İleri Teknoloji Yatırımları A.Ş. (Ankara Üniversitesi Tekno Kenti) ve Eko-Zon Halk Sağlığı ve Çevre Danışmanlık şirketine teşekkür ederim.

Ceren GENİŞ

Ankara, Ekim 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1 Karaciğer	5
2.1.1 Sıçan karaciğeri.....	5
2.1.2 Karaciğerin pıhtılaşmadaki rolü.....	6
2.2 Antikoagulant rodentisitler.....	7
2.2.1 Antikoagulant rodentisitlerin tanımı ve gelişimi.....	7
2.2.2 Antikoagulant rodentisitlerin sınıflandırılması.....	8
2.2.3 Antikoagulant rodentisitlerin etkileri.....	9
2.3 Brodifacoum.....	11
2.3.1 Brodifacoum'un toksisitesi.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1 Deney hayvanlarının bakımı.....	14
3.2 Hayvanlara brodifacoum uygulanması.....	14
3.3 Elektron Mikroskobu ve Işık Mikroskobu.....	14
4. BULGULAR.....	16
4.1 Işık Mikroskobu Bulguları.....	16
4.2 Elektron Mikroskobu Bulguları.....	20
5. TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	45

KISALTMALAR DİZİNİ

VKOR	Vitamin K epoksid redüktaz
VK	Vitamin K
Glu	Glutamil
Gla	Glutamik asit
KH ₂	Vitamin K ₁ hidrokinon
DMSO	Dimetil sülfoksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Sıçan karaciğerinin anatomisi.....	5
Şekil 2.2 K Vitamininin kofaktör olarak görev yaptığı reaksiyon.....	7
Şekil 2.3 Birinci nesil ve ikinci nesil antikoagulant rodentisitlerin ilk kullanıldıkları tarihler ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.4 Antikoagulant rodentisitlerin toksik etkilerinin mekanizması.....	10
Şekil 2.5 Brodifacoum'un birincil yapısı ve atom numaraları.....	11
Şekil 4.1 Kontrol grubu sıçanların lobu	16
Şekil 4.2 Brodifacoum uygulanmış (24 saat) sıçanların karaciğer lobul görüntüsü.....	17
Şekil 4.3 Brodifacoum uygulanmış (24 saat) sıçanlar sinüzoidlerindeki Kupffer hücreleri.....	18
Şekil 4.4 Dört günlük deney grubu sıçanlardaki lobül yapısı.....	19
Şekil 4.5 Yedi günlük brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerindeki lobül yapısı.....	20
Şekil 4.6 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer dokusundaki hepatositler ve Kupffer hücreleri.....	21
Şekil 4.7 Kontrol grubu hepatosit görüntüsü.....	22
Şekil 4.8 Kontrol grubundaki karaciğer sinüzoidi.....	23
Şekil 4.9 Deney grubuna ait (24 saat işlem görmüş) hayvanların karaciğer dokusunda hepatosit görüntüsü.....	24
Şekil 4.10 24 saatlik deney grubuna ait hayvanların sinüzodi.....	25
Şekil 4.11 Brodifacoum uygulanmış 24 saatlik hayvanların karaciğer dokusunda Kupffer hücreleri.....	26
Şekil 4.12 Brodifacoum uygulanmış 4 günlük deney grubundaki hepatosit görüntüleri.....	27
Şekil 4.13 Dört günlük deney grubuna ait karaciğer.....	28

Şekil 4.14 Brodifacoum uygulanmış (4 günlük) hayvanların karaciğer dokusu görüntüsü.....	29
Şekil 4.15 Brodifacoum uygulanmış (4 günlük) deney grubunun karaciğeri.....	30
Şekil 4.16 Dört günlük brodifacoum uygulanan karaciğer örneği.....	31
Şekil 4.17 Brodifacoum uygulanmış 7 günlük karaciğer kesiti.....	32
Şekil 4.18 Brodifacoum uygulanmış 7 günlük deney grubunun karaciğer dokusu.	33
Şekil 4.19 Yedi günlük deney grubunda hepatositlerdeki çekirdek invaginasyonu.....	34
Şekil 4.20 Brodifacoum uygulanmış 7 günlük bireylerin hepatositlerindeki çekirdek invaginasyonu ve kromatin yığınları.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Memeli türleri için Brodifacoum'un akut oral toksitesi.....	12
Çizelge 2.2 Anticoagulantların yarılanma ömürleri.....	12

1. GİRİŞ

İnsanlar besin maddelerinin üretiminde, tüketiminde ve depolanmasında ekonomik kayıplara ve hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar ve haşerelere karşı uzun zamandan beri mücadele etmektedir. Bunun için kimyasal ve biyolojik ajanlar kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasalların insanlar ve diğer canlılar için oldukça toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Kimyasal olarak kullanılan pestisitler yeni tanımıyla biyosidal ürünlerin çevreye amaçsız, sınırsız ve kontrolsüz olarak atıldığı ileri sürülmüştür (Güler ve Çobanoğlu 1997, Ünal vd. 2010).

Dünya da ortalama olarak 2,5-3 milyon ton biyosidal ürünün kullanıldığı ve bunların çoğunlukla herbisit olmak üzere insektisit ve fungusitlerden oluştuğu tahmin edilmektedir.

Biyosidal ürünler etki ettiği canlıya göre;

İnsektisitler (böcekleri öldüren pestisitler),

Herbisitler (otları öldüren pestisitler),

Fungusitler (mantarları öldüren pestisitler),

Akarisitler (akarları öldüren pestisitler),

Nemasitler (nematodları öldüren pestisitler),

Molluskositler (yumuşakçaları öldüren pestisitler),

Rodentisitler (kemirgenleri öldüren pestisitler) olarak sınıflandırılabilirler (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Kemiricilerin halk sağlığına, ekonomik ve sosyal olarak etkileri vardır. Örneğin bir fare 8 kilo buğday tüketebilmektedir. Farelerin elektrik tellerini kemirerek zarar verdiği görülmüştür. İnsanlarda veba yayılımına yol açmaları, taşıdıkları pireler aracılığıyla tifüs yaymaları, idrarları ile patolojik bir bakteri cinsi olan *Salmonella* yiyeceklere bulaştırmaları şeklinde birçok hastalıklara neden olmaktadır (Güler ve Çobanoğlu 1994).

Kemiricilerin dünyada en hızlı çoğalan canlı türü olarak kabul edilmektedirler. Gebelik süresi 21-25 gün, 60-90 günde bir gebe kalabilirler ve 5-9 arasında yavru yavruladıkları için

çok hızlı çoğalırlar (Güler ve Çobanoğlu 1994). Rodent popülasyonunun kontrolü için 50 yılı aşkın bir süredir antikoagülant rodentisitler kullanılıyor (Berny vd. 2010).

Antikoagülant rodentisitler kanın pıhtılaşmasını önleyen maddelerdir. Pıhtılaşma faktörlerinin sentezi karaciğer hücresindeki granüllü endoplazmik retikulumla bağlı ribozomlarda gerçekleşir. Karaciğer hücreleri bu maddeleri sitoplazmalarında depolamaz, sürekli olarak kan dolaşımına verir (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

Pıhtılaşma faktörlerinden II, VII, IX ve X'un aktive olabilmesi için post-translasyonel gama karboksilasyonuna ihtiyaç vardır. Gama karboksilasyonunun gerçekleşebilmesi içinde vitamin K'nın redükte vitamin K'ya dönüşmesi gerekmektedir. Bu dönüşümü yapan enzim ise vitamin K epoksid redüktazdır (VKOR). Antikoagülant rodentisitler vitamin K epoksid redüktazı inhibe eder. Böylece pıhtılaşma faktörlerinin karboksilasyonu meydana gelmez ve kanın pıhtılaşması engellenir (Valchev vd. 2008) ve bu engelleme sonucu salgılanamayan pıhtılaşma faktörleri yüzünden rodentler kan kaybından ölürlere (Mosterd ve Thijssen 1991). Rodentlerin karaciğerlerinde incelendiği zaman antikoagülant kalıntılarına rastlanmıştır (Hadler ve Bukle 1992).

Rodentleri kontrol altında tutmak için ikinci nesil antikoagülantlardan bir rodentisit olan brodifacoum kullanılmaktadır (Littin vd. 2000, Broll vd. 2011, Buckle 2011). Brodifacoum 1970'lerin ortalarında geliştirilen güçlü bir ikinci nesil antikoagülant (süper warfarin grubu) rodentisittir. Karaciğer dokuları üzerine etkisi diğer antikoagülant rodentisitlere göre daha uzun sürelidir (Fisher vd. 2003). Brodifacoum gibi diğer süper warfarin rodentisitler warfarinden 100 kat daha zehirlidir ve dokulardaki yarılanma süresi daha uzundur (Lee vd. 2009). Brodifacoum(3-(3- 4'-bromobiphenyl -4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl-4-hydroxycoumarin) kimyasal formülüne sahip hidrofobik, yağda çözünen ve zehirli bir moleküldür. İnsan ve hayvanlarda brodifacoum K vitamininin sentezinde görev alan epoksid redüktaz (VKOR) enziminin inhibisyonuna neden olup iç kanamaya ve dolayısıyla canlı ölümlerine neden olur (Cort ve Cho 2009, Berthier vd. 2011).

Naz vd. (2011) brodifacoum verilen *Rattus rattus*'larda karaciğer, kalp, böbreklerinin ağırlıklarının kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Çöpçüoğlu (2009) Brodifacoumun 1-2 mg'lık dozunun pıhtılaşma bozukluğuna sebep olduğunu ve hayvanlara uygulanan K vitamininin bu bozukluğu ortadan kaldırdığını öne sürmüştür.

Yırtıcı kuşların rodentleri besin olarak kullandığı bilinmektedir. Doğaya bırakılan brodifacoumun sıçanları yemelerinden dolayı baykuşlara (*Otus asio* ve *Megascops asio*) dolaylı olarak etki ettiği ve öldürdüğü tespit edilmiştir (Naim vd. 2012).

Oldukça ölümcül bir Antikoagulant rodentisit olan brodifacoum, K vitamini antagonistidir. Brodifacoum dolaylı yoldan insanları da etkilemektedir. Onsekiz yaşındaki bir erkeğin ağır kanama bozukluğunun nedeninin brodifacoumdan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Park vd. 2011). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada araştırmacılar K vitamini tedavisine rağmen yine de birkaç ay kanama bozukluğunun devam ettiği ve bu nedenle brodifacoumun vücutta yarılanma ömrünün oldukça uzun sürdüğünü tespit etmişlerdir.

K vitamini döngüsünün tamamlanması için vitamin K₁ 2,3 epoksid redüktaz enziminin vitamin K₁ 2,3 epoksidi vitamin K₁ kinona çevirmesi gerekmektedir. Bu enzim ise oral antikoagulantlar tarafından inhibe edilir (Begent vd. 2001). Bruno vd. (2000), brodifacoumun tek dozunun bile vitamin K₁ döngüsünü inhibe ettiklerini bildirmekteler. İdrarında kan görülen 52 yaşındaki bir hastanın kanında 43 gr rodentisit bulunduğu rapor edilmiştir ve bu hastaya yüksek dozda oral olarak vitamin K₁ verildiğinde hastanın iyileştiği rapor edilmiştir.

Weitzel vd. (2012), kanama bozuklukları ile gelen hastalarda K vitamini eksikliğine bağlı pıhtılaşma faktörlerinin üretilmediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu hastalarda brodifacoumun yanlılıkla yenilmesi sonucunda başlayan deri kanamalarını hastalara yüksek dozda K vitamini vererek tedavi ettiklerini rapor etmişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasının amacı daha önceki araştırmalar doğrultusunda ikinci nesil antikoagulant rodentisitlerden brodifacoum'un sıçanların karaciğerine toksik etkisini hücresel yönden incelemektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

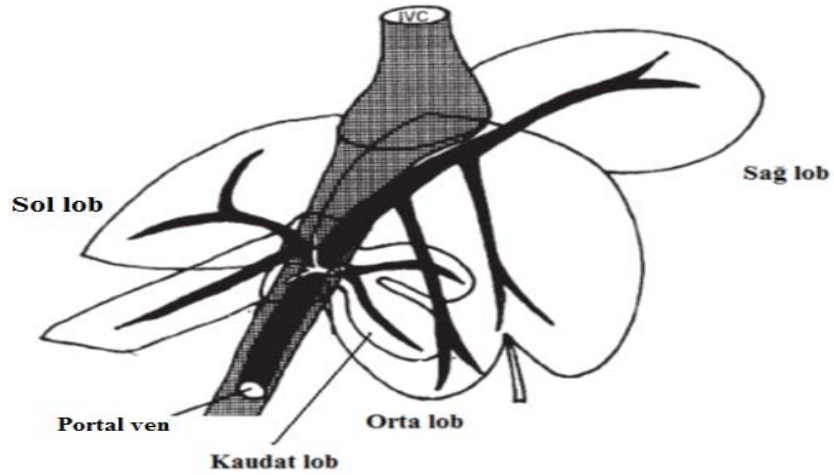
2.1 Karaciğer

2.1.1 Sıçan Karaciğeri

Karaciğer, karın boşluğunda sağ üst tarafta, diyafram ile sağ alt kostaların altında yerleşmiştir ve area nuda bölgesi dışında peritonla sarılı olarak bulunur. İç ve dış salgı yapar ve vücudun en büyük bezidir (Yurdakul vd. 2005).

Sıçan karaciğeri dört lobdan oluşur (Şekil 2.1) (Kogure vd. 1999). Bu lobüllerin ortasında santral ven ve periferinde hepatik triadlar vardır. Hepatositler santral venden ışınsal olarak trabeküller oluşturacak şekilde sıralanırlar. Bu hepatosit sıraları arasında Kuppfer hücreleri içeren sinüzoidler vardır (Brzoska vd. 2003).

Karaciğer sinüzoidleri, lobül kenarından vena centralise doğru kan akımı olan özel kapillerlerdir. Karaciğer hücreleri ile sinüzoidler arasında dar bir aralık (Disse aralığı) bulunur. Disse aralığı, karaciğer parankim hücreleri ile sinüzoidler arasında yoğun madde geçişinin gerçekleştiği bir aralıktır (Yurdakul vd. 2005).



Şekil 2.1 Sıçan karaciğerinin anatomisi (Kogure vd. 1999)

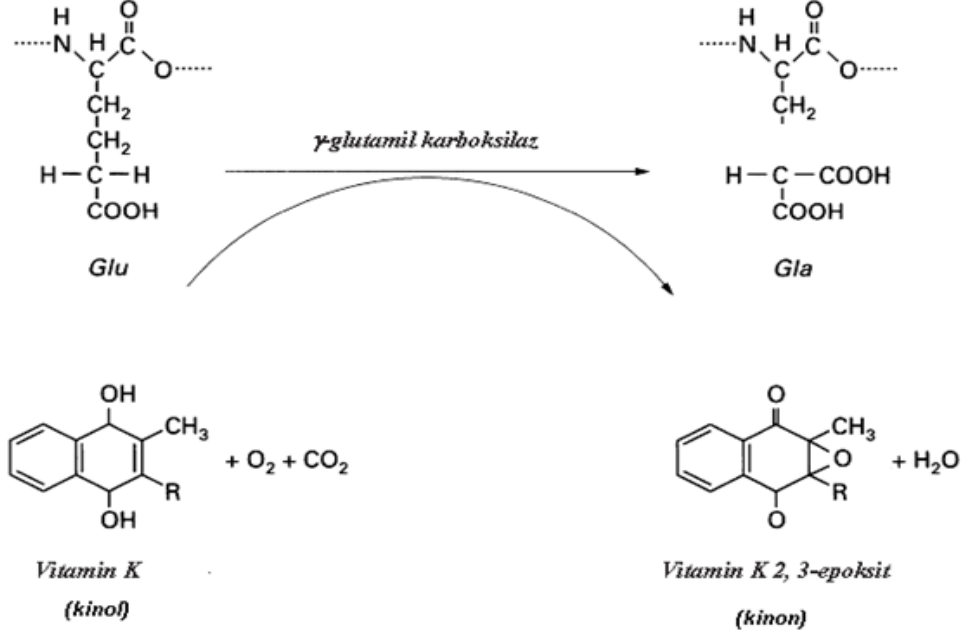
Bir karaciğer hücresi hepatosit olarak da adlandırılmaktadır. Hepatositler organizmadaki toksit etkileri ortadan kaldırdığı, kan moleküllerinin ve (örneğin; serum albumin) glikojen sentezlediği için sitoplazmalarında organel çeşidi ve sayısı fazladır. Bu hücrelerde endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, lizozomlar, mitokondriler ve bazı hücrelerde olmak üzere çift çekirdek vardır (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

2.1.2 Karaciğerin Pıhtılaşmadaki Rolü

Kandaki koagulyasyonda kullanılan maddelerin çoğu karaciğerde üretilir. Bu maddeler fibrinojen, protrombin, akseleratör globulin, Faktör VII gibi bir çok önemli koagulyasyon faktörleridir. Ayrıca karaciğer, kanın damar içerisinde pıhtılaşmasını engelleyen heparini meydana getirmektedir (Demirsoy vd. 2004).

Vitamin K bağırsaktaki bakteriler tarafından üretilir ve karaciğer tarafından depolanır. Karaciğerin içerisinde K vitamini; kanın pıhtılaşma faktörlerinden II, VII, IX ve X'un üretiminde kullanılır. Bu faktörler inaktif ön maddeler (zimojenler) olarak sentezlenirler ve biyolojik olarak aktif hale çevrilmeleri K vitamini varlığına bağlıdır. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok düştüğünden pıhtılaşma hemen hemen tamamen ortadan kalkar (Hadler ve Bukle 1992, Guyton ve Hall 1996).

Vitamin K (VK), pıhtılaşma proteinlerinin aktif formlarının sentezinde etkili, normal koagulyasyonun sağlanmasında hayati öneme sahip yağda eriyen esansiyel bir vitamindir (Demirtaş ve ark. 2010). Vitamin K birçok biyokimyasal yolda kofaktör olarak görev alır. Bunların en önemlisi vitamin K bağımlı karboksilasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlarda vitamin K'nın indirgen formu (kinol), γ - glutamil karboksilaz enzimi ile glutamatın (Glu), γ -karboksi glutamata (Gla) dönüşümünü sağlarken kendisi epoksit (kinon) formuna dönüştürür. Bu reaksiyon, normal trombotik yolu başlatmak için hayati rol oynar. Vitamin K bağımlı proteinlerin kalsiyum kanalları yoluyla yüzey fosfolipitlerine bağlanmasını sağlarlar ve pıhtılaşma faktörlerinin aktif formlarının sentezini gerçekleştirir (Şekil 2.2) (Namıduru ve Tarakçıoğlu 2011).



Şekil 2.2 K Vitamininin kofaktör olarak görev yaptığı reaksiyon (Namıduru ve Tarakçıoğlu 2011)

2.2 Antikoagulant Rodentisitler

2.2.1 Antikoagulant Rodentisitlerin Tanımı ve Gelişimi

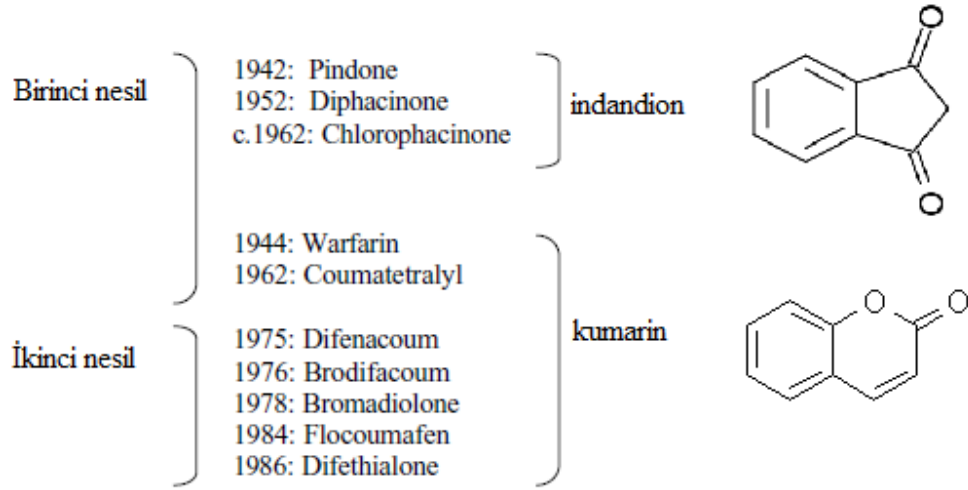
Zararlı rodentisitlerin kontrolü için kullanılan pestisitlerin büyük bir çoğunluğunu antikoagulant rodentisitler içerir (Valchev vd. 2008).

Antikoagulant rodentisitler, 1940'ta keşfedilmiştir ve ılıman ülkelerde rodentlere karşı etkileri denenmiştir (Hadler ve Bukle 1992). Antikoagulant rodentisitler; 1940-1960 yılları arasında geliştirilmiş olup birinci nesil antikoagulantlar (coumachlar, coumafuryl ve warfarin) ve ikinci nesil antikoagulantlar (brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, difethialone ve flocoumafen) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Eason ve Ogilvie 2009). 1950'lerin başlarında ilk defa birinci nesil antikoagulant olan warfarin kullanılmaya

başlanmıştır. Fakat rodentler warfarin gibi diğer birinci nesil antikoagulantlara karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirmişlerdir. Rodentlerin kazandıkları dirençten sonra antikoagulantlarla ilgili araştırmalara ağırlık verilmiş ve böylece ikinci nesil antikoagulantlar keşfedilmiştir (Berny vd. 2010, Clarke ve Prescott 2011).

2.2.2 Antikoagulant Rodentisitlerin Sınıflandırılması

Birinci ve ikinci nesil antikoagulant rodentisitler kimyasal olarak indandion ve kumarinleri içerirler (Fisher 2005) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Birinci nesil ve ikinci nesil antikoagulant rodentisitlerin ilk kullanıldıkları tarihler ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Fisher 2005)

Birinci nesil antikoagulantların ikinci nesil antikoagulantlara göre karaciğere bağlanma potensiyelleri daha düşüktür. İkinci nesil antikoagulantların en büyük avantajı warfarin gibi birinci nesil antikoagulantlara karşı direnç kazanmış sıçanlara bile öldürücü etkiye sahip olmalarındandır. İkinci nesil antikoagulantlar çok daha zehirli olduklarından ve dokulardaki aktiviteleri daha uzun süreli oldukları için hedef olmayan canlıları da zehirleyebilirler. Hedef olmayan canlılar için birinci nesil antikoagulantlar daha hızlı metabolize edilip, vücuttan atıldığından dolayı daha az risk taşır (Fisher 2005).

2.2.3 Antikoagulant Rodentisitlerin Etkileri

Antikoagulant rodentisitlerden hidrosikumarin ve indandione'nin etki mekanizmaları aynıdır (Valchev vd. 2008).

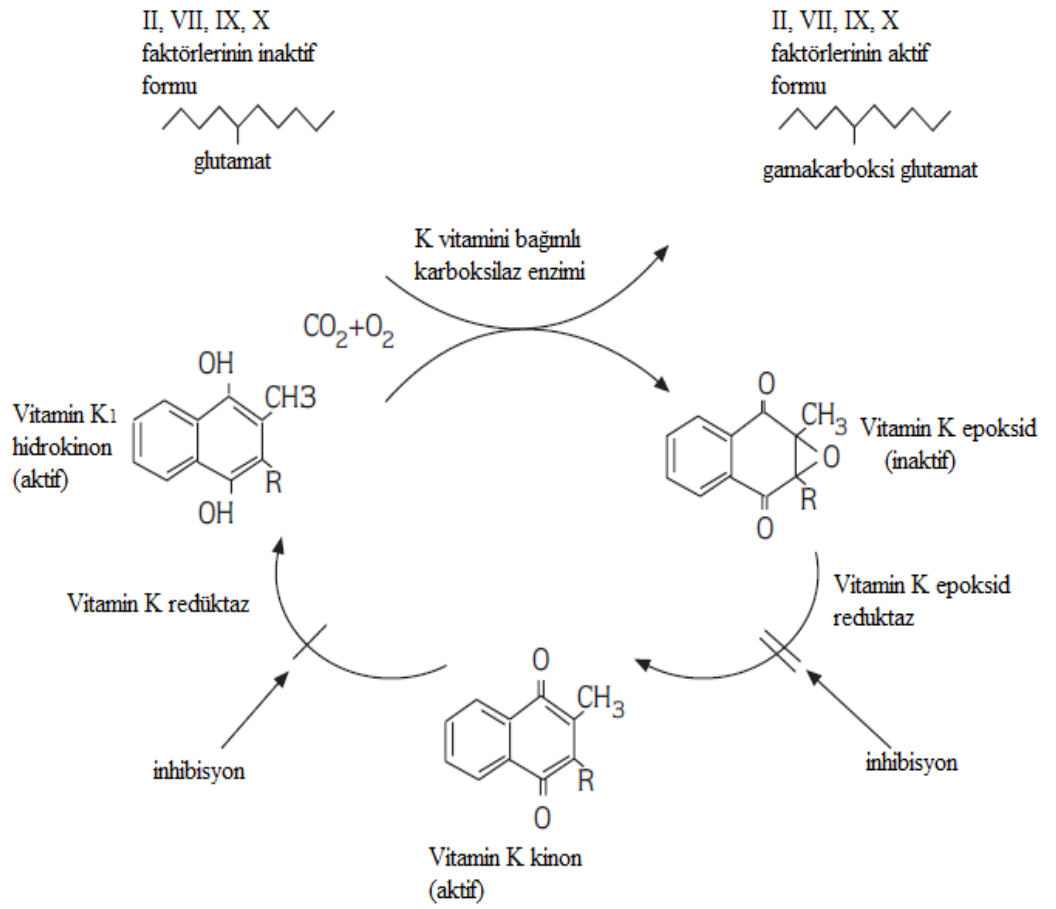
Antikoagulant rodentisitler K vitamininin antagonistidir. Bu rodentisitlerin organizmalardaki asıl etki alanı karaciğerdir. Karaciğer antikoagulant rodentisitleri biriktiren ve depolayan organdır. Karaciğerde; kanın pıhtılaşma öncülerinden bir çoğu dolaşıma katılmadan önce K vitaminine bağlı post traslasyonel bir işleme tabi tutulurlar (Vanderbrouche vd. 2008).

K vitamini döngüsüyle ilgili enzimler hepatositlerin endoplazmik retikulumunda bulunurlar. K₁ vitamininin hepatositlerdeki endoplazmik retikulum enzimleri için ve K₁ vitaminine bağlı karboksilasyon için gerekli bir kofaktördür (Begent vd. 2001).

K₁ vitamini glutamik asidin (Gla) gama karboksilasyonu ile kanın pıhtılaşma faktörlerinden II, VII, IX ve X'un üretiminde kullanılır (Zivelin vd. 1993). K vitamininin aktif formu olan vitamin K₁ hidrokinon (KH₂) K vitaminine bağlı karboksilaz enzimiyle inaktif formu olan 2,3-epoksid'e dönüştürülür. Bu inaktif form ise hepatik endoplazmik retikulum enzimi vitamin K₁ 2,3-epoksid redüktaz enzimiyle K₁ vitamininin kinon formuna dönüştürülür. Pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde K vitamininin temel kaynağı vitaminin tekrar aktive edilmesidir (Mosterd ve Thijssen 1991). Aktif vitamin K kinon, vitamin K redüktaz enzimiyle vitamin K₁ hidrokinona dönüştürülür ve vitamin K₁ hidrokinonda yeniden pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X'un karboksilasyon döngüsüne katılır (Smith vd. 2000).

Vitamin K 2,3-epoksid redüktaz ve vitamin K quinone redüktaz enzimleri antikoagulant rodentisitlere oldukça duyarlıdır. Antikoagulant rodentisitler vitamin K epoksid redüktaz enzimini inhibe ederek K vitamini eksikliğine neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.4) (Valchev vd. 2008). Yapılan araştırmalarda sıçanlara antikoagulant rodentisitlerin

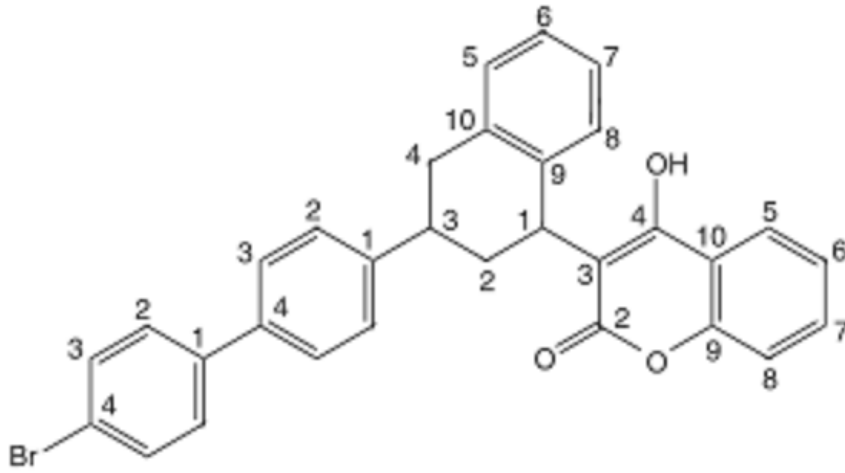
yukarıdaki enzimleri bloke ettikleri için aktif vitamin K'nın geri çevriminin durduğu ve karboksilasyon reaksiyonu için gerekli K vitamininin yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Bu yüzden de pıhtılaşma faktörlerinin sentezinin durduğu ve 12-24 saat içinde bu rodentisitlerin toksik etkileri kanda arttığı ve şiddetli kanamalara neden oldukları belirtilmiştir (Begent vd. 2001).



Şekil 2.4 Antikoagulant rodentisitlerin toksik etkilerinin mekanizması (Valchev vd. 2008)

2.3 Brodifacoum

Brodifacoum 1970'ler de geliştirilen güçlü bir ikinci nesil antikoagulant rodentisittir. Brodifacoum oldukça zehirli ve uzun süreli antikoagulant aktivite gösteren warfarin türevidir (Eason vd. 2008). Brodifacoum molekülü 1. ve 3. karbonlarında 4-hidroksikoumarin ve para-bromobiphenil'den oluşur (Şekil 2.5) (Cort ve Cho 2009).



Şekil 2.5 Brodifacoum'un birincil yapısı ve atom numaraları (Cort ve Cho 2009)

2.3.1 Brodifacoum'un toksitesi

Brodifacoum diğer tüm ikinci nesil antikoagulantlar gibi yalnızca bir tek dozu bile ölümcül etki yapabilir (Mosterd ve Thijssen 1991). Brodifacoum birinci nesil antikoagulantlardan daha zehirlidir ve dokulardaki yarı ömür süresi de daha uzun ömürlüdür (Lee vd. 2009). Bu antikoagulant bir çok hayvan türü için yüksek derecede toksik etkilidir fakat bu toksik etki türler arasında çeşitlilik gösterir. Genellikle memelilerdeki LD₅₀ dozu 1 mg/kg veya daha azdır (Çizelge 2.1) (Eason ve Ogilvie 2009).

Çizelge 2.1 Memeli türleri için Brodifacoum'un akut oral toksitesi (Eason ve Ogilvie 2009)

Türler	LD ₅₀ mg/kg
Domuz	0,1
Keseli sıçan	0,17
Tavşan	0,2
Kedi	0,25-25
Köpek	0,25-3,56
Sıçan	0,27
Fare	0,4
Koyun	5-25

Brodifacoum da diğer ikinci nesil antikoagulantlar gibi pankreas, böbrek ve karaciğer reseptörlerine güçlü bir şekilde bağlanırlar. Bağlanamayanlar ise dışkı ile atılırlar. Bu antikoagulantların karaciğerdeki yarılanma ömürleri uzun sürelidir. Örneğin; Brodifacoum'un koyun karaciğerindeki yarılanma ömrü 128 gündür. İkinci nesil antikoagulantlardan brodifacoum, bromadiolone ve difenacoum'un sıçan karaciğerindeki yarılanma ömürleri sırasıyla 130, 170 ve 120 gündür (Çizelge 2.2) (Eason vd. 2008).

Çizelge 2.2 Antikoagulantların yarılanma ömürleri (Eason vd. 2008)

Bileşik	Yarı ömür değerleri	Sub-lethal dozun kalıcılığı
pindone	2.1 gün	4 hafta
diphacinone	3 ay	6 hafta
cholecalciferol	10-68 gün	3 ay
coumatetraly	50-70 gün	4 ay
brodifacoum	130 gün	24 aydan uzun
bromodiolone	170 gün	24 aydan uzun
flocoumafen	220 gün	24 aydan uzun

Taylor ve Thomas (1989) brodifacoumun, hedef canlının davranışları ve çevre şartları göz önünde bulundurarak, basit bir yöntem ile uygulamışlardır. Bir deney alanı (400m²) oluşturmuşlar ve fare yuvalarını tespit etmişlerdir. Buralara 2. nesil antikoagulant olan brodifacoumu tablet halinde bırakmışlar ve İki hafta boyunca 25-50 sıçanın öldüğünü tespit etmişlerdir.

Mosterd ve Thijssen (1991) brodifacoumun sıçan karaciğerindeki K vitamini döngüsüne ve kan pıhtılaşması üzerine etkisini 30 gün boyunca incelemişlerdir. Tek oral doz brodifacoum uygulanmasından sonra PCA (protrombin kompleks aktivitesi) 3-4 gün boyunca %35'e düştüğünü gözlemişlerdir. Vitamin K epoksidaz enziminin ise 2-7 gün arasında %25 azaldığını rapor etmişlerdir.

Rodentislere maruz kalan rodentlerle beslenen 3 baykuş türünün (peçeli baykuş, çizgili baykuş ve büyük boynuzlu baykuş) karaciğerleri incelendiğinde hayvanlarda antikoagulant kalıntılarının varlığı tespit edilmiştir (Albert vd. 2010).

Yapılan araştırmalar doğrultusunda bu tez çalışmasında hedef canlıya ve hedef olmayan canlılara toksik etkisi olan brodifacoum'un 0,2 mg/kg'lık dozunun sıçanların karaciğer hücrelerinde ne gibi değişiklikler yaptığı hücresel yönden araştırıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanlarının Bakımı

Çalışmada kullanılan olan erkek sıçanlar Refik Saydam Hıfzıssıhha Müdürlüğü Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden alındı. Ağırlıkları 200-250 gr olan toplam 20 adet sıçanın 5 tanesi kontrol grubu 15 tanesi de brodifacoum muameleli grup olarak değerlendirildi. Muameleye başlamadan önce sıçanlar yedi gün karantinaya alındı (Hadler ve Bukle 1992). Hayvanların her biri ayrı kafeslerde olmak üzere uygun fotoperiyot (12 aydınlık-12 saat karanlık) ve oda sıcaklığında tutuldu (Monterd ve Thijssen 1991).

3.2 Hayvanlara Brodifacoum Uygulanması

Dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözünen brodifacoum'un 0,2 mg/kg'lık tek dozu oral yoldan gastrik gavaj ile verildi. Aynı zamanda kontrol grubu hayvanlara 1 ml/kg BW DMSO bir defa verildi (Monterd ve Thijssen 1991). Brodifacoum uygulanan sıçanlardan 24 saat, 4 gün ve 7 gün sonra eter anestezisi altında karaciğer dokuları alındı. Kontrol grubu hayvanlardan da brodifacoum uygulamasından 7 gün sonra eter anestezisi altında karaciğer örnekleri alındı (Hadler ve Bukle 1992).

3.3 Elektron Mikroskobu ve Işık Mikroskobu

Doku örnekleri aşağıdaki işlemlerden geçirilerek elektron ve ışık mikroskobunda incelenmeye hazırlandı:

- i. Deney hayvanlarından alınan örnekler, 0,1 M Sodyum fosfat tamponunda, pH 7.4'de yıkandı.
- ii. Yıkanan örneklerin % 2.5'luk Gluteraldehitte (0.1 M Sodyum fosfat tamponunda hazırlanan) ilk tespiti yapıldı (2saat, +4 °C'de).

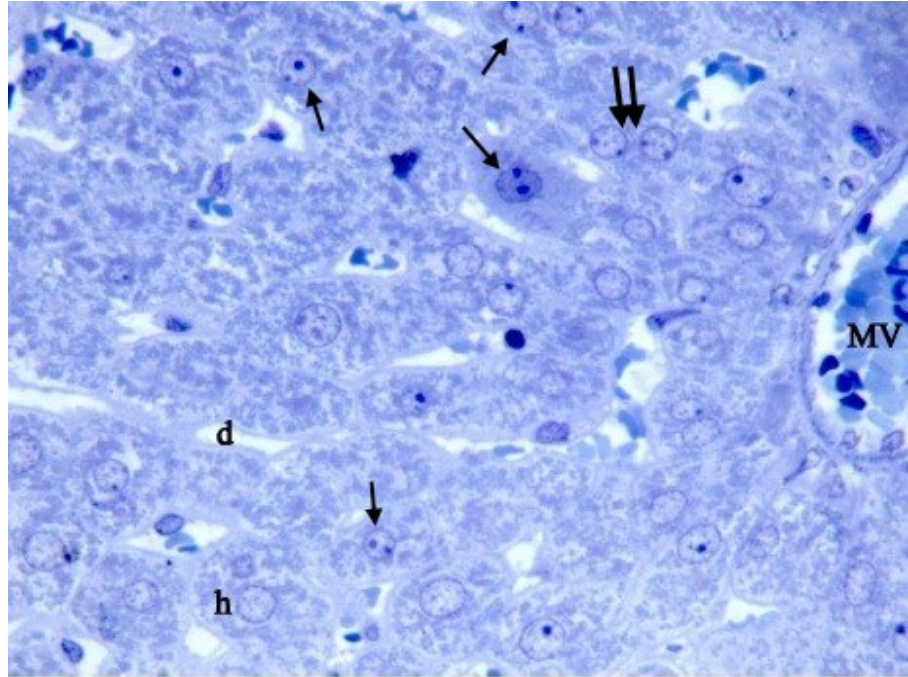
- iii. İlk tespit işleminden sonra örnekler Na-fosfat tamponunda bir saatte üç kez solusyon değiştirilerek yıkandı.
- iv. Na-fosfat tamponunda hazırlanan örneklerin ,% 1'lik Osmium tetroksit çözeltisi ile 1 saat, +4°C'de ikinci tespiti yapıldı.
- v. Sodyum fosfat tamponu ile örnekler 1 saat yıkandı.
- vi. Fiksasyon işlemlerinden sonra, örnekler çeşitli derecelerdeki etanol serilerinde (%70'lik, %80'lik, %90'lık, %100'lük ve %100'lük) 5'er dakika bekletilerek dehidre edildi.
- vii. Dehidrasyondan sonra örnekler gömme ortamına (Araldit CY212) geçiş aşamasında,
3 hacim Propile oksit + 1 hacim Araldit CY212
1 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit CY212
1 hacim Propilen oksit + 3 hacim Araldit CY212
karışımında 30'ar dakika bekletildi.
- viii. Blok kaplarındaki örnekler Araldit CY212 gömme ortamına alınıp 24 saat 45 °C'de ve 48 saat 70 °C'de bekletildi.
- ix. Gömme ortamında bloklanmış örneklerden ultramikrotomla yarı ince ve ince kesitler alındı (Hayat 1981).
- x. Yarı ince kesitler (1-1,5 »m kalınlıkta), Toluidin blue ile boyandı ve Nikon-Eclipse marka ışık mikroskobunda incelendi.
- xi. Bakır gritler üzerine alınan ince kesitler (70-90 nm kalınlıkta) %2'lik Uranil asetat ve Kurşun sitrat ile boyandı. Jeol 100 CXII marka elektron mikroskobunda 80 KV'de incelendi.
- xii. Elektron mikroskobunda çekilen negatif filmler (Kodak marka) karta basıldı ve fotoğraflar üzerinde yorum yapıldı.

4. BULGULAR

Yapılan tez çalışmasında sıçanlara brodifacoum oral gavaj yoluyla verildi. Kontrol grubu ve brodifacoum verilmiş sıçan karaciğer örneklerinden yarı ince ve ince kesitler alınıp, Işık Mikroskopunda ve Geçirmeli Elektron Mikroskopunda (TEM’de) incelendi.

4.1 Işık Mikroskobu Bulguları

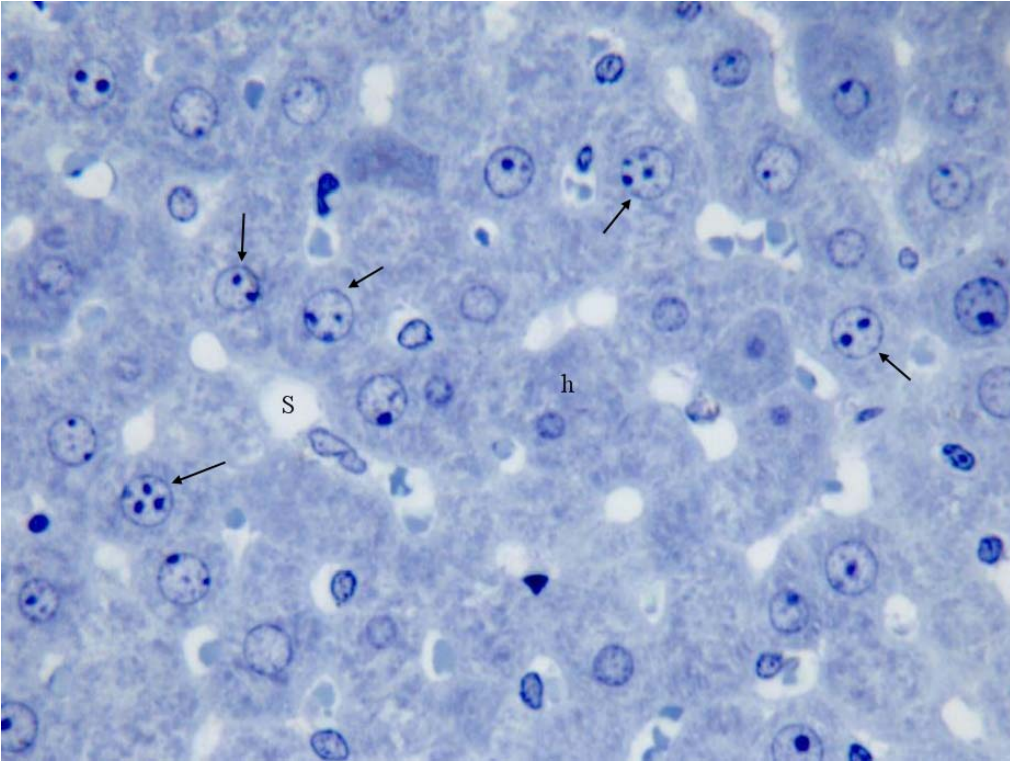
Elektron mikroskobu için hazırlanan bloklardan alınan yarı ince kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, kontrol grubunda merkezi ven etrafındaki hepatositlerin ve disse aralıklarının düzenli bir dağılım gösterdiği tespit edildi. Bazı hepatositlerde iki çekirdeğin olduğunu ve bazı hepatositlerde ise çekirdekçik sayısının fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kontrol grubu sıçanların karaciğer lobu

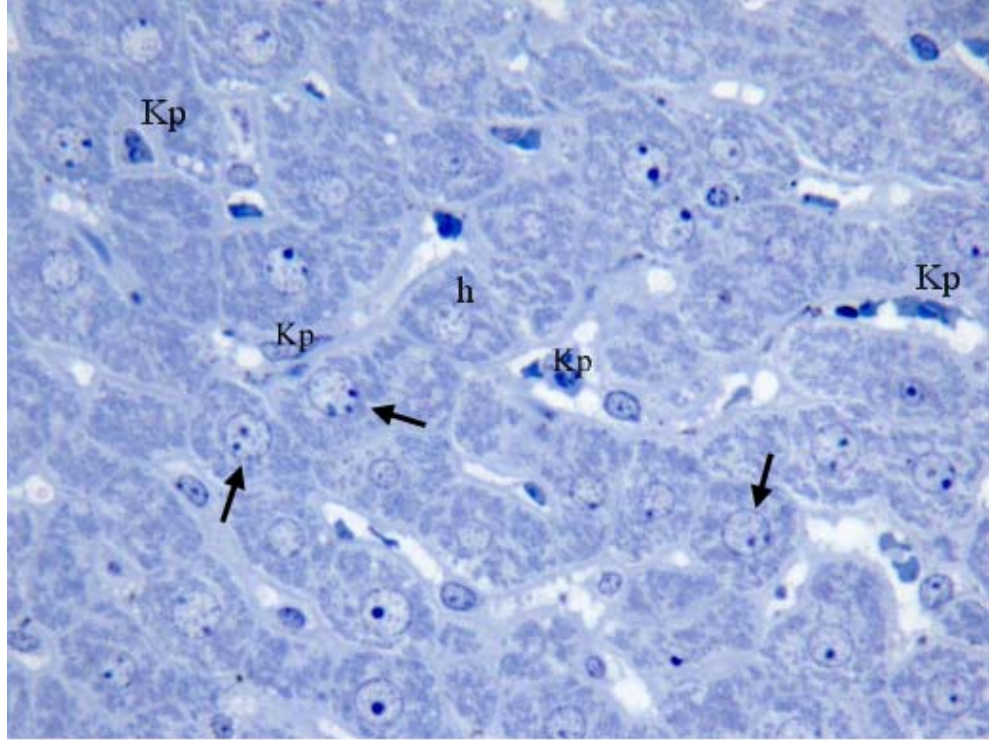
d. Disse aralığı, h. Hepatosit, MV.Merkezi ven, Çift çekirdekçik (→), Çift çekirdek (⇔). x 1000, Toluidin mavisi.

Brodifacoum uygulanan gruptaki sıçanlardan 24 saat sonra alınan karaciğer örnekleri incelendiğinde, sinüzoidlerin kontrol grubu hayvanların karaciğer sinüzoidlerine yapı ve içerik açısından benzediği tespit edildi. Lobüllerdeki disse aralıklarının da düzenli bir yapıda olduğu gözlemlendi. Yapılan gözlemlerde kontrol grubuna göre 24 saatlik brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğer lobüllerinde farklı olarak hepatositlerin çekirdeklerinde birden fazla (2-3) çekirdekçığın bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.2).



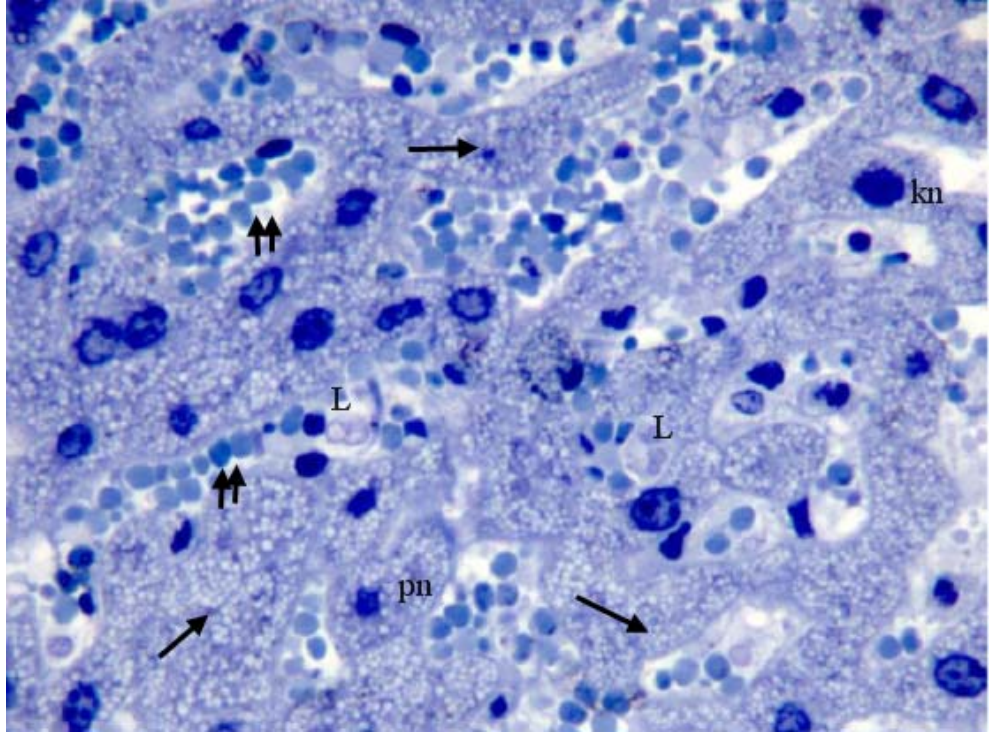
Şekil 4.2 Brodifacoum uygulanmış (24 saat) sıçanların karaciğer lobul görüntüsü
s. Düzenli sinüzoidler , h. Hepatosit ve Çok çekirdekçikli nukleus (→). x 1000, Toluidin mavisi.

Brodifacoum uygulanmış (24 saat) sıçanların karaciğer lobüllerindeki sinüzoidler de Kupffer hücrelerinin infiltrasyonuna rastlandı. Ayrıca hepatositlerin çekirdeklerinde iki veya üç çekirdekçiğin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Brodifacoum uygulanmış (24 saat) sıçanların sinüzoidlerindeki Kp. Kupffer hücreleri, h. Hepatosit, 2-3 çekirdekçikli hepatositler (→). x 1000, Toluidin mavisi.

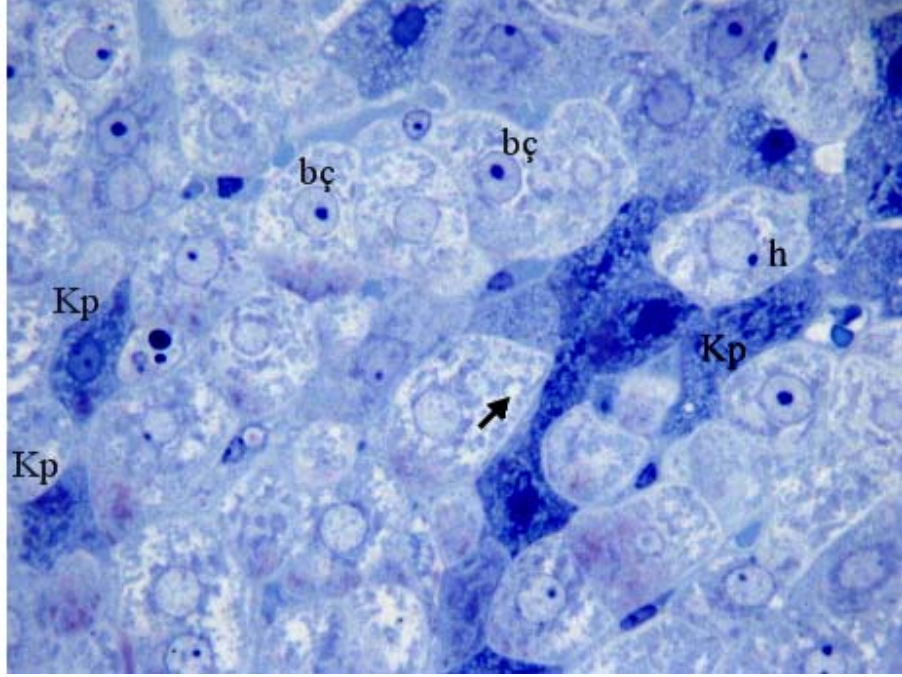
Tıp dilinde hepatositeatoz olarak adlandırılan karaciğer yağlanması karaciğer hücrelerinde aşırı yağ birikmesinden meydana gelir. Bunun çeşitli nedenleri vardır; aşırı alkol tüketimi, hastalıklar, ilaçlar, beslenme ve yaşam şekli vb. Bizim çalışmamızda dört günlük brodifacoum uygulanmasının sonucunda sıçanların karaciğer hepatositlerinde, aşırı yağ birikimi gözlemlendi. Ayrıca hücrelerde düzensiz şekilli piknotik (küçülmüş) ve kromatin maddesi yığın halinde olan değişik nukleuslar tespit edildi. Sinüzoidlerde eritrositlerin ve granüllü lökositlerin infiltrasyonuna rastlandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Dört günlük deney grubu sıçanlardaki lobül yapısı

kn. Kromatin maddesi yoğun nukleus, pn. Düzensiz şekilli piknotik nukleus, L. Granüllü lokosit, Hepatositlerdeki yağ damlacıkları (→), Sinüzoidlerdeki eritrositler (⇔). x 1000 Toluidin mavisi.

Yedi gün brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğer lobüllerindeki hepatositlerin sitoplazmalarında yer yer materyal kaybından dolayı hiyalinleşmeler gözlemlendi. Bunun yanı sıra hepatositlerin etrafında Kuppfer hücrelerinin yoğunlaştığı tespit edildi. Hepatositlerdeki çekirdekçiklerin kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu dikkati çekti. Ayrıca hepatositlerin sitoplazmalarında yer yer madde birikintilerine de rastlandı (Şekil 4.5).

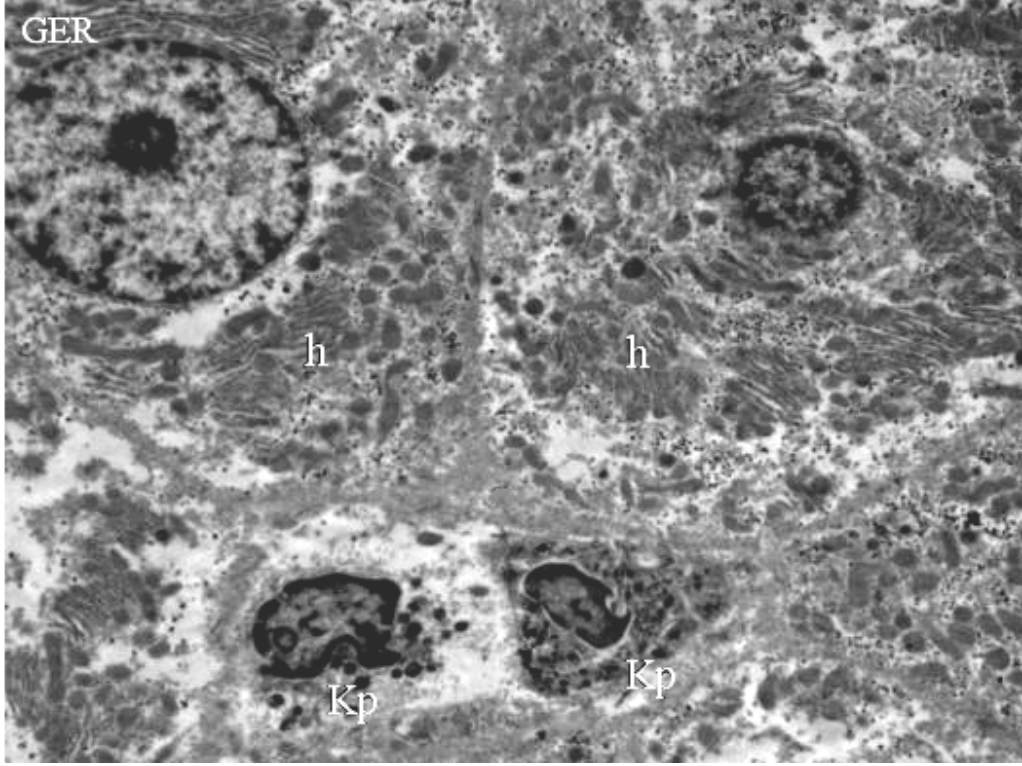


Şekil 4.5 Yedi günlük brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerindeki lobül yapısı

Kp. Kupffer hücreleriyle çevrilmiş h. hepatosit, bç. belirgin çekirdekçik, Sitoplazmik materyal birikintisi (→). x 1000 Toluidin mavisi.

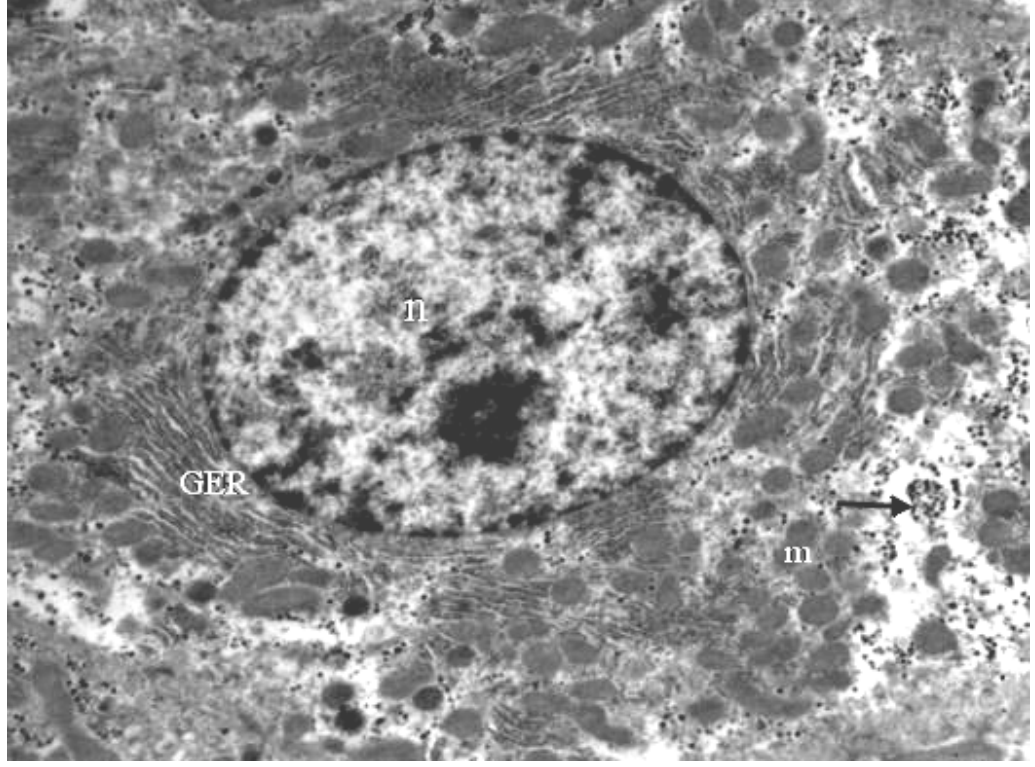
4.2 Elektron Mikroskop Bulguları

Çalışmada kullanılan kontrol grubu sıçanların karaciğerlerinden alınan ince kesitler elektron mikroskobunda incelendiği zaman, hepatositlerin yuvarlak şekilli nukleuslara, düzenli yerleşmiş granüllü endoplazmik retikulum keselerine (GER) ve mitokondrilere sahip olduğu gözlemlendi. Kesitlerde ayrıca sinüzoid içerisinde düzgün hücre yapısına sahip Kupffer hücreleri tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer dokusundaki h. Hepatositler ve Kp. Kupfer hücreleri, GER. Granüllü endoplazmik retikulum. x 5800

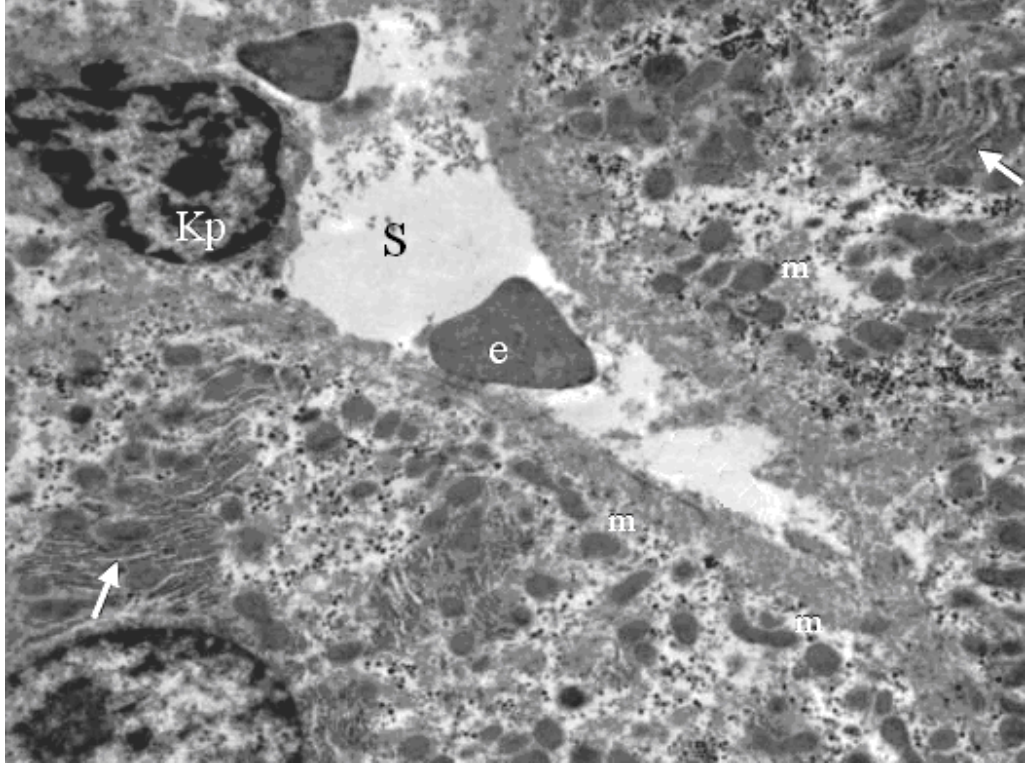
Kontrol grubu hayvanların hepatositlerinde yuvarlak şekile sahip çekirdek ve etrafında halkasal yerleşmiş GER, çok sayıda mitokondri ve glikojen granülleri gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Kontrol grubu hepatosit görüntüsü

n. Nukleus, m. Mitokondri, GER. Granüllü Endoplazmik Retikulum keseleri, glikojen (→). x 10000

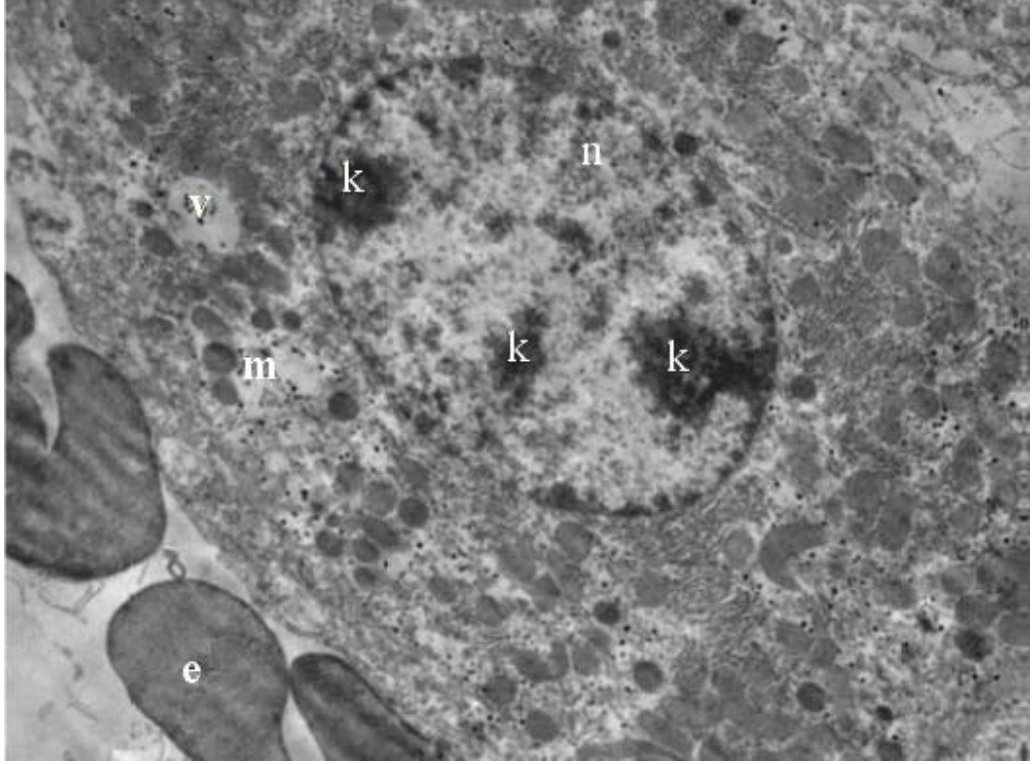
Deneylerde kullanılan kontrol grubu hayvanların karaciğer örneklerinde düzgün yapılı sinüzoidlere ve buralara yerleşen Kupffer hücrelerine rastlandı. Yine karaciğer lobülündeki hepatositlerde belirgin GER keselerinin ve bunların etrafında yerleşen mitokondrilerin bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Kontrol grubundaki karaciğer sinüzoidi

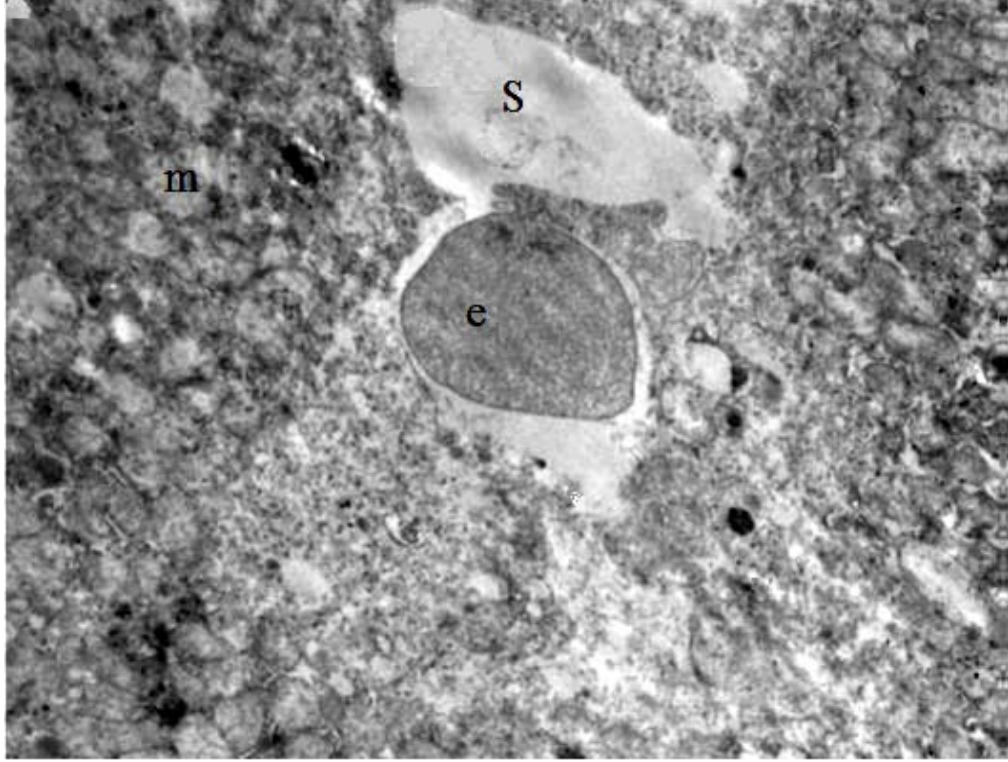
s. Sinüzoid, Kp. Kuppfer hücresi, e. Eritrosit, m. Mitokondri, Granüllü Endoplazmik Retikulum keseleri (→). x 10000

Brodifacoum uygulanmasından 24 saat sonra sıçanların karaciğer hücrelerinde kan damarındaki eritrositlerin hemoliz olduğu gözlemlendi. Hücrelerin nükleusunda yer yer kromatin yığılıları ve sitoplazmalarında vakuol oluşumuna rastlandı. Bazı kesitlerde hücrelerindeki sitoplazmalarındaki mitokondrilerin kristalların eridiği tespit edildi. Sinüzoidlerde eritrositlerin sitoplazmik materyalinde bantlaşmalar gözlemlendi (Şekil 4.9).



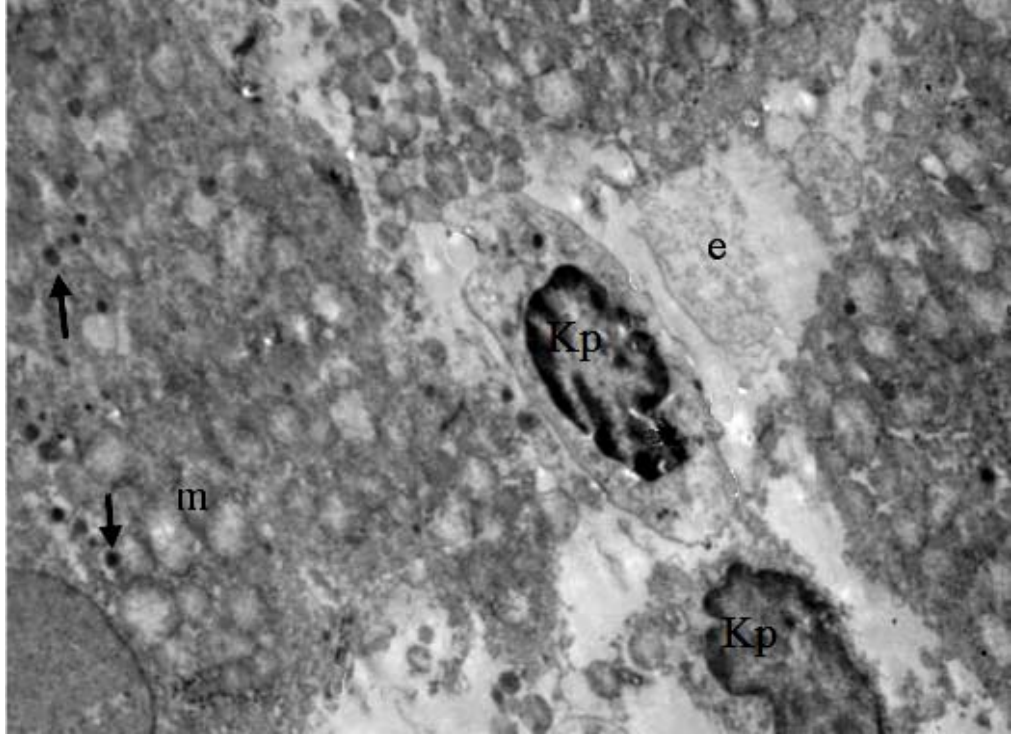
Şekil 4.9 Deney grubuna ait (24 saat işlem görmüş) hayvanların karaciğer dokusu
n. Nükleus, m. Kristalları erimiş mitokondri, k. Kromatin yığımları, e.Eritrosit, v. Vakuol. x 10000

24 saat brodifacoum uygulanmış hayvan grubuna ait karaciğer dokularında düzensiz şekle sahip sinüzoidler ve bunun içinde sitoplazmik materyal eritrosit yoğunluğu gözlemlendi. Sinüzoidlerin etrafındaki hepatositlerin sitoplazmalarında hemen hemen bütün mitokondrilerin kristallarının eridiği gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 24 saatlik deney grubuna ait hayvanların sinüzodi.
s. Sinüzoid, e. Sitoplazması erimiş eritrosit, m. Kristası erimiş mitokondri. x 10000

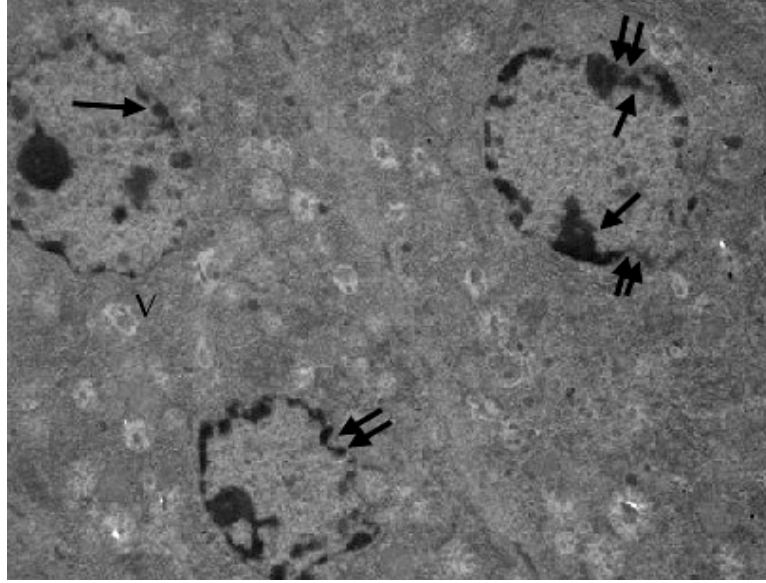
Aynı gruba ait karaciğer örneklerinin bazılarında sinüzoidlerde Kuppfer hücrelerinin infiltrasyonuna ve sitoplazmik materyali tamamen erimiş eritrosit gözlendi. Bir önceki kesitte olduğu gibi hepatosit mitokondrilerinde krista erimesi ve glikojen granüllerinin belirginleştiği gözlendi (Şekil 4.11).



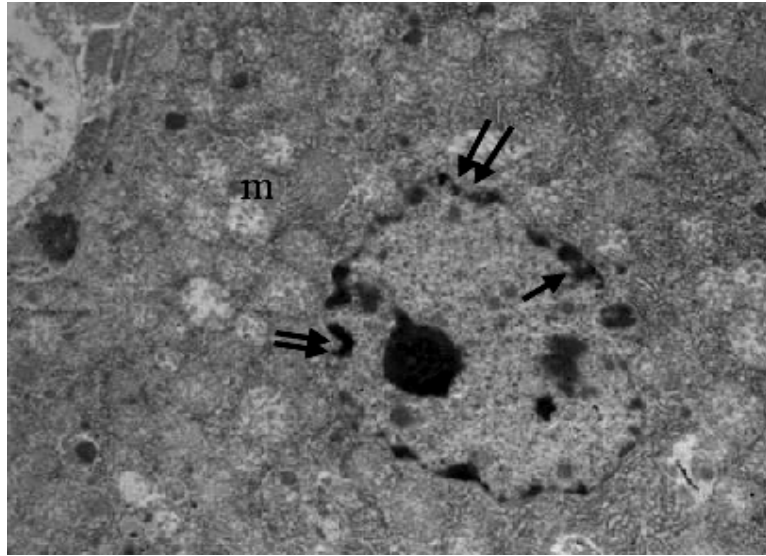
Şekil 4.11 Brodifacoum uygulanmış 24 saatlik hayvanların karaciğer dokusunda Kp. Kupffer hücreleri, m. Mitokondri, e. Eritrosit, Glikojen (→). x 7200

Dört günlük karaciğer hücreleri elektron mikroskobunda incelendiğinde, çekirdek morfolojisinde invaginasyonlara, çekirdek nükleoplazmasında nükleus zarına yakın bölgelere yığılmış kromatin materyaline ve sitoplazmada fagositik vakuollere rastlandı. Kristalleri erimiş mitokondrilere rastlandı (Şekil 4.12 a,b).

a.



b.



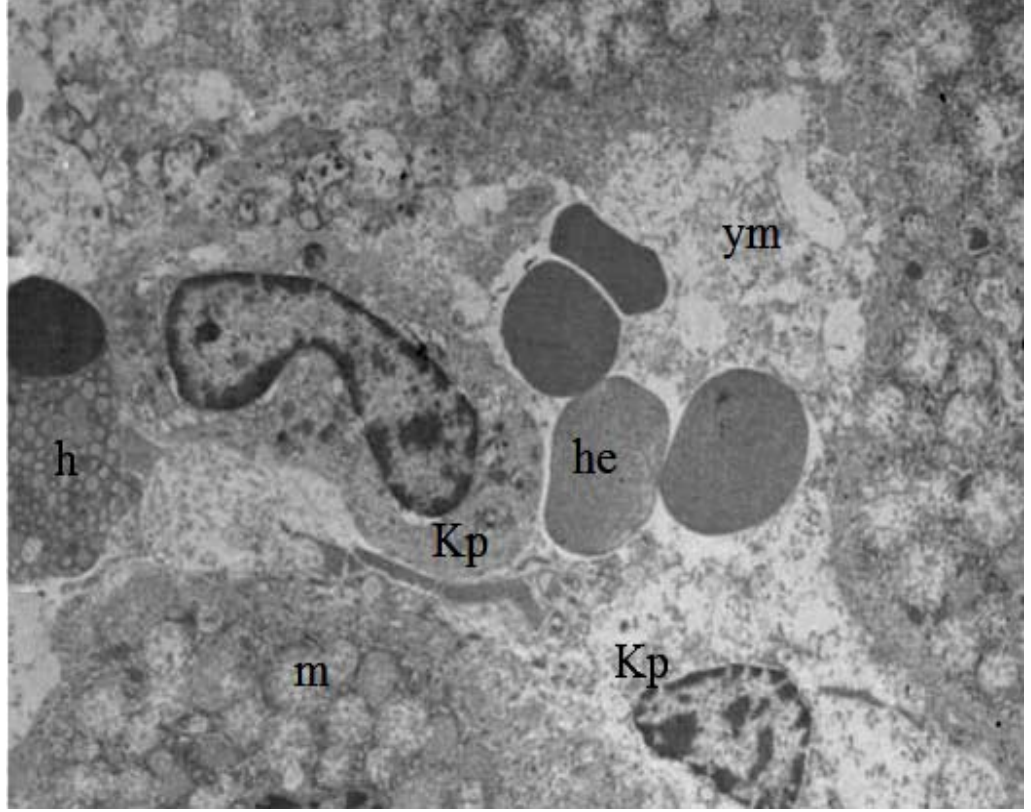
Şekil 4.12 Brodifacoum uygulanmış 4 günlük deney grubundaki hepatositler

a. v. Vakuol, (→) Yığılan kromatin materyali, (⇔) Çekirdekte invaginasyonlar.
x 4800

b. m. Kristalları erimiş mitokondri, (⇔) Çekirdekte invaginasyonlar, (→) Çekirdek zarına yerleşmiş kromatin materyali. x 5800

Başka bir kesitten alınan fotoğrafta sinüzoidal aralıkta Kupffer hücrelerinin arttığı, eritrositlerin sitoplazmik materyalini kaybettiği ve sinüzoidlerde yoğun madde birikimi

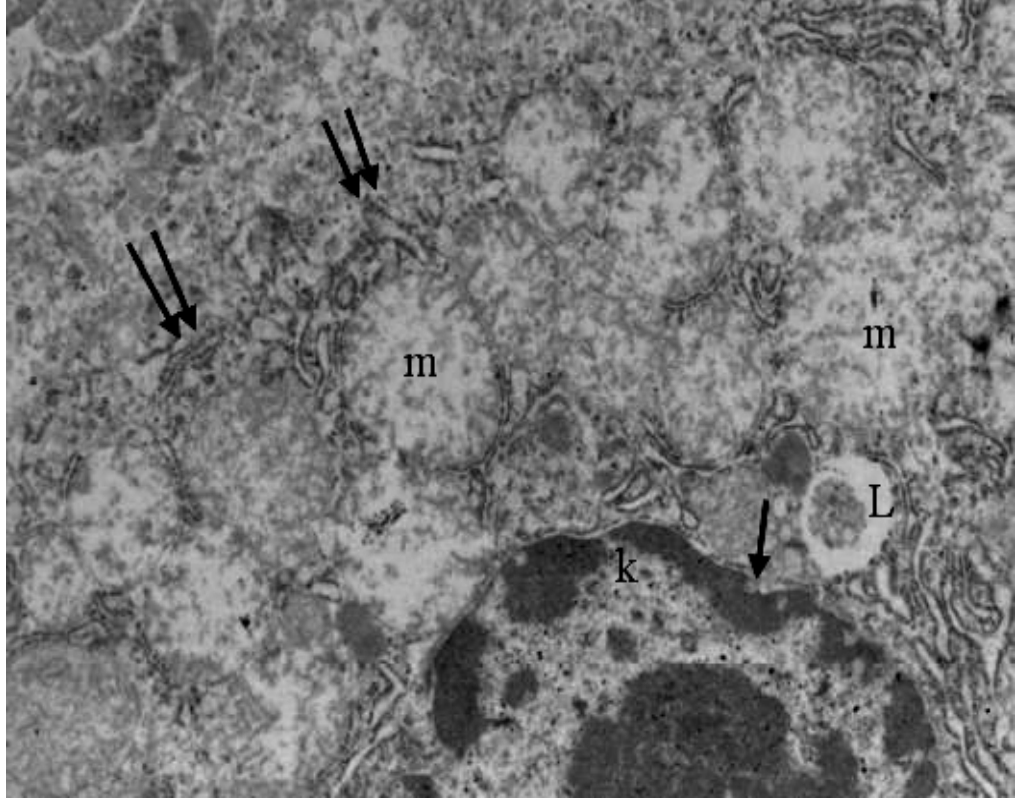
tepit edildi. Sinüzoidin çevresindeki hepatositlerde mitokondrilerin küçüldüğü, kristalların eridiği olduğu ve bol sayıda yağ damlacıklarının bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Dört günlük deney grubuna ait karaciğer

he. Hemoliz olmuş eritrosit, m. Kristalları erimiş mitokondri, Kp. Kupffer hücresi, ym. Yoğun madde birikimi, h. Sitoplazmasında bol sayıda yağ granülü bulunan hepatosit. x 5800

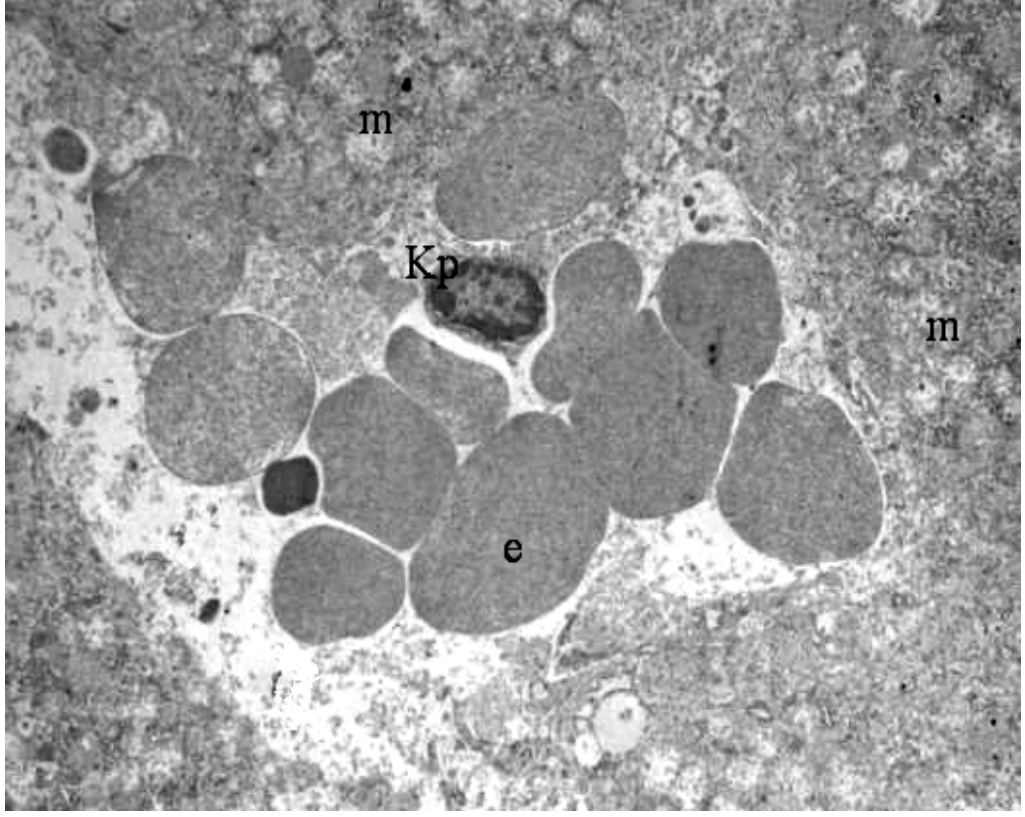
Deneyleerde kullanılan 4 günlük sıçanların karaciğer kesitlerindeki hepatositlerin sitoplazmalarında sisternaları genişlemiş ve mitokondrilerin etrafına yerleşmiş granüllü endoplazmik retikulum keseleri, zarları parçalanmış ve kristalları erimiş mitokondriler ve fagositik materyal içeren sekonder lizozomlar gözlemlendi. Aynı hepatosite ait çekirdekte invaginasyon ve çekirdek zarının altına yerleşen kromatin yığımları tespit edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.14 Brodifacoum uygulanmış (4 günlük) hayvanların karaciğer dokusu görüntüsü

L. lizozom, m. Mitokondri, k. Kromatin, Çekirdek invaginasyonu (→), Sisternaları genişlemiş GER (⇔) . x 14000

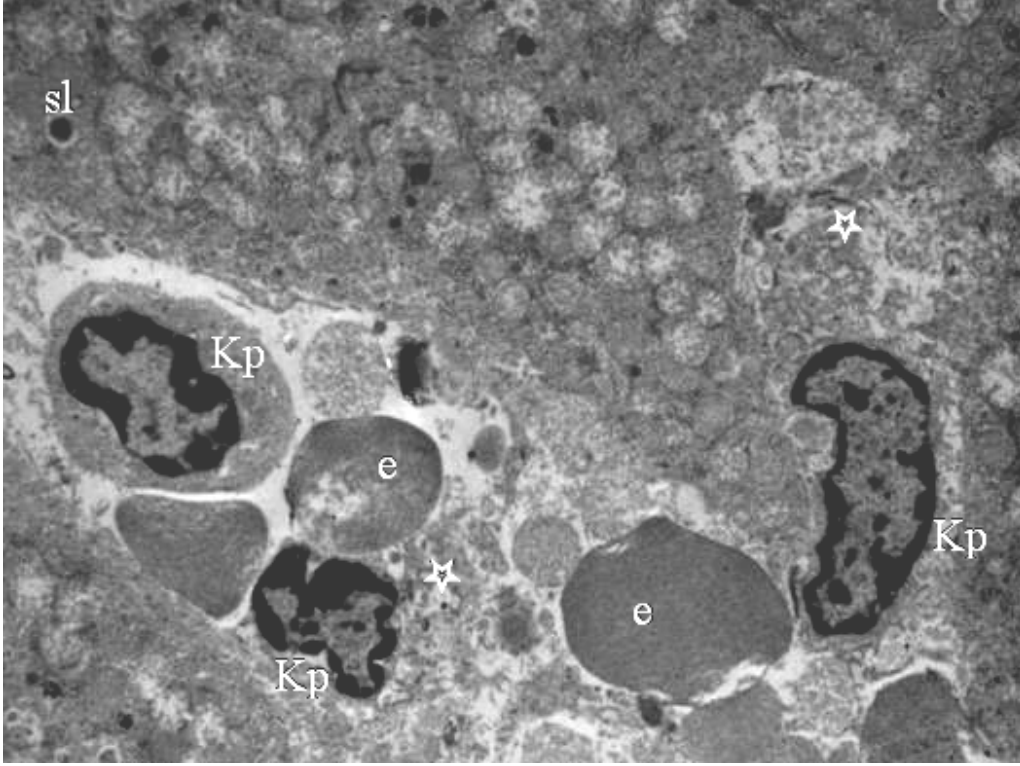
Brodifacoum uygulanmış 4 günlük karaciğer dokularında düzensiz şekle sahip sinüzoidler ve içerisinde sitoplazmik materyali azalmış bol sayıda eritrosit ve sitoplazmik hacmi az, çekirdeği büyük Kupffer hücresi gözlemlendi. Ayrıca sinüzoidde yakın hepatositlerde kristalleri erimiş çok sayıda mitokondriye rastlandı. (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Brodifacoum uygulanmış (4 günlük) deney grubunun karaciğeri.

e. Eritrosit, Kp. Kupffer hücresi, m. Mitokondri. x 5800

Aynı gruptaki bir başka karaciğer örneğinde sinüzoide yakın bulunan hepatositte bol sayıda kristalleri erimiş mitokondrilere, sekonder lizozomu olan ve sinüzoide yakın olan hepatositler gözlemlendi. Sinüzoidlerde ise Kupffer hücrelerinin infiltrasyonu (artışı), kısmen parçalanmış eritrositler ve yoğun madde birikimi tespit edildi (Şekil 4.16).

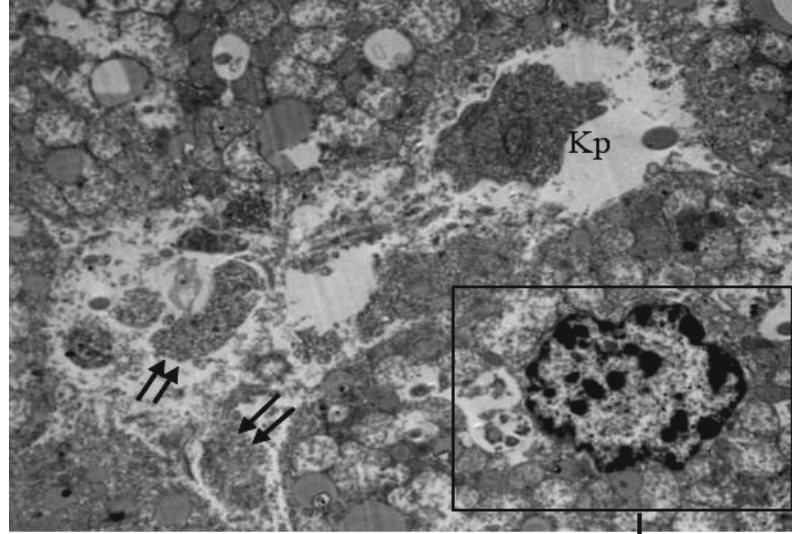


Şekil 4.16 Dört günlük brodifacoum uygulanan karaciğer örneği

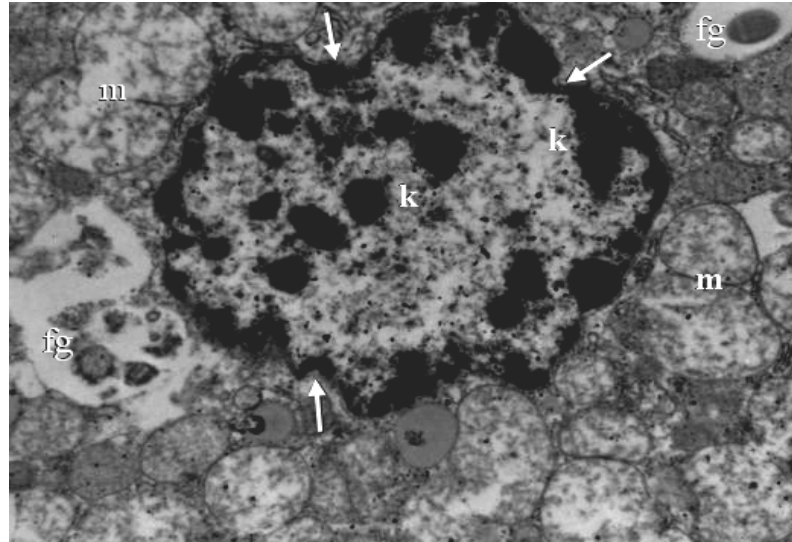
e. Kısmen bozulmuş eritrosit, Kp. Kupffer hücrelerinde artış, sl. Sekonder lizozom, Yoğun madde birikimi (*). x 5800

Brodifacoum uygulandıktan 7 gün sonra, hücresel düzeyde hepatositlerin çekirdeklerinde invaginasyonların belirginleştiği ve çekirdeğin nükleoplazmasında hem çevresel hem de merkezi olarak kromatin yığınlarının olduğu tespit edildi. Ayrıca bu hepatositlerin sitoplazmalarında fagositik vakuollere, kristalleri erimiş ve birbirleriyle temas eden mitokondrilere rastlandı. Düzensiz şekile sahip sinüzoidlerde bol miktarda hücresel artıklara ve Kupffer hücrelerine rastlandı (Şekil 4.17 a.b).

a.



b.



Şekil 4.17 a ve b Brodifacoum uygulanmış 7 günlük karaciğer kesiti

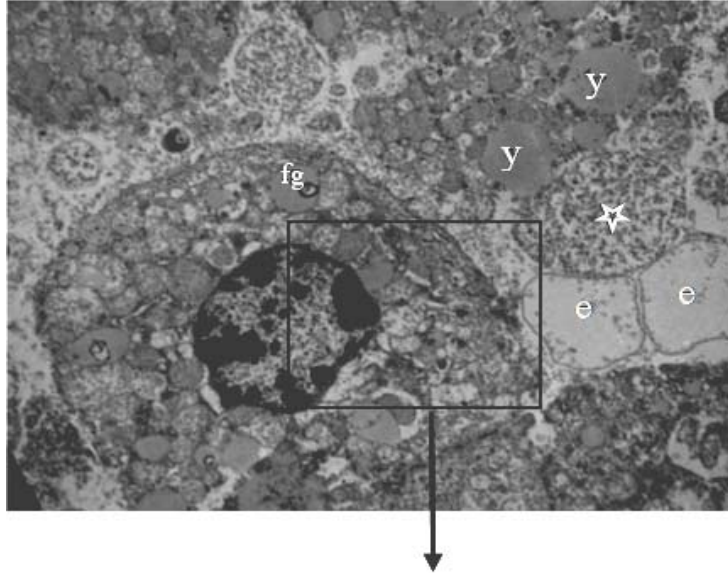
a. Kp. Kupffer hücresi, Sinüzoidlerdeki hüresel artıklar (⇔). x 5800

b. Şekil 4.17 a'dan büyütülmüş bir kesit, k. Çevresel ve merkezi yerleşen kromatin materyali, fg. fagozomlar, m. Birbirleriyle temas eden kristaları erimiş mitokondriler, Belirgin çekirdek invaginasyonu (→). x 1000

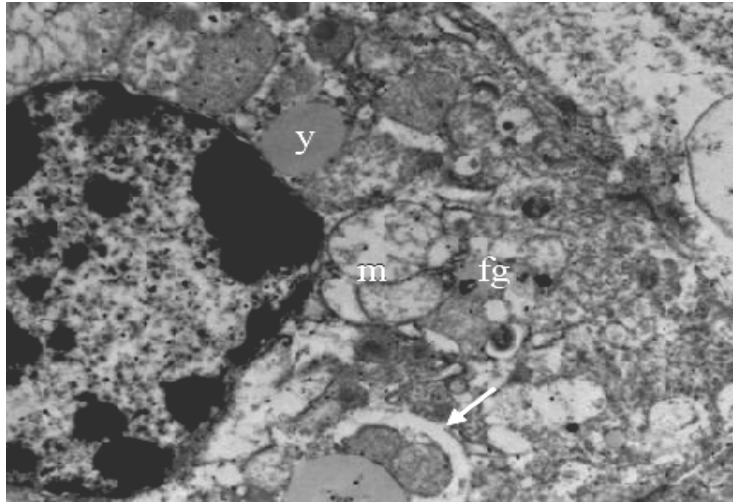
Yedi günlük uygulama sonunda alınan karaciğer hepatositlerinde genel olarak fagositik vakuoller, birbiriyle temas eden ve kristaları erimiş mitokondrilerin yanısıra çekirdekte kromatin yığınları, yağ tanecikleri tespit edildi. Sinüzoidlerde sitoplazmik materyali

azalmış veya tamamen erimiş eritrositlere ve irili ufaklı yağ damlacıklarına rastlandı (Şekil 4.18 a.b).

a.



b.

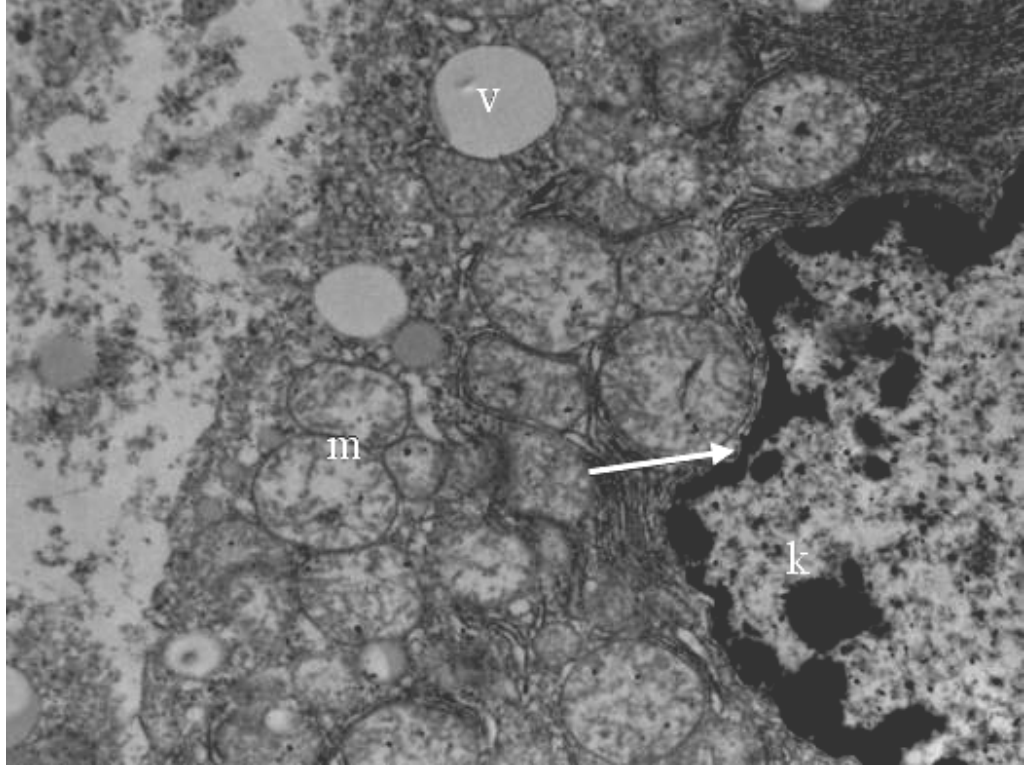


Şekil 4.18 Brodifacoum uygulanmış 7 günlük deney grubunun karaciğer dokusu

a. e. Sinüzoide yakın hepatosit ve sinüzoide bulunan sitoplazması erimiş eritrositler, y. Yağ damlacıkları, fg. Fagositik vakuoller, Hücresel artıklar (*). x 4800

b. Şekil 4.18 a'dan büyütülmüş hepatosit kesiti m. Birbiriyle temas eden mitokondriler, y. Yağ damlaları, fg. Fagositik vakuoller ve Sisternası genişlemiş GER (→). x 14000

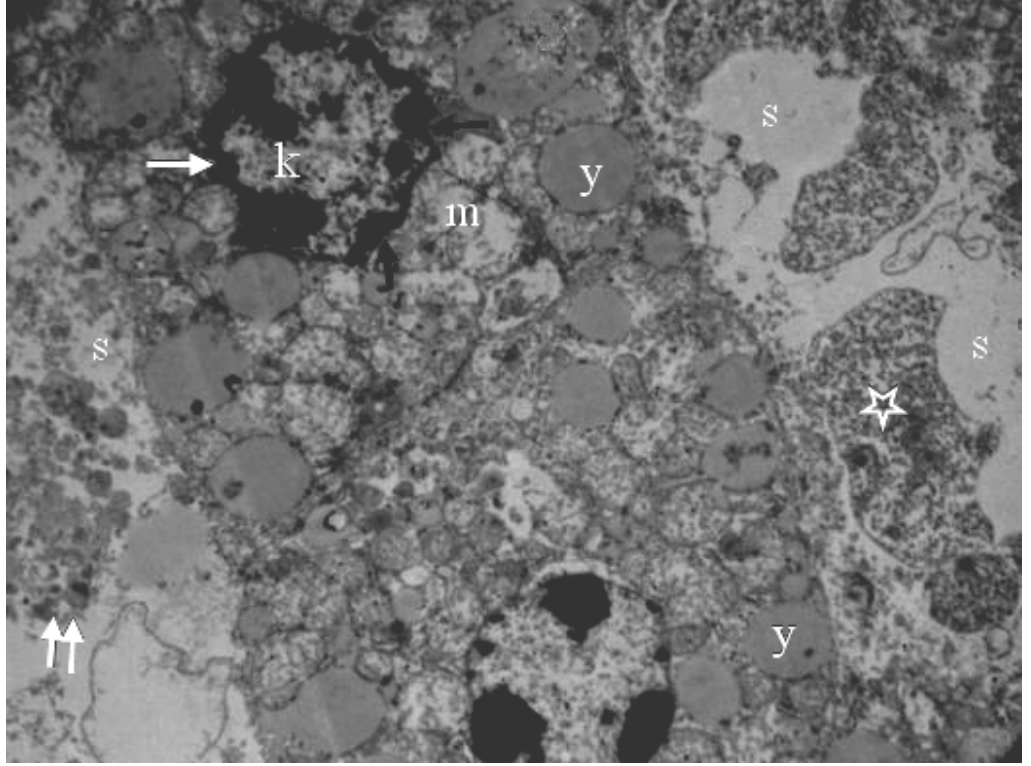
Kesitlerden alınan bir başka fotoğrafta vakuollerin arttığı sitoplazmadaki mitokondrilerin aşırı derecede şişip birbirini sıkıştırdığı, çekirdekte bir mitokondriyi alacak şekilde derin bir invaginasyonun olduğu ve kromatin yığınlarının çekirdek zarına yakın yerleştiği geçirmeli elektron mikroskopunda gözlemlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Yedi günlük deney grubunda hepatositlerdeki çekirdek invaginasyonu (→)

m. Birbiriyle temas eden mitokondri, v. Vakuol, k. Çevresel kromatin yığını. x 14000

Yedi günlük brodifacoum uygulanmış sıçanların karaciğerinde ağır hasarların meydana geldiği dikkati çekti. Sinüzoidde yakın bulunan hepatositlerin sitoplazmasında dejenerasyon, şişmiş kristası erimiş ve birbiriyle temas eden mitokondriler, çok sayıda yağ granülü yoğun madde birikimi şeklinde idi. Hepatositlerin çekirdek hacminde azalma morfolojik invaginasyon ve daha çok çevresel yığılmış kromatin materyali tespit edildi. Düzensiz şekile sahip sinüzoidlerde ve içerisinde hücre kalıntı ve yoğun madde birikimi gözlemlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Brodifacoum uygulanmış 7 günlük bireylerin hepatositlerindeki (→) çekirdek invaginasyonu ve k. kromatin yığımları

s. Sinüzoid, m. Mitokondri, , y. Yağ damlacığı, Hücresel kalıntı (*), (⇔) Yoğun madde birikimi. x 7200

5. TARTIŞMA

Antikoagulant rodentisit olan brodifacoum'un sıçan karaciğeri üzerine 24 saatlik, 4 günlük ve 7 günlük toksik etkisinin hücresel yönden hem ışık mikroskobunda hem de elektron mikroskobunda incelendi.

Littin vd. (2000), brodifacoum ile zehirlenmiş Norveç sıçanlarının ve keseli sıçanlarda davranış bozukluklarına, patolojik değişikliklerin olduğu ve çoğununda öldüğünü tespit etmişlerdir. Ölen hayvanların otopsisinde ise brodifacoumun tek bir dozunun bile toksik etki yaptığını belirtmişler ve her iki türde de kanamaların olduğu rapor etmişlerdir. Buna benzer bulgular birkaç çalışma da daha rapor edilmiştir. Örneğin Lechevin ve Vigie (1992), 20 köpeğe brodifacoumun ölümcül dozu (LD_{50} 0,25) 0,14 mg/kg uygulamışlar ve köpeklerin intratorasik kanamadan dolayı öldüğünü tespit etmişler. Buna paralel olarak bu uygulamada 2 mg/kg K vitamini vererek hayvanların iyileştiklerini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda brodifacoumla zehirlenen sıçanların 24 saat sonra davranışlarında bozukluklar gözlemlendi. Dördüncü güne doğru sıçanların gözlerinden, ağzından ve burnundan kan geldiği gözlemlendi ve yedinci günde ise bütün sıçanların öldüğü tespit edildi. Kontrol grubu karaciğerleriyle diğerleri karşılaştırıldığında renginin daha fazla koyulaştığı ve büyüdüğü dikkati çekti.

Fisher vd. (2011), antikoagulant rodentisit brodifacoum içeren yemler helikopter ile taşınırken Güney Yeni Zellandada göle döküldüğünü tespit etmişlerdir. Dökülmeden aylar sonra göl suyunda, sedimentlerde, bentik omurgasızlarda, yılan balığı ve iki kuş örneklerinde brodifacoum kalıntılarına rastlanmıştır. Gözlenen canlılarda antikoagulant zehirlenmeye bağlı olarak iç kanamaların ve karaciğerlerinde nekrozlara neden oldukları tespit edilmiştir (Fisher vd. 2011). Fisher vd. (2011)'nin canlıların karaciğerine brodifacoumun nekroz etkisini tespit ettikleri gibi yapılan tez çalışmasında da karaciğer hücrelerinde nekroz ve eritrositlerin parçalanmasından dolayı kanamalar gözlemlendi.

Revathi ve Yoganonda (2006), ikinci nesil antikoagulant bromodiolone ile zehirlenen hayvanlarda davranış bozuklukları neden olduğu ve hayvanların dışkılarında da kan izleri tespit etmişlerdir. Aynı bulgular 24 saatlik brodifacoum uygulanmasından sonra deney hayvanlarında gözlemlendi. İkinci nesil antikoagulantların hayvanlarda davranışsal bozuklara ve kanamalara sebep olduğu bu bulgulara dayanılarak öne sürülebilir. Revathi ve Yoganonda (2006) aynı çalışmada oral olarak uyguladıkları brodifacoumun hayvanların karaciğerinin büyümesine ve hücrelerinde multifokal sitoplazmik vakuolleşme, nekrozis, toksik madde birikimine neden olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada özellikle 7. günde vakuollerin artışı, çekirdek küçülmelerinin meydana gelmesi gibi bulgular Revathi ve Yoganonda (2006)'nın bulgularıyla aynıdır. Bu bulgular brodifacoumun hepatositlerde yapısal bozukluğa neden olduğunu düşündürülebilir.

Binev vd. (2011), sülünlere antikoagulant rodentisit bromadiolonenun artan dozlarda vererek morfolojik olarak incelediklerinde kuşlarda bitkinlik ve gagalarından sulu kan geldiğini gözlemişlerdir. Kuşların karaciğer dokuları mikroskopta incelendiğinde ise kılcal damarların belirgin bir şekilde genişlediği, hepatositlerdeki disse aralıklarının genişlediği, anormal şekilde vakuollerin oluştuğu gözlenmiştir. Hepatositlerin çekirdeklerinde karyolizis olduğu rapor edilmiştir. Kuşlarda intra- ve inter- lobüllerinde kanamalar gözlenmiştir. Yapılan çalışmada kuşların karaciğer hepatositlerindeki çekirdeklerin karyolizis olmasına karşın tez çalışmasındaki deney hayvanlarının karaciğer hepatositlerdeki çekirdeklerde kromatin yığılımları tespit edildi. Kuşlarda intra- ve inter- lobüllerdeki kanamalar gibi yapılan çalışmada da deney hayvanlarının karaciğer sinüzoidlerinde eritrosit hemolizinden dolayı kanamalar tespit edildi.

Del Piero ve Poppenga (2006), kuzularda chlorophacinone'un ağır akut kanamalar şeklinde toksik etki yaptığını öne sürmüşlerdir. Hayvanların karaciğer hepatositlerinde nekroz tespit etmişlerdir. Çalışmada deney hayvanlarının karaciğer hepatositlerinde de hücresel bozukluklar gözlemlendi.

Duvall vd. (1989), 1986-1987 yıllarında rodentisit ile zehirlenen kedi ve köpeklerin bazılarının karaciğer hepatositlerinde şişmiş vakuoller ve sentrolobüler bölgede madde birikimi tespit etmişlerdir. Ayrıca hayvanlarda deri kanamalarının olduğunu rapor etmişlerdir. Deneylerde kullanılan 4 ve 7 günlük hayvanların karaciğer hepatositlerindeki vakuol artışı ve hayvanlardaki kanamalar Duvall vd. (1989)'nın elde ettiği bulgulara paralellik gösterdi.

Karant ve Nayyar (2003), fosfor bazlı rodentisitten etkilenen bir kadın hastanın karaciğer biopsisinden aldıkları doku kesitinde hepatositler arasında fibrillerin olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada böyle bulgu tespit edilmedi.

Jack vd. (1996)'nın kumarinin farelerin karaciğeri üzerinde olan etkisini incelediklerinde hepatositlerin nekroze uğradığı yani bozulup öldüğünü tespit etmişlerdir. Benzer bulgu deney sıçanlarının 4. ve 7. gününde hepatositlerinde tespit edildi.

Lake ve Grasso (1996) Sprague-Dawley CD erkek sıçanlar, CD-1 erkek fareler ve Suriye erkek hamsterların kumarine tepkisini incelemişlerdir. Sıçanların 1 ila 4 hafta % 0-0,75 kumarinle beslemişlerdir. Sıçanlarda kumarinin etkisine bağlı olarak hücrelerde vakuoller dejenerasyon ve apoptozis gözlemişlerdir. Buna karşılık CD-1 farelerde ve Suriye hamsterlerinde hepatoksik etki gözlememişler ve bunun farklı türlerin zehire farklı tepkiler gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Sıçanların 4 haftalık kumarin etkisinin hücresel bulguları yapılan deneyde 4 ve 7 günlük uygulama sonucunda karaciğer örneklerindeki hepatositlerde vakuolleşme ve dejenerasyonla benzerlik gösterdi.

Sonuç olarak rodentisitlerle yapılan araştırmalardan elde edilen bulgulara göre hayvanlarda ve insanlarda kanamalar, davranış bozuklukları sıkça tespit edilen bulgulardır. Bunun yanı sıra organ düzeyinde hücresel yönden vakuolleşmeler, çekirdek bozuklukları, mitokondri şişmeleri ve krista erimeleri, lizozomal artışlar gibi toksik etkilerin olduğu rapor edilmektedir. Yapılan bu tez çalışmasıyla brodifacoumün hücresel düzeyde hasar verici

etkisinin mikroskopik yönden tespit edilmesi hem brodifacoum ile yapılan araştırmalara destek olacağı hem mücadelelerde bilim dünyasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Albert, C. A., Wilson, L. K., Mineau, P., Trudeau, S. and Elliott, J. E. 2010. Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988-2003. Arch Environ Contam Toxicol. Vol. 58(2) pp.451-9.
- Aytekin, Y., Solakoğlu S., 2006. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, s.332-334 İstanbul.
- Begent, L.A., Hill, A.P., Steventon, G.B., Hutt, A.J., Pallister, C.J., Cowell, D.C., 2001. Characterization and purification of vitamin K₁ 2,3 epoxide reductase system from rat liver. Journal of Pharmacy and Pharmacology JPP, vol. 53 pp.581-486.
- Berny P., Velardo J., Pulce C., D'amico A., Kammerer M., Lasseur R., 2010. Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved. Clinical Toxicology, Vol.48, Number 9: pp. 928-934.
- Berthier, K., Benoit, E., Berny, P., Lasseur, R., Merville, A., Peigneaux, F., Cosson, J.-F., 2011. Fluctuation and fixation of rodenticide resistance alleles in *Rattus norvegicus*. Julius-Kühn-Archiv, pp.432-72.
- Binev, R.G., Valchev, I., Groseva, N., Lazarov, L., Hristov, T., Uzunova, K., 2012. Morphological Investigations of Experimental Acute Intoxication with the Anticoagulant Rodenticide Bromadiolone in Pheasants. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 38 (2), pp.161-173.
- Broll, A., Esther, A., Schenke, D., Jacob, J., 2011. Anticoagulant rodenticides: exposure and residues in non-target rodents and their predators. Julius-Kühn-Archiv, pp.432-145.
- Bruno, R.G., Howland, M.A., McMeeking, A., Hoffman, R.S., 2000. Long-acting anticoagulant overdose: brodifacoum kinetics and optimal vitamin K dosing. Ann Emerg Med.; vol. 36 pp. 262-267.
- Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Piłat-Marcinlaewicz, B., Sawicki B., 2003. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. Alcohol & Alcoholism Vol. 38.no.1, pp.2-10.

- Buckle, A., 2011. Anticoagulant resistance in the UK and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Julius-Kühn-Archiv*, pp. 432-61.
- Clarke, D.J., Prescott, C.V., 2011. Investigation of the current status of anticoagulant resistance in UK Norway rats by VKORC1 genotyping. *Julius-Kühn-Archiv*, pp. 432-63.
- Copcuoğlu, Ö., 2009. İlaç intoksikasyonu tanısı ile son 5 yılda 2. Çocuk kliniğine yatırılan olguların geriye dönük olarak değerlendirilmesi. Aile hekimliği uzmanlık tezi (basılmamış). Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdag Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, İstanbul.
- Cort, J.R., Cho, H., 2009. ¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments and conformational analysis for the two diastereomers of the vitamin K epoxide reductase inhibitor brodifacoum. *Magn. Reson. Chem.* 47-897-901.
- Del Piero, F., Poppenga, R.H., 2006. Chlorophacin-one exposure causing an epizootic of acute fatal hemorrhage in lambs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18 (5), pp.483-485.
- Demirsoy, A. vd. 2004. Genel Biyoloji. Palme Yayıncılık. s.457-459 Ankara.
- DuVall, M., Murphy, M., Ray, A., Reagor, J., 1989. Case studies on second-generation anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1, pp.66-68.
- Eason, C., Ogilvie, S., Miller A., Henderson, R., Shapiro, L., Hix, S., Macmorran, D., Murphy E., 2008. Smarter Pest Control Tools with Low-Residue and Humane Toxins. Proc. 23rd Vertebr. Pest Conf. Published at Univ. of Calif., Davis. 2008. pp. 148-153.
- Eason, C.T. and Ogilvie S. 2009. A re-evaluation of potential rodenticides for aerial control of rodents. New Zealand Department of Conservation ISBN 978-0-478-14618-9.
- Fisher, P., 2005. Review of house Mouse (*Mus musculus*) susceptibility to anticoagulant poisons. DOC Science Internal series p.198.

- Fisher, P., Funnell, E., Fairweather, A., Brown, L., Campion, M., 2011. Accidental discharge of brodifacoum baits into a freshwater lake: a case study. Bull Environ Contam Toxicol. DOI 10.1007/s00128-011-0470-1.
- Fisher, P., Griffiths, R., Speedy, C., Broome, K., 2011. Environmental monitoring for brodifacoum residues after aerial application of baits for rodent eradication. Pages 300-304 In: Veitch, C. R.; Clout, M. N. and Towns, D. R.
- Fisher, P., O'Connor, C., Wright, G. and Eason, C.T., 2003. Persistence of four anticoagulant rodenticides in livers of laboratory rats. DOC Science Internal Series 139.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z., 1994. Vektör, kemirici ve başıboş hayvanların kontrolü, Aydoğdu ofset basımı ISBN-975-7572-32-2, Ankara.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z., 1997. Pestisitler, ISBN 1975-8088-69-6, Ankara.
- Hayat, M.A., 1981. Principle and Techniques of Electron Microscopy. Biological application. 2nd Ed. Vol.1 Edward Arnold Publish, 313 p., USA.
- Hadler, M.R., Bukle A.P., 1992, Forty five years of anticoagulant rodenticides past, present and future trends. Vertebrate Pest Conference Proceeding collection, Proceeding of the fifteenth vertebrate pest conference.
- Jack, K.R., Kho, K., Thomas, N.W., Fry, J.R., 1996. Further studies on the lobar heterogeneity in response to coumarin-mediated hepatotoxicity. International Journal of Experimental Pathology 77 (2), 79-82.
- Karanth, S., Nayyar V., 2003. Rodenticide-induced Hepatotoxicity. Journal of Association of Physicians India 51, 816-817.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H. and Makwchi, M., 1999. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. J. Hepatobiliary Pancreat Surg 6:171-175.

- Lake, B.G., Grasso, P., 1996. Comparison of the hepatotoxicity of coumarin in the rat, mouse, and Syrian hamster: a dose and time response study. *Fundamental and Applied Toxicology* 34 (1), 105-117.
- Lechevin, J.C. ve Vigie, A., 1992. Which useful toxicological information can be drawn from studies on the hepatic fixation of anticoagulant rodenticides. *Proceeding of the fifteenth vertebrate pest. Conference paper* 45.
- Lee, Ju-Hee, Kim, H., Han, H., Lee, K., M.D.^{1,2,3} ve Kim, S., M.D.^{1,2,3}, 2009. A case of superwarfarin intoxication without a definitive history of brodifacoum exposure. *J. Hematol*; 44-53-57.
- Littin, K.E., O'Connor, C.E., Eason, C.T., 2000. Comparative effects of brodifacoum on rats and posum. *New Zealand Plant Protection* vol. 53 pp.310-315.
- Mosterd, J.J., Thijssen, H.H.W., 1991. The long-term effects of the rodenticide, brodifacoum, on blood coagulation and vitamin K metabolism in rats. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 104, pp.531-535.
- Naim, M., Umar, J. ve Hafidzi, M.N., 2012. The Ranging Behaviour of *Tyto alba* in Oil Palm under Baiting with Anticoagulant Rodenticides, Warfarin and Brodifacoum and a Biorodenticide *Sarcocystis singaporensis*. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 35 (2): 209 – 221.
- Namıduru, E.S. ve Tarakçioğlu, M., 2011. K vitamini ve Osteoporoz. *Gaziantep Tıp Dergisi*; Cilt 17(1) pp.1-7.
- Naz, S., Rana, S. A., Javed, M., Khalil-ul-Rehman, 2011. Toxicological effects of brodifacoum and food energy inhibitor on some physiological parameters in house rats (*Rattus rattus*). *Pakistan Veterinary Journal* Vol. 31 No. 3 pp. 219-222.
- Park, CW, Cho, JH, Bae, JH, Moon, JB, Chon, SB, Ahn, KO, Lee, HY, 2011. A Case of Prolonged Coagulopathy in a Patient Intoxicated with Superwarfarin Rodenticide. *J Korean Soc Clin Toxicol* Dec 9(2):113-116.
- Revathi, K. ve Yoganonda, M., 2006. Effect of bromadiolone on haematology, liver and kidney in *Mus musculus*. *Journal of Environmental Biology* January 2006, 27(1) 135-140 (2006).

- Smith, S.A., Kraft, S.L., Lewis, D.C., Freeman, L.C., 2000. Plasma pharmacocnetics of warfarin enantiomers in cats. J.Vet. Pharmacol. Therap. Vol. 23, pp.329-337.
- Ünal, H. H., Oruç, H. H.,Sezin, A.,Kabil, E. 2010. Türkiye’de, 2006-2010 yılları arasında, bal arılarında görülen ölümler sonrasında tespit edilen pestisitler, Uludağ Arıcılık Dergisi 10(4):119-125.
- Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V., Nikolov, Y., 2008. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals- a review. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 32(4):237-243.
- Vanderbrouck, V., Desme,t N., Backer, P.D., Croubels, S., 2008. Multi- residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatagraphy combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B., 869-101-110.
- Yurdakul, U., Uçankuş, N.L., Ömeroğlu, S., Hatipoğlu, M.T., 2005. Değişik yağ gruplarındaki sıçan karaciğer dokusunda bağ dokusu liflerinin dağılımı. Düzce Tıp Fak. Derg.;3:15-20.
- Taylor, R. H.,Thomas, B.W.1989. Eradition of Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Hawea Island, Fiordland, using brodifacoum. New Zeland Journal of Ecology, vol. 12 pp.23-32.
- Weitzel, J. N., Sadowski, J. A., Furie, B. C., Moroose, R., Kim, H., Mount, M.E., Murphy, M.J., ve Furie, B., 2012. Surreptitious Ingestion of a Long-Acting Vitamin K Antagonist/Rodenticide, Brodifacoum: Clinical and Metabolic Studies of Three Cases. Blood, Vol76, No 12 (December 15). 1990: pp 2555-2559.
- Zivelin, A., Rao, L.V.M. ve Rapaport, I., 1993. Mechanism of the anticoagulant effect of warfarin as evaluated in rabbits by selective depression of procoagulant vitamin K- dependent clotting factors. J. Clin. Invest. Vol.92, 2131-2140.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceren GENİŞ

Doğum Yeri : KARABÜK

Doğum Tarihi: 29/08/1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Halide Edip Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2009- Temmuz 2012)