



Canım Annemin Anısı na.....

23496

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METİL KOLANTREN VE FENOBARBİTAL İLE KARACİĞER MİKROZOMAL
ARİL HİDROKARBON HİDROKSİLAZ ENZİMİNİN İNDÜKSİYONU**

İsmet YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA
1990**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

" Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya
Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
olarak kabul edilmiştir.



Başkan-----
Prof. Dr. Engin GÖZÜKARA

Üye-----
Prof. Dr. Şeref GÜÇER

Üye-----
Doç. Dr. Mustafa DEMİR

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim

üyelerine ait olduğunu onaylarım.

9.14.1996

Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, karsinojenik (MC) ve karsinojenik olmayan (PB) bazı bileşiklerin rat karaciğerindeki mikrozomal enzim sentezi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu tezin birinci bölümünde biyotransformasyon yapan enzimlerin yerleştikleri dokular ve karaciğerde mikrozomal ve mikrozomal olmayan enzimlerin indüksiyonundan örnekler verilmiştir. İkinci bölüm deneysel çalışmayı, üçüncü bölüm ise sonuç ve tartışma kısmını içermektedir.

Çalışmaların sonunda, karsinojenik olan MC ve karsinojenik olmayan PB bileşiklerinin rat karaciğerindeki mikrozomal enzim aktivitesine olan etkileri konusunda dikkate değer ve teori ile paralellik gösteren sonuçlar elde edilmiştir.

Mikrozom izolasyonu ultracentrifüj ve doku homojenizatörü ile sitokrom P-450 analizleri belli dalga boylarında tarama yapabilen spektrofotometre ile , enzim aktivite tayinleri ise modern bir floresansspektrofotometre ile başarılmıştır.

ABSTRACT

In this work the effects of some carcinogenic and noncarcinogenic compounds on the microsomal enzyme synthesis in rat liver are investigated. In the first part of this thesis particularly tissues which contain enzymes that induce biotransformation; oxidation reactions caused by microsomal and nonmicrosomal enzymes in liver are described and examples of microsomal enzyme induction are given. The second part comprises the experimental work and the third part is devoted to results and discussion.

Results that are significant and consistent with the theory obtained for the effect of carcinogenic MC and of noncarcinogenic on microsomal enzyme activity in rat liver.

Microsome isolations are performed by the use of an ultracentrifuge and a tissue homogenizator, cytochrome P-450 analyses are made by a scanning spectrophotometer and analyses of enzyme activities are realized with modern fluorescence spectrophotometer.

TESEKKÜR

Çalışmam boyunca yakın ilgi ve desteğini bir an bile esirgemeyen; yerinde ve zamanında yaptığı uyarılarla yol göstererek bana güç ve moral veren değerli hocam; Prof.Dr.Engin GÖZÜKARA ya, ayrıca bu çalışmamın başlangıcında olumlu yaklaşımlarıyla çok büyük desteğini gördüğüm değerli hocam

Yrd.Doç.Dr.Kayahan FISKIN a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmam sırasında manevi desteğini gördüğüm çok kıymetli hocalarım;

Prof.Dr.Bekir ÇETİNKAYA'ya ,Prof.Dr.Engin ÇETİNKAYA'ya , Doç.Dr.Mustafa

DEMİR'e,Yrd.Doç.Dr.Engin ŞENER'e ,Yrd.Doç.Dr.Ahmet METE'ye, Arş.Grv.Turgay

SFÇKİN'e, Arş.Grv.Ismail ÖZDEMİR'e , Arş.Grv.Türkan ESEN'e, Arş.Grv.Hikmet

SAYILIKAN'a , Arş.Grv.Şadiye ŞENER'e ve arkadaşım Mehmet KURNAZ'a sonsuz

teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Biyotransformasyon Yapan Enzimlerin Yerleştikleri Yapılar.....	2
1.3. Karaciğerde Mikrozomal Enzimler Tarafından Yapılan Oksidasyon Olayları.....	5
1.3.1. Aromatik Halkanın Hidroksillenmesi.....	9
1.3.1.1. Epoksid Oluşumu.....	10
1.3.2. Mikrozomal Olmayan Enzimlerin Yaptıkları Oksidasyon Olayları.....	13
1.4. Karaciğer Mikrozomal Enzimlerinin İlaç Metabolizmasındaki Rolü.....	14
1.5. Mikrozomal Enzim İndüksiyonu.....	16
1.6. Karaciğer Mikrozomal Karışık Fonksiyonlu Oksidaz Seviyelerini Ve Sitokrom P-450'yi Yükseltme Metodları...	23
1.6.1. Fenobarbital İle İndüksiyon.....	23
1.6.2.3- Metil Kolantren Veya 3,4-Benzpiren İle İndüksiyon.	24
1.7. Benzo(a)piren Metabolizmasının Floresans Özellikleri.	26
2. DENEYSEL BÖLÜM	29
2.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
2.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler.....	29
2.3. Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi Aktivite Tayin Yöntemi.....	35

3. SONUÇ VE TARTIŞMA..... 43)

4. KAYNAKLAR.....44



ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. Prekarsinojenlerin Detoksifikasyon ve Aktivasyonlarının Neden Olduğu Metabolik Yollar Arasındaki İlişki.....	4
Şekil 1.2. Mikrozemlerde Meydana Gelen Elektron Transport Reaksiyonları.....	6
Şekil 1.3. Mikrozemal Oksidazlarla Hidroksillenme Olaylarında Elektron Akışının Son Basamakları.....	7
Şekil 1.4. Çok Bileşenli Monooksijenaz Sisteminin Rol Oynadığı Reaksiyon Mekanizması.....	8
Şekil 1.5. Eksenobiyotiklerin Epoksid Türevlerine Dönüşerek Vücuttan Atılmalarına İlişkin Mekanizma.....	11
Şekil 1.6. Polinükleer Hidrokarbon Metabolizmasının Aktivasyon ve Detoksifikasyon Yolu.....	15
Şekil 1.7. Sığan Karaciğerindeki Polisiklik Hidrokarbonların Metabolizması.....	21
Şekil 1.8. Benzo(a)Piren'in Enzimatik Reaksiyonları.....	25
Şekil 1.9. Aktivasyona ve Detoksifikasyona Neden Olan Benzo(a)Piren Metabolizması.....	27
Şekil 2.1. Standart BSA İle Hazırlanan Çalışma Grafiği.....	33
Şekil 2.2. MC Mikrozemlerinin Fluoresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi.....	38
Şekil 2.3. PB Mikrozemlerinin Fluoresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi.....	39
Şekil 2.4. Kontrol Mikrozemlerinin Fluoresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi.....	40
Şekil 2.5. MC , PB , Kontrol Mikrozemlerinin Fluoresans Şiddetlerinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişiminin Birlikte Gösterimi.....	41

TABLULAR

Sayfa

Tablo 1.1. Karaciğerde Sitokrom P-450'ye Özgü Reaksiyonlar.....	5
Tablo 1.2. İnsanda Mikrozomal Enzimleri İndüklediği Gösterilen İlaçlar ve Diğer Kimyasal Etkenlerden Bazıları.....	18
Tablo 1.3. Benzo(a)Piren ve Türevlerinin Fluoresans Özellikleri.....	26
Tablo 2.1. Standart BSA Çözeltileri İle 750 nm de Elde Edilen Absorbans Değerleri ve Ortalaması.....	32
Tablo 2.2. Örneklerle Okunan Absorbans Değerleri ve Ortalaması.....	34
Tablo 2.3. Örneklerdeki Protein Miktarları.....	34
Tablo 2.4. Mikrozomların Fluoresans Şiddetlerinin Inkubasyon Sürelerine Göre Değişimi.....	37

KISALTMALAR

AHH	: Aril Hidrokarbon Hidroksilaz
MFO	: Mixed Function Oksidase
KFO	: Karışık Fonksiyonlu Oksidaz
MEI	: Mikrozomal Enzim İndüksiyonu
B(a)P	: Benz(a)Piren
3-MC	: 3-Metil Kolantren
PB	: Fenobarbital
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (redükte)
NADP ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (okside)
BSA	: Bovin Serum Albumin
FMN	: Flavin mononükleotid (okside)
FAD	: Flavin adenin mononükleotid (okside)
MSS	: Merkezi sinir sistemi
cyt-b	: Sitokrom-b
cyt-c	: Sitokrom-c
cyt-P-450	: Sitokrom-P-450

1. GİRİS:

1.1: Genel Bilgiler:

İlaçlar vücutta, uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalırlar.İlaçların enzimlerin etkisi ile vücutta kimyasal değişikliklere uğramasına "Biyotransformasyon" denilir. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilirler.

Biyotransformasyon sonucu ilacın dönüştüğü bileşiklere o ilacın metaboliti adı verilir. İlaçların çoğu, vücutta birkaç çeşit kimyasal reaksiyona maruz kaldıkları için onlardan birkaç çeşit metabolit oluşur.

Biyotransformasyon yapan bazı enzimlerin polimorf türleri vardır.Bunların etkinlikleri farklılık gösterir. Kişideki enzimin türü veya miktarı genetik olarak belirlenir. Bu durum nedeniyle biyotransformasyon yapan enzimlerin etkinliği ve dolayısı ile ilaçların inaktivasyon ve oranı kişiler arasında belirgin farklar gösterebilir.

Biyotransformasyon yapan enzimler sadece ilaçları değil, bütün diğer kimyasal maddeleri de metabolize edebilirler.Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan insan vücuduna giren kimyasal maddelere "Ksenobiyotikler" adı verilir. Çağdaş yaşamda ilaçtan, hergün insan vücuduna çeşitli şekillerde birçok ksenobiyotik girer; bunların önemli türleri: besin aditifleri, insektisid ve fungusid artıkları(besin kontaminantları), havayı ve suları kirleten

artıklar ve sigara dumanıdır. Biyotransformasyon yapan enzimler, genellikle (fakat her zaman değil) ksenobiyotiklerin zararlı etkilerini azaltmaya yönelik etkinlikleri ile vücudu onlara karşı korurlar. Karaciğerdekiler, ağızdan alınan çeşitli ksenobiyotiklerin zararlı etkilerine karşı bir kimyasal savunma hattı oluştururlar; aynı durum çevre havasından alınan ksenobiyotiklere karşı akciğer dokusunda ve hamile kadınlarda fötüsü korumak için plasenta da görülür.

Bu enzimlerin büyük bir bölümü, adaptif değişiklikler göstermeye elverişlidir şöyle ki; ksenobiyotiklerin vücuda fazla girmesi sonucu kimyasal sataşma(challenge) artarsa enzim ve etkinliğide artar ve detoksifikasyon güçlenebilir. Biyotransformasyonda rol oynayan enzimlerin büyük bir kısmı vücutta besin öğeleri ve endojen maddelerin metabolizmasında da rol oynarlar.

1.2. Biyotransformasyon Yapan Enzimlerin Yerleştikleri Yapılar:

Biyotransformasyon yapan enzimlerin bazıları az veya çok, bütün hücrelerde bulunurlar. Diğer bazıları selektif olarak, belirli organlarda yerleşmişlerdir. İlaçları metabolize eden enzimlerin bulunduğu başlıca organlar şunlardır:

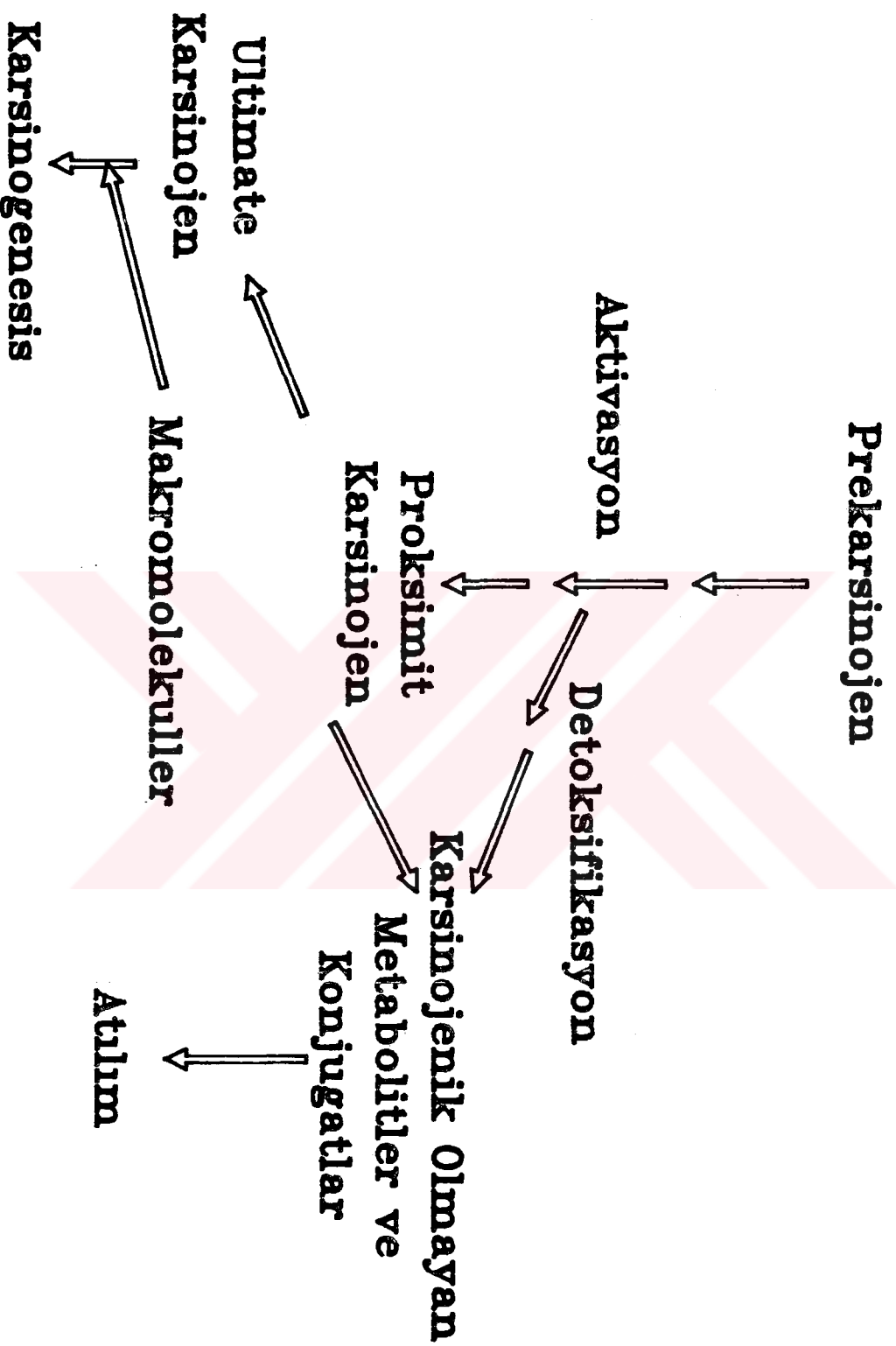
1. Karaciğer
2. Gastrointestinal kanal mukozası ve lümeni
3. Akciğer
4. Böbrekler
5. Diğer yapılar(cilt, mss, plazma, eritrositler, ağız mukozası, dış elleri, plasenta).

Karaciğer:

Çeşit ve miktar(etkinlik) bakımından en fazla enzim içeren yapıdır. Biyotransformasyonda baş rolü oynayan organ karaciğerdir. Karaciğerde biyotransformasyon bakımından en önemli enzim fraksiyonu ise mikrozomal enzimlerdir(1). Bu enzim sistemleri karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulum membranında bulunurlar. Karaciğer hücreleri homojenize ve ultrasantrifüj işlemlerine tabii tutulurlarsa, tubül halindeki endoplazmik retikulum membranı parçacıklarının uçları kapanarak veziküller(kesecikler) şekillenir; bunlara "microsome"(mikrozom) denir.

İlaçlar ve öteki yabancı maddeler karaciğerde oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon tepkimeleri ile metabolize edilirler. Bu kimyasal tepkimelerin esas hedefi, lipofilik(yagda eriyen) maddeleri, hidrofilik(suda eriyen) hale dönüştürmektir. Zira, suda eriyen maddeler böbrekler tarafından kandan kolayca uzaklaştırılabilirler. Yabancı maddelerin detoksifiye edilmesinde, karaciğer çoğunlukla oksidasyon tepkimesini kullanır, çünkü oksidasyon için çok çeşitli yollar vardır. Örneğin; yan zincir oksidasyonu, N - dealkile edilme, deamine edilme, sülfoksid şekillenmesi gibi...(2).

Oksidasyon olaylarının büyük bir kısmı, karaciğer parenkima hücresinin mikrozomal enzimleri tarafından yapılır. Bu hücrelerde veya vücudun diğer organlarında bulunan mikrozomal olmayan bazı enzimlerin yaptığı oksidasyon olayları da vardır. Bundan dolayı bu olaylar iki kısımda incelenecektir.



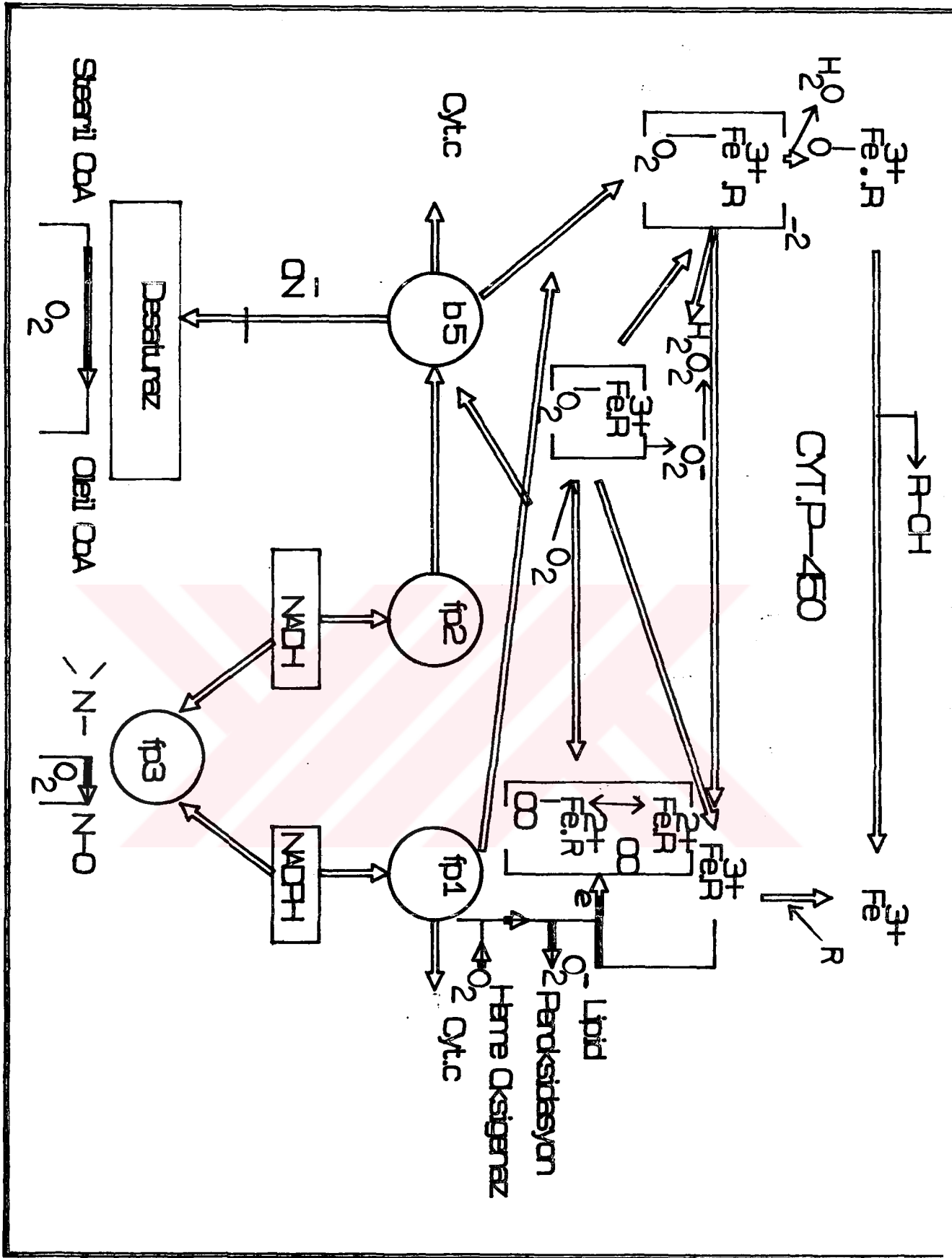
Prekarsinojenlerin Detoksifikasyon ve Aktivasyonlarının Neden Oldugu Metabolik Yollar Arasındaki Diskü

Tablo 1.1. Karaciğerde mikrozomal sitokrom P-450 ye özgü reaksiyonlar.

Aromatik hidroksilasyon	Dehalojenasyon
Azoredüksiyon	Deamine edilme
Desülfürasyon	N - oksidasyon
Sülfoksidasyon	Nitroredüksiyon
Peroksidasyon	Epoksidasyon
Alifatik hidroksile	S - dealkilleme
O - dealkilleme	

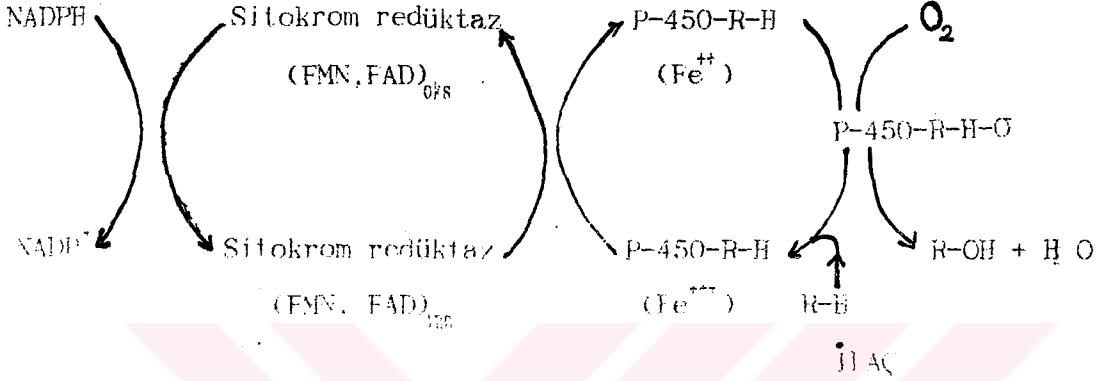
Karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından yapılan oksidasyon olayları:

Karaciğerin oksidasyon yapan mikrozomal enzimleri, tamamıyla idantifiye edilmemiş bir grup enzimden oluşur ve "Karma fonksiyonlu oksidazlar (Mixed Function Oxidase)" adını alırlar; bunlara P-450 sitokromuna bağlı monooksijenazlar veya kısaca sitokrom P-450 enzimleri adı da verilir. Oksidasyon için indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve moleküler oksijen gereklidir. Elektron akış yolağı tam olarak aydınlatılmamıştır. Yolağın ucunda bulunan enzim, iyonize demir içeren hem'li ve 300'den fazla aminoasid residüsüne sahip peptidler olan sitokrom P-450 dir. (Karbon monokside maruz kaldığında 450 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ettikleri için bu adı almışlardır). (1, 2.)



ŞEKİL 1.2. Mikrozomlarda Meydana Gelen Elektron Transport Reaksiyonları

İlaç molekülü(substrat) ile birleşen bu enzimdir.NADPH, bir flavoprotein olan sitokrom c redüktaz tarafından NADP^+ ' ye oksidlenir; sonuçta flavoproteinden bir elektron daha önce substrat ile birleşmiş olan oksidlenmiş sitokrom P-450'ye transfer edilir ve ikinci bir elektronun ilavesiyle ilaç oksidlenmiş şekilde salıverilir.Enzim serbest kalır ve yeni bir ilaç molekülünü bağlar.



Sekil 1.3. Mikrozomal Oksidazlarla Yapılan Hidroksillenme Olaylarında Elektron Akışının Son Basamakları

Söz konusu edilen kimyasal olayın stokiyometrisi aşağıdaki gibidir:



Moleküller oksijenin bir atomu okside edilen bileşiğin yapısına girer, diğer atom oksijen genellikle iki hidrojenle birleşerek su oluşturur.Hücre solunumunda görevli sitokromlar, hemoglobin gibi oksijeni bağlarlar ve bu oksijeni okside edilecek bileşiğe aktarırlar.Sitokrom P-450, hücre solunumunun son kısmında oksidaz görevi yapar; önce elektron transport zincirinde bir bileşikten diğerine aktarılan elektronları alır, sonra oksijen bağlar ve bu oksijeni okside edilecek bileşiğe(hücre solunumunda hidrojenlere) verir. İlaç metabolizmasında ise, sitokrom P-450 bağladığı oksijeni,

okside edilecek ilaç bileşimine verir. İlaçların toksik etkilerinin giderilmesinde (detoksifiye edilmesinde) işe karışan sistem; oksijen, NADPH ve sitokrom P-450' den başka bir de sitokrom P-450 redüktaz içerir.

Diğer bir sitokrom (sitokrom b5) Keza işe karışabilir. Karaciğer mikrozoamlarında mevcut bu sitokrom b5 in, ilaç metabolizmasındaki esas fonksiyonu henüz açıklığa kavuşturulmuş değil. Sitokrom P-450 redüktaz ve sitokrom b5 mikrozoam membranının dışında, sitokrom P-450 membranın içine gömülüdürler. (2)

Mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemini oluşturan enzimlerin yaptığı oksidlenme türleri şunlardır:

- a-) Aromatik halkanın hidroksillenmesi
- b-) yan zincir oksidlenmesi
- c-) N- dealkilasyon ve O- dealkilasyon
- d-) S- demetilasyon
- e-) Desülfürasyon
- f-) = Metilliaminlerin oksidatif deaminasyonu
- g-) Sülfoksit oluşumu
- h-) N-oksitasyon ve N-hidroksilasyon

1.3.1. a) Aromatik halkanın hidroksillenmesi:

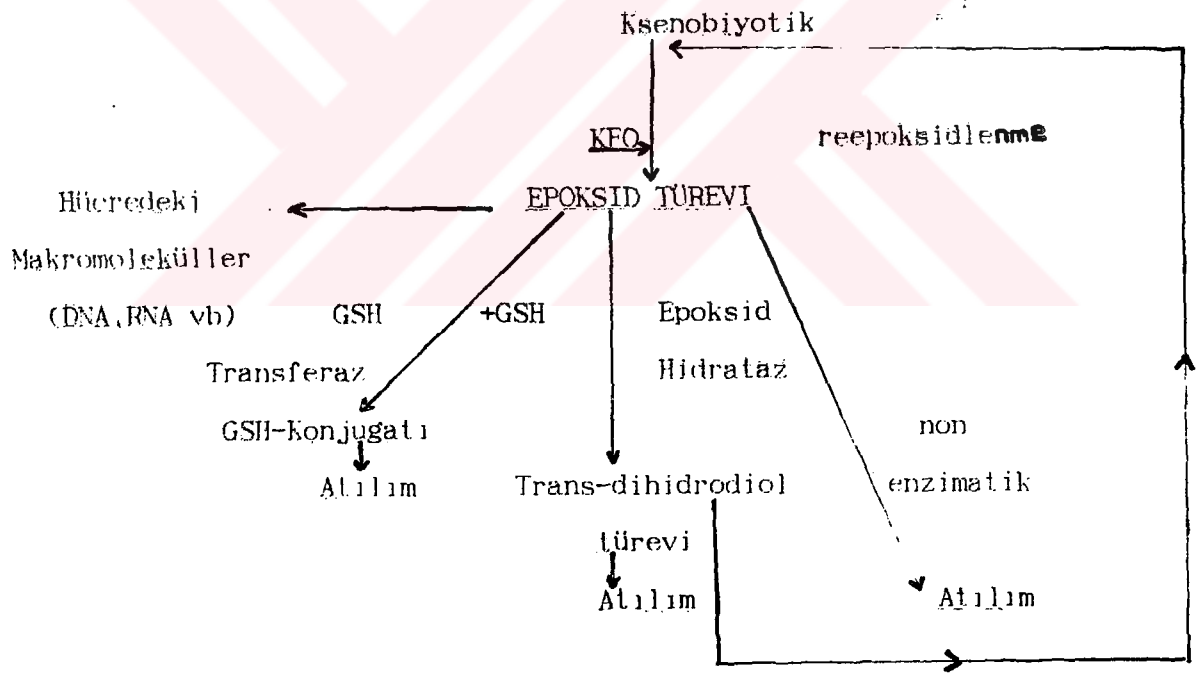
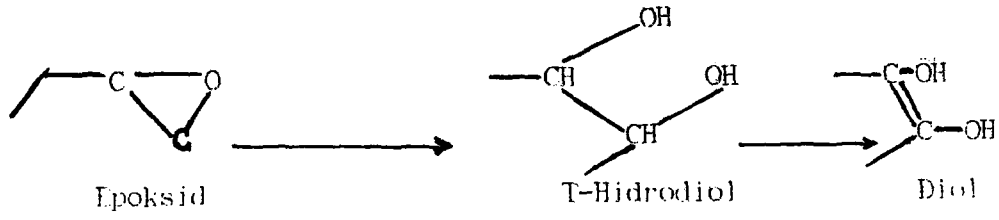
Bu olayları katalize eden enzim, aril hidrokarbonhidroksilaz(AHH) adı verilen monooksijenaz türüdür. Benzen türevleri ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu enzim tarafından, önce epoksit(aren oksit) türevlerine dönüştürülürler, onlardan da fenol veya trans- dihidrodil

türevleri oluşur. Steroid hormonlarının ve benzen türevlerinin fenol metabolitleri, halkaya doğrudan doğruya -OH grubunun bağlanmasıyla da oluşabilirler. AHH enzimi, karaciğerden başka, diğer dokularda ve bu arada akciğerlerde de bulunur.

1.3.2: Epoksid oluşumu

Epoksidler bir oksijen atomunun yanyana iki karbon atomu ile köprü yapması suretiyle oluşan ve genellikle stabil olmayan bileşiklerdir. Benzen türevleri, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve olefinik bileşiklerin karaciğer ve diğer bazı organlardaki oksidlenmeleri sırasında ilk basamak ara ürünü olarak epoksid türevleri (diğer adıyla arenoksidler) oluşur. Bu dönüşümü monooksijenazlar yapar.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, AHH aracılığı ile epoksidlenirler. Epoksidlerin en önemli fizikokimyasal özellikleri lipofilik ve özellikle son derece elektrofilik (elektron çeken) olmalarıdır. Biyolojik yönden en önemli özellikleri ise, reaktif ara metabolitler olmalarıdır; bu nedenle dokularda nükleofilik (elektron veren) endojen bileşiklerle (glutatyon gibi) konjuge edilerek, inaktif duruma gelirler. Epoksidlerin glutatyon ile birleşmesi GSH (indirgenmiş glutatyon) transferaz (diğer adıyla glutatyon S-epoksid transferaz) enzimi tarafından katalize edilir; GSH-epoksid konjugatı böbrekten atılır. Ayrıca hücredeki makromoleküllerin (DNA, RNA, enzimler ve diğer protein molekülleri gibi) nükleofilik gruplarına kovalent bağla bağlanarak onları arillerler veya alkillerler, böylece yapılarını bozarlar.



SEKİL.1.5. Ksenobiyotiklerin Epoksid Türevlerine Dönüşerek Vücuttan Atılmalarına İlişkin Mekanizma.

Yukarıda belirtilen şekilde doku ögeleri ile bir reaksiyona girmeyen epoksidler ise,

1) Ya moleküllerin, enzimatik olmayan bir mekanizma ile yeniden düzenlenmesi sonucu, ya da

2) Karaciğerde mikrozomal bir enzim olan fakat vücudu diğer yerlerinde de bulunan epoksid hidrataz (diğer adıyla epoksid hidrolaz) enzimini aracılığı ile trans-dihidrodiol türevlerine çoğu kez çok hızlı bir şekilde dönüştürülürler.

Epoksidler, genellikle çok kısa ömürlü ara metabolitler olmalarına rağmen yukarıda belirtilen reaktiflikleri nedeniyle bazı ilaç ve zehirli maddelerin karsinojenik, mutajenik, teratojenik, hepatotoksik ve diğer bazı toksik etkilerinden sorumludurlar. (1)

Bazı epoksidler, kural dışı olarak fazla reaktif değildirler ve nisbeten stabildirler. Epoksidlerden epoksid hidrataz enziminin etkisi altında oluşan transdihidrodiol türevleri, genellikle glukoronik asid veya sülfat ile konjuge edilerek itrah edilirler. (1)

Konjugasyon, kimyasal maddelerin vücudun doğal maddeleri ile birleştirilmesi ile olur. Örneğin; glukozdan kök alan glukoronik asitle, amin asidi glisin ile, tripeptid glutatyon ile yabancı maddelerin birleştirilmesi, karaciğerin kullandığı konjugasyonlara örnektir. Adı geçen vücudun doğal maddeleri, karboksil (- COOH), sülfidril (- SH), amin (-NH) ve hidroksil (- OH) grupları taşıyan yabancı maddelerle ve enzim aracılığı ile kolayca konjuge edilirler. Konjuge edilmiş yabancı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ortadan kalkar.

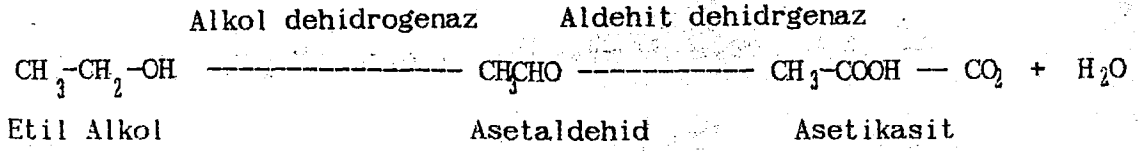
Karaciğerin mikrozomal enzimleri, steroid hormonları, kolesterolü, yağasitlerini okside ederler; okside edilmiş bileşikler, vücudun doğal maddeleri ile (glukoronik asitle) konjuge edilirler ve böbrekler tarafından uzaklaştırılırlar.

Hemoglobinin parçalanması ile oluşan hem molekülünden demir ayrıldıktan sonra porfirin bilirubine çevrilir; bilirubin karaciğerde okside edilir ve glukoronid ile konjuge edilerek vücuttan uzaklaştırılırlar. Bu tepkimede görevli enzim, glukoronil transferaz enzimidir. Yeni doğan bebeklerde, bu enzim henüz tam kapasite ile çalışmaz. Kan uyumsuzluğu gibi nedenlerle alyuvar tahribi artarsa, bilirubin glukoronid ile yeterince konjuge edilemez; bebeğin vücudunda biriken bilirubin " Kernikteno " denilen kötü bir hastalığa neden olur.

Birçok bileşikler anne kanından plasentayı geçerek bebeğin kanına girebilirler. Örneğin; doğum yapacak anneye verilen barbiturat ve morfin plasentayı geçerek bebeğin vücudunda birikir ve doğan bebekte solunumu baskılayabilir.(2)

1.4. Mikrozomal Olmayan Enzimlerin Yaptığı Oksidasyon Olayları

Bu tür enzimlerin bir örneği dehidrojenazlardır. Alkollerin oksidasyonu karaciğerde kısmen mikrozomal oksidazlar tarafından, kısmen de aşağıda gösterilen şekilde, mikrozomal olmayan dehidrojenaz enzimleri tarafından yapılır.

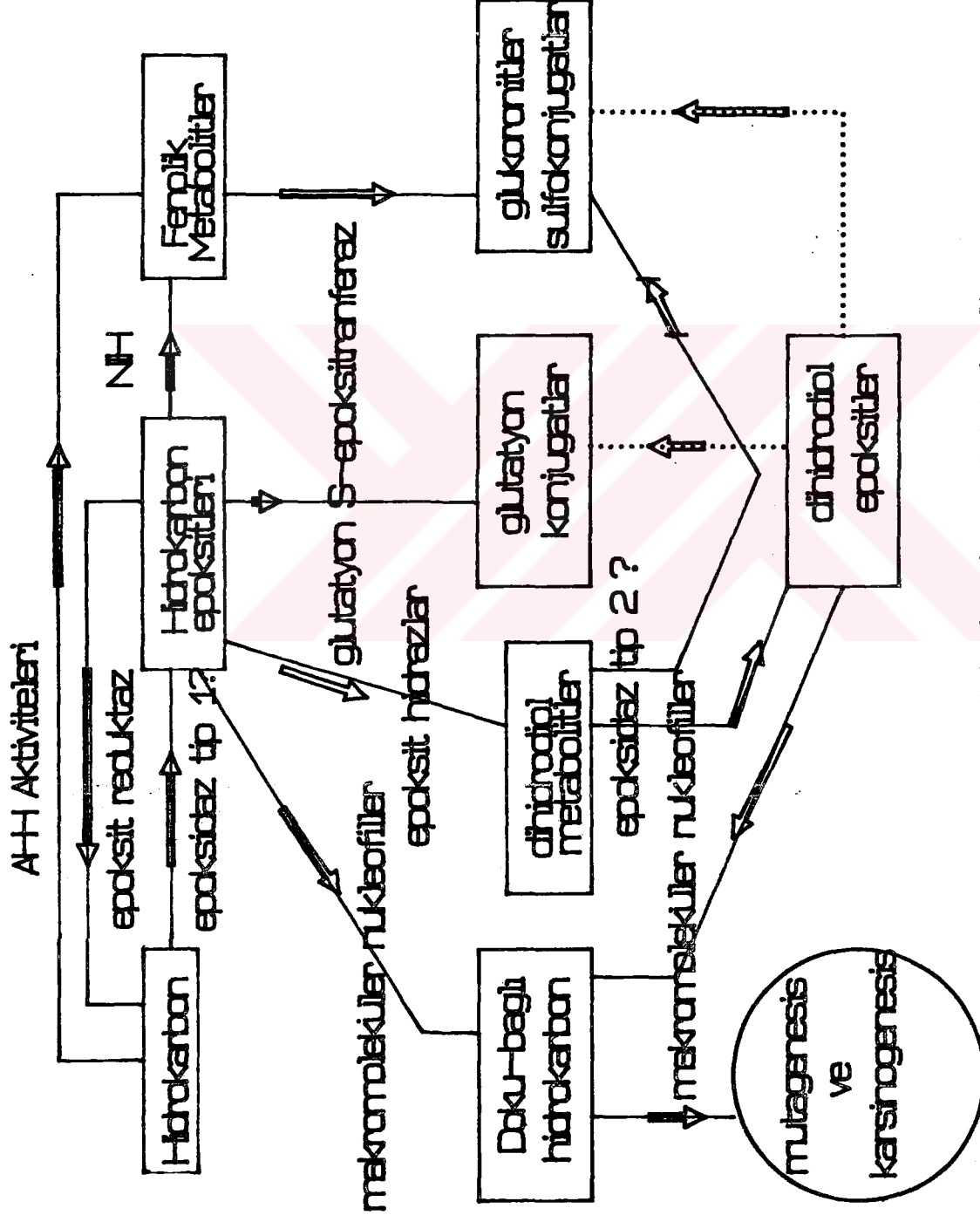


Bu reaksiyonun ilk basamağını katalize eden alkol dehidrogenaz sitoplazmik bir enzimdir; mikrozomal etanol oksidleyici sistemin bu basamağa katkısı ancak % 20-25 oranındadır. İlaç metabolizmasında önemi bulunan ve mikrozomal olmayan diğer enzimler, monoamin oksidaz (MAO), diamin oksidaz veya histaminaz (DAO), ksantin oksidaz, tirozin hidroksilaz ve diğer bazı hidroksilaz enzimleridir.

1.5. Karaciğer Mikrozomal Enzimlerinin İlaç Metabolizmasındaki Rolü

Karaciğer hücrelerindeki enzimlerin önemli bir bölümü, mikrozomlar içinde bulunurlar. Hücre membranı, stoplazma (sitazol) ve mitokondrilerde de çeşitli enzimler bulunursada bunlar, birçok ilacın veya diğer yabancı maddelerin metabolizmasında mikrozomal enzimler kadar önemli değildir. İntakt bir hücrede mikrozom bulunmaz. Bunlar homojenizasyon sırasında hücrenin endoplazmik retikulumunun parçalanması sonucu oluşan artifakt'lardır.

Endoplazmik retikulum, karaciğer hücrelerinde nukleus membranından hücre stoplazmik membranına kadar bir ağ şeklinde uzanan bir kanal sistemidir. Hücre içinde madde taşınmasını sağlar. Büyük bir bölümünde kanallar üzerinde ribozomlar yerleşmiş olup bu kısım yüzeyi pürüzlü retikulumu oluşturur; mikrozomal enzimler ise pürüzsüz kısımda



Sekil 1.6. Polinukleer Hidrokarbon Metabolizmasının Aktivasyon ve Detoksifikasyon Yolu

bulunurlar. Mikrozoamların membranı lipid tabiatlı olduğu için, ancak liposolubl maddeler endoplazmik retikulum içine girebilirler; yukarıda sayılan olaylar sonucu suda çözünlüğü fazlalaşmış ve böylece atılımı daha kolay olan bileşikler haline getirilirler. Mikrozomal enzimler genetik polimorfizm gösterirler, bundan dolayı etkinlikleri kişiler arasında farklılık gösterir.

1.6. Mikrozomal Enzim İndüksiyonu:

Mikrozomal enzim indüksiyonu (MEI), mikrozomal bir enzimin substratı olan bir madde tarafından, bu enzimin ve çoğu kez benzer enzimlerin sentezinin arttırılması sonucu enzimatik etkinliğin artması olayıdır. Mikrozomal sitokrom P-450 enzimleri yani karma fonksiyonlu oksidazlar, kimyasal etkenler tarafından en sık ve en fazla indüksiyona uğratılan enzimlerdir. İlaç ve diğer ksenobiyotiklerin yaptığı mikrozomal enzim indüksiyonunun karaciğerde, bağırsak mukozasında, akciğerde, plasentada ve kandaki lenfositlerde meydana geldiği gösterilmiştir. Belirli bir mikrozomal enzimin farklı yerlerdeki şekillerinin indüklenebilirliği farklı olabilir. Mikrozomal olmayan enzimler, ilaçlar ve diğer kimyasal etkenler tarafından indüklenmeye genellikle rezistandırlar.

Deney hayvanlarında (örneğin sıçanlarda) fenobarbital verilmek suretiyle yapılan deneylerde mikrozomal enzim indüksiyonu esnasında karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda, bir hiperplazi ve karaciğer hücrelerinde büyüme saptanmıştır. Fenobarbital birçok

sitokrom P-450 türünü ve diğer bazı enzimleri indükler, bu şekilde yaygın indüksiyona "Fenobarbital tipi indüksiyon" denir; eskiden insektisid olarak kullanılmış maddeler olan poliklorlu bifenillerde (Araclor 1254 maddesi gibi) fenobarbital gibi spektrumlu indüksiyon yapar. Sıçanlarda 4 gün ağızdan fenobarbital verildiğinde sitokrom P-450b miktarı karaciğerde yaklaşık 40 kez artar. Karsinojen bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan 3-Metil kolantren daha az sayıdaki sitokrom P-450 türünü indükler. Kısıtlı sayıda enzim türünde meydana getirilen indüksiyona "Metil kolantren tipi indüksiyon" denilir, bu durumda karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda hiperplazi olmaz. İnsanda enzim indüksiyonu yapan kimyasal etkenler aşağıdaki tablo da gösterilmiştir.

Kronik alkol kullanımı mikrozomal enzim indüksiyonu yapar; ancak kişi alkolün etkisi altında olduğu sırada bu enzimler inhibe durumundadır. Kişinin alkol almadığı intervallerde indüksiyona bağlı enzimatik etkinlik artması belirgindir.

Yeniden enzim sentezindeki artma spesifik genlerin aktive edilmesine bağlıdır. Bu olay aşağıdaki şekilde olur:

İndükleyici madde sitoplazmadaki hipotetik bir reseptörle (Ah reseptörü) kompleks yapar. Bu kompleks, hücre çekirdeğine girer (translokasyon). (3,4,5)

Tablo.1.2: İnsanda Mikrozoimal enzimleri İndüklediği Gösterilen İlaçlar Ve Diğer Kimyasal etkenlerden Bazıları:

Etkenin Grubu	İlaç veya Diğer kimyasal Etken
Antiinflamatuvar analjezikler	Aminopirin, fenilbutazon, Antipirin
Antikonvulsanlar	Fenitoin, Karbamazepi
Antikoagülanlar	Varfarin ve Diğer kumarin türevleri
Antibiyotikler ve diğer kemoterapotikler	Rifampin, Griseofulvin, Isoniazid
Diüretikler	Spironolakton
Endüstriyel ürünler	Poliklorlu ve Polibromlu Bifeniller ve Dioksan
Insektisidler ve Herbisidler	DDT, Gama-benzen heksaklorür, Endrin, Dieldrin, Fenoksiasitler, Klorofenoller
PAH	Havadaki katı yakıt veya akaryakıt yanma ürünleri, Katranlı merhemler, Kömürde ızgara yapılmış etler.
Sigara	Dumandaki Polisklik Aromatik Hidrokarbonlar
SSS'ni deprese eden ilaç ve maddeler	Barbituratlar, glutetimid, metakalon Kloralhidrat, Meprobamat, Etil alkol,
Esrar Oral kontraseptifler	projestinler.

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlarla rodentlerde yapılan incelemeler, DNA molekülü üzerinde indüksiyonda rol oynayan ve bir dizi genden oluşan bir bölgenin bulunduğunu göstermiştir; bu bölgeye "Ah lokusu" adı verilir.

İlaç-reseptör kompleksi bu bölgede kendisine uyan regülatör geni etkiler ve onun yanındaki yapısal gen üzerinde yaptığı represyonu ortadan kaldırır(derepresyon). Böylece m-RNA sentezini arttırır ve sonuçta ribozomlarda enzim sentezi fazlalaşır.().

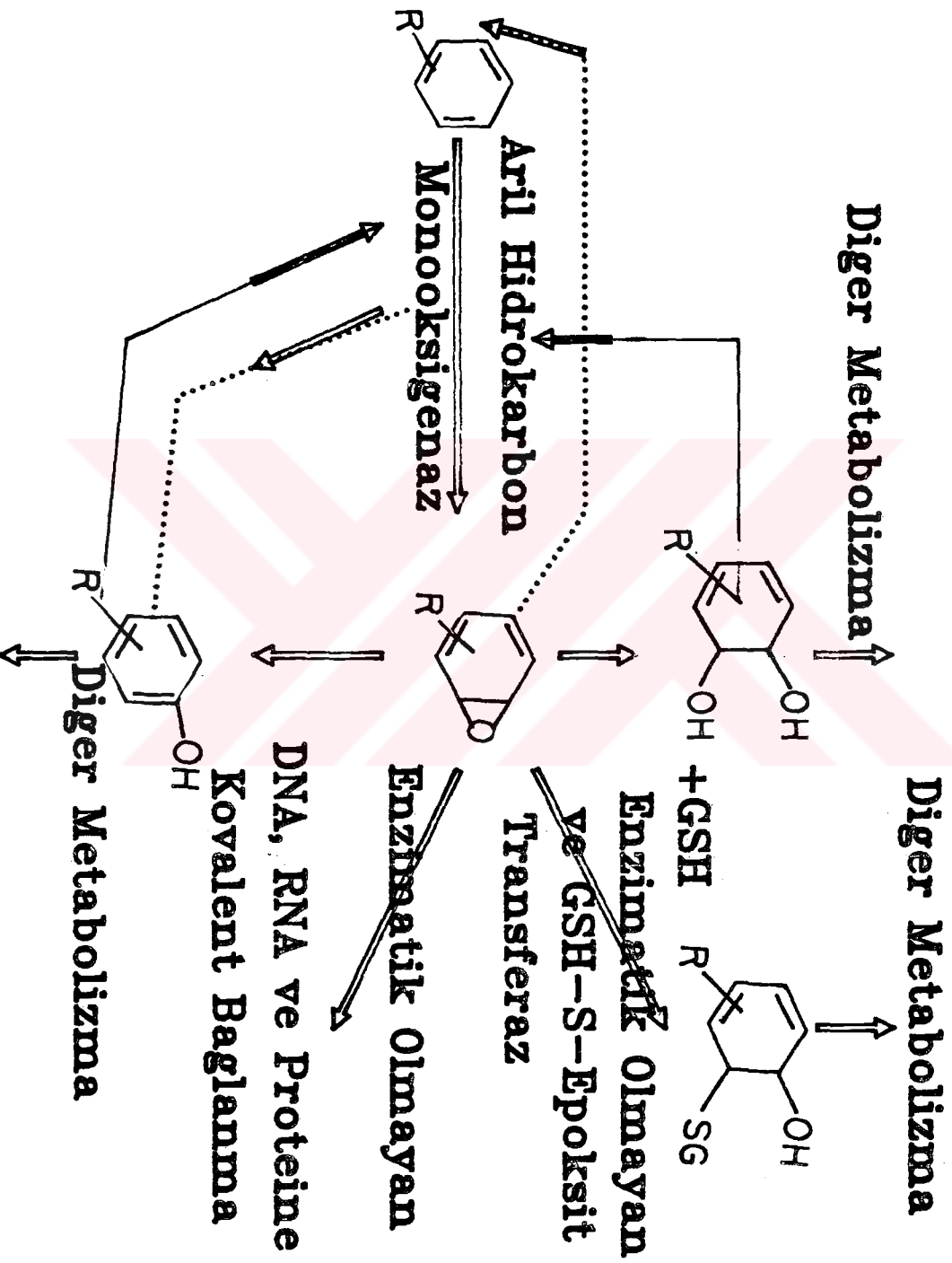
Fenobarbital gibi yaygın indüklemeye yapan ilaçlar, oksidasyon yapan enzimlerden başka, glukuronil transferaz gibi hemoprotein içermeyen enzimlerin ve daha ilginç gama- glutamil transferaz gibi sitoplazma membranında yerleşmiş bir proteininde sentezini arttırırlar. Mikrozomal enzimleri indükleyebilen ilaç dışı kimyasal etkenlerde vardır. Bunların dışında diyet ve sigara dumanı, kirli hava ve diğer şekillerde alınan polisiklik aromatik hidrokarbonlar gelir.

Sigara dumanı, egzoz gazları ve diğer şekillerde kirlenmiş hava içinde alınan benzo(a)pyren maddesi de O-dealkilasyon ve diğer oksidatif biyotransformasyon olaylarını indükler.

İlaç ve diğer kimyasal etkenlerin karsinojenik etkinliğinin değiştirilmesinde enzim indüksiyonu ikili bir rol oynar. Bu olay, karsinojenik maddelerin inaktif metabolitlere dönüşümünü sağlayan enzimler düzeyinde olursa, dönüşüm karsinojenik olmayan metabolitler lehine bozulduğu için ilacın karsinojenik etkinliği azalır veya ortadan kalkar. Enzim indüksiyonu sonucu ilacın karsinojenik etkiden sorumlu metabolitlere dönüşmesi arttırılırsa, enzim indüksiyonu karsinojenik etkinliği arttırır. Örneğin; sigara dumanındaki polisiklik hidrokarbonların akciğer ve diğer yerlerdeki aril hidrokarbon hidroksilaz(AHH) enzimlerini indüklemeleri, bu

maddelerin karsinojenik etkilerini güçlendirir. Akciğer kanserine yakalanmış sigara tiryakilerinde akciğer dokusunda AHH etkinliği çok yüksek bulunmuştur.

Deney hayvanlarında veya hücre kültürlerinde bazı polisiklik hidrokarbonların mutajenik ve karsinojenik etkileri, AHH enzimi indüklenmiş ise daha fazla olur. AHH'nin 7,8-benzoflavon tarafından inhibisyonu belirtilen toksik etkileri azaltır. AHH, polisiklik hidrokarbonların karsinojenik metabolitlere biyotransformasyonunda ilk basamağı katalize eder. (9,10.)



ŞEKİL 1.7. Sıcan Karaciğerindeki Polisiklik Hidrokarbonların Metabolizması

1.7. Karaciğer Mikrozomal Karışık Fonksiyonlu Oksidaz Seviyelerini ve Sitokrom P-450'yi yükseltme metodları:

Karaciğer mikrozomları, çok değişik çözünebilir ilaçlar ve aromatik bileşiklerin oksidasyonundan sorumlu olan karışık fonksiyonlu oksidaz sistemi içerirler. Bu sistemin etkisiyle oluşan reaksiyonlar, önceden de belirtildiği gibi; N- dealkilleme (örnek: aminopirin), O- dealkilleme (örnek: kodein), Yan zincir oksitlenmesi (örnek: barbituratlar), Aromatik halka hidroksilasyonu (örnek: anilin, hidrokarbonlar) ve sülfoksidasyon (örnek: klorpromazin).

Birçok maddenin, karaciğer mikrozomlarının karışık fonksiyonlu oksidaz aktivite içeriğini yükselttiği görülmüştür. Bu maddelere örnek olarak, barbituratlar, sakinleştiriciler, böcek öldürücü ilaçlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (örneğin: 3,4-benzopyren ve 3-metil kolantren) verilebilir. Protein sentezi inhibitörleri (puromisın ve aktinomisin D) ile yapılan deneyler, enzim aktivitesindeki artışın mikrozomal enzim sentezinden dolayı olduğunu göstermiştir.

Bunların en iyi bilineni, sıçanların fenobarbital ile muamelesinden sonra, karışık fonksiyonlu oksidazın indüksiyonudur. Karaciğer mikrozomlarıyla metabolizlenen, NADPH ve moleküler oksijen gerektiren tüm farklı substratların oksitlenmesi için enzim aktivite seviyesindeki artış, esterazlar, redüktazlar ve transferazlar gibi mikrozomlarla birleşmiş olan diğer enzimlerin aktivitesindeki artıştan önce gelir.

İntraselular yapının gelişimi (yani karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunun pürüzsüz zarlarının artışı) elektron mikroskopuyla gözlenebilir. Aynı zamanda karaciğer ağırlığı da artar ve bu karaciğerin gerçek bir hipertrofi'si olarak gözönüne alınabilir. Mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz aktivitelerinin maksimum seviyelere çıkması için gereken zaman, kullanılan indükleyici bileşiğe göre değişir. Metil kolantren veya benzopyren muamelesi 24 saatte maksimum etkiyi gösterir.

Polisiklik hidrokarbonların; hidroksilleyen enzim aktivitesini sadece bazı maddeler için arttırmasının nedeni şu anda anlaşılamamış durumdadır. DDT enjeksiyonundan sonra maksimal aktivite 1 veya 2 hafta sonra elde edilebilir. Fenobarbital kullanıldığında maksimal enzim aktivitesi, tüm substratlar için enjeksiyondan 3-5 gün sonra elde edilir.

Karaciğer mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz aktivitesi ve sitokrom P-450 seviyelerini yükselten belli başlı prosedürler aşağıda tarif edilmiştir. İlk metot'da indükleyici olarak fenobarbitali ikincisinde 3-metil kolantren veya 3,4-benzopyren, üçüncü metot'da ise DDT kullanılmaktadır. (6,7,8)

1.7.1: Fenobarbital ile indüksiyon:

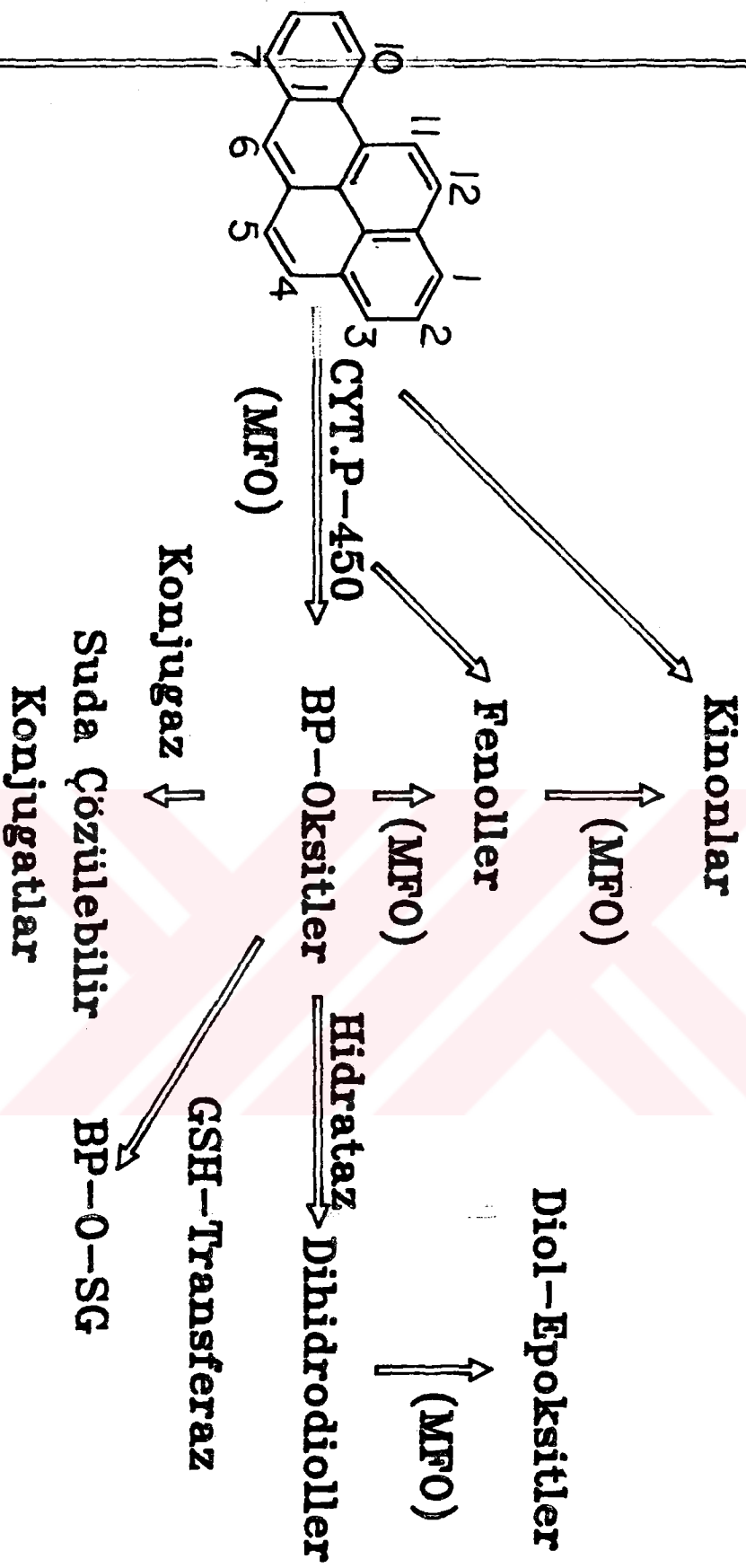
Mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz seviyesini yükseltmek için seçilecek barbiturat fenobarbitaldir. Remmer tarafından yapılan deneyler uzun süreli aktif barbituratların kısa süreli aktif olanlardan bu amaç için daha etkili olduğunu göstermiştir. Her ne kadar tepki doza bağımlı ise de çeşitli araştırmacılar tarafından

uygulanan bileşiklerin frekansı ve dozajları geniş bir şekilde farklılık göstermektedir.

Seçilecek metod, günlük olarak; beş gün boyunca vücut ağırlığının her kg'ı için 75 mg fenobarbital (0,15 M NaCl içinde) intraperitoneal enjeksiyonunu gerektirir. Genellikle 200 gr civarında ağırlığı olan erkek ratlar kullanılmaktadır. Çünkü kontrol hayvanlarının enzim aktivite seviyesi, gelişkin olmayan erkek, dişi veya gelişkin erkek ratlarınkinin biraz üzerinde olup, gelişkin erkek ratlar bu dozdaki fenobarbitale daha iyi tolerans gösterebilirler. Tam gelişkin olmayan erkek, dişi ve gelişkin erkek ratlar için daha düşük bir fenobarbital dozajı (60 mg/kg) önerilmektedir. Daha yüksek fenobarbital seviyesi ve daha uzun süreli muameleler rat karaciğer mikrozomlarının enzim aktivitesinin veya sitokrom P-450 içeriğinin yükselmesinde daha hızlı veya daha fazla bir tepki meydana getirmez. (15,16,17.)

1.7.2. 3-Metil Kolantren Veya 3,4-Benzpiren ile İndüksiyon

Bu iki hidrokarbon, belirli karaciğer mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz aktivitelerinin yükseltilmesinde aynı etkiye sahiptirler. Ratlara yapılan 0,25 ml mısır yağı içinde 25 mg/kg 3,4-Benzpiren intraperitoneal enjeksiyonu, 18 saat içinde sitokrom P-450 ve enzim aktivitesinde maksimal artışı sağlar. Maksimal enzim aktivitesi en az 24 saat için korunur ve 6 gün sonra kontrol seviyesine ulaşmak için azalır. Daha az Benzpiren, enzim seviyelerinde daha az artış sağlar. Tekrar tekrar Benzpiren(20 mg/kg) enjeksiyonları daha fazla yükselmeye sebep olmaz. Enjeksiyona tabii tutulmuş ratların karaciğerleri benzpiren ile yapılan enjeksiyondan 24 saat sonra çıkarılır ve dondurulmak için buz soğukluğunda 0,25M sukroz içine konulurlar. (6,7)



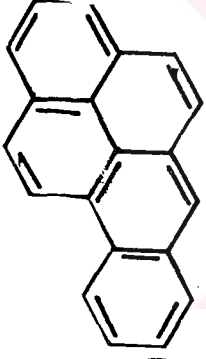
ŞEKİL 1.8. Benzo(a)Piren'in Enzimatik Reaksiyonları

1.8. Benzo(a)piren Metabolizmasının Floresans Özellikleri

Benzo(a)piren'in fenolik ve fenolat anyonlarının 12 izomeri floresans spektra ile bulunmuştur. Fenol veya fenolat anyonları içinde -3 ve -9 izomerlerinin kuvvetli floresans özellik gösterdikleri bulunmuştur. 3-OH Benzo(a)piren anyonunun yanında diğer fenolatların floresansı sınırlıdır veya yetersizdir. Ancak fenoller karşılaştırılabilir floresans özelliğine sahiptirler. (10,11,)

Tablo 1.3. Benzo(a)piren ve Türevlerinin floresans özellikleri

Bileşik	Maksimum Dalga Boyu		Bağıl Floresans	
	Ex	Em	Max	387 ve 407nm'de
BP	387	407	100	100
2-HO-BP	389	419	38,5	7,1
3-HO-BP	383	438	14,0	0,7
7-HO-BP	408	440	12,7	2,1
9-HO-BP	382	427	76,9	1,5
BP-4,5-oksit	334	368	2,0	0
BP-7,8-oksit	408	441	9,8	0,3
BP-4,5-diol	325	368	10,1	1,7
BP-7,8-diol	369	400	82,8	4,1
BP-9,10-diol	345	405	32,2	1,5



Benzo(a)piren (BP)

DETOKSIFIKASYON



Aktivasyon ve Detoksifikasyona Neden Olan Benzo(a)piren Metabolizması

Benzo(a)piren'in karaciğer mikroozmları veya rekonstitüye sistemler ile inkübasyonundan sonra oluşan fenolik ürünlerin fluoresans özelliklerinin alkali ve asidik ortamda karşılaştırılmaları sonucu % 35- 50 civarında fenolik ürünlerin alkali ortamda dedekte edilemedikleri sonucuna varılmıştır. Benzo(a)piren gibi karsinojen aromatik hidrokarbonların metabolizmada reaktif ürünlere parçalandığı ve bu ürünlerin doku bileşenlerine kovalent bağlarla bağlandığı bilinen bir gerçektir. (15, 16)

Arenoksitler, BP metabolizmasının ara ürünleri olup fenolleri kendiliğinden izomerizasyona uğratar.

Conney adlı bir araştırmacı, Benzo(a)piren Hidroksilaz için geri kazanılan substratın güçlü fluoresans özelliği göstermesinden yola çıkarak bir metod geliştirmiştir.

Wattenberg, analizin duyarlılığını fluoresans alkali özütlenebilir metabolitlerde ölçümleyerek güçlendirmiştir. (substrat kaybolmasına bağlı kalmayan ölçümleme ile).

Dehner, alkali özütlemenin gereksiz olduğunu çünkü değişmeyen BP'nin fluoresans özelliğinin trietil aminli sütunda güçleneceğini belirtmiştir. (13, 14.)

2.DENEYSEL BÖLÜM

2.1.Deneylerde kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılan tüm deneylerde kullanılan KCl, Na₂CO₃, NaOH, Na, K tartarat, CuSO₄, Tris-HCl, MgCl₂, BSA, NaCl, KCl, Sukroz, Aseton, Hekzan, Folin's fenol reagent (Merck), B(a)P (Hacettepe Üniveristesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından), 3-MC ve PB (Amerika dan özel bir laboratuvardan) temin edilmiştir.

2.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler

Bu çalışma esnasında, kullanılan deney hayvanları (Beyaz albino cinsi ratlar) Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Deneye alınan ratlar (Yaklaşık 6 haftalık olan) düzenli olarak ve normal koşullarda beslendikten sonra belli dozlarda intraperitoneal olarak 3-MC (25mg/Kg) ve PB (75 mg/Kg) enjeksiyonlarına maruz bırakılmışlardır. Enjeksiyondan 24-48 saat sonra derhal öldürülüp karaciğerleri çıkarılmış ve bu karaciğerlerden mikrozom izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1) Ratlar aniden öldürülüp karın kısımları açıldı ve karaciğerleri süratle çıkarılıp soguk saf suda bir iki defa yıkandı ve yağlarından temizlendi.

2) Karaciğerlerin fazla suyu kurutma kağıdı ile alındıktan sonra , tartıldı. Tartım sonuçları aşağıdaki gibidir.

<u>Enjeksiyon Türü</u>	<u>Karaciğer Ağırlığı</u>
MC	5.05 g
PB	4.09 g
Kontrol	3.15 g

3) Karaciğer ufak ufak doğrandı ve üzerine %0.9 luk NaCl çözeltisinden 30 ml eklendikten sonra bu yıkama çözeltisi döküldü ve bu beher içi buz dolu başka bir beher içerisine yerleştirildi.

4) Karaciğer, ağırlığına karşılık 0.5 M sukroz ile %10 luk (w/v) çözelti olacak şekilde doğrudan homojenize işlemine tabi tutuldu. Bu deneyde homojenizatör olarak PCU Kinematica Modeli Status tipi homojenizatör kullanılmıştır.

5) Homojenize karaciğer dokusu (Homojenat), Beckman-L8-70M Modeli ultrasantrifüj aletinde +4 °C da 2000 rpm de 10 dk süreyle santrifüje tabi tutuldu.

6) Süpernatana 6500 rpm de 10 dk süreyle tekrar santrifüj edildi.

7) Süpernatana bu defa 10000 rpm de 10 dk süreyle tekrar döndürüldü.

8) En son olarak süpernatana 8 mM CaCl₂ eklendi ve 15000 rpm de 10 dk süreyle santrifüjlendi. Sonuçta ele geçen pelet mikrozoamları oluşturmaktadır.

9) Mikrozoomal pelet % 0,9'luk KCl de resuspende edildi ve tekrar 15000 rpm de 15 dakika süre ile santrifüjlenir.

10) Yıkamış mikrozoamlar, her ml 0,25M sukroz, 20 mg proteine karşılık gelecek şekilde çözelti haline getirilerek -70 C de derin

dondurucuda saklandı. Elde edilen mikrozoom miktarları aşağıda belirtilmiştir.

<u>Mikrozoom Türü</u>	<u>Mikrozoom Miktarı (g)</u>
MC	1,09
PB	0,55
Kontrol	0,48

11) Süpernatantın bir mililitresindeki protein miktarı tayini için lowry protein tayin yöntemi uygulandı. (lowry et al, 1951) .

Bu yöntem için gerekli çözeltiler şu şekilde hazırlandı:

Çözelti A :

% 2 lik Na_2CO_3 ' ün 0,1 N NaOH daki çözeltisi-----100 hacim

% 2 lik Na, K tartarat çözeltisi-----1 hacim

% 1 lik CuSO_4 çözeltisi-----1 hacim

Bu çözeltiler ayrı ayrı hazırlandı ve deneyden hemen önce karıştırılarak çözelti A oluşturuldu.

Çözelti B :

Folin's fenol ayıracı -----2 hacim

1 N NaOH çözeltisi-----1 hacim

BSA çözeltisi:

Standart protein çözeltisi olarak BSA (Bovin Serum Albumin) çözeltisi kullanıldı. 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerden 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 ug/ml lik çözeltiler hazırlandı.

Lowry protein tayin yöntemi aşağıdaki şekilde uygulandı :

a) Her supernatant örneğinden 0,05 ml alınarak uygun oranlarda seyreltildi.

b) Seyreltilmiş örnekten iki test tüpüne 1'er ml otomatik pipetle dağıtıldı.

c) Taze hazırlanmış çözelti A dan 5'er ml eklendi ve 15 dakika beklendi.

d) Taze hazırlanmış çözelti B den 0,5'er ml eklendi ve tüpler çalkalanarak hızlı karışma sağlandı.

e) Renk oluşumu için 30 dakika beklendi.

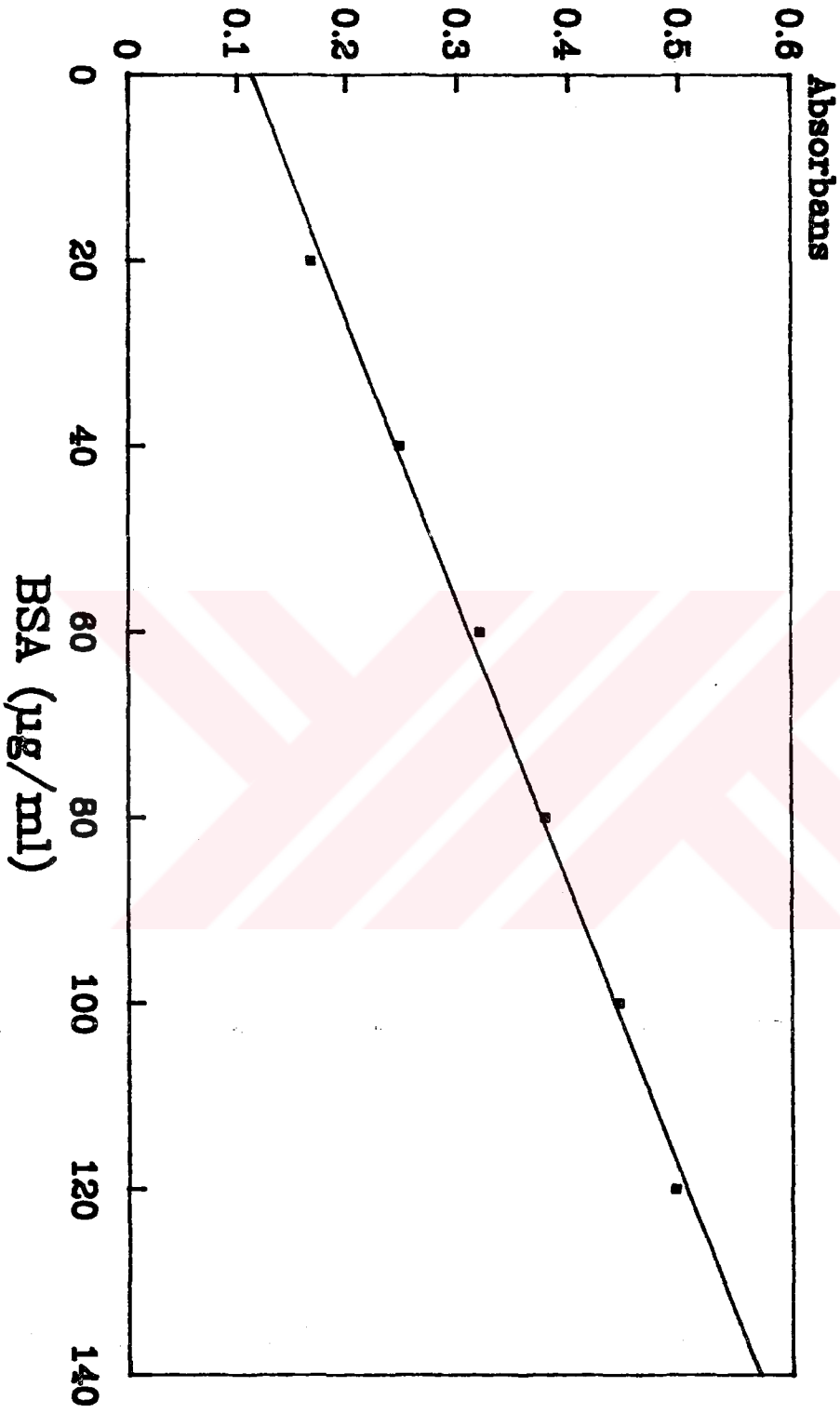
f) Spektrofotometrede (Milton Roy Company Spectronic 20 D Tipi) 750 nm de absorbens değerleri kaydedildi.

g) Standart BSA çözeltilerine de aynı işlemler uygulanarak çalışma grafiği çizildi. Standart BSA çözeltisi ile elde edilen absorbens değerleri ve çalışma grafiği tablo.2.1.'de ve şekil.2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo.2.1. Standart BSA çözeltileri ile 750 nm de elde edilen absorbens değerleri ve ortalaması.

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	A_1	A_2	\bar{A}
20	0.168	0.167	0.168
40	0.248	0.247	0.248
60	0.318	0.322	0.320
80	0.374	0.382	0.378
100	0.442	0.447	0.445
120	0.494	0.498	0.496
150	0.574	0.582	0.578

**Standart BSA ile Hazırlanan Çalışma
Grafiği**



SEKİL 2.1.

h) Örneklerden elde edilen absorbanans değerleri ve ortalaması tablo.2.2.'de verildi. Bu absorbanans değerlerine karşı gelen protein miktarları şekil.2.1.'den okunarak 1 ml'deki protein miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tablo.2.3.'de verilmiştir.

Tablo.2.2. Örneklerle okunan absorbanans değerleri ve ortalaması.

Örnek	A_1	A_2	A_{ort}
MC	0.417	0.409	0.413
PB	0.409	0.413	0.415
Kontrol	0.356	0.394	0.375

Tablo.2.3. Örneklerdeki Protein Miktarları

Örnek	A_{ort}	Çalışma grafiğinden Okunan Protein Miktarı µg/ml	1ml örnekteki Protein Miktarı µg/ml
MC	0,413	88,0	1760
PB	0,411	86,0	1720
Kontrol	0,375	78,0	780

Sitokrom P-450 miktar tayinleri ise Ortadoğu teknik Üniversitesi Biyoloji bölümünde yapılmıştır (Belli dalga boylarında tarama yapabilen HITACHI marka spektrofotometre ile).

Bu işlem sırasında şu yol izlenmiştir:

Elde edilen mikrozoamlardan alınan belirli miktarlar, kolat ilavesiyle seyreltildi çok az bir miktar ditiyonit eklendi ve ardından örnek ile dolu hücre yaklaşık 1 dakika CO atmosferine tabii tutulup hemen belirli dalga boyu aralıklarında (450 - 490nm) tarama yapılarak spektrofotometrik ölçümler alındı. Bu ölçümler sonucu bulunan sitokrom P-450 miktarları aşağıdaki gibidir.

$$\text{MC Mikrozoamları : } \frac{\Delta OD \times 0,001}{\epsilon \times 1,76 \text{ mg protein/ml}} \times \frac{6}{5} \times 1000 = 0,564 \text{ nmoles/mg}$$

91 mM cm^{-1}

$$\text{PB Mikrozoamları : } \frac{51 \times 0,001}{91 \times 1,72 \text{ mg protein/ml}} \times \frac{6}{5} \times 1000 = 0,391 \text{ nmoles/mg}$$

$$\text{Kontrol Mikrozoamları : } \frac{8 \times 0,001}{91 \times 0,78 \text{ mg protein/ml}} \times \frac{6}{5} \times 1000 = 0,135 \text{ nmoles/mg}$$

2.2. Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi Aktivite Tayin Yöntemi:

Yöntemde ve aril hidrokarbon hidroksilazların özelliklerinin araştırılmasında rat karaciğer mikrozoamları ile çalışılmıştır. Bu çalışma esnasında 2 yol izlenmiştir:

1) Mikrozoimler, ilk önce ön inkübasyona daha sonra benzo(a)piren ve NADPH eklenmesiyle esas inkübasyona tabii tutulmuşlardır.

2) Mikrozoimler, ön inkübasyona tabii tutulmadan doğrudan 37 °C de belirli sürelerde inkübe edilmişlerdir.

AHH aktivitesi, genellikle substrat olarak benzo(a)pirenin kullanıldığı fluorometrik metod ile tayin edilmektedir ve dolayısı ile BP hidroksilaz ismi de kullanılmaktadır.

AHH aktivite yöntemi için gerekli olan karışım şu şekilde hazırlanmıştır:

Reaksiyon karışımı, toplam hacim 1ml olacak şekilde; 0,05M Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 3mM MgCl₂, 50µg BSA, 0,5mM NADPH ve 0,05mg/ml mikrozoimden ibarettir.

Reaksiyon, 10µl 10mM BP (100µM Aseton içinde) ilavesiyle başlatılır (buharlaşmayı engellemek için karışım buz içinde korunur) ve karışım 37 C de 10-30 dakika arasında inkübe edilir (MC mikrozoimleri, PB ve Kontrol mikrozoimlerine göre daha uzun süre inkübe edilirler). Reaksiyon 1ml soğuk + 3ml soğuk hekzan karışımının eklenmesiyle durdurulur ve karışım 3-5 sn çalkalandıktan sonra dinlendirilir. Aseton + Hekzan + örnek karışımı santrifüjlenir. Üst (organik) faz temiz bir deney tüpüne alınır ve üzerine 1ml 1N NaOH ilave edilir, karıştırılır ve santrifüjlenir. Daha sonra dikkatli bir şekilde otomatik pipetle alttaki NaOH fazı alınır ve 392nm (Ex) 5nm bant aralığı ve 522nm (Em) 10nm bant aralığı koşullarında floresans spektrofotometrede okuma yapılır. (BECKMAN F3010 Fluorospektrofotometre).

Fluoresansspektrofotometre ile alınan bu spektrofotometrik ölçümler aşağıda verilmiştir.

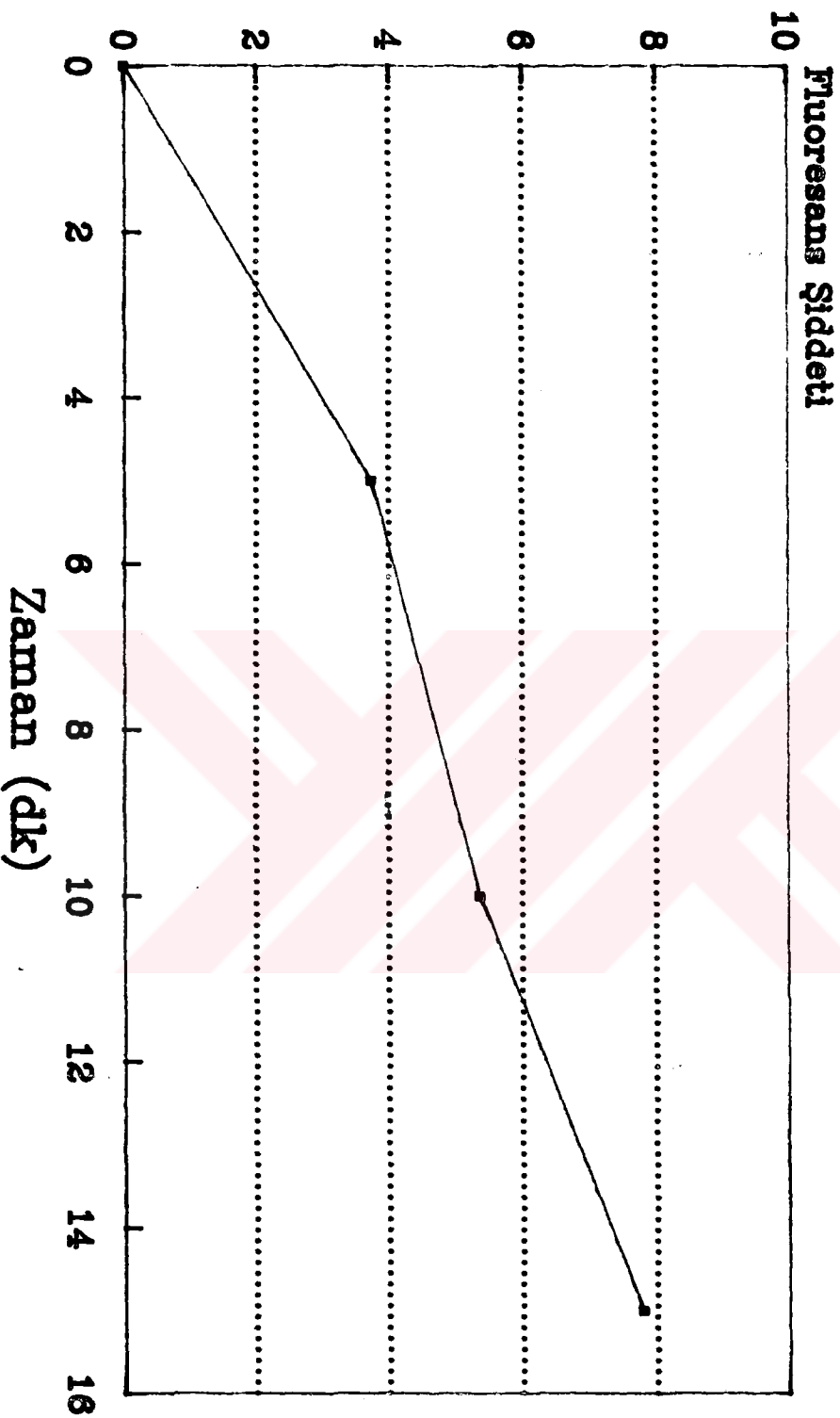
Tablo.2.4. Mikrozoomların Fluoresans Şiddetlerinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi
İnkubasyon Süresi (dk)

Mikrozoomlar	5		10		15	
	X ^(£)	S ^(§)	X ^(£)	S ^(§)	X ^(£)	S ^(§)
<u>MC</u>	3.734	0.845	5.366	1.574	7.792	2.493
<u>PB</u>	2.200	0.803	3.747	0.522	2.581	0.138
<u>Kontrol</u>	1.513	0.478	2.057	0.001	2.170	0.208

£ : X Ortalama Değer ; § : S Standart sapmayı ifade eder.

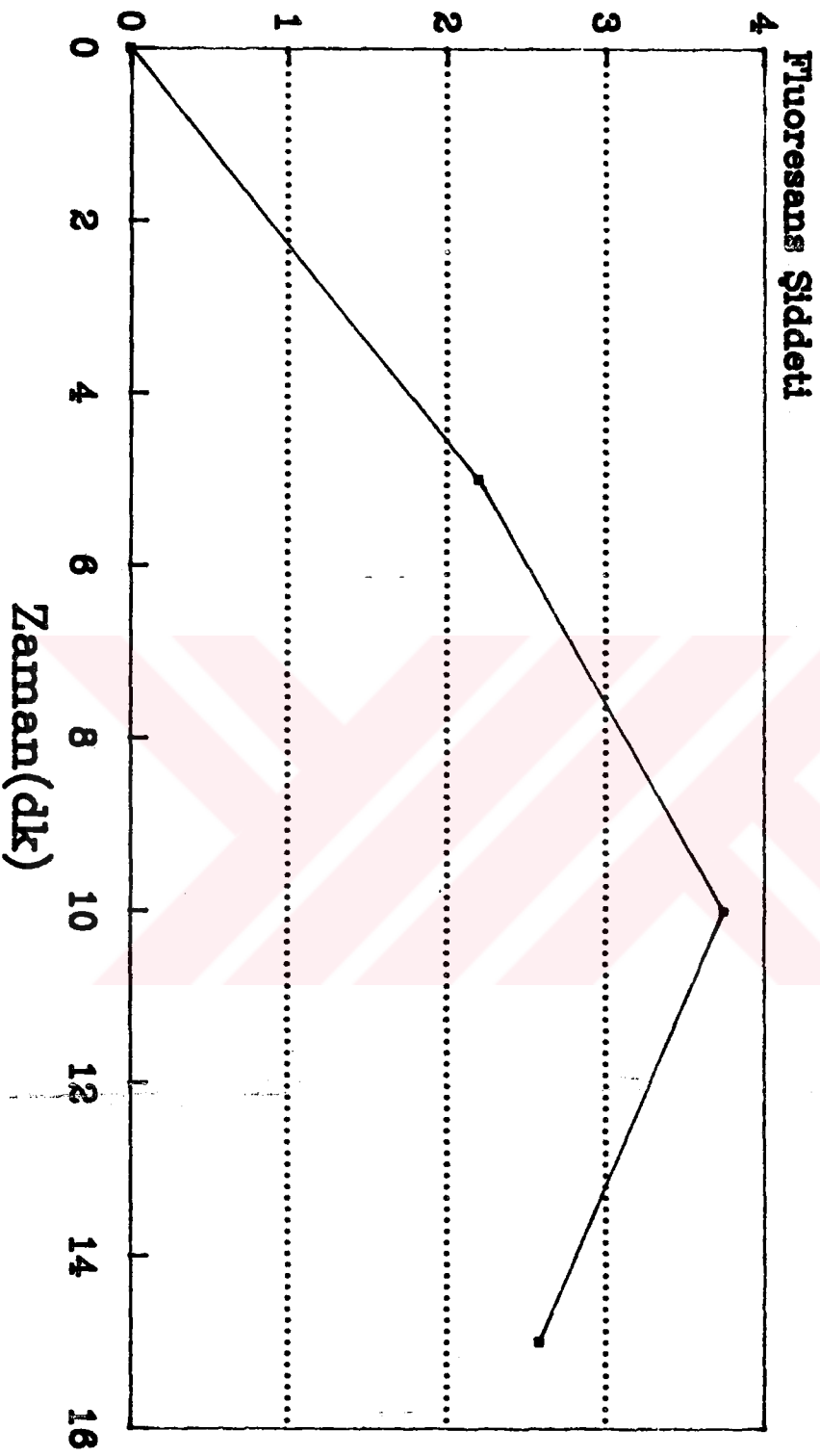
* Bütün örnekler yukarıda belirtilen inkubasyon sürelerine ilave olarak 6'şar dakikalık preinkubasyona tabii tutulmuşlardır.

MC Mikrozomlarının Fluoresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi



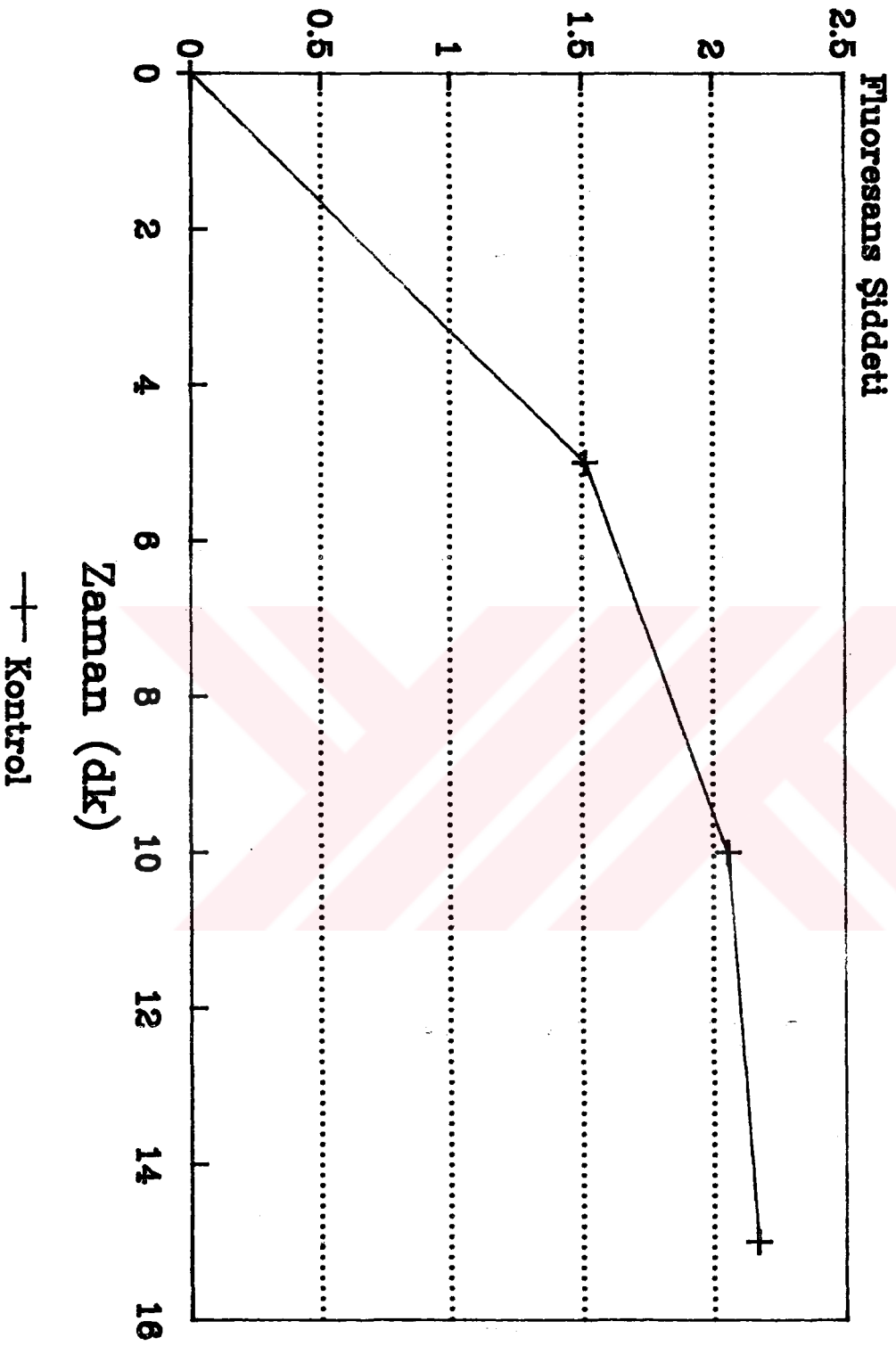
—•— Series 1

PB Mikrozomlarının Floresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi

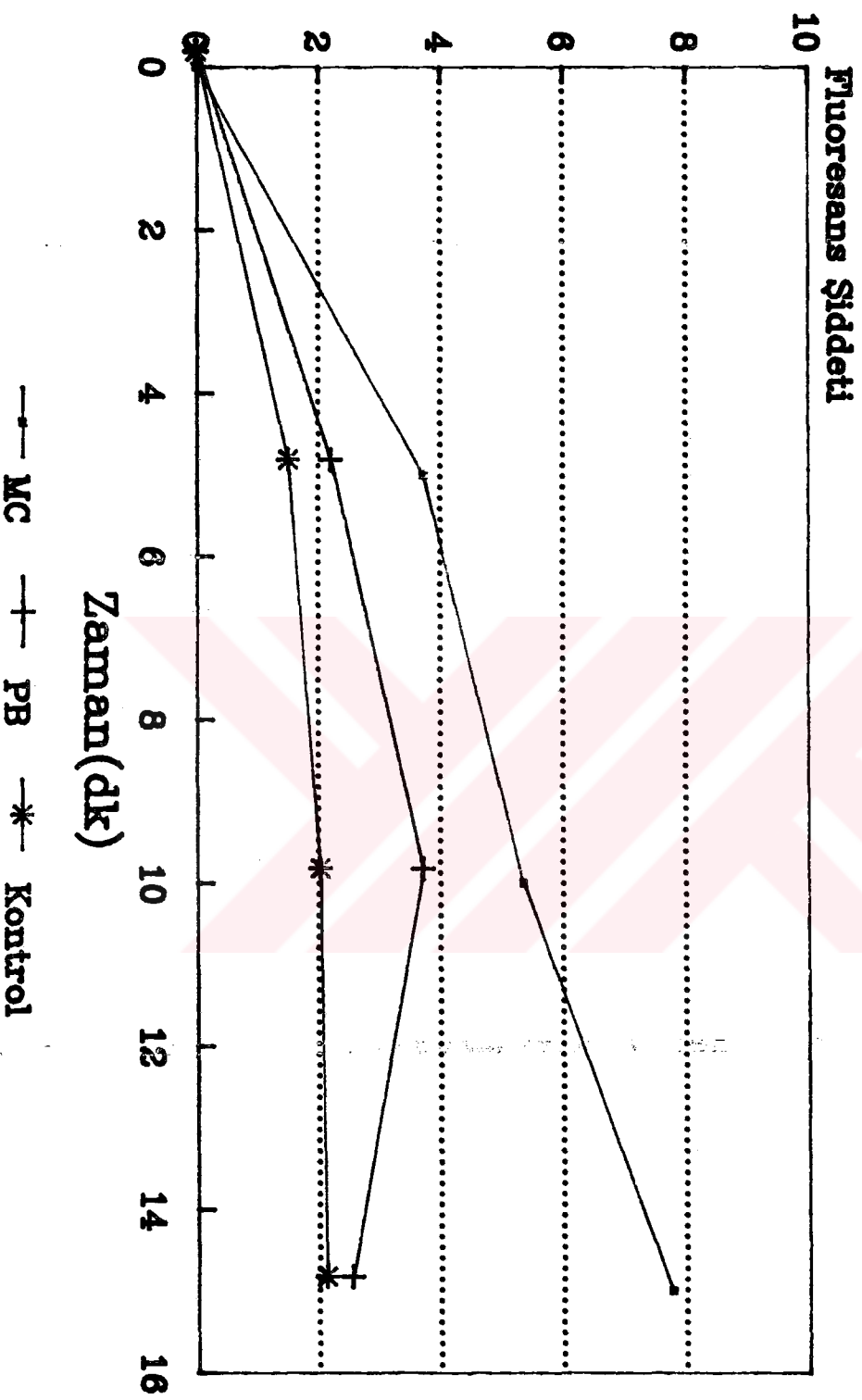


SEKİL 2.3.

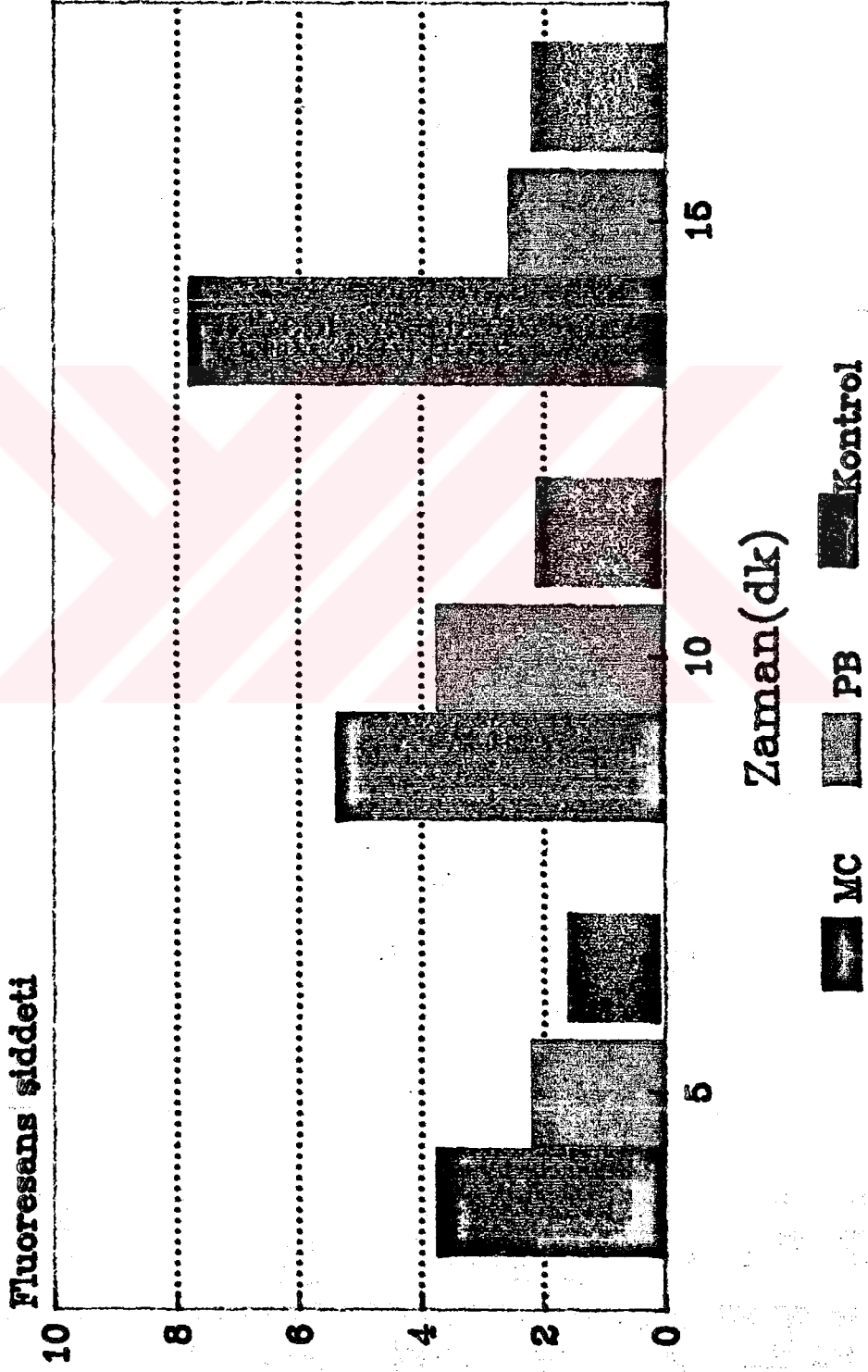
**Mikrozomların Fluoresans Şiddetinin
İnhibisyon Şiddetlerine Göre Değişimi**



Mikrozoomlarının Fluoresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi



Mikrozomların Floresans Şiddetinin İnkubasyon Sürelerine Göre Değişimi



SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada gözlenmek istenen, MC ve PB enjeksiyonu yapılan rat karaciğerindeki mikrozomal Aril Hidrokarbon Hidroksilaz enzim seviyesindeki artışın hangi düzeyde olabileceği idi. Elde edilen birtakım veriler, bu artışın özellikle MC enjeksiyonlu durumda gayet yüksek olduğunu göstermiştir. Bunu tablo 2.4 ve şekil 2.5 de gayet iyi olarak görmek mümkündür. PB enjeksiyonlu karaciğer mikrozomal Aril Hidrokarbon Hidroksilaz aktivitesi ise MC'den düşük, kontrol sonuçlarından ise fazladır. Çalışma sırasında gözlenen diğer bir nokta, PB ile çalışılan mikrozomların fluoresans şiddetinin belli bir maksimumdan sonra düşmesi olmuştur. Burada ilk akla gelen, ürünlerin oluşmasında bir azalmanın olduğudur. Buna sebep de ortamda enzim tarafından kullanılan substrat'ın miktarının azalması gösterilebilir. Tüm bu enzim aktivite çalışmalarında özellikle substrat konsantrasyonunun doygun olmasına dikkat edilmiştir. Çünkü doygun substrat konsantrasyonlarında yapılan tayinlerde görülen farklı aktiviteler yalnız enzime bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Yapılan tüm deneyler vücut ısısında (37 °C) gerçekleştirilmiş ve özellikle bu sıcaklığın sabit kalmasına büyük özen gösterilmiştir.

Bulunan sonuçlar, bazı araştırmacıların bulduğu değerlerden az da olsa farklı olabilir. Bu farklılığın kullanılan yöntemlerin farklı olmasından veya kullanılan deney hayvanlarının cinslerinin ayrı olmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Yapılan bu çalışmanın orijinalliği göz önüne alınarak bundan sonra daha da geliştirilmesi (enzim inhibisyonu, DNA'ya bağlanma çalışmaları gibi) düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1.) Kayaalp, S. Oğuz. " İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)." Tıbbi Farmakoloji, 91-127. 1987.
- 2.) Noyan Ahmet. " Karaciğerin Toksik Maddeleri Metabolize ve Detoksifiye Etme Fonksiyonu." Fizyoloji, 5.baskı, 953-957 .
- 3) Ryan Dene, Lu, Anthony.Y.H, and Levin Wayne. " Purification of Cytochrome P-450 and P-448 from Rat Liver Microsomes." Methods in Enzymology. Volume LII. Section.II.
- 4) Estarook, R.W.,and Werringloer .J." Cytochrome P-450- Its Role in Oxygen Activation for Drug Metabolism." Drug Metabolism Concepts. Ed. by. D.M.Jerina. American Chemical Society. 1977.
- 5) Alveres,A.P, Schilling, G.R. and Kuntzman.R." Differences in the Kinetics of Benzpyrene Hydroxylation by Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes from Phenebarbital and 3-Metilcholantrene Treated Rats." Biochem. Biophys.Res.Commun.30,588-593.(1968).
- 6) Leboeuf.Renee, Havens.Mary, Tabron.Dorothy and Paigen.Beverly. " Arylhydrocarbon Hydrxylase Activity and Cytochrome P-450 in Human Tissues." Biochimica et Biophysica Acta,658 348-355. (1981).

- 7) Coon, M.J., Vermilion, J.L., Vatsis, K.P., French, J.S., Dean, W.L. and Haugen, D.A. " Biochemical Studies on Drug Metabolism: Isolation of Multiple Forms of Liver Microsomal Cytochrome P'450." Drug Metabolism Concepts. Ed. by D.M. Jerina. American Chemical Society. 1977.
- 8) Gelboin, Harry.V.; Kinoshita, Nadao and Wiebel, J. " Microsomal Hydroxylases: Induction and Role in Polycyclic Hydrocarbon Carcinogenesis and Toxicity. " Federation Proceedings .Vol.31. No.4, July-August, (1972).
- 9) Gelboin, Harry.V.; Kinoshita, Nadao and Wiebel, F.J. " Microsomal Hydroxylases: Studies on the Mechanism of Induction and Their Role in Polycyclic Hydrocarbon Action. " Environment and Cancer. (1971).
- 10) Yang, Shen.K; Deutsch, Joseph, and Gelboin, Harry.V. " Benzo(a)Pyrene Metabolism: Activation and Detoxification." Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol.1.
- 11) Wiebel, F.J; Leutz, J.C; Gelboin, H.V.
" Aryl Hydrocarbon (Benzo(a)Pyrene) Hydroxylase: A Mixed Function Oxygenase in Mouse Skin." The Journal of Investigative Dermatology, 64.184-189, (1975).

12) Selkirk, James.K, Yang, Shen.K, and Gelboin, Harry.V. " Analysis of Benzo(a)Pyrene Metabolism in Human Liver and Lymphocytes and Kinetic Analysis of Benzo(a)Pyrene in Rat Liver Microsomes." Carcinogenesis, Vol.1. New York, 1976.

13) Holder.G, Yagi.H, Levin.W, Lu,A.Y.H, and Jerina,D.M, "Metabolism of Benzo(a)Pyrene An Evaluation of the Fluorescence Assay." Biochemical and Biophysical Research Communications. " Vol.65.No.4, (1975).

14) Yang, Chung.S, and Kicha, Louis.P., " A Direct Fluoremetric Assay of Benzo(a)Pyrene Hydroxylase." Analytical Biochemistry 84, 154-163 (1978).

15) Kinoshita, Nadao., Shears, Barbara, and Gelboin, Harry.V., " K-Region and Non-K-Region Metabolism of Benzo(a)Pyrene by Rat Liver Microsomes." Cancer Research 33, 1937-1934, August 1973.

16) Whitlock, James.P, Jr. and Gelboin, Harry.V. " Aryl Hydrocarbon (Benzo(a)Pyren) Hydroxylase Induction In Ceels In Culture." Pharmac. Ther. Vol. 4, pp. 587-589.

17) Viviani. Andreas and Lutz, Werner.K., " Modulation of the Carcinogen Benzo(a)Pyrene to Rat Liver DNA in vivo by Selective Induction of Microsomal and Nuclear Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity." Cancer Research 38. 4640-4644, December. 1978.

ÖZGEÇMİŞ

3.3.1964 tarihinde Malatya da doğdum. İlk ve orta okulu Malatya da Lise öğrenimimi İstanbul da tamamladım. 1983 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Lisansında Eğitim yapmaya hak kazandım. 1987 yılında bu üniversite den mezun oldum ve ardından aynı üniversitenin Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.