

İÇME SUYU İLE BELİRLİ DOZLARDA FLOR VERİLEN TAVŞANLARIN KARACİĞER DOKUSUNDAKİ YAPISAL VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Mehmet AKDOĞAN¹ Ali BİLGİLİ² Erdal KARAÖZ¹ Alparslan GÖKÇİMEN¹
Ender YARSAN² Gökhan ERASLAN³

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta-TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara-TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri-TÜRKİYE.

Geliş Tarihi: 17.05.2001

The Structural and Biochemical Alternations in Liver Tissue of Rabbits, Received Flour with Water for Particular Dose and Period

Summary

The aim of this study was to investigate the effect of sodium fluoride on liver tissues in rabbits, which was given in drinking water in the doses of 10 and 40 ppm for 70 days. New Zealand strain, 21 male rabbits were used for this purpose. At the end of 70th day, blood samples taken from control and experimental groups (10 ppm and 40 ppm) were evaluated regarding the levels of plasma aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) which are antioxidant enzymes in liver tissue and the activities of superoxide dismutase (SOD), glutation peroxidase (GSH-Px), glutation reductase (GSH-Rd), catalase (CAT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and the levels of malondialdehyde (MDA). In the experimental groups (Groups II, III), the activities of LDH and MDA were increased significantly when they were compared to control. The activities of tissue SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT were significantly increased in the group of 10 ppm, in contrast, there was significant decrease in the group of 40 ppm. The activity of G6PD was shown a decrease only in the group of 40 ppm. In both experimental groups, it was determined that fibrosis in the portal area of liver tissue and proliferation in bile canals, abnormal focal cellular infiltration in the periphery of lobe, dilatation in sinusoidal capillaries and heterochromatisme in the nuclei of hepatocytes which were much more severely occurred proportional to higher dose. On the other hand, there was significant increase in the levels of plasma flour.

Key Words: Rabbit, flour, liver, biochemical changes, structural changes.

Özet

Bu çalışmada, tavşanlara içme suyu ile 10 ve 40 ppm dozunda 70 gün süreyle verilen florun karaciğer dokusuna yönelik bazı etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Yeni Zelanda ırkı 21 adet erkek tavşan kullanılmıştır. Yetmişinci günün sonunda kontrol ve deneme grubundaki (10 ppm ve 40 ppm) tavşanlardan kan örnekleri alınarak plazma aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyleri ile karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerden süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd), katalaz (CAT), glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) aktiviteleri ve malondialdehid (MDA) düzeyleri değerlendirilmiştir. Deneme gruplarında (Grup II, III) LDH ve MDA aktivitesinde kontrole göre dozdaki artışa bağlı olarak anlamlı bir yükselme bulunmuştur. Doku SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre 10 ppm'lik grupta anlamlı bir yükselme, 40 ppm'lik grupta anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. G6PD aktivitesinde ise sadece 40 ppm'lik grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür. Deneme gruplarının her ikisinde de yüksek dozda daha şiddetli olmak üzere karaciğer dokusunun portal alanlarında fibrozis ve safra kanallarında proliferasyon, lobcukların periferinde atipik hücre infiltrasyon odakları, sinuzoidal kapillerlerde dilatasyon ve hepatosit çekirdeklerinde hetokromatikleşme gözlenmiştir. Ayrıca plazma flor düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tavşan, flor, karaciğer, biyokimyasal ve yapısal değişiklikler.

Giriş

Eser elementlerden olan flor, vücut için gerekli bir halojendir. Günde 1 mg miktarda alınan flor hem vücut, hem de diş gelişimi için faydalıdır (3,17,27). İnsanlarda ve hayvanlarda akut flor zehirlenmesinde başlıca mide, bağırsak, akciğer, kalp, beyin, böbrek, sinir ve kaslarda florun kalsiyumu bağlayıcı ve çeşitli enzim sistemlerini baskılayıcı etkilerine bağlı olarak oluşan kalsiyum seviyesinde düşme, potasyum seviyesinde artma ve hücresel düzeyde kullanılabilir oksijen azalması sonucu çeşitli bozukluklar ortaya çıkabilir (12,19,28,29,31,33). Bunların en önemlileri kalpte kalsiyum düzeyinde düşmeye bağlı olarak kalp kasının kasılma yeteneğinde azalma, atım düzensizlikleri, sistolik ve diyastolik bozukluklardır (8,16,23). Kronik flor zehirlenmesinde ise akut flor zehirlenmesinde ortaya çıkan bozukluklara ilaveten, özellikle kemik, böbrek, tiroid bezi, hipofiz, hipotalamus, testisler ve dişlerdeki bozukluklar dikkat çeker. Ayrıca, kıl örtüsünde bozulma, sperm üretiminde ve süt veriminde azalma görülür (5,10,11,13).

Bu çalışmada, üzerinde çalışma kolaylığı ve sonuçların diğer hayvanlara aktarılabilirliği açısından bir model oluşturacağı düşüncesi ile materyal olarak seçilen tavşanlarda değişik dozda yetmiş gün süre ile flor alımının karaciğer dokusu üzerine etkilerinin çok yönlü incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

A. Kimyasal Maddeler ve Kitler: Sodyum florid (NaF) (Merck, Cat No: 6441), Aspartat aminotransferaz (Kat No: OSR6109 Olympus System Reagent), Alanin aminotransferaz (Cat No: OSR60100 Olympus System Reagent), Laktat dehidrogenaz (Kat No: OSR6126 Olympus System Reagent), 0,1 M Sodyum florid standard (Orion Kat. No: 94 09 06), 100 ppm Sodyum florid standard (Orion Kat. No: 94 09 07), TISAB II (Orion Kat. No: 94 09 09).

B. İçme Sularının Hazırlanması: 10 ppm ve 40 ppm flor içeren içme suları, 5000 ppm'lik stok solüsyondan günlük olarak hazırlanmıştır.

C. Hayvan Materyali: Çalışma 3.5 ± 0.3 kg ağırlığında 6 aylık, erkek, New Zeland ırkı 21 tavşanda gerçekleştirilmiştir. Tavşanların hepsi deney aşamasında Korkuteli Yem Fabrikasından temin edilen tavşan geliştirme pelet yemi ile beslenmiştir. Her birinde 7'şer tavşan bulunacak şekilde, Grup I kontrol, Grup II ve III de deneme grubu olmak üzere üç çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma süresini

oluşturan 70 gün boyunca Grup II'de 10 ppm ve Grup III'de 40 ppm flor içeren su önlerrinde sürekli olarak bulundurulmuştur. Tavşanlardan, 70. günün sonunda eter anestezisi altında göğüs kafesleri açılarak 22 G iğne ile kalpten kan alınmıştır. Biyokimyasal parametreleri saptamak üzere alınan kan örnekleri K_2EDTA 'lı tüplere aktarılmıştır. Kan örnekleri 15 dk. oda ısısında bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Plazmaları başka bir deney tüpüne aktarılmış Olympus AU 640 (Japan) marka otoanalizörde Olympus marka kit kullanarak plazma AST, ALT ve LDH düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca karaciğer dokusu örnekleri alınarak, dokuda SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT, G6PD aktiviteleri ve MDA düzeyleri saptanmıştır. Biyokimyasal inceleme için alınan karaciğer doku örnekleri cam şişeler içinde etiketlenerek $-80^\circ C$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır. Dokunun homojenasyonu, Tapiwanashe yöntemine göre yapılmıştır (24). Homojenatlardan protein yoğunluğu ise Lowry yöntemi (15) ile ölçülmüştür.

D. Biyokimyasal Yöntemler: Homojenatlar SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT, G6PD aktivite düzeylerini ve MDA düzeylerini tespit etmek için kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz aktivitesi Williams J.A. ve ark. (30) bildirdikleri yöntemle, glutatyon peroksidaz aktivitesi tayini Paglia and Valentine (18) yöntemiyle, Glutatyon redüktaz aktivitesi Goldberg (9) yöntemiyle, CAT aktivitesi Aebi'nin (1) metoduyla, G6PD aktivitesi Worthington (32)'nin metoduyla ölçülmüş ve sonuçlar U/mg protein einsinden hesaplanmıştır. MDA düzeyleri, Uchiama ve Mihara (26) yöntemiyle belirlenmiştir. Flor ölçümü ise manuel olarak gerçekleştirilmiştir (2).

E. Histopatolojik Metotlar: Tavşanlardan alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilmiştir. Rutin takiplerden sonra 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin ve trikrom triple bağ dokusu boyasıyla boyanarak, BO 71 Olympus marka mikroskopta resimleri çekilerek değerlendirilmiştir.

F. İstatistiki Değerlendirmeler: İstatistiki değerlendirmeler için "SPSS 9.05 for Windows" istatistik paket programından yararlanılmıştır. Veriler, aritmetik ortalama ve $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiş ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Farklı olan gruplar ise Duncan Testi kullanılarak tespit edilmiştir.

Bulgular

Biyokimyasal Bulgular: Çalışmanın 70. gününde tablo 1'de görüldüğü gibi, gruplar arasında AST ve ALT düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken ($p>0.05$), LDH düzeyinde Grup II'de önemli bir artış ($p<0.05$) tespit edilmiştir. SOD, GSH-Rd, CAT aktivitelerinde Grup III'de kontrole göre önemli ($p<0.05$) ve GSH-Px ve G6PD aktivitelerinde önemsiz ($p>0.05$) bir artış; Grup III'de ise bu parametrelerin hepsinde önemli bir düşüş ($p<0.05$) bulunmuştur. MDA ve plazma flor düzeylerinde ise doz ile orantılı olarak her iki

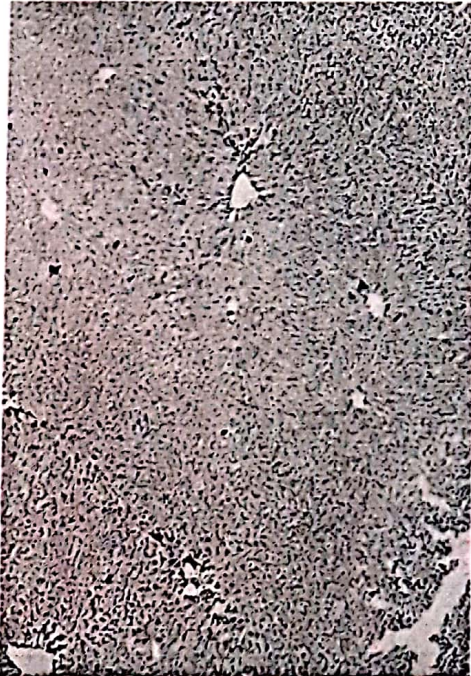
deneme grubunda da (Grup II ve III) önemli ($p<0.05$) bir artış gözlenmiştir.

Histopatolojik Bulgular: Yetmişinci günün sonunda kontrol grubuna ait (Grup I) hayvanların karaciğer kesitlerinde, bu organlara özgü histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 1). 10 ve 40 ppm florlu su verilen deneme gruplarının karaciğer dokularının incelenmesinde ise portal alanlarda fibrozis ve safra kanallarında proliferasyon, lobcukların periferinde atipik hücre infiltrasyon odakları, sinuzoidal kapillerlerde dilatasyon ve hepatosit çekirdeklerinde hetokromatikleşme gözlenmiştir (Şekil 2,3).

Tablo 1. Kontrol ve deneme gruplarının plazma AST, ALT, LDH ve flor düzeyleri ile karaciğer dokusu SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT, G6PD aktiviteleri ve MDA düzeyleri.

Parametre	Grup I (n=7)	Grup II (n=7)	Grup III (n=7)
AST (U/L)	19 ± 4.4	21 ± 3.8	26 ± 5.92
ALT (U/L)	28 ± 5.4	32 ± 4.0	38 ± 8.3
LDH (U/L)	199 ± 24 ^a	256 ± 59 ^a	309 ± 86 ^b
SOD (U/mg protein)	10.01 ± 1.25 ^a	16.12 ± 1.08 ^b	7.40 ± 0.64 ^c
GSH-Px (U/mg protein)	0.56 ± 0.058 ^a	0.59 ± 0.090 ^a	0.41 ± 0.077 ^b
GSH-Rd (U/mg protein)	0.131 ± 0.015 ^a	0.154 ± 0.014 ^b	0.128 ± 0.015 ^a
CAT (k/mg protein)	0.79 ± 0.11 ^a	0.99 ± 0.12 ^b	0.52 ± 0.11 ^c
G6PD (U/mg protein)	0.48 ± 0.089 ^a	0.53 ± 0.088 ^a	0.39 ± 0.086 ^b
MDA (nmol/gr protein)	250 ± 37.00 ^a	322 ± 72.00 ^a	411 ± 99.00 ^b
Flor (mg/L)	0.067 ± 0.016 ^a	0.145 ± 0.024 ^b	0.220 ± 0.071 ^c

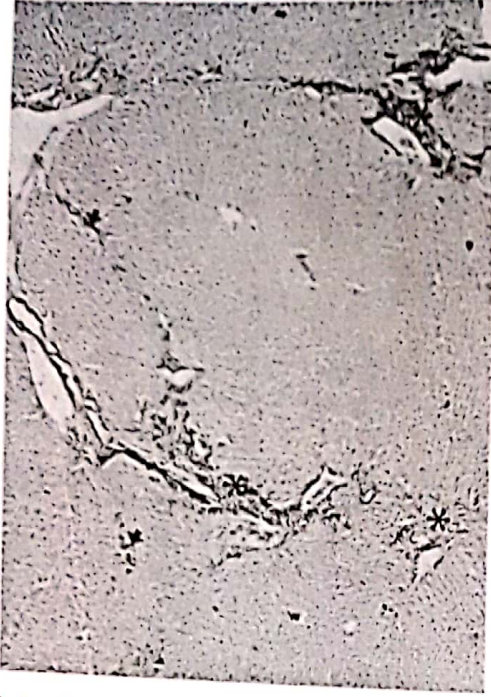
a, b, c.: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$).



Şekil 1. Kontrol grubu karaciğer dokusu (x 48, H-E)



Şekil 2. 10 mg/L florlu su alan tavşanların karaciğer dokusu (x 48, H-E)



Şekil 3. 40 mg/L florlu su alan tavşanların karaciğer dokusu (x 48, H-E)

Tartışma

Karaciğer, metabolizmanın merkezi kontrol organıdır. Karaciğer metabolik aktivitesi ölçülerek fonksiyonel durum hakkında bilgi edinilebilir. Serum AST, ALT ve LDH karaciğer için spesifik enzimlerdir (6,7). Çalışmada, AST, ALT ve LDH düzeylerinde düşüş görülmüştür bu yönü ile Araya ve ark. (4) ve Sel (21)'in çalışması ile farklılık arz etmektedir. Zira Araya ve ark. (4) florozisli sığırların AST ve ALT aktivitesini önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Aynı şekilde Sel (21) de florosis belirtisi gösteren koyunlarda LDH aktivitesinin düştüğünü tespit etmiştir. Daha çok karaciğer fonksiyonları ile ilişkili olan bu enzimlerin üçünde de kontrole göre her iki deneme grubunda da artış görülmüştür. Bu enzim aktivitelerindeki artış, bahsedilen organda bir bozukluğun olduğunun işaretidir. Fakat, yalnızca LDH aktivitesinin istatistik olarak anlamlı bulunması doz ve maruziyet süresi ile ilişkili olabilir. Karaciğer dokusundaki yapısal değişiklikler ise Tiwary ve ark. (25)'nin koyunlara 15 mg/kg NaF'ü ağız yolu ile vererek oluşturduğu akut flor zehirlenmesinde de gözlenmiştir.

Lipid peroksidasyonuna yol açarak membran hasarına sebep olan serbest oksijen radikallerinin süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerle giderilmeye çalışıldığı bilinir. Süperoksit radikallerinin H_2O_2 'e dönüşümünü

katalizleyen süperoksit dismutaz, yüksek H_2O_2 yoğunluklarında inhibe edilirken, ortamda bulunan fazla miktardaki O_2 ise katalaz ve glutatyon peroksidazı inhibe eder (14). Soni ve ark. (22) sıçanlara 5 ve 20 mg/kg sodyum florid, %0.9'luk fizyolojik tuzlu su içerisinde periton içi yolla 4 gün boyunca vermişler; her iki doz düzeyinde de karaciğer dokusu antioksidan enzimlerde düşüş tespit etmişlerdir. Saralakumari ve ark. (20) yüksek düzeyde flor içeren sulara (7.2-10.7 ppm) kronik olarak maruz kalan insanlarda MDA ve glutatyon metabolize edici enzim aktivitesinde düzeylerini normal su (0.5-1.0 ppm) içen insanlardaki düzeyler ile karşılaştırmışlar ve her ikisinde de artış bulmuşlardır. Bilimsel veriler, yüksek düzeyde alınan florun gerek kanda gerekse dokularda lipid peroksidasyona sebep olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmada, 10 ppm florlu su verilen deneme grubu (Grup II) ile kontrol grubunun (Grup I) karaciğer dokusundaki değerler karşılaştırıldığında; SOD, GSH-Px, GSH-Rd, CAT aktiviteleri ve MDA düzeyleri önemli derecede artarken, G6PD aktivitesinde önemli bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Demek ki yüksek dozda alınan florun metabolizması sırasında aşırı miktarda süperoksit radikali oluşmuştur. Süperoksit dismutaz'daki %50'lik aktivite artışı bile bu radikallerin ortadan kaldırmasında yeterli olmadığı görülmüştür. Zira MDA düzeyindeki önemli artış da bunun göstergesidir. 40 ppm florlu su verilen deneme grubu (Grup III) ile Grup I ve Grup II'nin karaciğer dokusundaki değerleri karşılaştırıldığında, SOD, GSH-Px, CAT, GSH-Rd, G6PD aktivite düzeylerinde önemli düşüş olurken, MDA düzeyinde önemli artış bulunmuştur. Bu da 40 ppm dozundaki florun karaciğer dokusunda ileri derecede hasara sebep olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, 10 ppm florlu su (Grup II) karaciğer dokusu savunma sisteminde anlamlı bir indüksiyona yol açmıştır. Fakat bu indüksiyon, oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında yeterli olmadığı için lipid peroksidasyondan hücreyi koruyamadığı anlaşılmıştır. 40 ppm florlu su verilen çalışma grubunun (Grup III) karaciğer dokusu SOD, GSH-Px, CAT, GSH-Rd, G6PD aktivite düzeylerinde önemli düşüş, MDA düzeyinde önemli artış ise karaciğer dokusunda ileri derecede hasar oluştuğunu gösterir. Karaciğer dokusundaki oksidatif hasar bulgularını diğer biyokimyasal ve histopatolojik bulgular destekler niteliktedir.

Kaynaklar

1. Aebi H. Catalase .In :Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. New York Academic Press, London. 1974; 673.
2. Anon 1. Instruction manuel for Fluoride Electrode Model 94-09 Orion. Research Inc. Cabridge Mass. 1977.
3. Anon 2. Review of Fluoride: Benefits and Risks. Report of the Ad. Hoc. Subcommittee on fluoride of the Committee to Coordinate Environmental Health and Related Programmes, Public Health Service. Washington, DC, Dept. of Health and Human Services. 1991.
4. Araya O, Wittwer F, Villa A, Ducom C. Bovine fluorosis following volcanic activity in the Southern Andes. Vet Rec 1990; 126: 641-642.
5. Boillat MA, Garcia J, Velebit L. Radiological criteria of industrial fluorosis. Skeletal Radiol 1981; 5:161-165.
6. Bozkurt B, Koç M, Coşkun F, Cengiz Ö, Bilgin A, Demirpençe E, Kılınç K, Aksoy F. Ratlarda oluşturulan endotoksehide glutatyon eksikliğinin karaciğer histopatoloji ve fonksiyonlarına etkisi, T. Klin Tıp Bilimleri 1998; 18: 388.
7. Cornellus CE. Liver function. In: Kaneko, JJ. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3rd Ed New York, London, Academic Press 1980; 230-242.
8. Çetin N, Sağmanlıgil V, Emre B, Bilgili A, Tokar M. Tavşanlarda akut flor zehirlenmesinin bazı ekokardiyografik değerler üzerine etkisi. TÜBİTAK Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi (Basımda).
9. Goldberg DM, Spooner RJ. In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HV. Ed.) 3rd Vol 3, 1983; pp. 258-265. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fl.
10. Greene DA. Acute and chronic complications of diabetes mellitus in order patients. Am J Med 1980; 80 (5A): 39-53.
11. Hillman D, Bolenbaugh DL, Convey EM. Hyperthyroidizm and anemia related to fluoride in dairy cattle. J Dairy Sci 1979; 62: 416-423.
12. Hirano S, Ando M, Kanno S. inflammation responses of rat alveolar macrophages following exposure to fluoride. Arch Toxicol 1999; 73: 310-315
13. Kaya S, Akar F. Metaller ve diğer inorganik ve radyoaktif maddeler. İçinde: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji Eds.: Kaya,S., Pirinçi,İ. ve Bilgili,A. Medisan Yayınevi , Yayın No:35, Ankara.1998.
14. Kumari DS, Rao RP. Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. Biochem. Int. 1991; 23(4): 639-648.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 182: 265.
16. Morgan JP, Emy RE, Allen PD, Grosman W, Ghatmeyer JK. Abnormal intracellular calcium handling. A Major Cause of Systolic and Diastolic Dysfunction in Ventricular Myocardium Circulat 1980; 81(111): 21-23.
17. Murray JJ. Ed. Appropriate Use of Fluorides for Human Health. Geneva, WHO. 1986.
18. Paglia PE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70(1): 158-169.
19. Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. Arzneimittelforschung 1996; 46:531-53.
20. Saralakumari D, Rao PR. Erythrocyte glutathione metabolism in human chronic fluoride toxicity Biochem Int. 1991; 23(2): 349-357.
21. Sel T. Doğu Anadolu Bölgesinde normal ve florosis belirtisi gösteren koyunlarda serum spesifik karaciğer enzimleri (Glutamat Oksalasetat Transaminaz, Glutamat Piruvat transaminaz, Laktad Dehidrojenaz) ve alkalin fosfataz düzeylerinin araştırılması. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 1991.
22. Soni MG, Kachole MS, Pawar SS. Alternation in drug metabolising enzymes and lipid peroxidation in different rat tissues by fluoride. Toxicol Lett 1984; 21:167-172.
23. Strubelt O. The Pathophysiological profile of the acute cardiovascular toxicity of sodium fluoride. Toxicol, 1982; 2483-49: 313-323.
24. Tapiwanashe M, Yoheshkumar SN, Hasler JA. Effects of chloroquine treatment on antioxidant enzymes in rat liver and kidney. Free Radical Biol Med, 1997; 22: 321-327.
25. Tiwary SN, Singh CDN, Jha GJ, Sinha BK. Some observations on the pathology of experimental fluoride poisoning in sheep. Ind J Anim Health, 17(2): 141-143.

26. Uchiama M, Mihara M. Evaluation of thiobarbituric acid (TBA) value as an index of lipid peroxidation in CCl₄-intoxicated rat liver. *Yakugaku Zasshi Japanese*. 1981; 101 (3): 221-6.
27. Underwood EJ. Fluorine. In: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 2nd Ed., Academic Press.; New York, 1962.
28. Usuda K, Kono K, Dote T, Nishiura K, Miyata K, Nishiura H, Shimahara M and Sugimoto K. Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity *Arch Toxicol* 1998; 72: 104-109.
29. Varner JA, Jensen KF, Horvath W, Isaacson RL. Chronic administration of aluminium-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res* 1998; 784: 284-98.
30. Williams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. *Res Vet Sci* 1983; 34: 253-256.
31. Walton KC. Environmental fluoride and fluorosis in mammal. *Mammal Rev* 1988; 18(2): 77-90.
32. Worthington V. Worthington enzyme manual. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Worthington Biochemical Corporation Freehold, New Jersey, U.S.A. 1993; 189-192.
33. Yolken R, Korecny P, Mc Carty P. Acute fluoride poisoning. *Pediatrics* 1976; 58(1): 90-93.