

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA*) KARACİĞER MİKROZOMLARINDA
İLAÇLARI METABOLİZE EDEN ENZİMLERİN
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE YAŞLANMA İLE
İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Danışman: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Temmuz, 2006

DENİZLİ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca büyük ilgi ve anlayışımı gördüğüm, değerli bilgi ve desteği ile beni bu çalışmaya yönlendiren tez danışmanım, Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Alaattin ŞEN hocama minnettarlığımı belirtir, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek ve onaylarını gördüğüm Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Halil ÇETİŞLİ'ye, Kimya Bölümünün tüm hocalarına, her zaman ilgilerini gördüğüm Araştırma Görevlisi ve Uzman arkadaşlarıma teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında numune temininde bana yardımcı olan, İzmir, Çeşme, Ildır'da bulunan Pınar Balık Ltd.'ye, İsmail ASLAN'a ve HÖL ailesine göstermiş oldukları fedakarlıklarından dolayı tüm içtenliğimle teşekkür ediyorum.

Her zaman benden inancını ve desteğini esirgemeyen, tüm eğitim hayatım boyunca göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili anneme ve babama şükranlarımı ve sevgilerimi sunuyorum.

Çalışmalarım esnasında numune temini dahil tüm aşamalarda ilgi, fedakarlık ve desteğini gördüğüm sevgili eşim Abdullah AKDOĞAN'a ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim kardeşim Asiye ARDAĞ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Hatice Ardağ AKDOĞAN tarafından Prof. Dr. Alaattin ŞEN yönetiminde hazırlanan "Çipura (Sparus Aurata) Karaciğer Mikrozomlarında İlaçları Metabolize Eden Enzimlerin Karakterize Edilmesi Ve Yaşlanma ile İlişkilerinin Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Diler Aslan

Alaattin ŞEN

Yrd.Doç.Dr. Azra Bozcaarmutlu

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

....II..... Tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL

Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza : 
Öğrenci Adı Soyadı : **Hatice Ardağ AKDOĞAN**

ÖZET

ÇİPURA (*SPARUS AURATA*) KARACİĞER MİKROZOMLARINDA İLAÇLARI METABOLİZE EDEN ENZİMLERİN KARAKTERİZE EDİLMESİ VE YAŞLANMA İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Akdoğan Ardağ, Hatice
Yüksek Lisans Tezi, Kimya ABD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Alaattin ŞEN
Temmuz 2006, 83 Sayfa

Sitokrom P450 enzimleri; retinoidler, biyojenik aminler, prostaglandinler, yağ asitleri, vitamin D₃, safra asitleri, endojen bileşikler içeren steroidler, gıda katkı maddeleri, çevre kirleticileri, boyalar, anestezi ajanlar, organik çözücüler, pestisitler ve ilaçlar gibi xenobiyotiklerin detoksifikasyon ve aktivasyonunda önemli rol oynayan hemoprotein süper ailesidir. Sitokrom P450 ailesi (CYP450), karaciğerdeki faz I metabolik enzim sisteminin önemli bir enzim grubunu oluşturur.

Bu çalışmada farklı yaşlardaki çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozom ve sitozolleri örnek olarak kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan çipura (*Sparus aurata*) balığı, Türkiye'nin Ege bölgesinde bulunan, İzmir'deki Pınar Balık işletmesinden temin edildi. Karaciğer mikrozom ve sitozolleri Arınç ve Şen metoduna göre hazırlandı. Etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), Metoksirezorufin O-demetilaz (MROD), Pentiloksirezorufin O-depentilaz (PROD), Benziloksirezorufin O-debenzilaz (BROD), Anilin 4-hidroksilaz (A4H), N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-DE), Kafein N-demetilaz (CN3D), Aminopiren N-demetilaz (APND) ve Eritromisin N-demetilaz (ERND); çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında tayin edildi. Sitozolik Glutatyon S-transferaz (GST-CDNB); çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer sitozollerinde tayin edildi.

Yapılan ölçümler sonucunda; farklı gelişim evrelerindeki (1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20, 24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz ve eritromisin N-Demetilaz aktivitelerinde yaş artışı ile paralel olarak artış gözlemlendi. 1,5 aylık balıktaki A4H aktivitesi; $0,002 \pm 0,001$ nmol/dakika/mg protein iken, 24 aylık balıkta $0,058 \pm 0,002$ nmol/min/mg protein olarak bulundu. 1,5 aylık balıktaki ERND aktivitesi; $0,09 \pm 0,006$ nmol/dakika/mg protein iken, 24 aylık balıktaki aktivite $0,189 \pm 0,008$ nmol/min/mg protein şeklinde ölçüldü. 1,5 aylık balıktaki NDMA-ND aktivitesi; $0,019 \pm 0,007$ nmol/dakika/mg protein iken, 24 aylık balıktaki aktivite; $0,323 \pm 0,014$ nmol/dakika/mg protein olarak tespit edildi.

Kafein N-Demetilaz ve Aminopiren N-Demetilaz aktivitelerinde, yaş artışıyla birlikte azalış gözlemlendi. 1,5 aylık balıktaki CN3D aktivitesi; $0,438 \pm 0,014$ nmol/dakika/mg protein iken, 24 aylık balıktaki aktivite; $0,069 \pm 0,012$ nmol/dakika/mg protein olarak bulundu. 1,5 aylık balıktaki APND aktivitesi; $0,944 \pm 0,024$ nmol/dakika/mg protein iken, 24 aylık balıktaki aktivite; $0,056 \pm 0,011$ nmol/dakika/mg protein şeklinde tespit edildi.

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında EROD ve PROD aktivitelerinde, yaş artışıyla paralel olarak bir artış gösterirken MROD ve BROD aktiviteleri tayin edilemedi. 9 aylık balıktaki EROD aktivitesi; $88,6 \pm 1,1$ pmol/dakika/mg protein, 24 aylık balıktaki aktivite; $998,4 \pm 13,7$ pmol/dakika/mg protein olarak bulundu ve 1,5-9 aylık balıklarda EROD aktivitesi gözlenmedi. 15 aylık balıktaki PROD aktivitesi; $285,6 \pm 20,9$ pmol/dakika/mg protein, 24 aylık balıktaki aktivite; $613,7 \pm 16,3$ pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. 1,5-15 aylık balıklarda PROD aktivitesi gözlenmedi.

GST-CDNB aktivitesinin de yaş artışı ile artış gösterdiği belirlendi. 1,5 aylık balıktaki GST-CDNB aktivitesi; $17,71 \pm 0,54$ pmol/dakika/mg protein, 20 aylık balıktaki aktivite; $690,9 \pm 32,0$ pmol/dakika/mg protein şeklinde tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Sparus Aurata*, Sitokrom P450 enzimleri, İlaçları metabolize eden enzimler, Yaşlanma

ABSTRACT**CHARACTERIZATION OF AGING OF DRUG METABOLIZING ENZYMES AND ASSESSMENT OF AGING IN GILTHEAD SEABREAM (*SPARUS AURATA*) LIVER MICROSOMES**

Akdoğan Ardağ, Hatice

M. Sc. Thesis in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

July 2006, 83 Pages

Cytochrome P450 (CYP) comprises a superfamily of hemoproteins that play a pivotal role in the activation and detoxification of xenobiotics such as drugs, pesticides, antioxidants, organic solvents, anesthetic agents, dyes, environmental pollutants and food additives and endogenous compounds including steroids, bile acids, vitamin D₃, fatty acids, prostaglandins, biogenic amines and retinoids. The cytochrome P450 (CYP450) family is the major phase I metabolic enzyme system in the liver.

In this study, gilthead seabream (*Sparus aurata*) fish liver microsomes and cytosol of different ages were used as sample. The fish used in this study, Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*), were bought from Pinar Fish in İzmir, Aegean coast of Turkey. In this study Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Fish Liver Microsomes and cytosoles of different ages (ranging from 1.5 to 24 months) were used. Liver microsomes and cytosoles were prepared according to the method of Arinc and Sen (1998). Liver microsomal Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), methoxyresorufin O-demethylase (MROD), pentyloxyresorufin O-depenthylase (PROD), benzyloxyresorufin O-debenzylase (BROD), aniline 4-hydroxylase (A4H), N-nitrosodimethylamine N-demethylase (NDMA-DE), aminopyrene N-demethylase (APND) ve erythromycin N-demethylase (ERND) were determined from this Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) fish liver microsomes.

A4H activity increased with aging. While 1.5 months of the fish activity is $0,002 \pm 0,001$ nmol/dakika/mg protein, 24 months of the fish is $0,058 \pm 0,002$ nmol/min/mg protein. ERND activity increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 1.5 months of the fish activity is $0,09 \pm 0,006$ nmol/dakika/mg protein, 24 months of the fish is $0,189 \pm 0,008$ nmol/min/mg protein. NDMA-ND activity increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 1.5 months

of the fish activity is $0,019 \pm 0,007$ nmol/min/mg protein, 24 months of the fish is $0,323 \pm 0,014$ nmol/min/mg protein.

CN3D activity decreased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 1.5 months of the fish activity is $0,438 \pm 0,014$ nmol/min/mg protein, 24 months of the fish is $0,069 \pm 0,012$ nmol/min/mg protein. APND activity decreased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 1.5 months of the fish activity is $0,944 \pm 0,024$ nmol/min/mg protein, 24 months of the fish is $0,056 \pm 0,011$ nmol/min/mg protein.

EROD activity increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 9 months of the fish activity is $88,6 \pm 1,11$ pmol/min/mg protein, 24 months of the fish is $998,4 \pm 13,7$ pmol/min/mg protein. 1.5 to 9 months of the fish liver activity were not detected. PROD activity increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 24 months). 15 months of the fish activity is $285,6 \pm 20,9$ pmol/dakika/mg protein, 24 months of the fish is $613,7 \pm 16,4$ pmol/dakika/mg protein. 1.5 to 15 months of the fish liver activity were not detectable. MROD and BROD activities were not detectable.

Glutathione S-transferase (GST) were determined from this Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) fish livers cytosoles. GST-CDNB activity increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver microsomes of different ages (ranging from 1.5 to 20 months). 1.5 months of the fish activity is $17,7 \pm 0,5$ pmol/dakika/mg protein, 20 months of the fish is $690,9 \pm 32,0$ pmol/dakika/mg protein.

Key: Words: *Sparus Aurata*, Cytochrome P450 enzymes, Drugs metabolizing enzymes, Aging

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Teşekkür.....	i
Etiksayfası.....	ii
Özet.....	iii-iv
Abstract.....	v-vi
İçindekiler.....	vii-viii
Şekiller Dizini.....	ix
Tablolar Dizini.....	x
Simgeler Dizini.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Sitokrom P450.....	2
1.1.1. Sitokrom 450 Döngüsü.....	4
1.1.2. Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması.....	6
1.2. Balık Sitokrom P450'leri.....	7
1.2.1. Sitokrom P4501 Ailesi.....	9
1.2.1.1. Sitokrom P4501A Ailesi.....	9
1.2.1.2. Sitokrom 1B Ailesi.....	10
1.2.1.3. Sitokrom 1C Ailesi.....	11
1.2.2. Sitokrom CYP2E.....	12
1.2.3. Sitokrom P4502P Ailesi.....	13
1.2.4. Sitokrom P4502N Ailesi.....	14
1.2.5. Sitokrom P4502K Ailesi.....	15
1.2.6. Sitokrom P4502M Ailesi.....	15
1.2.7. Sitokrom P4503A Ailesi.....	16
1.2.8. Sitokrom P4503C Ailesi.....	17
1.2.9. Sitokrom P4504T Ailesi.....	18
1.2.10. Sitokrom P4504F7 Ailesi.....	18
1.3. Sitokrom P450 Enzimleri ve Yaşlanma Mekanizması.....	19
1.4. Glutasyon S-Transferaz Enzimleri.....	23
1.5. Deney Hayvanı.....	26
1.6. Çalışmanın Amacı.....	28
2. MATERYAL VE METOT.....	29
2.1. Materyaller.....	29
2.1.1. Kimyasallar.....	29
2.2. METOTLAR.....	30
2.2.1. Dokulardan Sitozolik ve Mikrozoim Fraksiyonlarının Hazırlanması.....	30
2.2.2. Analitik İşlemler.....	31
2.2.2.1. Protein Miktarı Tayini.....	31

2.2.3. Analitik İşlemler.....	31
2.2.3.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini (A4H).....	31
2.2.3.2. Mikrozomal N-Demetilaz Aktivite Tayinleri.....	33
2.2.3.3. Alkoksiresorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri Tayini.....	36
2.2.3.4. Sitozolik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini.....	38
2.2.3.4.1. 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesi.....	38
2.3. İstatiksel Analizler	39
3. BULGULAR.....	40
3.1. Çipura (<i>Sparus aurata</i>) Balığı Çeşitli Dokuların Protein Miktarları.....	40
3.2 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) Balığı Karaciğer Mikrozomal MO Aktiviteleri.....	41
3.2.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivite Tayini.....	41
3.2.2. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz Aktivite Tayini.....	42
3.2.3. Eritromisin N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini.....	44
3.2.4. Kafein N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini.....	45
3.2.5. Amino piren N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini.....	47
3.2.6. Etoksirezorufin O-Deetilaz (EROD) Aktivitesinin Tayini.....	48
3.2.7. Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) Aktivitesinin Tayini.....	50
3.3. Çipura (<i>Sparus aurata</i>) Balığı Karaciğer Sitozolik MO aktiviteleri.....	51
3.3.1. GST-CDNB Aktivite Tayini.....	51
4. TARTIŞMA.....	53
5. SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR.....	67
7. ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Sitokrom P450 Reaksiyon Döngüsü.....	6
Şekil 1.2 Yaşlanma Mekanizması.....	19
Şekil 2.1 Anilin 4-hidroksilasyonu.....	31
Şekil 2.2 N-nitrosodimetilamin N-demetilasyonu.....	34
Şekil 2.3 Kafein N-demetilasyonu.....	34
Şekil 2.4 Eritromisin N-demetilasyonu.....	35
Şekil 2.5 Aminopyrine N-demetilasyonu.....	35
Şekil 2.6 Alkoksirezorufine dealkilasyon.....	36
Şekil 2.7 GST-CDNB enzimatik reaksiyonu.....	38
Şekil 3.1 Protein miktarı tayini için örnek BSA kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 3.2 Anilin 4-Hidroksilaz aktivitelerinin çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında yaşa bağlı olarak değişimi.....	42
Şekil 3.3 N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz aktivitelerinin çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında yaşa bağlı olarak değişimi.....	43
Şekil 3.4: Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında Eritromisin N-Demetilaz aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi.....	44
Şekil 3.5 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında Kafein N-Demetilaz aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi.....	46
Şekil 3.6 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında Aminopiren N-Demetilaz aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi.....	47
Şekil 3.7 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında EROD aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi.....	49
Şekil 3.8 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında PROD aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi.....	50
Şekil 3.9 GST-CDNB aktivitelerinin çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer sitozollerinde yaşa bağlı olarak değişimi.....	52

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Bazı Sitokrom P450 Substratları	3
Tablo 1.2 Örnek Substratlarla Sitokrom P450'lerce Katalize Edilen Genel Reaksiyonlar	5
Tablo 1.3 Farklı sınıftaki bileşiklerden GST substratlarına örnekler.....	25
Tablo 1.4 Çipura balığının (<i>Sparus aurata</i>) sitematiği.....	26
Tablo 1.5 Çipura balığının büyüme gereksinimleri, dağılımı ve orjini	28
Tablo 2.1 Çipura karaciğer mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.....	33
Tablo 2.2 N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri	36
Tablo 2.3 AROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.....	37
Tablo 2.4 Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği.....	38
Tablo 3.1 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri.....	42
Tablo 3.2: Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında N-nitrosodimetilamin N-demetilaz aktiviteleri.....	43
Tablo 3.3: Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktiviteleri.....	45
Tablo 3.4 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktiviteleri.....	46
Tablo 3.5 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarında aminopiren N-demetilaz aktiviteleri.....	48
Tablo 3.6 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarındaki EROD aktiviteleri.....	49
Tablo 3.7 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarındaki PROD aktiviteleri.....	52
Tablo 3.8 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer sitozollerindeki GST-CDNB aktiviteleri	55
Tablo 4.1 Ölçülen Enzim Aktiviteleri.....	64

SİMGELER DİZİNİ

ε-ACA	ε- Amino Kaproik Asit
AROD	Alkoksirezorifin O-Dealkilaz
B(a)P	Benzo (a) Piren
BHA	Bütile Hidroksi Anizol
BHT	Bütile Hidroksi Toluen
BND	Benzphetamin
BCNU	3-bis [2-kloretil]-1-nitrosoüre
BROD	Benziloksirezorufin O-debenzilaz
BSA	Sığır Serum Albumin
CDNB	1-Kloro-2,4-DiNitro Benzen
DDT	Diklordifeniltrikloretan
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik asit
EROD	7-etoksirezorufin O-deetilaz
GSH	Glutasyon (Redükte form)
GSSG	Glutasyon (Okside form)
GST	Glutasyon S-transferaz
LTs	Lökotrien
3-MC	Metilkolantren
MO	Monooksijenazlar
MROD	Metoksirezorufin O-demetilaz
NADPH	p-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NDMA	N-Nitrosodimetilamin
PAH	PoliAromatik Hidrokarbonlar
pAP	p-aminofenol
PROD	Pentiloksirezorufin O-depentilaz
PCB	PoliKlorlu Bifeniller
PCs	Prostaglandin
PMSF	Fenil Metan Sülfonil Florid
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin

1. GİRİŞ

Bütün organizmalar çeşitli yollarla ksenobiyotiklere ve ilaçlara maruz kalırlar. Organizmalar için bu bileşiklerin en önemli sorunu vücutta çeşitli toksisiteler oluşturmasıdır. Bu tür bileşiklerin vücuttan uzaklaştırılmaları için çözünür hale getirilmeleri ve organizma dışına atılmaları gereklidir. Ksenobiyotikler çok lipofiliktir ve çeşitli dokularda birikirler. Bu birikim bir çok toksik etkilere neden olur. Vücutta hücre membranlarını, proteinleri ve tüm hayatsal olayları olumsuz olarak etkiler ve tümör oluşumuna kadar çeşitli patofizyolojik olgulara neden olur. Bu durumda laurik asit ve testosteron gibi endojen metabolizmalarda değişimler gözlemlenir. Sitokrom P450 (CYP) süper enzim ailesi hem ekzojen ksenobiyotiklerin ve hem de yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzim grubudur (Orellana ve Guajardo 2001, Yamaori vd 2004, James vd 2005). Ksenobiyotiklerin ve yağ asitlerinin metabolizmasında rol alan enzimler sitokrom P450 süper enzim ailesidir. Ksenobiyotikler bu enzimler yardımıyla biyoaktif forma dönüştürülürken endojen yağ asitleri çeşitli önemli moleküllere dönüştürülür. Memelilerdeki çeşitli CYP izozimleri endojen substratları içeren arakidonik asitlerin, prostaglandinlerin (PCs) ve lökotrienlerin (LTs) metabolize edilmesinden sorumludurlar (Captevila ve Falck 2001, Kikuta vd 2002, Captevila vd 2002, Nebbia vd 2003, Wauthier vd 2004).

İlaçları metabolize eden sitokrom P450 enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, fizyopatolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi bir çok faktör rol oynar. Özellikle ilaçların ve diğer kimyasalların etkileri yaşa bağlı olarak çalışılmıştır. Yaşa bağımlı olarak karaciğer ve çeşitli dokularda ilaç metabolizmasının değiştiği çeşitli hayvan türleri ve insanda gösterilmiştir (Gibson ve Skett 1994). Bu değişimlerin temel mekanizmaları genel olarak saptanamamış olmasına rağmen birçoklarının in vivo metabolizmalarının yaş ile değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Monshouwer ve Witkamp 2000). Genç bireylerden

yaşlı bireylere kadar, ilaçların absorpsiyon oranı, plazma proteinlerine bağlanma dağılımı ve biyotransformasyonları özellikle insanlarda araştırılmıştır (Nebbia 2001, Nebbia 2003, James vd 2005). Her ne kadar insan ve (zirai) veterinerlik açısından önemli olan koyun (Kaddouri vd 1990, Kawalek ve El Said 1990b), sığır (Kawalek ve El Said 1994), tavuk (Coulet vd 1996) vb. gibi türler üzerinde yaş ile ilaçları metabolize eden enzimlerin değişimi üzerine çalışmalar bulunsa da özellikle balıklar üzerinde bu alanda çok kısıtlı bilgi mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmada çipura (*Sparus aurata*) balığında ilaçları metabolize eden enzimlerin yaş ile değişimleri araştırılmıştır.

1.1 Sitokrom P450

Sitokrom P450 enzimleri heme-içeren enzimlerdir (Tavaloni 1993, Orellana vd 2001, Orellana ve Guajardo 2001, Orellana ve Guajardo 2004, James vd 2005). Bu sistem. böbrek, akciğer, deri, bağırsak, adrenal korteks, plasenta ve diğer farklı dokularda bulunur, ama özellikle karaciğerde etkindir. Ayrıca, böcek ilaçları, prokarsinojenler, anestezi malzemeleri, organik çözücüler ksenobiotiklerin metabolizmasında bulunurlar (Orellana ve Guajardo 2004, Goeptar vd 1995, Magnusson ve Sandström 2004, Szotakova vd 2004, Mikhailova vd 2005). Sitokrom P450'ler, Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar veya karışık fonksiyonlu oksidazların terminal enzimleridir. Endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında önemli olan Faz I enzimlerinin bir ailesini teşkil ederler. Bunlar bakterilerden memelilere kadar çalışılmış tüm türlerde bulunan, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer hemoproteinler içeren bir gen süper ailesinin üyesidir (Nebert vd 1991, Nelson vd 1996).

Prokaryotik enzim çözünür bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda membrana bağlıdır. Memelilerde, mitokondriyal iç membranda ve endoplazmik retikulum membranların da yerleşmiştir. Bu grup protein, mikrozomal preparatın sodyum ditiyonat gibi bir indirgeme ajanı ile tepkimeye sokulmasını takiben, karbonmonoksit (CO) gazı ile muamelesi neticesinde oluşan karakteristik absorpsiyon spektrumuna sahiptirler. CO indirgenmiş hemoproteine bağlanır ve 450 nm'de bir tepe oluşturan absorpsiyon spektrumu verir. CO fark spektrumunda 450 nm'de pik veren bir pigment olması nedeniyle ismi sitokrom P450'dir (Omura ve Sato, 1964). İnsanlarda ve çoğu diğer memelilerde P450'ler;

a) Steroid hormonların biyosentezi

b) Antibiyotikler, karsinojenler, organik çözücüler, boyalar, pestisitler, alkoller, çevresel kimyasallar gibi ksenobiyotiklerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu

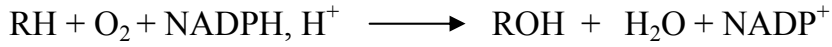
c) Doymamış yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonu

d) Yağda çözünen vitaminlerin stereo ve regio-spesifik metabolizması gibi reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol oynarlar (Lu ve Levin 1974, Arınç ve Philpot 1976, Nebert ve Gonzales 1987, Gonzales 1989, Porter ve Coon 1991, Okita ve Masters 1997, Hasler 1999, Orellana ve Guajardo 2001, Oleksiak vd 2002, Nebbia vd 2003, Orellana ve Guajardo 2004). Sitokrom P450 enzimlerinin bazı substratları Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1 Bazı Sitokrom P450 Substratları (Porter ve Coon’dan alınmıştır, 1991).

Ksenobiyotikler (Ekzojen)	Endojen Bileşikler
İlaçlar (asetaminofen)	Steroidler
Karsinojenler (PAH)	Eikosanoitler
Antioksidantlar	Yağ Asitleri
Çözücüler (hekzan)	Yağ hiperoksitleri
Anestetikler	Retinoidler
Boyalar	Aseton
Pestisitler (metil paration)	
Alkoller (etil alkol)	
Petrol ürünleri	
Koku vericiler	

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Reaksiyonda substrat (R) alkan, alken, aromatik halka ya da heterosiklik sübstituentler gibi oksijenasyon için olanak veren bir bölgeye sahiptir. Reaksiyon bir monooksijenasyon ve enzim bir monooksijenaz olarak adlandırılır.

Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar endojen ve ekzojen kaynaklı çok çeşitli lipofilik bileşikleri metabolize ederler (Akahori vd 2005). Bu enzimler, bir metil grubunun karbon atomunun hidroksilasyonu, bir alkanın metilen karbonuna hidroksil grubu sokulması, fenol oluşturmak için aromatik halkanın hidroksilasyonu ya da epoksit oluşturmak için çift bağa oksijen atomu katılması gibi çok kompleks ve değişken reaksiyonları katalizler. Dealkilasyon reaksiyonlarında, oksijen, karbon-hidrojen bağına girmektedir. Ancak son ürün stabil değildir ve primer alkol, amit ya da sülfidril bileşiğine dönüşür. Azot, kükürt ve fosfor atomlarının oksidasyon ve dehalojenasyon reaksiyonları da sitokrom P450 tarafından katalizlenir. Sitokrom P450'ler tarafından katalizlenen bazı reaksiyonlar Tablo 1.2'de gösterilmiştir.

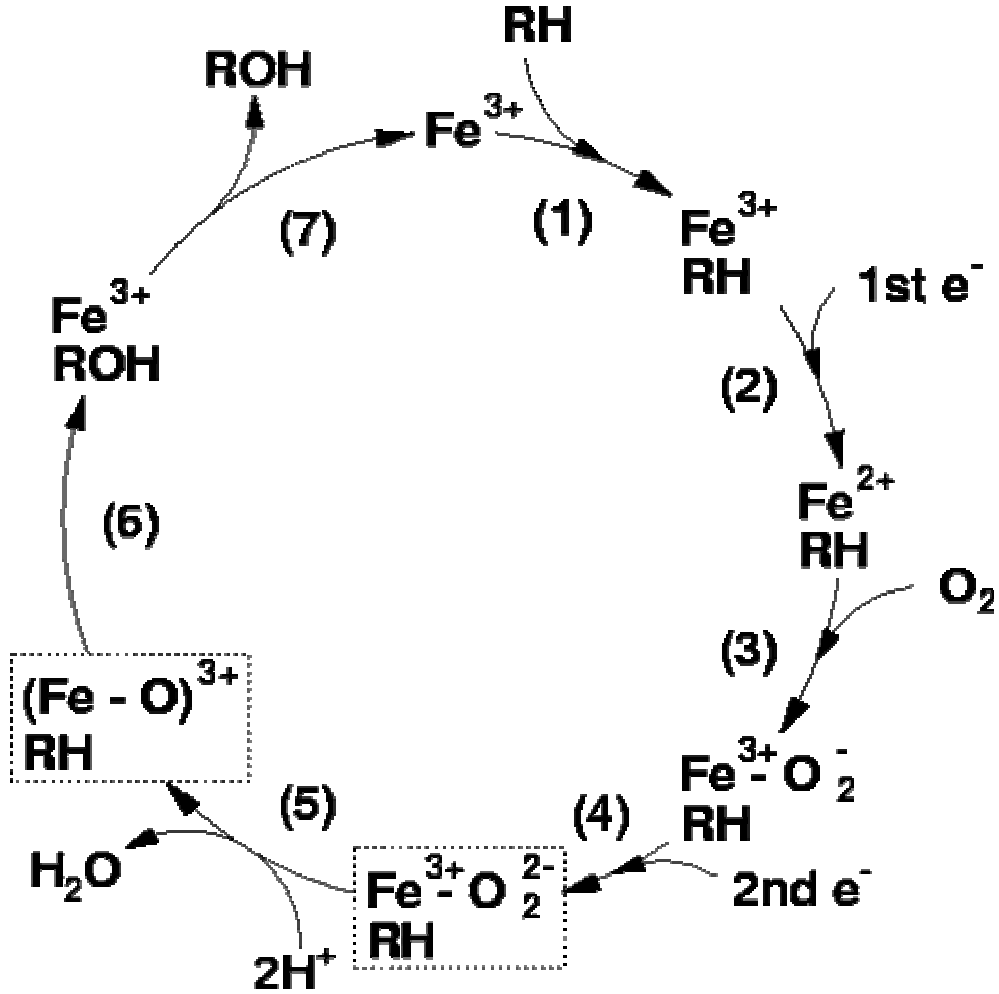
1.1.1 Sitokrom P450 Döngüsü

Sitokrom P450 proteinlerinin aktif bölgesi hidrofobik etkileşimlerle bağlanmış tek bir demir protoporfirin IX içerir. Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'nin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand yeri değişebilen su molekülü tarafından kullanılmaktadır. Substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda O₂ altıncı konuma bağlanmaktadır.

Tablo 1.2 Örnek Substratlarla Sitokrom P450'lerce Katalize Edilen Genel Reaksiyonlar

1. Hidroksilasyon
A. Karbon
a. Aromatik: benzo(a)piren, benz(a)antrasen, acetanilid, benzen, naftalen
b. Alifatik: n-propilbenzen, palmitik asit, pentobarbital
B. Azot:N-asetilaminofloren
2. Heteroatom Oksidasyonu
A. Azot: sulfanilamid, anilin, trimetilamin, indol, quinolin
B. Sülfür: klorpromazin, insektisitler, fenilbutazon, tiyo türevleri
C. Oksijen: testesteron, kumarin
3. Dealkilasyon
A. Azot: aminopiren, etilmorfin, dimetilanilin, nitrosodimetilamin
B. Oksijen: etoksirezorfin, p-nitroanizol, etoksikumarin,
C. Sülfür: 6-metilmerkaptopürin, S-metiltiyobenzol
4. Redüksiyon
A. Dehalojenasyonlar: halothane
B. Azo: amarant
C. Nitro: p-nitrobenzoat
5. Deaminasyon: amfetamin
6. Desaturasyon: testesteron
7. Desülfürasyon: paratiyon, malatiyon tiyobarbital

Genel olarak, P450'ler Şekil 1.1'de gösterilen reaksiyon döngüsüne girerler. Çeşitli bileşiklerin hidroksilasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH Sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Substrat RH öncelikle Fe^{3+} formu ile kombine olur. Daha sonra oksijenlenir ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürür. Bir iç oksidoredüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın ve suyun oluşumu gerçekleşir. Serbest sitokrom P450 Fe^{3+} formunda rejenere olur. NADPH-Sitokrom P450 redüktazdan sitokrom P450'ye elektron transferine lipitlerin yardımcı olduğu gösterilmiştir (Lu ve Levin 1974). Sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin tüm üç bileşenide (NADPH-Sitokrom P450 redüktaz, Sitokrom P450 ve lipit) hidroksilasyon aktivitesinin oluşturulmasını sağlar (Lu ve Coon, 1968, Lu ve Levin vd 1974, Arınç ve Philpot 1976, Adalı ve Arınç 1990, Şen ve Arınç 1998, Oleksiak vd 2002).



Şekil 1.1 Sitokrom P450 Reaksiyon Döngüsü.

1.1.2 Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Günümüzde sitokrom P450'ler omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterileride içeren ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunduğu gösterilmiştir. Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlenmelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir (Nebert vd 1987). Bu sistemde her bir sitokrom P450 için belirli aileyi tanımlamak için rakamlar verilir. Bunu, alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler ve bir diğer rakam özgün P450 formunu göstermek için kullanılır. Örnek olarak 1A2 ve 2E1 verilebilir. CYP terimi ise sitokromun "cytochrome" ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da

Sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Bu adlandırma sisteminde sitokrom P450 1A2 ve 2E1 CYP1A2 ve CYP2E1 olarak gösterilir. Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog amino asit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır (Nebert vd 1991, Nelson vd 1996, Nelson 2002).

1.2 Balık Sitokrom P450' leri

Brodie ve Maickel'in (1962) balıkların ksenobiyotik metabolizması için gerekli enzimlerden yoksun olduğunu söylemelerine rağmen, sucul türler üzerine yapılan çalışmalar bu türlerde sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz sistemin ve sitokrom P450'lerin varlığını çok iyi göstermiştir (Pohl vd 1974, Bend ve James 1978, James vd 1979, Stegeman vd 1981, Lech vd 1982, Monod vd 1987, Goksoyr vd 1987, Celandier ve Förlin 1991, Arınç ve Şen 1993, Buhler 1995, Arınç vd 2000, Oleksiak vd 2002, Nelson 2002, Chaty vd 2004, James vd 2005, Corley-Smith vd 2005, Godard vd 2005).

Memelilerde olduğu gibi balıklarda da ksenobiyotikler Faz I ve Faz II enzimleri ile katalize edilerek metabolitlerine dönüştürülür. Balıklar tarafından vücutlarına alınan pestisit, petrol ürünleri ve çeşitli endüstriyel atıkların oluşturduğu hidrofobik yapıdaki ksenobiyotikler önce Faz I enzimleri tarafından katalizlenen redüksiyon, oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları sonucunda kısmen daha suda çözünür metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitlerin bir kısmı bundan sonra Faz II enzimleri olarak adlandırılan konjugasyon enzimleri tarafından, daha da hidrofilik yapıda olan sülfat ve glukuronik asit konjugatlarına çevrilerek vücuttan atılırlar (Buhler ve Williams, 1989). Endojen fiziksel faktörler ve çevredeki değişimler balıklardaki sitokrom P450 monooksijenaz aktivitesini oldukça fazla etkilemektedir. Bunlar; steroidler, yağ asitleri, vitamin D, safra asitleri, olgun balığın cinsiyeti, mevsimsel varyasyonlar, ışık periyodu, basınç, tuzluluk ve gürültü gibi diğer stres faktörleridir (Dewaide ve Henderson 1970, Koivussarri vd 1981, Egaas ve Varanasi 1982, Walton vd 1983, Kleinow vd 1987, Edwards vd 1988, Vindimian ve Garric 1989, Arınç ve Şen 1994, Chaty vd 2004, Godard vd 2005).

Gerek memelilerde gerekse balıklarda Faz I enzimlerinin en önemlisi sitokrom P450'ye bağımlı olan monooksijenazlardır (MO). Ayrıca P450'ye bağımlı MO'ların toksik olmayan bazı ksenobiyotikleri daha toksik ve karsinojenik metabolitlerine dönüştürdükleri gösterilmiştir (Nebert ve Gonzales 1987, Arınç ve Şen 1992-1994, Stegeman 1995). Gerek

memelilerde, gerekse balıklarda sudaki çözünürlüğü az olan metabolitlerin vücuttan atılmayıp, yağ dokularında biriktiği gösterilmiştir. Sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar enzim sistemlerinin pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, koruyucu gıda katkı maddeleri ve çok halkalı hidrokarbonlar (benzpiren, naftoflavonlar) gibi vücuda yabancı olan maddeleri metabolize ettikleri gibi, yağ asitleri, kolesterol ve steroid hormonları gibi vücudun normal kimyasal maddelerini de metabolize ettikleri saptanmıştır (Arınç ve Philpot 1976, Buhler ve Wang-Buhler 1998, James vd 2005). 1976 yılında dünyada ilk kez Arınç vd, balık KFO enzim sistemini sitokrom P450, sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipit olarak komponentlerine ayırmış, komponentleri kısmen saflaştırmış, KFO aktivitesini test tüpünde yeniden oluşturarak, balık sitokrom P450'sinin biyokatalitik olarak aktif olduğunu göstermiştir (Arınç ve Philpot 1976). Yapılan çalışmalar, balıklardaki P450 izozimlerinin, endojen ve ekzojen organik kimyasalların metabolizmasında, cinsiyet hormonlarının sentez ve yıkımında ve kimyasal karsinogenlerdeki rollerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (Arınç ve Adalı 1983).

CYP1A, CYP2B, CYP2E, CYP2M, CYP2N, CYP2K, CYP3A, CYP11A, CYP17, CYP19, CYP 26, CYP46, CYP51 aileleri ve daha bir çoğuna ait olan sitokrom P450'nin çoklu formları memelilerde olduğu gibi çeşitli balık türlerinde de bulunur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, Nelson (2003), 18 memeli ailesinin 17'sinin kirpi balığında da bulunduğu belirtilmiştir. Sadece bir P450 ailesi, CYP39, bu balık türünde yoktur (Nelson 2003). Yapısal benzerliklerin yanında, balık karaciğer mikrozomal P450 KFO sisteminin katalitik fonksiyonları da memelilerdeki ile oldukça benzerdir. PAH, PCB ve dioksin tipi toksik çevresel kontaminantlar gibi ekzojen bileşikler ve testosteron, progesteron ve araşidonik asit gibi endojen bileşikler içeren substratlar balık MO sistem tarafından metabolize edilirler. Bu substratlar balık sitokrom P450 MO sisteminin çeşitli izoformları tarafından epoksidasyon, hidroksilasyon, dealkilasyon ve oksidasyon reaksiyonları yolu ile metabolize edilirler. Örneğin; CYP1A1 benzo(a)pirenin epoksidasyonunu katalizler, CYP2K1 laurik asidin ω -1 pozisyonundan hidroksilasyonunu katalizler (Williams ve Buhler 1984, Amet vd 1997, Haasch vd 1998, Sabourault vd 1998) ve CYP3A27 progesteronun 6 β pozisyonundan hidroksilasyonunu katalizler (Miranda vd 1990). Yeni P450 alt aileleri, CYP2N1 ve CYP2N2, araşidonik asidin epoksikosatrienoik asite epoksidasyonunu katalize eder (Buhler ve Wang-Buhler 1998, Oleksiak vd 2000, Oleksiak vd 2002).

1.2.1 Sitokrom P4501 Ailesi

En fazla sitokrom P450 çalışması sitokrom P4501A üzerinedir. Balık sitokrom P450 izoformları arasında P4501A1, karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasındaki fonksiyonlarından dolayı çok geniş şekilde araştırılmıştır (Williams ve Buhler 1984, Klotz vd 1983 ve 1986, Goksoyr 1985, Miranda vd 1989, Zhang vd 1991, Şen ve Arınç 1998a, Arınç vd 1999, Leaver ve George 2000, Nebbia vd 2003, Chaty vd 2004, Mikhailova vd 2005). Sitokrom P450'ler arasında sitokrom P4501A karsinojenlerin biyoaktivasyonda önemli bir rol oynar. Balıklarda, sitokrom P4501A proteini karsinojenlerin aktivasyonu ve metabolizmasındaki rolleri (Gelboin 1980, Conney 1982, Stegeman ve Hahn 1994, Parkinson 1995, Stegeman 1995), çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyelleri nedeni ile oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır (Payne vd 1987, Goksoyr ve Förlin 1992, Bucheli ve Pent 1995, Arınç vd 2000, Chaty vd 2004).

1.2.1.1 Sitokrom P4501A

CYP1A1 balıklarda oldukça geniş olarak çalışılmış ve alabalıktan (Williams ve Buhler 1984, Miranda vd 1989 ve 1990, Celandier ve Förlin 1991, Andersson 1992, Chaty vd 2004) tatlısu levreğinden (Zhang vd 1991) ve deniz türlerinden *Stenotomus chrysop*'tan (Klotz vd 1983 ve 1986, Stegeman vd 1990), morina balığından (Goksoyr 1985, Goksoyr vd 1986), çipuradan (Arınç ve Şen 1997) ve kefalde (Şen ve Arınç 1998a) saflaştırılmıştır. Moleküler özellikleri, biyokatalitik aktiviteleri, immunolojik özellikleri ve gen regülasyonu memeli CYP1A1'i ile benzerlik gösterir. Benzo(a)piren hidroksilasyon ve 7-etoksirezorufin 0-deetilaz (EROD) reaksiyonları için en büyük katalizördür. 3-Metilkolantren (3-MC) ve B(a)P tarafından oldukça fazla indüklenirler, bununla birlikte muamele olmamış balıklarda çok zor tespit edilirler. Moleküler ağırlıkları 58 000 dolaylarındadır ve değişik ortologlar ile oldukça güçlü çapraz bağlanmalar gösterirler (Arınç ve Şen 1999). 3-MC, B(a)P, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), poliklorlubifenil (PCB) ve diğer halojenli bileşikler sitokrom P4501A1'in güçlü indükleyicileri olarak bilinir (Teles vd 2004).

1994 yılında Arınç ve Şen B(a)P ile muamele edilmiş çipura balığında (25 mg/kg vücut ağırlığı) karaciger mikrozomlarında EROD aktivitesinin 2-3 kat artığını göstermiştir. Bununla birlikte aynı muamele sonucunda karaciger mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz ve etilmorfin N-demetilaz aktivitelerinde kayda değer bir değişim görülmemiştir (Arınç ve

Şen 1994). Bu nedenle PAH türü indükleyiciler tarafından sitokrom P4501A1 enziminin induksiyonu balık popülasyonlarında oldukça spesifik ve hassastır (Marionnet vd 2005).

Payne, 1976 yılında ilk olarak balık mikrozomal P450'ye bağımlı PAH aktivitesinin çevresel monitör olarak kullanılabileceği fikrini ortaya atmıştır (Payne 1976). Günümüzde balıklarda CYP1A1 bağımlı enzim aktivitesi 7-etoksirezorufin substratı kullanılarak tespit edilmektedir. EROD aktivitesinin ölçümü balıklarda CYP1A1 induksiyonunu tespit etmek için oldukça yaygın olarak kullanılan ve oldukça hassas olan bir yöntemdir. P4501A ve EROD aktivitesinin tayinine dayanan biyomonitöring çalışmaları ABD'nin çeşitli bölgelerinde, Atlantik ve Pasifik Okyanuslarında, Avustralya, Kanada, Baltık Denizi'nde ve Fransa'nın Akdeniz sahillerinde ve Ege denizinde 100'ü aşkın saha çalışmasında başarı ile kullanılmıştır (Payne vd 1985, 1987, Haux ve Förlin 1988, Goksoyr vd 1994, Bucheli ve Pent 1995, Arınç vd 1999, Arınç vd 2000, Whyte vd 2000, Doyotte vd 2001, Arınç ve Bozcaarmutlu 2003, Miller vd 2003, Laville vd 2003, Chaty vd 2004, Ricciardi vd 2005).

CYP1A1 proteinlerinin çeşitli balık türlerinden saflaştırılmasından sonra, bu proteinlere karşı antikorlar başarılı bir şekilde üretilmiştir. ELISA, Western Blot gibi immunokimyasal teknikler ile bu antikorlar CYP1A1 protein seviyesi ile kontaminantlar arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılmaktadır (Stegeman vd 1986, Varanasi vd 1986, Stegeman ve Kloepper-Sams 1987, Stegeman vd 1988, Elskus vd 1989, Arınç ve Şen 1999, Chaty vd 2004, Mikhailova vd 2005).

İlk balık CYP1A1 geninin klonlanmasından sonra (Heilmann vd 1988) cDNA probu CYP1A1 transkriptinin (mRNA) saptanmasında oldukça kullanışlı olmuştur. Çalışmalar P4501A1 mRNA seviyesinin P4501A1 enzim aktivitesi ve P4501A1 protein seviyelerindeki artış ile ilgili olduğunu göstermektedir (Renton ve Addison 1992).

1.2.1.2 Sitokrom 1B Ailesi

Sitokrom P450 1 ailesi enzimleri (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1) , poliaromatik hidrokarbonları, poliklorlanmış bifenilleri ve arilaminleri içeren çevresel kontaminantların hidrolize edilmesinde önemli role sahiptirler. Leaver ve George'nin 2000 yılında yapmış oldukları bir çalışmada CYP1 gen ailesi marine flat (*Pleuronectes platessa*) balığından izole edilmiştir. CYP1 izoformlarının aminoasit sekans analizleri bunların birbirlerine benzer

özelliklerde olduklarını göstermiştir. Elde edilen veriler neticesinde, CYP1B proteininin, memelilerdeki CYP1B1 proteini ile % 54 aynı yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. CYP1 ailesi ile yapılan bu çalışma göstermiştir ki CYP1A'nın dokularda PAH-bağımlı indüksiyonunun artmasının yanında CYP1B beta naftoflavonun ve PAH gibi diğer uyarıcılar ile de artış göstermektedir (Leaver ve George 2000).

CYP1A ve CYP1B gen aileleri memeli dokularında tanımlanmakla birlikte balık türlerinde de tanımlanmıştır. Shen ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada CYP1B1 proteini flat balığı karaciğerinden izole edilmiş ve 546 aminoasit içeren bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. 2004 yılında yapılan bir diğer çalışmada Carp (*Cyprinus carpio*)'tan CYP P4501B alt ailesinin bir üyesi olan CYP1B2 izole edilmiştir. CYP1B2; intraperitonel olarak 3-metil kolantrenin (3-MC) enjeksiyonundan sonra carp karaciğerinden izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, bu proteinin 530 aminoasitten oluştuğu bulunmuştur. CYP1B2'nin cDNA'sının % 91 CYP1B1 ile benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (El-kady vd 2004).

1.2.1.3 Sitokrom 1C Ailesi

Monooksijenazların CYP P4501 (CYP1) ailesinin üyeleri, çevresel karsinojenlerin ve promotajenlerin detoksifiye edilmesinde görevlidirler. Bu görevlerinden dolayı yaygın olarak araştırılmaktadırlar. Zebra balığı ile yapılan bir çalışmada CYP1C1 ve CYP1C2 izole edilmiş ve sekans analizi sonucunda sırasıyla 523 ve 514 aminoasit içerdiği tespit edilmiştir (Gotoh 1992). Godard ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; teleost balıktan iki yeni CYP1 alt ailesi (CYP1C1 ve CYP1C2) izole edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, teleost balıktan izole edilen CYP1C1 ve CYP1C2'nin sırası ile 524 ve 528 aminoasit içerdiği bulunmuştur. Bu CYP1C1 ve CYP1C2'nin %80-81 birbirine benzediği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, zebra balığı (*Danio rerio*)'dan izole edilen CYP1C1 ile karşılaştırıldığında, balık türlerinde CYP1C1 ve CYP1C2 proteinlerinin benzer bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. CYP1C'ler; katalitik olarak substrat spesifik özelliklere sahip olup, CYP1B'ler ve CYP1A'lar ile benzer özelliklere sahiptir. Sonuç olarak türler arasında CYP1C1 ve CYP1C2 proteinlerinde ortak bir çok özellikleri içermelerine karşın, aminoasit dizisi ve fonksiyon bakımından bazı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Godard vd 2005).

2005 yılında yapılan bir başka çalışmada Carp (*Cyprinus carpio*)’dan CYP P4501C1 izole edilmiştir. CYP1C1; intraperitoneal olarak beta-naftoflavonun enjeksiyonu sonrası carp karaciğerinden izole edilmiştir. Carp CYP1C1’inin, teleost ve memeli CYP1B1’i ile % 48,4, carp CYP1B1 ve CYP1B2’si ile % 45,5 benzer kapıda olduğu bulunmuş olup, insan, sıçan ve fare CYP1B1’i ile ortak özellikler taşıdığı tespit edilmiştir (Itakura vd 2005).

1.2.2 Sitokrom CYP2E Ailesi

Sitokrom P4502E1, P450LM3a, P450j, P450ac ya da P450alc olarakta bilinir ve önce tavşanlarda daha sonra sıçanlarda ve insanlarda tanımlanan P450’nin etanol ile indüklenebilen formudur (Yang ve Hong 1993). Etanolün dışında, aseton, piridin, izopropanol, benzen tarafından ve bazı açlık, diyabet, obezite, aşırı yağlı beslenme gibi patofizyolojik durumlarda indüklenebilir (Koop ve Casazza, 1985, Hong vd 1987, Song vd 1987, Schenkman vd 1989, Kim vd 1990, Arınç vd 1991, Yoo vd 1991, Amet vd 1997). CYP2E1 Sitokrom 2 (CYP2) ailesinin en çok korunan formudur. Geçen birkaç yılda, nitrosoaminler ve diğer toksik ajanlar gibi birçok düşük moleküler karsinojenlerin aktivasyonunda önemli rol almasından dolayı hayli önem kazanmıştır (Yang vd 1990, Yamazaki vd 1992). Ek olarak, diyabet, obezite ya da yukarıda verilen çeşitli kimyasallara bağlı sitokrom P4502E1 indüksiyonunu tiyoasetamid, kloroform, karbontetraklorür ve bromobenzen gibi belirli bileşiklerin hepatotoksitesini kuvvetlendirdiği bulunmuştur (Hanasono vd 1975, El-Hawari ve Plaa 1983, Wang vd 2000). Akut diyabetin anilin 4-hidroksilazı ve N-nitrosodimetilamin demetilasyon aktivitelerini hamster karaciğer ve böbrek mikrozomlarında 2 kat arttırdığını bulmuşlardır (P4502E1’le ilişkili enzimler). Tersine akut diyabetik durum, renal ve hepatik pentiloksirezorufin O-dealkilasyon aktivitesinin sırasıyla %66 ve %48 oranında düşüşüne neden olmuştur. (P4501B1’le ilişkili). Benzo(a)piren hidroksilasyonu (P4501A1’le ilişkili) diyabetik hamster böbrek ve karaciğerinde kontrollere benzer bulunmuştur. Balıklarda da; LM3 enzimi, anilin 4-hidroksilazı ve N-nitrosodimetilamin demetilasyonu reaksiyonlarını katalizlemektedir (Buhler ve Wang-Buhler 1998, Orellana vd 2001).

Shav ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, İngiltere’nin Port Quin semtindeki, kontamine olduğu düşünülen bölgeden, farklı mevsimlerde *Mytilus*

edilus midyesi yakalanıp, bu midyedelerde CYP2E1 seviyeleri tayin edilmiştir. Mart, nisan ve mayıs aylarında toplanan midyelerde, mayıs ayında en yüksek seviyede CYP2E1 miktarı belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda bu proteinin miktarının mevsimsel olarak değişim gösterebileceği düşünülmüştür (Shav vd 2000). Bir başka çalışmada, İtalya'nın endüstriyel olarak kirlenmiş durumdaki Venice Lagoon ve temiz bölge olarak nitelendirilen Lido bölgesindeki *Mytilus galloprovincialis* midyelerindeki CYP2E1 immunobloting yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, endüstriyel olarak kirlenmiş durumdaki Venice Lagoon bölgesindeki midyelerde, CYP2E1 protein miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu proteinin miktarındaki artışın; PAH, PCB gibi toksik kimyasalların bu bölgede yoğun bir biçimde atık olarak sulu ortama deşarjı nedeniyle olduğu tespit edilmiştir (Peters vd 1998).

1.2.3 Sitokrom P450P Ailesi

Arakidonik asit metabolizmasındaki eikosanoid türevleri biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar. Hayvanlardaki tuz, su transportu ve hücrel proliferasyonda görev alırlar. Memelilerdeki CYP2 sitokrom P450 ailesi arakidonik asit (A.A) epoksigenaz reaksiyonlarını ve arakidonik asitin ω -terminal hidroksilasyonunu gerçekleştirir (Gilday vd 1996, Schlezinger vd 1998).

2003 yılında yapılan bir çalışmada, yeni CYP2P sitokrom P450 ailesi teleost bir balık olan *Fundulus heteroclitus* (killi fish)'tan izole edilerek tanımlanmıştır. Bu yeni CYP2P'ler memelilerdeki CYP2J'ler ile çok benzer katalitik özellikler gösterir. Balık CYP2P'leri memelilerdeki CYP2J'ler ile yapı ve fonksiyon olarak ta benzer özellik gösterirler. CYP2P *Fundulus heteroclitus*'un karaciğer ve bağırsağından izole edilmiştir. CYP2P transkripsiyonu, karaciğer ve bağırsaktan predominant olarak ekspres edilerek gerçekleştirilmiştir. Killi balığı CYP2P3 ve bazı CYP2J'ler ksenobiyotik substratlara karşı benzer özellikler göstermiştir. CYP2P3, CYP2J1 ve CYP2J3 proteinlerinin hepside benzfetamini benzer oranlarda katalizlediği bulunmuştur (3,3-3,9 ve 3,0 nmol/dakika/mg protein). Böylece killi balığı CYP2P3 proteininin, insan CYP2J2 ve sıçan CYP2J3 proteinleri ile katalitik özelliklerinin benzer olduğu belirlenmiştir (Oleksiak vd 2003). CYP2P3 benzfetamine N-demetilasyonu ve arakidonik asitin oksidasyonunu katalizler. CYP2P3 bölge ve enantiyoselektif özelliğe sahiptir. Bu

balıktan CYP2P2 ve CYP2P3 ekspres edilmiştir. Fakat CYP2P1 ekspres edilememiştir. Bu enzimler sıçan bağırsağından izole edilen CYP2J proteini ile benzer özellikler gösterirler. CYP2P'ler ve CYP2J'ler genel olarak yağ asidi monooksijenasyonunda görev alırlar (Oleksiak vd 2000).

1.2.4 Sitokrom P450N Ailesi

Oleksiak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, CYP2N enzim ailesi ilk kez teleost bir balık olan *Fundulus heteroclitus*'tan izole edilerek tanımlanmıştır ve balığın karaciğer ve kalbinde bir sitokrom P450 altailesi olan CYP2N'lerin cDNA kütüphaneleri araştırılmıştır. Northern blot analizleri sonucunda; CYP2N1 transkripsiyonunun en çok karaciğer ve bağırsakta olduğunu, CYP2N2'nin de en çok beyin ve kalpte bulunduğu belirlenmiştir. CYP2N2 proteininin mRNA'sının da beyin ve kalpte bol olduğu görülmüştür (Oleksiak vd 2000).

CYP2N1 ve CYP2N2 proteinlerinin her ikisinde arakidonik asitin epoksiieikosotrienoik aside metabolize edilmesinde görev alırlar. Epoksidasyon büyük oranda bölge ve enantioselektif bir özellik ister. CYP2N1 ve CYP2N2 %90-91 seçiciliğe sahiptir. CYP2N proteinleri arakidonik asit epoksigenaz ve hidroksilaz reaksiyonlarının katalizlenmesinde görevlidir. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, teleost balığın (*Fundulus heteroclitus*) karaciğer ve kalbindeki CYP2N ekspresyonunun açlık ve kimyasalla muamele sonrası değişimi araştırılmıştır. CYP2N transkripsiyonu açlık ve 12-o-tetradekanoil phorbol-13-asetat ile muamelesi sonrası araştırılmıştır. CYP2N1 mRNA seviyesi hem açlık hem de 12-o-tetradekanoil phorbol-13-asetat ile muamele sonrası artmıştır. İlginçtir ki kalp CYP2N2 ekspresyonu phorbol ester muamelesi sonrası azalmış fakat açlık sonrası artmıştır. Bu sonuçlar göstermiştir ki çevresel faktörler ile ekspresyon değişim göstermiştir. CYP2N1 ve CYP2N2 proteinlerinin vertebratlarda benzer biyolojik fonksiyonlar içerdikleri belirlenmiştir (Oleksiak vd 2000).

1.2.5 Sitokrom P4502K Ailesi

CYP2K1; *Rainbow trout* (*Orcorhynchus mykiss*, Gökkuşığı alabalığı)'un temel P450 içeriğini oluşturur ve LM2 olarak adlandırılır. İlk yapılan çalışmalarda LM2 bu balığın karaciğerindeki 10,8 nmol P450 (mg mikrozomal protein)⁻¹ içeriğinden spesifik olarak izole edilmiştir (Williams ve Buhler 1984). LM2 diğer P450 biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar neticesinde LMC2 olarak tanımlandı. LMC2'nin molekül ağırlığı SDS-PAGE analizi ile 54000 Da olarak belirlenmiş olup, CO ortamında alınan spekturumunda 449,5 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı ölçülmüştür.

LMC2; 17 β -estradiol'ün 2-hidroksilasyonunu, testosteron'un 16 β -hidroksilasyonunu ve progesteron'un 16 α -hidroksilasyonunu katalizler (Miranda vd 1989). LMC2 P450'si laurat'ın (ω -1)-hidroksilasyonu için temel bir katalizördür (Buhler vd 1997, Buhler ve Wang-Buhler 1998, Haasch 2002). LMC2, ω -1 ve ω -2 pozisyonlarından regiospesifik olarak hidroksilasyon gerçekleştirir. Bu enzim, palmitat, miristat ve stearat gibi uzun zincirli yağ asitlerinin (ω -1)- ve (ω -2)- hidroksilasyonunu katalizler. Bu balık türlerinde AFB1 (Aflatoxin B1)'in karsinojenik etkilerine karşın LMC2 kuvvetli bir seçicilik göstermiştir (Bailey vd 1984, Bailey vd 1996, Buhler ve Wang-Buhler 1998). Balıklardaki sitokrom P4502K ailesi kompleks bir yapıya sahiptir. Northern blotting çalışmaları sonucunda CYP2K1'in tek bir kopya gen olmadığı belirlenmiştir. Southern blotting analizlerinde de 109 ve 208 kb olmak üzere iki temel mRNA'nın varlığı gözlenmiştir. *Rainbow trout*'dan saflaştırılan LMC2 P450'sinin molekül ağırlığı MALDI-TOF kütle spektrometresinde 56695 \pm 55 Da, CYP2K1'in cDNA sekans analizinde moleküler ağırlığı 56795 Da olarak ölçülmüştür.

İmmunokimyasal analizlerde LMC2'nin *Rainbow trout*'un böbreğinde proximal tubullerin ikinci kısmında lokalize olduğu bulunmuştur (Lorenzana vd 1988). Balıklarda LMC2'nin var olduğu organlar, karaciğer, böbrek ve kalptir (Buhler ve Wang-Buhler 1998, Haasch 2002)

1.2.6 Sitokrom P4502M Ailesi

CYP2M1 P450'si kimyasalla muamele edilmemiş *rainbow trout*'tan izole edilerek saflaştırılmış ve aktivitesi 11,6 nmol P450 (mg protein)⁻¹ olarak belirlenmiştir (Miranda vd 1989). LMC1'in maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 450 nm olup, SDS-PAGE sonucundaki molekül ağırlığı; 50000 Da'dur. Çok az 17 β -estradiol 2-

hidroksilasyonu, testosteron'un 16 β -hidroksilasyonu, progesteron'un 6 β ve 16 α -hidroksilasyonlarını sağlar. BaP ve benzfetamin (BND) metabolizmasında tayin edilmemiştir. Hidroksillenmiş laurat metabolitleri HPLC metodu kullanılarak tayin edilmiş ve kütle spektrometresi ile türleri belirlenmiştir (Buhler ve Wang-Buhler 1998).

LMC1'in daha önceden ω -hidroksilasyonu gerçekleştirmediği rapor edilmesine rağmen (Miranda vd 1990), gerçekte ω -6 hidroksilasyonunu katalizlediği bulunmuştur. LMC1 sadece laurat'ın ω -6 hidroksilasyonunu gerçekleştirmektedir. Saflaştırılan LMC1'in molekül ağırlığı ağırlığı MALDİ-TOF kütle spektrometresiyle 57114 \pm 55 Da olarak belirlenmiştir. cDNA sekans analizinde LMC1'in molekül ağırlığı ağırlığı 50000 Da olarak bulunmuştur (Miranda vd 1989). Bu farklılık in vivo olarak ekspres edilen CYP2M1 proteininin post-translational modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır (Buhler vd 1997, Buhler ve Wang-Buhler 1998, Haasch 2002).

2002 yılında Katchamart ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, 1 yıllık yetişkin gökkuşuğu alabalığına, metoksiklor (20mg/kg), dietlstilbestrol (15mg/kg), 4-tert-oktilfenol (25 mg/kg) ve biochain A (25 mg/kg) intraperitonel olarak, 1, 4 ve 7. günlerde enjekte edilerek, onuncu gün sakrifiye edilip hepatik CYP2M1 protein seviyeleri incelenmiştir. Metoksiklor, dietlstilbestrol, 4-tert-oktilfenol ve biochain A CYP2M1 ekspresyonunu artırmıştır (Katchamart vd 2002).

1.2.7 Sitokrom P4503A Ailesi

Saflaştırılmış balık (*rainbow trout*) CYP3A27 sitokrom P450'sinin aktivitesi; 14,9 nmol P450 (mg protein)⁻¹ olup, LMC5 olarak tanımlanmıştır. Bu P450 formunun SDS-PAGE sonucunda elde edilen molekül ağırlığı, 59000 Da'dur ve maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 448 nm'dir. LMC5 benzfetamin (BND) N-demetilasyonu, eritromisin N-demetilasyonu, projesteron ve testosteron'un 6 β -hidroksilasyonu için önemli bir aktivite gösterir (Miranda vd 1989). Memelilerde steroid 6 β -hidroksilasyonu CYP3A enzimleri ile katalizlenir. Balıklardaki LMC5 ile memelilerdeki CYP3A enzimleri arasında immunokimyasal olarak homolog bölgeler tayin edilmiştir. Balık karaciğer mikrozomlarındaki projesteron 6 β -hidroksilaz aktivasyonu LMC5 tarafından katalizlenir ve bu CYP3A izoformlarının karakteristik özelliğidir. İnsanlardaki CYP3A4 (sıçanlarda CYP3A1) ve balıktaki LMC5 arasında katalitik fonksiyon ve yapı bakımından benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Miranda vd 1991, Buhler ve Wang-

Buhler 1998). Sitokrom P4503A ile yapılan bir çalışmada, CYP3A, zebra balığından izole edilip tanımlanmıştır. Elde edilen sekans analizi sonuçlarına göre, bu proteinin 1290 nükleotit ve 430 amino asitten oluştuğu bulunmuştur (Bainy ve Stegeman 2004).

James ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, kasi balığının bağırsağında sitokrom P4503A'nın katalitik özelliği ve ekspresyonu tanımlanmaya çalışılmıştır. CYP3A'nın katalitik indikatörü olarak, mikrozomal testosteron 6 β -hidroksilasyon aktivitesi kullanılmıştır. Kedi balığı bağırsağındaki CYP3A indikatörü olan testosteron 6 β -hidroksilasyon aktivitesi 88,6 \pm 15,6 pmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. CYP3A protein seviyesi ve testosteron 6 β -hidroksilasyon aktivitesi bağırsakta karaciğerdekenden daha düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, CYP3A'nın ksenobiyotik metabolizmasında önemli rolünün olduğu tespit edilmiştir (James vd 2005).

Yapılan başka bir çalışmada, Atlantik salmon (*Salmo salar*) balığında, nonilfenol ile ilaçları metabolize eden sitokrom P450 enzimlerinin değişimi araştırılmıştır. 7 günlük zaman periyodunda balıklar nonilfenol ile muamale edilmiş ve farklı muamale günlerindeki balıklarda CYP1A1 ve CYP3A protein seviyelerine bakılmıştır. 7 günlük zaman aralığında CYP3A protein seviyesi, yedinci gün en yüksek olarak bulunmuştur (Meucci ve Arukwe 2006).

1.2.8 Sitokrom P4503C Ailesi

Corley ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada, yeni sitokrom P450 alt ailesi olan CYP3C1 rapor edilmiştir. CYP3C1 ilk kez zebra balığı (Danio rerio)'dan klonlanmış olup CYP3C1'in 505 amino asitli bir protein yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Memeliler ve teleost CYP3A ve CYP3B formlarıyla % 44 - % 54 benzer özellik ve yapı göstermiştir. CYP3C1 mRNA'sı balık karaciğeri ve yedi ekstrahepatik dokuda tayin edilmiştir (Corley-Smith vd 2006).

1.2.9 Sitokrom P4504T Ailesi

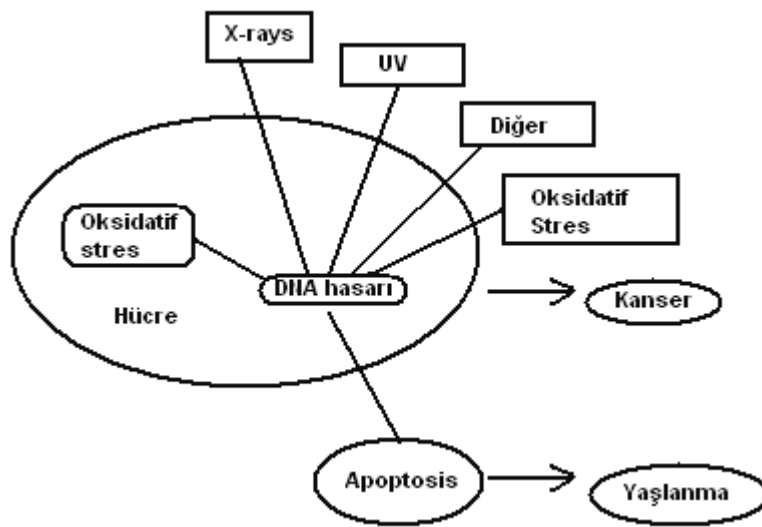
CYP4 ailesi üyesidir. İnsanda sıçanda ve balıklarda farklı isimlerle adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 130 amino asitli peptit içerdiği, tavşan CYP4B1'si ile %54,6 homolog ve sıçan CYP4B2'si ile %55,4 aynı özellikler gösterdiği belirlenmiştir. CYP4 ailesi benzer özellikler gösterir fakat bu balık P450 enzimi; sitokrom P450 Nomenclature komitesi tarafından CYP4T1 olarak adlandırılmıştır. Bu enzim henüz ne karakterize edilmiş ne de tanımlanmıştır (Falck vd 1997, Buhler ve Wang-Buhler 1998).

1.2.10 Sitokrom P4504F7 Ailesi

Sitokrom P450 ailesi CYP4 üyeleri bir çok organizma ve dokularda bulunmuştur. CYP4 enzimlerinin metabolizmadaki rolü; yağ asitlerinin ve prostaglandinlerin (ω -) ve (ω -1)- hidroksilasyonunu gerçekleştirmektir. Bu enzimlerin bir çoğu karaciğer ve böbrekte ekspres edilmiştir. Hormon gibi endojen substratların yanı sıra, herbisitler, insektisitler ve endüstriyel kimyasallar gibi ekzojen substratlarında detoksifikasyonunda görev alırlar. İnsan ve sıçanlardaki CYP4F alt ailesi üyeleri tanımlanmış ve CYP4F2 ve CYP4F3 sıçan ve insan karaciğerinden saflaştırılmıştır (Jin vd 1998, Kikuta vd 1993). CYP P450 enzimlerinin bir çoğu balıklarda da izole edilerek tanımlanmıştır. Balıklarla yapılan bir çalışmada; memelilerdeki CYP 4F ile %39 ile %56 arasında değişen miktarda aynı özelliğe sahip CYP4F7 alt ailesi belirlenmiştir. CYP4F7'nin, 526 amino asitlik protein yapısına sahip olduğu bulunmuştur (Sabourault vd 1999). 2004 yılında yapılan bir başka çalışmada kurbagadan (*Xenopus laevis*) iki yeni CYP4 geni izole edilerek tanımlanmıştır. Bunlar CYP4F42 ve CYP4V4 olup, sırasıyla 528 ve 520 amino asit içerdikleri belirlenmiştir (Fujita vd 2004). CYP4F42'nin lökotrien B₄'ün hidroksilasyonunda görev almaktadır. Başka bir deyişle memelilerdeki CYP4F enzimleri, prostaglandin ve arakidonik asidin hidrolizi fonksiyonlarını üstlenmişlerdir (Lasker vd 2000, Blylund ve Oliw 2001).

1.3 Sitokrom P450 Enzimleri ve Yaşlanma Mekanizması

Yaşlılık, ölüm olasılığının arttığı bir yaşam evresidir ve yaşlılığın temel özelliği, iç dengeyi (homeostazis) koruma yeteneğinin bozulmasıdır. Yaşlanma multifaktöryel etkenlerle gelişen bir süreçtir. Sonuçta, organizmada kişiye göre yeri, şekli ve şiddeti farklı, bir çok değişimler görülür. Örneğin, dokuların biyokimyasal bileşiminde ve hücresel düzeyde değişimler olur. Fizyolojik kapasitede ilerleyici azalma, hastalığa karşı duyarlılığın ve etkilenmenin artması, çevresel uyaranlara cevap verme yeteneğinde azalma, istirahat ve bazal parametrelerde değişim, rezerv depoların kaybı sonucu maksimum yanıtlarda küntleşme (körelme), pik seviyelere ulaşmada ve bazal seviyelere geri dönmeye gecikmeler olabilir. Rezerv kapasiteler azaldığı için yaşlanma ile bazı hastalıkların görülme olasılığı artarken, var olan hastalıkların da şiddetleri artmakta, tedavileri de daha güç olmaktadır.



Şekil 1.2 Yaşlanma Mekanizması

Vücudumuza alınan ilaçları metabolize eden enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, fizyopatolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi bir çok faktör rol oynar. Özellikle ilaçların ve diğer kimyasalların etkileri yaşa bağlı olarak araştırılmaktadır. Çeşitli sitokrom P450 izozimlerinin ekspres edilmesi, sıçanlarda ve insanlarda yaşlanma ile azalmaktadır (Akahori vd 2005). Farklı yaşlardaki maymunlarla yapılan bir çalışmada,

toplam sitokrom P450 içeriğinin yaşlanma ile azaldığı gözlemlenmiştir (Akahori vd 2005). Genç bireylerden yaşlı bireylere kadar, ilaçların absorpsiyon oranı, plazma proteinlerine bağlanma, dağılım ve biyotransformasyonu araştırılmıştır. Metabolik yollarda rol oynayan bir çok enzim insanlarda yaşa bağlı olarak incelenmiş olup, sıçan, köpekler koyunlar, domuzlar, keçiler ve tavuklarda çalışılmıştır (Kaddouri vd 1990, Kawalek ve El Said 1990b, Kawalek ve El Said 1994, Coulet vd 1996). Atlarla yapılan bir çalışmada; atların hepatik olarak ilaçları metabolize etme kapasiteleri yaşa bağlı olarak yaşama süreçleri içinde karakterize edilmiştir. Yaşları 1 yıl ile 12 yıl arasında olan 50 dişi atın karaciğer mikrozomlarında, sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar, karboksilesterazlar ve transferazlar analiz edilmiştir. CYP2B, CYP2E, CYP3A enzimleri western immunoblotting yapılarak miktarlarının yaş artışına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Aynı örneklerde glutatyon S-transferaz aktivitesi araştırılmış ve bu enzimin aktivitesinin yaş ilerledikçe azaldığı bulunmuştur. Bu atların yaşları arttıkça; EROD, MROD, BROD, Anlin 4-hidroksilaz, NDMA N-demetilaz, Eritromisin N-demetilaz, Benzo(a)piren hidroksilaz, Benzfetamin N-demetilaz ve Etilmorfin N-demetilaz aktivitelerinde artış tayin edilmiştir. Aminopiren N-demetilaz aktivitesinde dikkate değer bir değişim gözlemlenmemiştir (Nebbia vd 2003). Jeffrey (1997) ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; sıçanlardaki ksenobiyotik metabolizmasının, hepatik mikrozomal enzimlerinin aktivitelerine bağlı olarak, yaşlanma ile değişimi incelenmiştir. 22 aylık erkek sıçanlar ile 2 aylık erkek sıçanlarla çalışılmış ve 22 aylık erkek sıçanlardaki; CYP2B1, CYP2B2, CYP2C11, CYP2E1, CYP2A1 ve testesteron 5 α -redüktaz enzimlerinin mikrozomal aktivitelerinde artış görülmüştür. Hepatik sitokrom P450 içeriğinin tamında ise azalma tespit edilmiştir (Jeffrey vd 1997).

Jeffrey ve William'ın yaptığı bir diğer çalışmada, 3-6 aylık genç ve 22-24 aylık yetişkin sıçanlardaki p-nitrofenol hidroksilaz ve toplam CYP P450 miktarları incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, toplam Sitokrom P450 miktarında yaş artışı ile birlikte azalma gözlemlenmiş olup, p-nitrofenol hidroksilaz aktivitesinde yaşlanma ile artış gözlemlenmiştir. 3-6 ve 22-24 aylık sıçanlardaki p-nitrofenol hidroksilaz aktiviteleri sırasıyla $0,67 \pm 0,14$ ve $0,92 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/saat/gram}$ protein olarak bulunmuştur (Jeffrey ve William 1997). 2004 yılında 3, 9 ve 24 aylık sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada, sıçan karaciğer mikrozonlarındaki toplam P450 miktarı

incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sıçanlanlarda toplam P450 miktarının yaşlanma ile azaldığını göstermiştir (Wauthier vd 2004).

Balıklarda yaşlanmaya bağlı olarak yapılan bir çalışmada ise; farklı cinsiyet ve yaşlardaki balıkların (*rainbow trout*) hepatik mikrozomlarında LMC5 konsantrasyonları tayin edilmiştir. Western blotting kullanılarak 7 haftalık balık karaciğer mikrozomlarındaki LMC5 miktarı $30 \text{ pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ şeklinde tayin edilmiştir. 15 aylık balık için erkek ve dişi balıklarda 57 ve 33 $\text{pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ ve 20 aylık balık için 34 ve 33 $\text{pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ olarak ölçülmüş, bu enzimin erkeklerde yaş artışı ile birlikte arttığı ve dişilerde herhangi bir değişme göstermediği bulunmuştur. (Miranda vd 1990). CYP3A27 karaciğer başta olmak üzere testis, böbrek ve midede bulunmuş olup, CYP3A27 enziminin böbreklerde yaşlanma ile mRNA miktarının arttığı gözlenmiştir (Lee vd 1997). 15 ve 20 aylık gelişme evrelerindeki erkek gökkuşuğu alabalığının karaciğer mikrozomlarında 91 ve 79 $\text{pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ konsantrasyonunda LMC2 bulunmuştur. Aynı yaşlardaki dişi gökkuşuğu alabalığının karaciğer mikrozomlarındaki LMC2; 35 ve 24 $\text{pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Buhler-Wang-Buhler 1998). Gökkuşuğu alabalığı ile yapılan bir başka çalışmada, CYP2K1 enzim aktivitesinin gelişme ile artış gösterdiği belirlenmiştir. Embriyo, 40 günlük ve 51 günlük gökkuşuğu balıklarında CYP2K1 enzimi ölçülmüş ve 51 günlük balıktaki CYP2K1'in en yüksek olduğu belirlenmiştir (Miranda vd 1990).

Gökkuşuğu alabalığı ile yapılan başka bir çalışmada 7 haftalık karaciğer mikrozomlarındaki CYP2M1 konsantrasyonu $13 \text{ pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ olarak bulunmuştur. 15 aylık erkek ve dişi karaciğerlerindeki CYP2M1 seviyesi 36 ve 28 $\text{pmol (mg mikrozomal protein)}^{-1}$ şeklinde tespit edilmiştir. (Miranda vd 1990). Hem erkek hem de dişi balıkların karaciğer ve böbreklerinde CYP2M1 gözlenmiştir. CYP2M1 yaşlanma ile farklılık gösterdiği; 106 günlük balıktaki CYP2M1'in embriyodakinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Buhler ve Wang-Buhler 1998).

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler) detoksifikasyon metabolizmasında yer alan enzimler olup, yaşlanma ve kimyasal stres ile değişim gösterirler (Tchaikovkaya vd 2005). Morgado ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 70 günlük ve 18 aylık sıçan karaciğerlerinde GST aktivitesinin değişimi ölçülmüştür. Analiz sonucunda yaşlı (18 aylık) sıçan karaciğerlerindeki GST aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

(Morgado vd 2003). Yapılan başka bir çalışmada 5 haftalık ve 9 aylık sıçanların karaciğer ve beyinlerindeki GST aktivitesi araştırılmıştır. Sıçan karaciğerlerindeki GST aktivitesinin daha fazla olup, yaşlanma ile aktivitenin arttığı bulunmuştur. (Kim vd 2003).

Brown-Borg ve Rakoczy'in yaptığı bir çalışmada, 3, 12 ve 24 aylık dwarf mice karaciğerlerinde γ -glutamil transpeptidaz (GGT) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri incelenmiştir. Böbrekte, GGT aktivitesinde yaş artışıyla birlikte % 30 azalma gözlenirken, GST aktivitesinde % 85 artış görülmüştür. En yüksek GGT aktivitesi kalpte gözlenmiştir. GST aktiviteleri böbrek, karaciğer ve beyinde benzer şekilde bulunmuştur (Brown-Borg ve Rakoczy 2005). GST'ler ile yapılan bir başka çalışmada, Öztürk ve Gümürlü 1, 6 ve 12 aylık Wistar sıçanları kullanarak, 20 ve 40°C sıcaklıklarda kalp stresine maruz bırakılıp, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD), Süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerini incelemişlerdir. 1 ve 6 aylık sıçanlarda, kalp stresi sonrası, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde artış gözlenmesine karşın, 12 aylık sıçanlarda bu enzim aktivitelerinde azalma görülmüştür. süperoksit dismutaz (SOD) enzimi 1, 6 ve 12 aylık sıçanlarda yaş artışı ile birlikte artış göstermekle birlikte grupların kendi içindeki SOD aktiviteleride artmıştır. Glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri kalp stresi ile hem her bir grupta hem de yaş artışı ile paralel olarak artmıştır. Böylelikle kalp stresinin, çeşitli antioksidant enzimlerin ve GST enziminin aktivitesinde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir.(Öztürk ve Gümürlü 2004).

1.4 Glutatyon S-Transferaz Enzimleri

Glutatyon S-transferaz enzimleri (GST'ler) [E.C.2.5.1.18] faz II biyotransformasyon enzimlerinden çok fonksiyonlu ve dimerik yapısı olan bir ailedir, protein dizilerine, izoelektrik noktalarına, substrat spesifikliğine, inhibitörlere olan hassaslıklarına ve immünolojik özelliklerine dayanarak 8 sınıfta toplanmışlar ve aerobik organizmalarda oldukça geniş olarak tanımlanmışlardır (Habig vd 1974, Keen vd 1976, Clark 1989, Meyer vd 1991, Rouimi vd 1996, Armstrong 1997, Board vd 1997, Perez-Lopez vd 2000,). Çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu katalize ederler. Kataliz reaksiyonlarında GST'ler, elektrofilik

substratlar üzerine glutatyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler (Jakoby ve Habig 1980, Hayes ve Pulford 1995, Armstrong 1997). Böylece GST'ler, dışarıdan alınan toksik yabancı maddelerin veya oksidatif basamakta oluşan ürünlerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar (Mosialou vd 1993, Bulavin vd 1996). Bu anlamda GST'ler, vücut için hayati koruyuculuk fonksiyonu üstlenmiş olan enzim gruplarından biridir. Ancak bunun yanı sıra GST'ler toksik ve karsinojenik bileşikler içeren çeşitli kimyasalların aktivasyonunda da rol alırlar (Jacoby ve Habig 1980, Ketterer 1988, Eaton ve Bammler 1999). GST'ler aerobik bakterilerden omurgalılara kadar geniş bir dağılıma sahiptir (Stenersen vd 1987, Kalinina vd 1988, Hayes ve Pulford 1995). Bu enzimler temel olarak karaciğerin sitozolik fraksiyonlarında lokalize olmalarına rağmen bütün dokularda bulunurlar (Sijm ve Opperhuizen 1989). Bu enzimler yüksek organizmalarda, özellikle de memeli türlerinde oldukça geniş şekilde araştırılmıştır (Mannervik vd 1985). Fakat son yıllarda spesifik biyokimyasal markör olarak kullanılmalarından dolayı sucul organizmalarda bulunan GST formlarına olan ilgi de artmıştır (Machala vd 1997). Çeşitli türlerinin bu balık enzimlerinin farklı izozimlere sahip olduğu gösterilmiştir (Rammage ve Nimmo 1984, George ve Young 1988). Hepatik ve ekstrahepatik GST aktivitesi bir çok teleost balık türlerinde tespit edilmiş ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen model substratına karşılık enzim aktivitesi çalışılan bütün balık türlerinde gösterilmiştir (Nimmo 1987, Leaver ve George 1998, Gadagbui ve James 2000, Melgar Riol vd 2001, Novoa-Valinas vd 2002). Aktivite seviyelerine zıt olarak, balık GST izozimlerinin rolü ve moleküler karakterizasyonu üzerine daha az bilgi mevcuttur (George ve Young 1988).

GST'ler, çok geniş substrat spektrumuna sahiptirler. Belirli substratlara karşı GST'lerin spesifik aktiviteleri yeni tespit edilen GST'lerin sınıflandırılmasına imkan sağlar. Örneğin, α -sınıf GST'ler kumen hidroperoksidine karşı oldukça reaktiftir (Mannervik vd 1985, Meyer vd 1991), M-sınıf GST'ler epoksitler için önceliğe sahip iken, p-sınıf GST'ler de etakrinik asite karşı oldukça reaktiftirler (Meyer vd 1991). CDNB substratı sınıf spesifik değildir ve alpha, mu, pi, theta sınıfı GST'ler ile etkileşebilir (Takamatsu ve Inaba 1994, Meyer vd 1991). GST'ler, konjugasyon oluşumunu kataliz etmelerinin yanı sıra peroksidaz veya izomeraz aktiviteleri de gösterirler ve çok çeşitli kimyasallara kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanabilirler (Mannervik ve Danielson 1988). Bu şekilde bu metabolitlerin, makromoleküller ile olası etkileşimlerinin önlenmesi ile, ekzojen ve endojen olarak tanımlanan elektrofilik intermediyer bileşiklere karşı vücudun çok

önemli savunma sistemlerinden birini oluştururlar (Jakoby ve Habig 1980). GST'lerin varlığı ilk kez sıçan dokularında gösterilmiş (Booth vd 1961) ve birkaç GST izozimleri sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır (Habig vd 1974a ve 1974b, Keen vd 1976). Örtüşen substrat spesifikliğine sahip olan çok fazla GST izozimlerinin keşfi (Habig vd 1974a) ve bu enzimlerin çeşitli toksik bileşiklerin metabolizmasındaki rollerinin gösterilmesi, GSH-peroksidaz aktiviteleri (Prohaska ve Ganther 1977), hidrofobik moleküllerin hücre içi transportundaki katalitik olmayan bağlanmaları sayesinde toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda rol almalarının gösterilmesi (Jakoby 1978, Listowsky vd 1988) bu enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Son zamanlarda çeşitli patolojik ve çevresel faktörlerin bu izozimlerin ekspresyonunu etkilediğinin gösterilmesi de bu ilgiyi daha da arttırmıştır. Buna bağlı olarak, tümör markörleri olarak GST'lerin kullanımının mümkün olduğu önerilmiştir (Satoh vd 1985, Tsuchida ve Sato 1992, Kato vd 1995, Nielsen vd 1996, Mikhailova vd 2005).

Son yıllarda spesifik biyokimyasal markör olarak kullanılmalarından dolayı sucul organizmalarda bulunan GST formlarına olan ilgi de artmıştır (Machala vd 1997). Çeşitli türlerinin bu balık enzimlerinin farklı izozimlere sahip olduğu gösterilmiştir (Rammage ve Nimmo 1984, George ve Young 1988). Hepatik ve ekstrahepatik GST aktivitesi birçok teleost balık türlerinde tespit edilmiş ve l-kloro-2,4-dinitrobenzen model substratına karşılık enzim aktivitesi çalışılan bütün balık türlerinde gösterilmiştir (Nimmo 1987, Leaver ve George 1998, Gadagbui ve James 2000, Melgar Riol vd 2001, Novoa-Valinas vd 2002). Aktivite seviyelerine zıt olarak, balık GST izozimlerinin rolü ve moleküler karakterizasyonu üzerine daha az bilgi mevcuttur (George ve Young 1988). Balıklarda ve diğer deniz hayvanlarında, bir çok ksenobiyotik GST'ler tarafından detoksifiye edilmektedir. Bu enzimatik sistem, su kirliliğinin görüntülenmesinde bir çeşit haberci biyomarkördür (Melgar Riol vd 2001). Çeşitli ksenobiyotiklerin etkisi ile organizmada GST'nin indüksiyonu, çevredeki değişimlere adaptasyonu için bir yoldur (Mikhailova vd 2005). Birçok türde GST ekspresyon seviyeleri yabancı bileşiklere maruz kalma ile kayda değer bir şekilde artabilir, bu artış sucul kontaminasyonun etkili biyomarkörü olarak uygunluğunu belirleyebilir. Bu enzimler, balıklar ve diğer deniz canlılarında bileşiklerin büyük bir çeşidinin detoksifikasyonuna katılırlar. Farklı balık türlerinde hepatik GST'lerin çeşitli izoformları saflaştırılmış ve kısmen karakterize edilmiştir (Fouremant ve Bend 1984, George ve Young 1988, Lauren vd 1989, Perdu-Durand ve Cravedi 1989, George ve Buchanan 1990, Dominey vd 1991, Gallagher ve Di Giulio 1992, Rouimi vd 1996, Al-

Ghais 1997). Bu enzimler temel olarak balıkların karaciğerlerinde bulunmasına rağmen çeşitli balıkların solungaç, böbrek, ve bağırsaklarında GST aktiviteleri gösterilmiştir (Gallagher ve Di Giulio 1992, Al-Ghais 1997, Perez-Lopez vd 2000, Boutet vd 2004).

Tablo 1.3 Farklı sınıftaki bileşiklerden GST substratlarına örnekler

Bileşik Türü	Substratlar
Kanserojen Metabolitler	Aflatoksin B1-8,9-epoksit Benzo[a]piren-7,8-diol-9,10 oksit 5-hidroksimetil krisen sülfat 4-nitroquinolin-N-oksit 3-MC
Pestisitler	Alaklor Atrazin Diklordifeniltrikloretan (DDT) Lindan Metil paratyon
Oksidatif Zarar Ürünleri	Akrolein Bazik propenallar Yağ asidi hidroperoksitleri BHA BHT
Anti Kanser İlaçlar	1,3-bis (2-klor etil)-l-nitrosoürea (BCNU) Klorambusil Siklofosamid Melpalan Fosfomisin
Endojenler	Steroidler Histidin Metabolitleri

1.5 Deney Hayvanı

Chrysophrys aurata sinonimi ile de adlandırılan çipuranın sistematığı Tablo 1.4’de gösterilmiştir.

Tablo 1.4 Çipura balığının (*Sparus aurata*) sistematığı

Süperalem	Eukaryoda
Alem	Animalia
Filum:	Chordata
Altfilum:	Vertabrata
Sınıf:	Osteichthyes
Takım:	Perciformes
Alttakım:	Percoidei
Aile:	Sparidae
Cins:	Sparus
Tür:	Aurata (Linneaus 1758)

Çipura balığına tüm Akdeniz’de rastlanmakla birlikte doğu ve güney doğu Akdeniz ülkelerinde, Kanarya Adaları’nda, İngiltere kıyılarında, Verde Burnu’nda ve nadir olarak Karadeniz kıyılarında rastlanır. Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yayılım gösteren çipura deniz fenogramlarının bulunduğu kumlu-çamurlu ve çamurlu ortamlarda yaşamını sürdürür.

Ülkemizde daha çok güney sahilleri ve Ege kıyılarında yayılım gösterir. 30-50 gram olanları ince lidaki, 100 gram olanları lidaki, 100-180 gram olanları kaba lidaki, 200 ve üzeri ağırlıkta olanları da çipura olarak adlandırılır (Alpbaz 1990). 0-3 yaş arası çipuraların mide içerikleri incelendiğinde bu türün karnivor bir form olduğu ve özellikle ergin bireylerin Crustacea ve Mollusca familyasına ait türlerle beslendiği ortaya çıkmıştır. Hermafrodit özellik gösteren çipuraların, üst dudağı, alt dudağa oranla daha kalın olup gözün başladığı noktanın paralelinde biter. Gözler orta derecede gelişmiştir.

Göz çukuru önündeki mesafe, göz çapından en az iki kat daha uzundur. Gözler arasında V şeklinde yıldızsı bir bant vardır.

Çipuraların üreme periyodu ülkemizde Ekim-Aralık ayları arasında olup en iyi gelişim 22-25 °C aralığında gözlenmektedir. Yaşayabilecekleri sıcaklık aralığı 3-34 °C, tuzluluk değeri ise %5-40 olarak belirtilmiştir. %1 tuzluluğa kadar yaşayabildikleri Chervinski ve Chanin (1985) tarafından bildirilmiştir. Genellikle 5-25 m arası derinliklerde yayılım gösterirler. Yaşları ilerledikçe derinlerde yaşamayı tercih ederler. Bunun için dalyan alanlarında ergin bireylere rastlanmaz. Yaz aylarında 0.5-9 m derinliğe kadar olan sığ sulara giriş yapan çipuralar, kış aylarında 35-40 m derinliğe kadar inerler. 2 yaşını aşan bireyler daha da derin sulara inebilmektedirler. Maximum boyları 70 cm'ye ulaşan çipuraların ortalama uzunlukları 25-40 cm. arasındadır.

Günümüzde Akdeniz Bölgesi'nde oldukça iyi bir pazara sahip olan çipura balığına ait çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Yetiştiricilik çalışmalarında elde edilen bilgiler ise daha birçok konunun çalışılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır (Tandler ve Helps, 1985, Conides, 1992).

Çipuraların fizyolojisi ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar diğer türlere oranla daha azdır. Laboratuvar şartlarında çalışmaların zorluğu ve çipura balığının kültür koşullarında üretiminin oldukça güç olması bu türle ilgili araştırmaları olumsuz etkilemiştir (Freddi vd 1981, Camus ve Koutsikopoulos 1984, Tandler ve Helps 1985).

Ege Denizi'nin Anadolu kıyılarına derinlemesine sokulan İzmir körfezi doğal özellikleri bakımından farklıdır. Karaburun Yarımadası ile Gediz Deltası arasında kuzeybatı-güneydoğu doğrultusunda uzanan daha geniş ve daha derin kesimi Dış Körfez olarak adlandırılır. Deneyimizde kullanılacak olan farklı gelişme dönemlerindeki erkek çipura (*Sparus aurata*) balıkları Karaburun Yarımadasına kurulmuş, Çeşme, İldırı köyü mevkisindeki Pınar balık üretim tesisinden sağlanmıştır.

Tablo1.5 Çipura balığının büyüme gereksinimleri, dağılımı ve orjini

Tür	Sparus aurata
Orjin/Dağılım	Ege ve Akdeniz Bölgesi
Su Kalitesi Gereksinimleri Oksijen Sıcaklık Tuzluluk Amonyak toleransı pH	7-9 mg/L 23-28°C 23.5-26.5 % < 0.01 mg/L 7.4-7.7
Büyüme Dönemleri Larva Ergin Yetişkin	60-70 gün 8-10 ay 24 ay
Büyümede Önemli Faktörler	Sudaki Amonyak Konsantrasyonu Su Akımı Güneş Işığı Sıcaklık Oksijen miktarı Suyun tuzluluğu ve pH'ı

1.6 Çalışmanın Amacı

Günümüzde her geçen gün yeni bir ilacın üretilmesi ve bir çok kimyasal maddenin gıdalar dahil bir çok alanda kullanılması sonucu insanların bu maddelere maruz kalması, bu maddelerin vücutta nasıl metabolize edildiğini ortaya çıkarıcı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Deneyimizde; GST (glutatyon S-transferaz), EROD (etoksirezorufin O-Deetilaz), MROD (metoksirezorufin O-Demetilaz), PROD (pentiloksirezorufin O-Depentilaz), BROD (benziloksirezorufin O-Debenzilaz), anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz, eritromisin N-Demetilaz, kafein N-Demetilaz ve

4-metilamino antipiren N-Demetilaz aktiviteleri, 24, 20, 15, 11, 9, 8, 4 ve 1,5 aylık ipura (*Sparus aurata*) balıklarının karaciğer mikrozomlarında incelenip, elde edilen bilgilerin yaş değişimi tanımlanmaya, elde edilecek verilerin, önemli bir insan gıdası olan ipura balığının yetiştiriciliğinde kullanılması ve bağlantılı olarak insan sağlığı ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1 Materyaller

Deneysel çalışmalarımız sırasında; Black Decker, V2600 homojenizatör, Sigma 3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (12156 rotor, PO Box 1713, D-37507, Germany), Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) florometre ve Shimadzu UV-1600A spektrofotometre, Metler Toledo MP 220 pH metre, Nüve ST 402 su banyosu, Vortex mixer VM-20, Hirayama Hiclave HVE-50 otoklav, Scaltec analitik terazi, Nuaire -85 °C Ultralow Freezer, Human Power Scholar-UV saf su sistemi ve Electro-mag M 420P etüv kullanılmıştır.

2.1.1 Kimyasallar

Sığır serum albumin (BSA; A-7906), bütilemişhidroksitoluen (BHT; B-1378), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; C-6396), etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA; E-5134), 7-etoksirezorufin (E-3763), Folin reaktifi (F-9252), glutatyon

indirgenmiş formu (GSH; G-6013), p-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH; N-7505), fenilmetan sülfonil florid (PMSF; P7626), HEPES (H-4034), rezorufin pentil eter (P-2456), 7-benziloksi rezorufin (B-1532), N-Nitrosodimetilamin (N-7756), anilin (A-9880), 4-metilamino antipiren (D-8015), kafein (C-0750), Eritromisin (E-6376), glukoz 6-fosfat (G-7250), Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz (G-7877), rezorufin metil eter (M-1544), sodyum potasyum tartarat (S-2377), Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA)'den elde edilmiştir. Bakir sülfat pentahidrat (61240), gliserol (15524), potasyum klorür (60129), sodyum karbonat (31432), asetil aseton (00909), p-amino fenol (1009), kolik asit (27029), magnezyum klorür penta hidrat (63072), sodyum klorür (13423), Tris (33742), Fluka Chemie (GmbH Industrie Strasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'den elde edilmiştir. Potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873), hidroklorik asit (00314) E. Merck (Darmstadt, Germany)'ten elde edilmiştir. Etanol (32221), formaldehit (15512) ve fenol (16017) Riedel firmasından elde edilmiştir.

2.2 METOTLAR

2.2.1 Dokulardan Sitozolik ve Mikrozoim Fraksiyonlarının Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak olan farklı gelişme dönemlerindeki (1.5-24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları Karaburun yarımadasına kurulmuş, Çeşme, Ildır köyü mevkiisindeki Pınar balık üretim tesisinden elde edildi. Balıkların karaciğer dokuları dekaptasyon işlemi ile alınarak etiketlendi ve sıvı azota konuldu.

Laboratuarda dokular (karaciğer) sıvı azottan çıkarıldı ve daha sonra dokular ilk olarak buz üstüne alındı. Önce soğuk distile su daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırıldı. Filtre kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra dokular hızla tartıldı. Bundan sonraki bütün işlemler 0-4 °C arasında buz üzerinde gerçekleştirildi. Makas ile dokular buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Kesilen dokulara 2 mM EDTA, 0,25 mM PMSF, 0,15 mM BHT, % 0,05 Kolat ve % 10 gliserin içeren % 1,15'lik KCl çözeltisi içinde, buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem teflon cam homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan dokunun yaklaşık 3 katı homojenizasyon çözeltisi eklendi. Teflon çubuk cam tüp içinde 10 defa aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde

çevrilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Black Decker, V2600) kullanılarak yapıldı.

Homojenat, daha sonra postmitokondriyal fraksiyon elde etmek için 12000 *xg*' de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (Sup) çift katlı steril sargı bezinden süzülerek çökelekten ayrıştırıldı. Çıkan sup miktarı ölçülerek ölçülen sup miktarının 0,5 katı hacminde 0,16 mM CaCl₂ supun üzerine eklendi ve 20000 *xg*' de 75 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu çıkan sup üzerine % 10 gliserin olacak şekilde soğuk gliserin eklendi, elle homojenize edilip eppendorf tüplere konup -80 °C'de muhafaza edildi. Mikrozom fraksiyonlarını elde etmek için kalan çökelek homojenizasyon solüsyonu ile yıkandı ve tekrar 20000 *xg*'de 75 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu çıkan çökelek üzerine doku ağırlığının 0,5 katı kadar süspansiyon çözeltisi (0,1M EDTA içeren %10'luk gliserin çözeltisi) eklendi ve elle homojenize edilip eppendorf tüplere konup -80 °C'de muhafaza edildi.

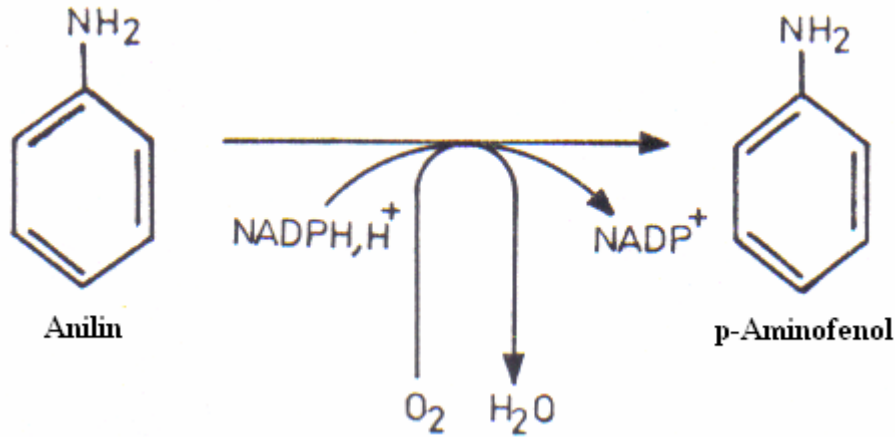
2.2.2. Analitik İşlemler

2.2.2.1 Protein Miktarı Tayini

Çipura dokularından elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albümin) standart olarak kullanılarak Lowry ve ark., (1951)'nin metoduyla yapıldı. 1:200 oranında seyreltilmiş olan mikrozomlar test tüplerine 0,1 mL'den 0,5 mL'ye değişen hacimlerde alındı ve son hacim deiyonize distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Sonra % 2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve % 2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in 1:1:100 oranında karışmasıyla oluşan 2,5 mL alkali bakır reaktifi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) reaktifinden her bir tüpe 0,25 mL ilave edildi. Folin reaktifini koyar koymaz hemen karıştırıldı ve 50 °C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplandı.

2.2.3. Analitik İşlemler

2.2.3.1. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Aktivitesinin Tayini



Şekil 2.1 Anilin 4-hidroksilasyonu

Çipura karaciğer mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark., (1966) tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Tablo 2.1’de verilen tipik reaksiyon karışımına göre tüplere 100 mM HEPES tamponu, pH 7,6 ve 10 mM anilin, karaciğer için 1 mg mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi kullanılarak son hacim 0,5 mL’e tamamlandı.

NADPH üretim sistemi; test tüpüne 0,5 unite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz, 2,5 mM glikoz 6-fosfat, 2,5 mM MgCl₂, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,8 ve 0,5 mM NADP⁺ eklenmesiyle hazırlandı. Daha sonra üretim sistemi içeren test tüpü 37 °C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi.

Reaksiyon 0,075 mL NADPH üretim sisteminin eklenmesiyle başlatıldı ve içinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,25 mL % 20 TCA eklendi. İnkübasyon 37 °C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,25 mL % 20 TCA eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 .xg de 25 dakika santrifüj edildi.

Sonuçta 0,5 mL süpernatant yeni tüplere transfer edilerek 0,25 mL % 20 Na₂CO₃ eklenerek nötrale edildi. Ardından 0,4 N NaOH içeren % 20 fenol eklenerek renk oluşumu sağlandı. Renk oluşumu için 30 dakika 37 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 630 nm’de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü.

Tablo 2.1 Çipura karaciğer mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.

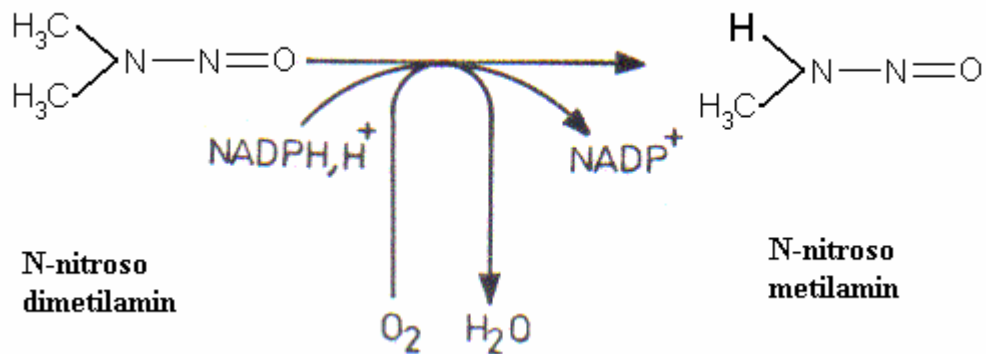
Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (mL)	Son Konsantrasyon
400 mM HEPES tamponu pH 7,6	0,125	100 mM
100 mM Anilin	0,050	10 mM
Mikrozomal protein		Karaciğer için 1 mg
<u>NADPH üretim sistemi</u>	0,075	0,55mM
100 mM Glikoz 6- fosfat	0,025	2,5 mM
100 mM MgCl ₂	0,025	2,5 mM
200 mM HEPES tamponu pH 7,8	0,073	14,6 mM
20 mM NADP ⁺	0,025	0,5 mM
500 u Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz	0,001	0,5 u
Ultra saf (USS) su	0,5mL'ye tamamla	
Toplam hacim	0,5 mL	

2.2.3.2 Mikrozomal N-demetilaz Aktivite Tayinleri

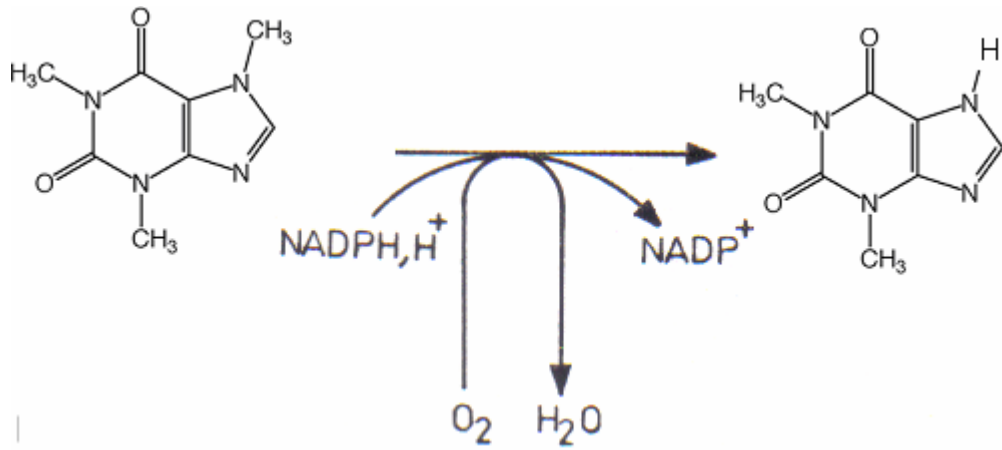
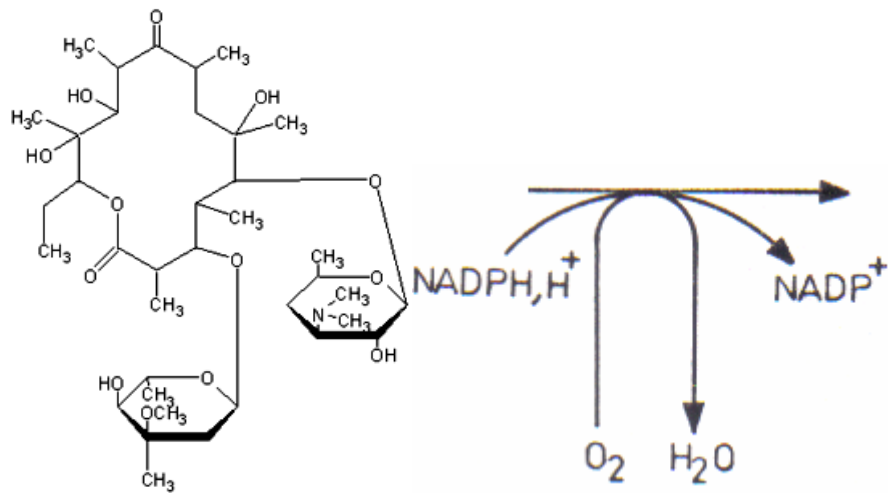
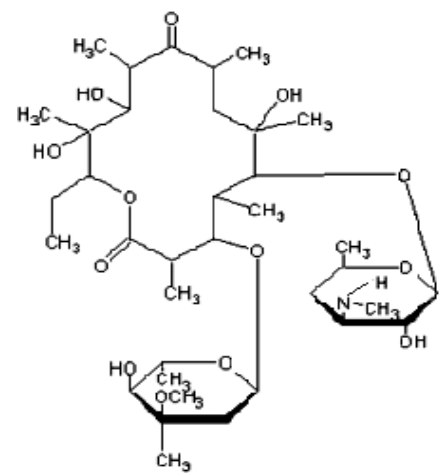
Çipura karaciğer mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin, eritromisin, kafein ve 4-dimetilamino antipiren (aminopiren) N-demetilaz aktiviteleri Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Tablo 2.2'de verilen tipik reaksiyon karışımlarına göre tüplere 400 mM HEPES tamponu, pH 7.7, uygun substrat, belirlenen miktarlarda karaciğer mikrozomal protein

ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 mL'e tamamlandı. NADPH üretim sistemi tanımlandığı gibi hazırlandı ve 0,075 mL NADPH üretim sisteminin ortama eklenmesiyle başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,5 mL 0.75 N'lik perklorik asit eklendi. İnkübasyon 37 °C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi.

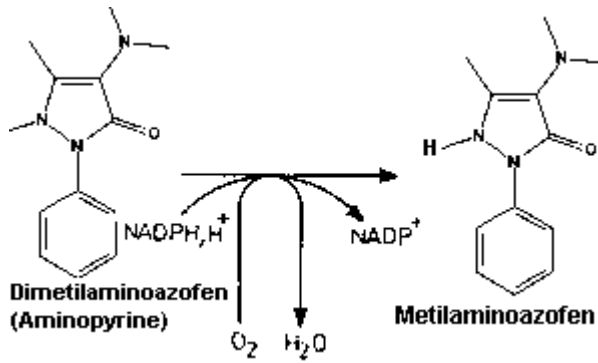
İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,5 mL 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 xg de 25 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 0,5 mL süpernatant yeni tüplere transfer edilerek 100 mL distile su da 30,5 gr amonyum asetat, 0,6 mL mutlak asetik asit ve 0,4 mL asetilasetondan oluşan Nash reaktifinden 0,5 mL eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika 50 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı. Enzim aktiviteleri sırasıyla, eritromisin N-demetilaz (END), N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND), kafein N-demetilaz (CN3D) ve 4-dimetilamino anti piren N-demetilaz (Amino piren N-demetilaz APND) olarak isimlendirilmektedir. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.2 N-nitrosodimetilamin N-demetilasyon

**Kafein****Norkafein****Şekil 2.3** Kafein N-demetilasyonu**Eritromisin****Noreritromisin**

Şekil 2.4 Eritromisin N-demetilasyonu

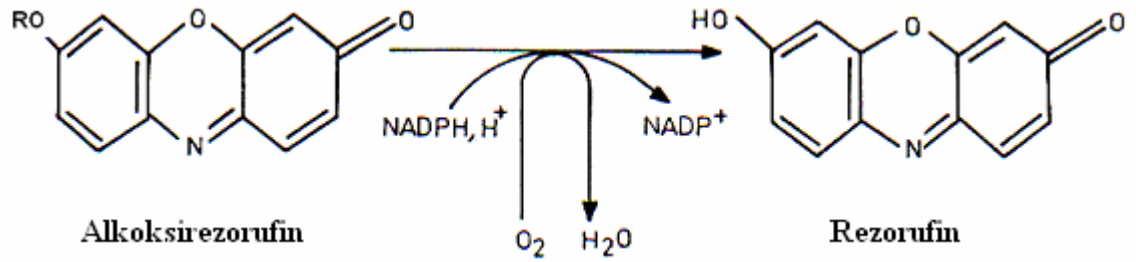


Şekil 2.5 Aminopyrine N-demetilasyonu

Tablo 2.2 N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri

Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (mL)	Son Konsantrasyon
400 mM HEPES tamponu pH 7.5 (APND için) pH 7.7 (NDMA-ND için) pH 7.8 (END ve CN3D için)	0,125	100 mM 50 mM 50 mM
<u>Substrat</u> 1 mM 4-dimetilaminoantipiren 25 mM N-nitrosodimetilamin 50 mM Eritromisin 1 mM Kafein	0,100 0,100 0,100 0,100	0,1 mM 2,5 mM 5 mM 0,1 mM
<u>Mikrozomal protein (karaciğer)</u> APND ve CN3D için NDMA-ND, END için		2 mg/mL 1 mg/mL
Ultra Saf Su (USS) su APND, CN3D, NDMA-ND, END için	0,5 mL'ye tamamla	
<u>NADPH Üretim Sistemi</u> 100 mM Glikoz 6-fosfat 100 mM MgCl ₂ 200 mM Hepses tamponu pH 7,8 20 mM NADP ⁺ 500 u Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz	0,025 mL 0,025 mL 0,073 mL 0,025 mL 0,001 mL	0,50 mM 2,5 mM 2,5 mM 14,6 mM 0,5 mM 0,5 u
Toplam hacim APND, CN3D, NDMA-ND, END için	1 mL	

2.2.3.3 Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri Tayini



Şekil 2.6 Alkoksirezorufine dealkilasyon

Hazırlanan çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarının AROD aktivitesi Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi. Bu aktivite tayininde substrat olarak 7-etoksirezorufin, 7-metoksirezorufin, 7-pentoksirezorufin ve 7-benziloksirezorufin kullanılmıştır. Tablo 2.2’de verildiği üzere tipik reaksiyon ortamı 1mL son hacimde 100mM potasyum fosfat tamponu (pH:7,80); 100mM NaCl; 1,2mg BSA; 100µg mikrozomal protein; 1,5 µM substrat ve 0,1mM NADPH içermektedir.

Her bir substrat (7-etoksirezorufin, 7-metoksirezorufin, 7-pentoksirezorufin ve 7-benziloksirezorufin) için enzim aktiviteleri sırasıyla; etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), pentoksirezorufin O-depentilaz (PROD), metoksirezorufin O-demetilaz (MROD) ve benziloksirezorufin O-debenzilaz (BROD) olarak isimlendirilmektedir.

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.3’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 mL reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Gary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre’de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans’taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

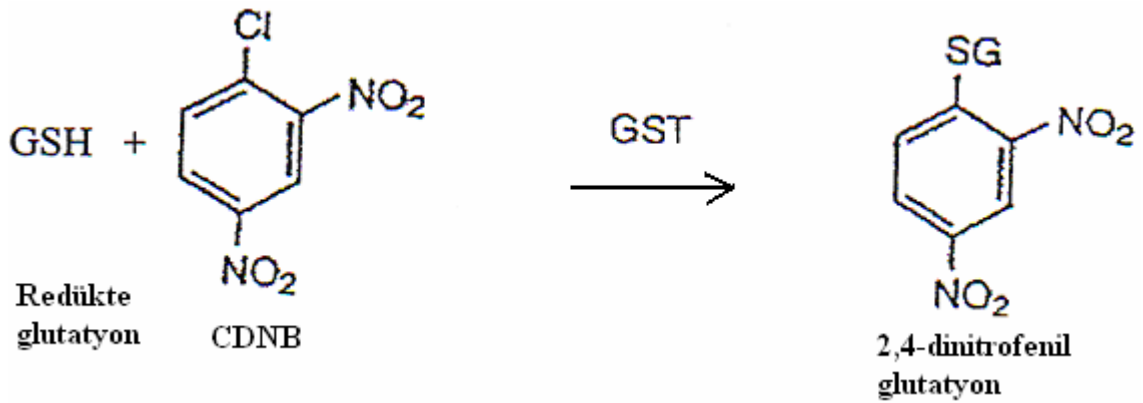
Tablo 2.3 AROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok Solüsyonlar	Eklenen hacim (mL)	Son konsantrasyon
400 mM KPi tamponu pH7,8	0,25	100 mM
1 M NaCl	0,10	100 mM
12 mg/ml BSA	0,10	1,2 mg
Mikrozomal protein 1 mg/mL	0,10	100 µg
<u>Substrat</u>	0,15	
10 µm 7-Etoksirezorufin		1,5 µM
1,5 mM 7-metoksirezorufin		0,225 µM

1,5 mM 7-pentiloksirezorufin		0,225 μ M
1,5 mM 7-benziloksirezorufin		0,225 μ M
NADPH Üretim sistemi	0,15	0,50 mM
Ultra saf su (USS)	1,0 mL'ye tamamla	
Toplam hacim	1,0 mL	

2.2.3.4 Sitolik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini

2.2.3.4. 1 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesi



Şekil 2.7 GST-CDNB enzimatik reaksiyonu

Hazırlanan çipura sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak Habig vd, (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Şen ve Kırıkbakan'ın optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edildi. Habig metodu, GST tarafından CDNB ile GSH konjugasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutasyon kompleksinin ışığı 340 nm'de absorpsiyonuna dayanmaktadır.

Tablo 2.4'deki gibi tipik reaksiyon ortamı son 1 mL hacimde 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,50); 1 mM redükte glutasyon (GSH); 25 μ g sitozolik protein ve 1 mM CDNB içermektedir.

Tablo 2.4 Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok çözeltiler	Eklenen hacim (mL)	Son konsantrasyon
400 mM KPi tamponu pH 7,5	0,250	100 mM
50 mM GSH	0,020	1 mM
20 mM CDNB	0,050	1 mM
Sitozolik protein	0,050	50 µg
Ultra saf su (USS)	0,630	-
Toplam	1	-

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.4’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 mL reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son CDNB ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn’lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Shimadzu UV-1600A Spektrofotometre de 340 nm’de 1 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

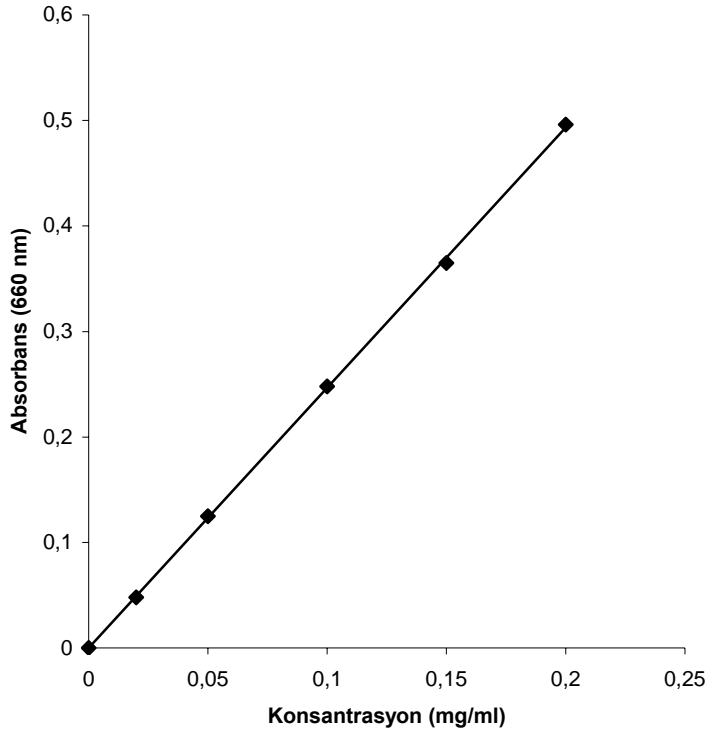
2.3. İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her biri veri noktası için Oratalama \pm Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için One Way Anova, Tukey ve Dunnet testleri uygulandı.

3. BULGULAR

3.1 Çipura (*Sparus aurata*) Balığı Çeşitli Dokuların Protein Miktarları

Postmitokondriyal, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı (Şekil 3.1). Her bir nokta iki ölçümün ortalamasıdır.



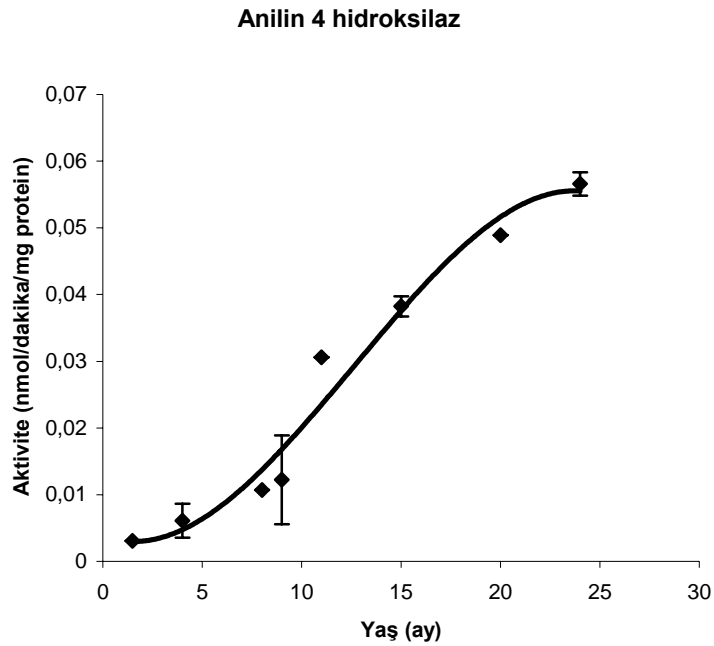
Şekil 3.1 Protein miktarı tayini için örnek BSA kalibrasyon eğrisi

3.2 Çipura (*Sparus aurata*) Balığı Karaciğer Mikrozomal MO Aktiviteleri

3.2.1 Anilin 4-Hidroksilaz Aktivite Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark., (1966) tarafından önerilen metoda göre 630 nm'de spektrofotometrik olarak, p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Yapılan çalışmada çipura balığının 0-24 aylık gelişim evrelerindeki anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.2'de verilmiştir ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Anilin 4-hidroksilaz aktivitelerinin çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında yaşa bağlı olarak değişimi

Tablo 3.1 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri

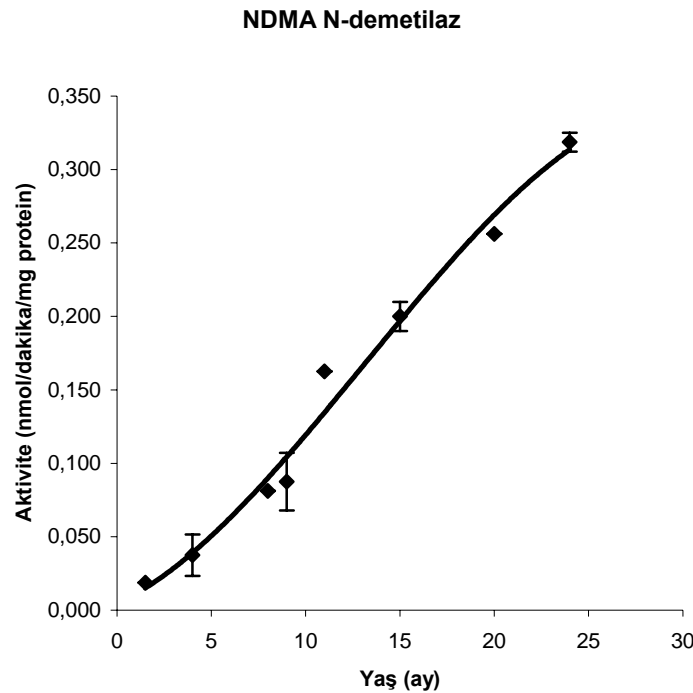
Yaş (ay)	Balık Sayısı	Anilin 4-hidroksilaz Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	0,003; 0,003; 0; 0,003	0,002 ± 0,001
4	75	0,006; 0,006; 0,006; 0,009; 0,006; 0,006; 0,006; 0,006; 0,009; 0,006; 0,006	0,007 ± 0,001
8	52	0,009; 0,012; 0,009; 0,009; 0,009; 0,012	0,010 ± 0,002
9	48	0,012; 0,015; 0,015; 0,012; 0,012; 0,018; 0,012; 0,015; 0,018; 0,012	0,014 ± 0,002
11	45	0,030; 0,027; 0,030; 0,030; 0,030; 0,027; 0,030; 0,034; 0,030; 0,030;	0,03 ± 0,002

		0,030; 0,030; 0,027; 0,027; 0,031; 0,030; 0,027; 0,027	
15	36	0,040; 0,037; 0,040; 0,040; 0,040; 0,037; 0,040; 0,037; 0,037; 0,040; 0,040; 0,037; 0,037; 0,040; 0,037; 0,040	0,039 ± 0,002
20	35	0,049; 0,049; 0,036; 0,036; 0,030; 0,033; 0,049; 0,036; 0,036; 0,049	0,044 ± 0,006
24	25	0,055; 0,058; 0,061; 0,055; 0,058; 0,061; 0,055; 0,058	0,058 ± 0,002

3.2.2 N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz Aktivite Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm’de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında incelenen N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz aktivitesinin farklı gelişim evrelerine bağlı olarak değişimi araştırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Tablo 3.2’de sunulmuştur ve Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz aktivitelerinin çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında yaşa bağlı olarak değişimi

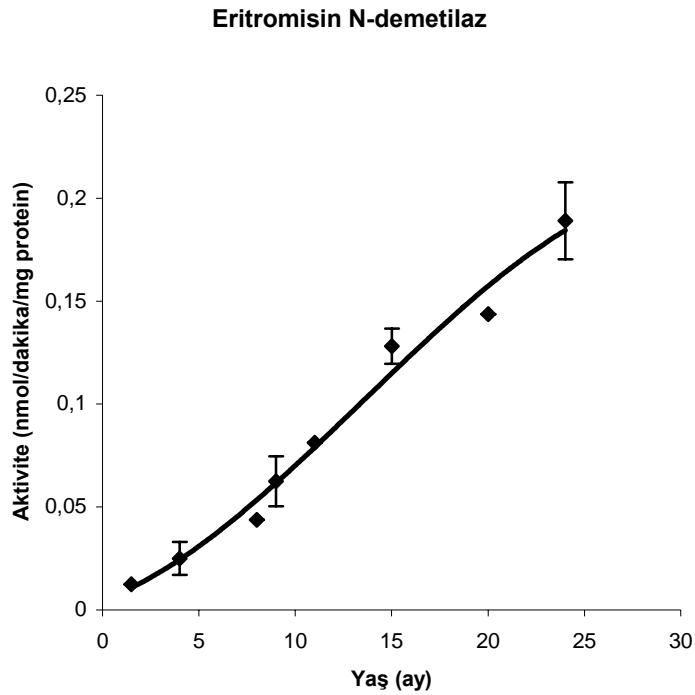
Tablo 3.2 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında NDMA-ND aktiviteleri

Yaş (ay)	Balık Sayısı	N-Nitrosodimetilamin N- Demetilaz Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	0,025; 0,012; 0,025; 0,012	0,019 ± 0,007
4	75	0,038; 0,050; 0,050; 0,038; 0,038; 0,050; 0,050; 0,038; 0,025; 0,050; 0,050; 0,038	0,043 ± 0,008
8	52	0,075; 0,088; 0,075; 0,075; 0,075; 0,088	0,079 ± 0,006
9	48	0,088; 0,100; 0,075; 0,100; 0,100; 0,100; 0,075; 0,100; 0,088; 0,088	0,091 ± 0,008
11	45	0,162; 0,150; 0,150; 0,150; 0,150; 0,162; 0,162; 0,162; 0,150; 0,162; 0,150; 0,150; 0,150; 0,162; 0,150; 0,150; 0,162; 0,162	0,156 ± 0,006
15	36	0,188; 0,188; 0,200; 0,200; 0,188; 0,188; 0,188; 0,200; 0,188; 0,212; 0,200; 0,188; 0,212; 0,200; 0,188; 0,212	0,196 ± 0,01
20	35	0,238; 0,238; 0,212; 0,225; 0,262; 0,268; 0,262; 0,238; 0,225; 0,275	0,241 ± 0,02
24	25	0,300; 0,325; 0,338; 0,312; 0,325; 0,338; 0,312; 0,338	0,323 ± 0,014

3.2.3 Eritromisin N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki Eritromisin N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm'de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tayin edildi.

Bu çalışmada çipura (*Sparus aurata*) balığının farklı yaşlardaki Eritromisin N-Demetilaz aktiviteleri incelendi. Sonuçlar Tablo 3.3'de verilmiş olup Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozoamlarında Eritromisin N-Demetilaz aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi

Tablo 3.3 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozoamlarında eritromisin N-demetilaz aktiviteleri

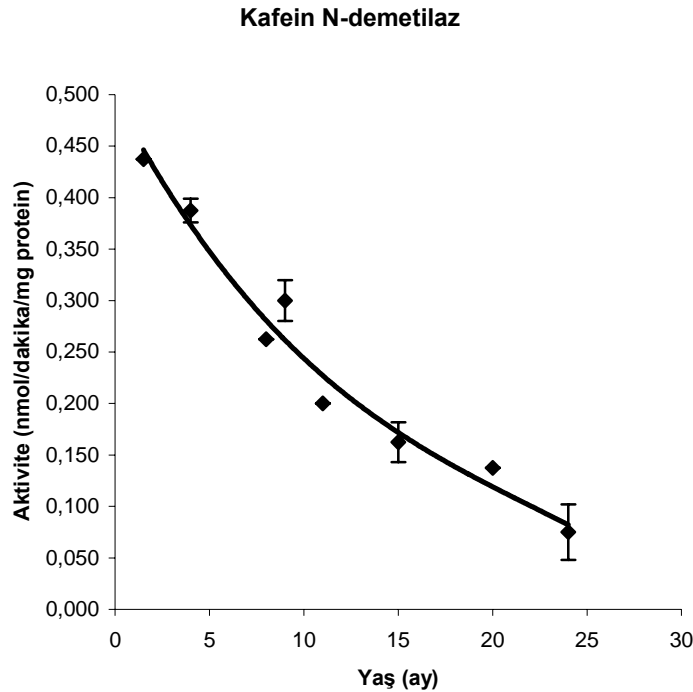
Yaş (ay)	Balık Sayısı	Eritromisin N- Demetilaz Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama Standart Sapma (SS) ±
1,5	35	0,012; 0; 0,012; 0,012	0,009 ± 0,006
4	75	0,025; 0,025; 0,025; 0,038; 0,025; 0,025; 0,038; 0,063; 0,025; 0,025; 0,025; 0,025	0,030 ± 0,010
8	52	0,050; 0,038; 0,063; 0,050; 0,050; 0,038	0,048 ± 0,010
9	48	0,062; 0,050; 0,062; 0,050; 0,062; 0,050; 0,050; 0,062; 0,050; 0,062	0,056 ± 0,006
11	45	0,062; 0,100; 0,138; 0,125; 0,112; 0,087 0,062; 0,112; 0,100; 0,112; 0,100; 0,100; 0,088; 0,088; 0,100; 0,100; 0,088; 0,100	0,099 ± 0,018

15	36	0,125; 0,138; 0,125; 0,112; 0,138; 0,125; 0,112; 0,138; 0,138; 0,125; 0,125; 0,125; 0,125; 0,138; 0,125; 0,138	0,128 ± 0,008
20	35	0,150; 0,150; 0,150; 0,112; 0,150; 0,150; 0,138; 0,138; 0,150; 0,150	0,144 ± 0,012
24	25	0,188; 0,175; 0,188; 0,188; 0,200; 0,188; 0,200; 0,188	0,189 ± 0,008

3.2.4 Kafein N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki Kafein N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre formaldehit miktarının 412 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edildi.

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında incelenen Kafein N-Demetilaz aktivitesinin 0-24 aylık gelişim evrelerine bağlı olarak değişimi araştırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Tablo 3.4’de sunulmuştur ve Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında Kafein N-Demetilaz aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi

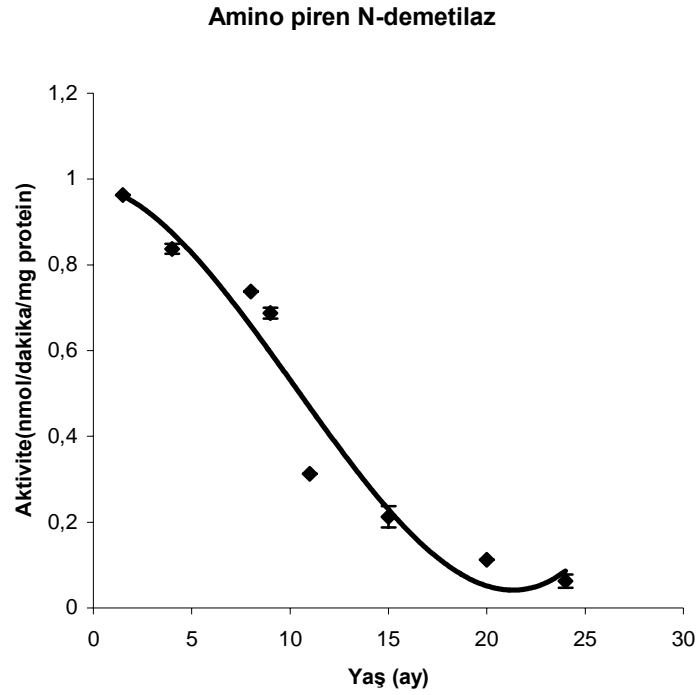
Tablo 3.4 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktiviteleri

Yaş (ay)	Balık Sayısı	Kafein N- Demetilaz Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	0,450; 0,450; 0,425; 0,425	0,438 ± 0,014
4	75	0,375; 0,400; 0,400; 0,400; 0,350; 0,350; 0,375; 0,350; 0,400; 0,375; 0,400; 0,350	0,383 ± 0,025
8	52	0,275; 0,250; 0,250; 0,275; 0,250; 0,250	0,258 ± 0,013
9	48	0,300; 0,275; 0,300; 0,275; 0,300; 0,225; 0,300; 0,275; 0,275; 0,300	0,292 ± 0,017
11	45	0,175; 0,200; 0,175; 0,175; 0,150; 0,200; 0,250; 0,250; 0,175; 0,175; 0,200; 0,200; 0,175; 0,200; 0,225	0,193 ± 0,027
15	36	0,150; 0,150; 0,125; 0,175; 0,100; 0,150; 0,175; 0,150; 0,150; 0,150; 0,150; 0,175; 0,150; 0,150; 0,150; 0,175	0,152± 0,020
20	35	0,125; 0,125; 0,150; 0,175; 0,150; 0,125; 0,125; 0,175; 0,150; 0,150	0,145 ± 0,019
24	25	0,075; 0,075; 0,050; 0,075; 0,075; 0,050; 0,075; 0,075	0,069 ± 0,012

3.2.5 Amino piren N-demetilaz Aktivitesinin Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki 4-Dimetilamino antipiren N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm’de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tayin edildi.

Bu çalışmada çipura (*Sparus aurata*) balığının farklı gelişim gruplarındaki, amino piren N-demetilaz aktiviteleri incelendi. Sonuçlar Tablo 3.5’de verilmiş ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.6 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında Aminopiren N-Demetilaz aktivitesinin yaşa bağlı olarak değişimi

Tablo 3.5 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında aminopiren N-Demetilaz aktivitelemi

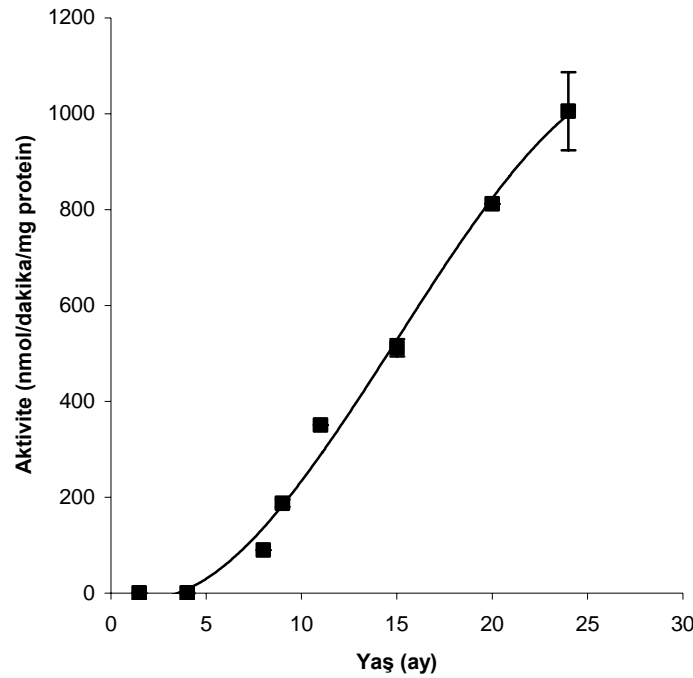
Yaş (ay)	Balık Sayısı	Aminopiren N- Demetilaz Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	0,950; 0,925; 0,925; 0,975	0,944 ± 0,024
4	75	0,825; 0,875; 0,875; 0,875; 0,825; 0,875; 0,825; 0,850; 0,875; 0,875; 0,875; 0,850	0,852 ± 0,027
8	52	0,750; 0,725; 0,725; 0,750; 0,725; 0,725	0,733 ± 0,013
9	48	0,700; 0,675; 0,675; 0,600; 0,675; 0,675; 0,675; 0,650; 0,675	0,668 ± 0,026
11	45	0,325; 0,325; 0,300; 0,275; 0,325;	0,311 ± 0,015

		0,300; 0,300; 0,325 0,325; 0,300; 0,325; 0,300; 0,325; 0,300; 0,300; 0325; 0,325; 0,300	
15	36	0,225; 0,200; 0,175; 0,225; 0,200; 0,175; 0,200; 0,225; 0,150; 0,225; 0,175; 0,225; 0,175; 0,225; 0,175; 0,200	0,198 ± 0,025
20	35	0,100; 0,100; 0,125; 0,125; 0,100; 0,125; 0,100; 0,125; 0,100; 0,125	0,115 ± 0,013
24	25	0,050; 0,075; 0,050; 0,050; 0,050; 0,050; 0,050; 0,075	0,056 ± 0,011

3.2.6 Etoksirezorufin O-Deetilaz (EROD) Aktivitesinin Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomal Etoksirezorufin O-Deetilaz aktivitesi florometrik olarak Burke ve Mayer (1974) metodu kullanılarak tespit edildi.

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında incelenen EROD aktivitesinin 0-24 aylık gelişim periyotlarına bağlı olarak değişimi araştırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Tablo 3.6'de sunulmuştur ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında EROD aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi

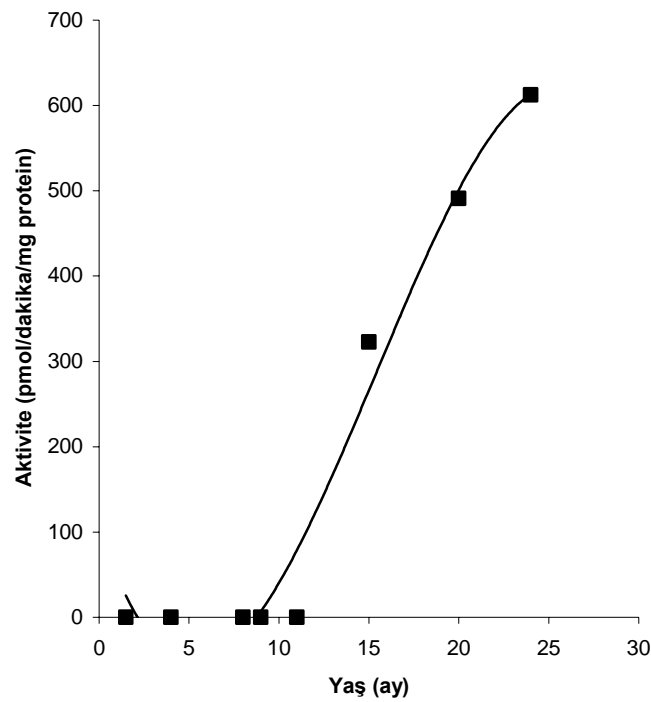
Tablo 3.6 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarındaki EROD aktiviteleri

Yaş (ay)	Balık Sayısı	EROD Aktivitesi (pmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	Gözlenmedi	-
4	75	Gözlenmedi	-
8	52	Gözlenmedi	-
9	48	89,61; 88,74; 89,13; 86,84; 87,47; 88,58; 89,61; 90,08; 87,16; 89,05	88,63 ± 1,1
11	45	273,8; 286,5; 272,6; 288; 272,2; 274,9; 288,2; 272,9; 289,3; 273,6; 287,4; 274,5; 273,6; 275,1; 286,7; 288,9; 289,1; 287,4	280,8 ± 7,4
15	36	421,6; 445,6; 399,5; 401,2; 416,8; 421,5; 404,4; 411,0; 450,2; 448,2; 439,6; 427,9; 403,6; 398,9; 426,2; 431,0; 447,0; 435,9	423,9 ± 18,0
20	35	631,1; 630,6; 635,3; 628,8; 822,1; 637,3; 821,7; 628,7; 619,5; 619,3	667,4 ± 81,6
24	25	989,3; 979,9; 1009,2; 1003,6; 996,6; 1001,0; 1013,4; 1021,1; 986,5; 983,4	998,4 ± 13,7

3.2.7 Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) Aktivitesinin Tayini

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarındaki Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) aktivitesi florometrik olarak Burke ve Mayer (1974) metodu kullanılarak tespit edildi.

Çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında incelenen PROD aktivitesinin yaşa bağlı olarak değişimi araştırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Tablo 3.7’de sunulmuş ve Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında PROD aktivitelerinin yaşa bağlı olarak değişimi

Tablo 3.7 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarındaki PROD aktiviteleri

Yaş (ay)	Balık Sayısı	PROD Aktivitesi (pmol/dakika/mg protein)	Ortalama ± Standart Sapma (SS)
1,5	35	Gözlenmedi	-
4	75	Gözlenmedi	-
8	52	Gözlenmedi	-
9	48	Gözlenmedi	-
11	45	Gözlenmedi	-
15	36	274,8; 286,5; 273,6; 288,0; 273,2; 275,9; 287,3; 275,6; 276,4; 275,5; 274,6; 275,1; 285,6; 287,8	285,6 ± 20,9
20	35	319,9; 319,9; 342,8; 320,3; 411,2; 411,2; 357,8; 357,8; 357,9; 302,3	350,1 ± 37,6
24	25	623,5; 629,6; 599,8; 609,4; 631,5; 627,0; 587,9; 601,1; 624,2; 619,9	613,7 ± 16,4

Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) aktivitesi, farklı yaşlardaki çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında ölçülmüş ve Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) aktivitesinin 0-24 aylık gelişim periyotlarında artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.7).

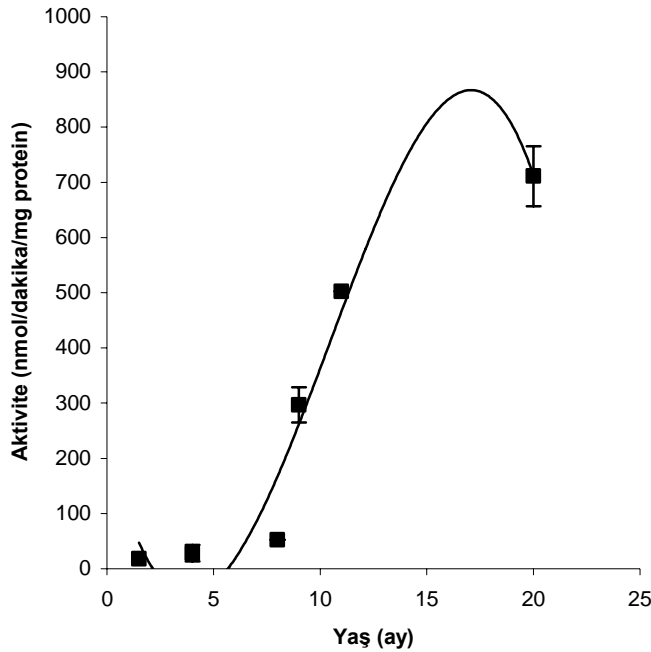
Benziloksiresorufin O-debenzilaz (BROD) aktiviteleri de ölçüldü fakat örneklerde bu enzimlerin aktiviteleri gözlenemedi. 24 ve 20 aylık çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarında, metoksiresorufin O-demetilaz (MROD) aktiviteleri gözlemlendi.

3.3 Çipura (*Sparus aurata*) Balığı Karaciğer Sitolik MO Aktiviteleri

3.3.1 GST-CDNB Aktivite Tayini

Glutasyon S-Transferazlar çipura balığı karaciğer sitozollerinde 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivite optimum şartlar tespit edildi. GST aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de Habig ve ark., (1974a) tarafından önerilen metoda göre CDNB substratı kullanılarak tayin edildi.

Bu çalışmada çipura balığının farklı yaşlardaki GST aktiviteyi incelendi. Sonuçlar Tablo 3.8’de verilmiş ve Şekil 3.9’da gösterilmiştir. GST izozimleri pirimer olarak sitozolik olmalarından dolayı GST aktiviteyi sitoplazmada tespit edildi.



Şekil 3.9 GST-CDNB aktiviteyiinin çipura (*Sparus aurata*) karaciğer sitozollerinde yaşa bağlı olarak değişimi

Tablo 3.8 Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer sitozollerindeki GST-CDNB aktiviteyi

Yaş (ay)	Balık Sayısı	GST Aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)	Ortalama Standart Sapma (SS)
1,5	35	17,92; 17,5; 17,08; 18,33	17,71 ± 0,54
4	75	29,38; 27,08; 25,62; 25,41; 27,29; 25,62; 23,96; 25; 29,37; 27,29; 28,96; 26,67	26,81 ± 1,77
8	52	36,25; 36,04; 38,75; 42,71; 43,75; 46,67	40,69 ± 4,34
9	48	318,3; 319,2; 300,2; 275,4; 259,2; 262,3; 320,4; 321,2; 300,2; 275,4	295,2 ± 25,0
11	45	571,2; 571,7; 510,2; 516,2; 573,3; 573,7; 525; 518,3; 450,2; 492,9; 563,1; 522,9; 565,2; 525; 432,1; 430,8; 434,2; 432,9	511,6 ± 54,3
20	35	728,5; 703,5; 626,4; 645,2; 699,2; 715,2; 699,2; 715,2; 682,1; 694,2	690,9 ± 32,0

4. TARTIŞMA

Vücudumuza alınan ilaçları metabolize eden enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, fizyopatolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi bir çok faktör rol oynar. Özellikle ilaçların ve diğer kimyasalların etkileri yaşa bağlı olarak araştırılmaktadır. Çeşitli sitokrom P450 izozimlerinin ekspres edilmesi, sıçanlarda ve insanlarda yaşlanma ile azalmaktadır. Farklı yaşlardaki maymunlarla yapılan bir çalışmada, toplam sitokrom P450 içeriğinin yaşlanma ile azaldığı gözlemlenmiştir (Akahori vd 2005). Bu değişimlerin temel mekanizmaları genel olarak saptanamamış olmasına rağmen birçoklarının in vivo metabolizmalarının yaş ile değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Monshouwer ve Witkamp 2000, Akahori vd 2005).

Genç bireylerden yaşlı bireylere kadar, ilaçların absorpsiyon oranı, plazma proteinlerine bağlanma dağılımı ve biyotransformasyonları özellikle insanlarda araştırılmıştır (Nebbia 2001, Nebbia 2003, James vd 2005). Metabolik yollarda rol oynayan bir çok enzim insanlarda yaşa bağlı olarak incelenmiş olup, bir çok türde de araştırılmıştır (sıçan, köpek, koyun, domuz, keçi ve tavuk) (Kaddouri vd 1990, Kawalek ve El Said 1990b, Kawalek ve El Said 1994, Coulet vd 1996).

Her ne kadar insan ve (zirai) veterinerlik açısından önemli olan koyun (Kaddouri vd 1990, Kawalek ve El Said 1990b), sığır (Kawalek ve El Said 1994), tavuk (Coulet vd 1996) vb. gibi türler üzerinde yaş ile ilaçları metabolize eden enzimlerin değişimi üzerine çalışmalar bulunsa da özellikle balıklar üzerinde bu alanda çok kısıtlı bilgi mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmada çipura (*Sparus aurata*) balığında ilaçları metabolize eden enzimlerin yaş ile değişimleri araştırılmıştır.

Günümüzde bilinen 21.000 farklı balık türü bulunmakta ve bu balıklar çok farklı ortamlarda yaşayabilmektedirler. Buna bağlı olarakta, çevreyi ilgilendirmesinden dolayı balık monooksijenaz sistemine olan ilgi artmaktadır. Sitokrom P450 formları arasında sitokrom P4501A1 karsinogenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolize edilmesinde önem arz etmektedirler.

İzmir'deki gıda, içecek, deri, bitki yağı, sabun, kimya, metal, plastik, boya ve tekstil endüstrilerinin atıkları nedeni ile körfez sularının ağır metalleri, poliklorlu bifenil ve türevlerini, poliaromatik hidrokarbonları, klorlu benzofuranları ve dioksin gibi dayanıklı organik kimyasalları içerdiği muhakkaktır. Suda doğal olarak parçalanmayan bu bileşikler balıklarda ve insanlarda birikmekte ve çeşitli toksik etkilerinin yanı sıra karsinogenik ve mutajenik etki yapmaktadırlar (Arınç vd 2002). Organizmalar için bu bileşiklerin en önemli sorunu vücutta çeşitli toksisiteler oluşturmasıdır. Bu tür bileşiklerin vücuttan uzaklaştırılmaları için çözünür hale getirilmeleri ve organizma dışına atılmaları gereklidir. Sitokrom P450 (CYP) süper enzim ailesi hem ekzojen ksenobiyotiklerin ve hem de yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzim grubudur. Bu bileşikleri metabolize eden sitokrom P450 enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, fizyopatolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi bir çok faktör rol oynar. Özellikle ilaçların ve diğer kimyasalların etkileri yaşa bağlı olarak çalışılmıştır (Nebbia 2001, Nebbia 2003).

Bu çalışmada hermofrodit çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer dokusunda ilaçları metabolize eden sitokrom P450 enzim gruplarının aktivitelerindeki değişim bu balığın değişik gelişim evrelerinde araştırıldı. Bu amaçla farklı yaş sınıflarındaki çipura (*Sparus aurata*) balıkları, İzmir; Çeşme, Ildırı köyündeki Pınar Balık üretim tesisinden sağlandı. Yapılan ölçümler sonucunda; çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında EROD aktivitelerinde, yaş artışıyla paralel olarak bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 3.6 ve 3.7). EROD aktivitesi; 24, 20, 15, 11 ve 9 aylık çipura (*Sparus aurata*) balıklarında yaşa bağlı olarak değişiklik gösterirken, 8, 4 ve 1,5 aylık balıklarda EROD aktivitesi gözlenmemiştir. 9, 11, 15, 20, 24 aylık çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozomlarında EROD aktivitesi sırasıyla birbirine göre; 3,2 / 1,5 / 1,6 / 1,5 kat artış göstermiştir. Yapılan ölçümler sonucunda, EROD aktivitesinde yaş artışı ile artışın gözlenmesi, balıkların zamanla vücutlarına aldıkları çeşitli kirleticilerden kaynaklanış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak daha önce bu alanda

yapılan kirlilik çalışmalarında bu bölgenin organik kirlilik açısından temiz olduğu görüldü. Bu artışın genel nedeninin balıkların beslenmesinde kullanılan yem ve küçük yaşlardaki hasta balıklara verilen ilaç türlerinden kaynaklanmış olabilir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, balık sitokrom P450'leri memeli sitokrom P450'leri ile ortak özellikler taşımaktadırlar (Goksoyr ve Förlin 1992, Andersson ve Förlin 1992, Stegeman 1995, Buhler 1995, Şen ve Arınç 1998). Bu güne kadar en iyi karakterize edilmiş ve kullanılan biyokimyasal markör sitokrom P4501A bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazlar veya monooksijenazların indüksiyonudur. PCB, PAH, PCDD ve PCDF gibi organik kontaminatlar balık karaciğerinde CYP1A'yı indüklerler (Gelboin 1980, Conney 1982, Kleinow vd 1987, Stegeman ve Lech 1991, Bucheli ve Fent 1995). CYP1A indüksiyonu daha sonra ki zamanlarda oluşacak önemli patolojik durumlar için erken uyarı sinyali olarak görev yapmaktadır (Payne vd 1987).

P4501A1, çeşitli organik kimyasalların oksidasyonunu katalizleyerek onları daha hidrofilik veya Faz II enzimleri tarafından ileri konjügasyonlara uğratılabilecek formlara dönüştürüp vücuttan atılımını sağlayan sitokrom P450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazların alt ailesidir. Sitokrom P450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazlar ayrıca yabancı kimyasalların reaktif ara ürünlere aktivasyonundan da sorumludur. Özellikle P4501A1 izozimi, PCB, PAH ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini katalize eder. PAH'ların bir üyesi olan, petrol ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda bulunan benzo(a) piren, mutajenik ve karsinojenik forma CYP1A1 tarafından katalize edilerek dönüşür (Conney ve Burns 1972, Heidelberger 1973).

Balıklarda PAH'lar, PCB'ler, dibenzodioksinler ve dibenzofuranlara karşılık Sitokrom P4501A1'nin indüksiyonu ve ilgili enzim aktiviteleri, bu alanda yapılmış çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Payne vd 1987, Haasch vd 1989, Goksoyr ve Förlin 1992, Stegeman 1995, Addison 1996, Buhler vd 1998, Arınç ve Şen 1999, Arınç vd 2000, Arınç vd 2001, Van der Oost vd 2003). Yapılan çalışmalarında genel amaç, şüphelenilen bölgelerden toplanan balıklardaki CYP1A1 ilgili enzim aktivitelerinin referans bölgesinden alınan balıklardaki aktiviteler ile karşılaştırılmasıdır. İlk arazi çalışmaların çoğunda belirteç için karaciğer B(a)P hidroksilaz aktivitesinin indüksiyonu kullanılmıştır.

Günümüzde ise CYP1A1 ilgili enzim aktiviteleri 7-etoksirezorufin substratı kullanılarak yapılmaktadır. 7-etoksirezorufin 0-Deetilaz (EROD) aktivitesinin ölçümü oldukça hassastır ve balıklarda CYP1A1'nin indüksiyonunu tespit etmek için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. İzmir körfezi Akdeniz'in en kirli bölgelerinde biridir. Endüstriyel ve evsel atıklar, zirai bölgelerden gelen tarımsal mücadele ilaçları, doğal ve sentetik gübreler, taban sedimentlerinden ve atmosferden körfez yüzeyine yayılan kimyasallar bilhassa İzmir iç körfezindeki kirliliği artırmıştır. Körfezde, kefal ve dil balıklarında CYP1A1 indüksiyonunun ölçülmesi ile ilgili çalışmalar 1995'den beri yapılmaktadır (Arınç ve Şen 1999, Arınç vd 2000, Arınç vd 2001). Bu çalışmalar körfezin PAH, PCB ve diğer dirençli prekarsinojen/karsinojen kimyasallar ile oldukça kontamine olduğunu göstermiştir. Canlı organizmalarda biriken kirleticiler, moleküler ve hücre seviyesinde etkilerini gösterirler. Daha sonra, organizmalarda çeşitli olumsuzluklara sebep olarak, ileriki yıllarda da populasyon ve komünite seviyesinde önemli değişikliklere neden olurlar (Arınç vd 2002).

Sitokrom P450 1 ailesi enzimleri (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1) , poliaromatik hidrokarbonları, poliklorlanmış bifenilleri ve arilaminleri içeren çevresel kontaminantların hidrolize edilmesinde önemli role sahiptirler. Leaver ve George'nin 2000 yılında yapmış oldukları bir çalışmada CYP1 gen ailesi marine flat (*Pleuronectes platessa*) balığından izole edilmiştir. CYP1 izoformlarının aminoasit sekans analizleri bunların birbirlerine benzer özelliklerde olduklarını göstermiştir. Elde edilen veriler neticesinde, CYP1B proteininin, memelilerdeki CYP1B1 proteini ile % 54 aynı yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. CYP1 ailesi ile yapılan bu çalışma göstermiştir ki CYP1A'nın dokularda PAH-bağımlı indüksiyonunun artmasının yanında CYP1B beta naftoflavonun ve PAH gibi diğer uyarıcılar ile de artış göstermektedir (Leaver ve George 2000).

Elde edilen verilere bakıldığında, EROD aktivitesinin gözlenmesine karşın MROD aktivitesi sadece 24 ve 20 aylık çipura (*Sparus aurata*) karaciğer miktozomlarında gözlemlendi.

EROD aktivitesi ile karşılaştırıldığında, MROD aktivitesinin aynı yaşlardaki balıklarda tespit edilememiş olması, bu iki aktivitenin farklı izozimlece katalizleniyor olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu tezin tespiti için daha ileri düzeyde, gen ve protein düzeyinde çalışmalar gerektirmektedir.

PROD aktivitelerinde, yaş artışıyla paralel olarak bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 3.7). PROD aktivitesi; 24, 20 ve 15 aylık balıkların karaciğer mikrozoamlarında, gelişim periyotları ile ilişkili olarak değişiklik arz ederken, 11, 9, 8, 4 ve 1,5 aylık balıkların karaciğer mikrozoamlarında PROD aktivitesi tespit edilmemiştir. 15, 20, 24 aylık çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer mikrozoamlarında PROD aktiviteleri sırasıyla birbirine göre; 1,2 / 1,8 kat artış göstermiştir ve artış düzenlidir. Eğer 24 ay üstü yaşlardaki balıklarda da PROD aktivitesine bakılmış olsa idi muhtemelen artış devam edecekti. Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozoamlarında PROD aktivitesinin gözlenmesine karşın BROD aktivitesinin gözlenmemiştir.

PROD aktivitesi balıklarda, CYP2B ve benzeri izozimlerce katalizlendiği bilinmektedir (Font vd 1998). Bu P450 izoformları testesteron metabolizmasında (15 α hidroksilasyonu vb) rol aldığı düşünüldüğünde, PROD aktivitesinin genç ve ergin olmayan bireylerde gözlenmemesi ve erginleşmeye başlamış balıklarda gözlenmesi normaldir. Çünkü bu balıklarda testesteron düzeyi ancak yeni yeni belirli düzeylere ulaşmaya başlamıştır. Eğer bu çalışmada daha yaşlı (36 aylık gibi) balıklarda da bu aktivite tayini yapılabilmiş olsa idi, muhtemelen PROD aktivitesinin daha da artmış olması gözlenecekti.

Her ne kadar Anklay vd 1987, 3-MC ile muamele edilmiş “channel catfish (*Ictalurus punctatus*)” balıklarında BROD ve MROD aktivitelerinde artış olduğu bulunabilmiş olmasına rağmen benzer sonuçlar başka çalışmalar ile tekrarlanmamış ve literatürde rapor edilmemiştir. Ayrıca bir çok balıkta BROD aktivitesi ölçülemedi ya da ölçülemeyecek kadar düşük bildirilmiştir. Bu nedenle balıklardaki PROD ve BROD aktivitelerinin, memelilerde katalizleyen CYP2B izoformlarınca katalizlendiği veya farklı formlarla katalizlendiği tam net değildir. Bu aktiviteler memelilerde PB ile indüklenmelerine rağmen balıklarda bu etki gözlenmemiştir (Addison vd 1987, Tatarazako vd 2002). Bu nedenle bizim bu çalışmamızda da BROD aktivitesi gözlenmediğimiz literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Glutasyon S-transferazlar bir çok elektrofilik madde ile glutasyon konjügasyonunu katalize eden çok fonksiyonlu izozimler ailesidir. GST'ler karsinojen metabolizmasında da rol oynarlar. Çeşitli dokularda GST'lerin bir çok izozimleri tanımlanmıştır (Noda vd 2000, Prapanthadara vd 2000). Detoksifikasyon metabolizmasında yer alan, Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), yaşlanma ve kimyasal stres ile değişim gösterirler

(Tchaikovkaya vd 2005). Morgado ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 70 günlük ve 18 aylık sıçan karaciğerlerinde GST aktivitesinin değişimi ölçülmüştür. Analiz sonucunda yaşlı (18 aylık) sıçan karaciğerlerindeki GST aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. (Morgado vd 2003). White-Footed (*Peromyscus leucopus*) dişi ve erkek micelerde da GST aktivitesinin yaşla değişimi incelenmiş ve yaş artışı ile GST aktivitesinin azaldığı bulunmuştur (Guo vd 1993).

Bu çalışmada; farklı yaş gruplarındaki (20, 11, 9, 8, 4 ve 1,5 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer sitozollerinde GST-CDNB aktiviteleri tayin edildi (Tablo 3.9). Yapılan ölçümler sonucunda; çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer sitozollerindeki GST-CDNB aktivitelerinde, yaş artışıyla paralel olarak bir artış gözlemlenmiştir. 1,5, 4, 8, 9, 11, 20 aylık çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer sitozollerinde GST-CDNB aktiviteleri sırasıyla birbirine göre; 1,5 / 1,5 / 7 / 1,7 / 1,3 kat artış gösterdiği belirlenmiş olup en yüksek aktivite artışı 9 aylık çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer sitozollerinde gözlemlenmiştir. Faz II enzimlerinden olan GST-CDNB aktivitelerinin farklı yaş gruplarında ölçülmesi sonucunda yaş artışı ile bu enzimin aktivitesinde artışın olduğu bulunması, Faz I enzimi olan EROD aktivitesi ile bağlantılı olarak, bu enziminde aktivitesinin yaş artışı ile artması, EROD aktivitelerindeki artışı doğrulamaktadır. Farklı bir tür olan sıçanlarda da, farklı yaşlardaki GST aktivitesi ölçülmüş, yaşlı sıçanda GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan çipura (*Sparus aurata*) balığı ile benzer şekilde yaş artışı ile vücuda alınmış yabancı maddelerin metabolizmasının hızlandığı görülmüştür. Bu durum insanlarda bu şekilde değildir.

İnsanlarda vücuda alınan ksenobiyotiklerin metabolize edilme hızları zamanla azalmakta, bununla bağlantılı olarak vücutta oluşan serbest radikal ve istenmeyen reaktif ürünlerin oluşumu artmaktadır. Benzer şekilde dişi atlarla yapılan bir çalışmada da GST aktivitesi yaş artışı ile azalmıştır. GST enzimleri farklı türlerde, farklı düzeylerde ekspres edilmektedir. Ayrıca yaş, hormonal gibi endojen veya çevresel (inhibitörler) faktörler aktivitelerdeki değişime neden olmuş olabilir. Bu çalışmada da yaş faktörünün etkisi incelenmiş ve farklı gelişim evrelerinde, yaş artışı ile GST-CDNB aktivitesinin artış gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda farklı gelişim periyodundaki (1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıklarında anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri ölçülmüş ve bu yaş

grubundaki balıklardaki aktivite değerlerinin sırasıyla birbirine göre; 3,5 / 1,43 / 1,40 / 2,1 / 1,3 / 1,13 / 1,32 kat artış gösterdiği bulunmuştur. Aktivitedeki artışın en çok olduğu periyot 1,5-4 aylık gelişim evresinde görülmüştür. Genel olarak anilin 4-hidroksilaz'ın, 1,5 aylık balıklardaki aktivitesi $0,002 \pm 0,001$ nmol/dakika/mg protein iken 24 aylık balıklardaki aktivitesi $0,058 \pm 0,002$ nmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar yaş artışı ile, anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin yaklaşık 29 kat arttığını göstermektedir. Bu artışa balık beslenmesinde kullanılan azot içeren yem ve ilaçların yanı sıra Pınar LTD.'nin diğer birimlerindeki bazı yağ ağırlıklı atıkların besin olarak kullanılmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürdü. Vücuda alınan azotlu gıda maddelerinin metabolize edilmesi sırasında muhtemelen P450LM3a geninin indüksiyonu artmaktadır. Bu genin indüksiyonunun artması, vücuda alınan çeşitli besin maddelerinin hidroksile edilerek polaritelerinin artırılmasını içermektedir.

NDMD N-demetilaz aktiviteleri; 1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık çipura (*Sparus aurata*) balıkları karaciğer mikrozomlarında incelendi ve her bir yaş grubunun aktiviteleri arasındaki artış sırası ile birbirine göre; 2,26 / 1,84 / 1,15 / 1,71 / 1,26 / 1,23 / 1,34 kat olarak bulunmuştur. En fazla aktivite artışı 1,5-4 aylık gelişim evresinde gözlemlenmiştir. Dışarıdan besin ve diğer yollarla alınan, nitrosoamin bileşikleri, P450LM3a geninin indüksiyonunu artırmaktadır. Bu nedenle nitrosoamin ve diğer karsinojen maddelerin biyotransformasyonunda rol almalarından dolayı önem kazanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, ilk 4 ayda NDMD N-demetilaz aktivitesi daha fazla artış göstermekle birlikte, 24 aya kadar düzenli bir şekilde artmaktadır. Eğer ölçümlerimiz 24 ay sonrasında devam etmiş olsa idi muhtemelen bu artış devam edecekti. N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz, 1,5 aylık balıklarda $0,019 \pm 0,007$ nmol/dakika/mg protein aktivite gösterirken 24 aylık balıklarda $0,323 \pm 0,014$ nmol/dakika/mg protein aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar, N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz aktivitesinin yaklaşık 17 kat arttığını göstermektedir.

Sıçanlarda obezitenin CYP2E1'nin üzerindeki etkisi, 1990 yılında Raucy ve arkadaşları tarafından test edilmiştir. Hepatik CYP2E1 seviyelerinin bu hastalıktan yükseldiğini bulmuşlardır. Yoğun enerji (enerji-dense) diyeti ile obez hale getirilmiş rat karaciğer mikrozomlarında ve toplam P450 içeriğinde %28 yükselme gözlenmiştir. CYP2E1 ile ilişkili katalitik aktivitelerinden NDMD N-demetilasyon %66, anilin hidroksilasyon %52, p-nitrofenol hidroksilasyonu %28 kuvvetlenmiştir. Tersine obezite

ratlarda P4502C11 ve P4503A1 ile bağıntılı benzfetamin N-demetilasyonu ve eritromisin N-demetilasyonunu değiştirmemiştir (Raucy vd 1990).

2003 yılında atlarla yapılan bir çalışmada; atların hepatik olarak ilaçları metabolize etme kapasiteleri yaşa bağlı olarak yaşama süreçleri içinde karakterize edilmiştir. Yaşları 1 yıl ile 12 yıl arasında olan 50 dişi atın karaciğer mikrozomlarında, sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar, karboksilesterazlar ve transferazlar analiz edilmiştir. CYP2B, CYP2E, CYP3A enzimleri western immunoblotting yapılarak miktarlarının yaş artışına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Aynı örneklerde glutatyon S-transferaz aktivitesi araştırılmış ve bu enzimin aktivitesinin yaş ilerledikçe azaldığı bulunmuştur. Bu atların yaşları arttııka; EROD, MROD, BROD, Anilin 4-hidroksilaz, NDMA N-demetilaz, Eritromisin N-demetilaz, Benzo(a)piren hidroksilaz, Benzphetamin N-demetilaz ve Etilmorfin N-demetilaz aktivitelerinde artış tayin edilmiştir. Aminopiren N-demetilaz aktivitesinde dikkate değer bir değişim gözlemlenmemiştir (Nebbia vd 2003).

White-Footed (*Peromyscus leucopus*) micelarla yapılan bir çalışmada; 6, 8, 12, 18, 24, 30, 36 ve 48 aylık dişi ve erkek denekler kullanılarak, EROD, PROD, NDMA-N-demetilaz ve GST aktivitelerinin yaşla değişimi incelenmiştir. PROD ve NDMA-N-demetilaz aktiviteleri dişi micelerde yaş artışı ile azalma göstermiştir. Fakat Erkek micelerde sadece PROD aktivitesi azalma göstermiştir. NDMA-N-demetilaz aktivitesinde dikkate değer bir artış gözlemlenmemiştir. Erkek yetişkin micelerde, dişilere oranla daha yüksek EROD aktivitesi gözlenmiştir. Faz II enzimlerinden olan GST aktivitesi de hem dişi hemde erkek micelerde yaş artışı ile azalma göstermiştir (Guo vd 1993).

Bu çalışmada; farklı gelişim evrelerindeki ipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozomlarında; anilin 4-hidroksilaz ve N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz aktiviteleri araştırıldı. Farklı yaş gruplarındaki (1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık) ipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz ve N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz aktivitelerinde yaş artışı ile paralel olarak artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, denek hayvanımızın yağ ağırlıklı beslenmesinin bu artışa neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Sıçanlarda aksine anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz aktivitelerinde yaş artışı ile azalış görülmüştür. Atlarla yapılan bir çalışmada, bizim sonuçlarımızla benzer olarak anilin 4-hidroksilaz ve N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz aktivitelerinde yaş artışı ile birlikte artış gözlemlenmiştir. White-Footed (*Peromyscus leucopus*) dişi ve erkek micelarla yapılan bir çalışmada ise bizim çalışmamızdan farklı olarak yaşlanma ile NDMA-N-demetilaz aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir. Böylelikle sitokrom P450 enzimlerinin aktivitelerinin değişiminde, tür, cinsiyet, yaş ve beslenme faktörünün etkili olduğu bulunmuştur. Literatürde balıklar üzerine yaş ile ilaçları metabolize eden enzimlerin değişimine ilişkin çok kısıtlı bilgi mevcuttur.

Farklı yaş grubundaki (1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları karaciğer mikrozomlarında Eritromisin N-demetilaz aktiviteleri ölçüldü ve değişik gelişim periyodundaki balıklardaki aktivite artışı sırası ile birbirine göre; 3,5 / 1,6 / 1,16 / 1,76 / 1,29 / 1,12 / 1,3 kat olarak belirlenmiştir. 1,5 aylık ile 4 aylık balık karaciğer mikrozomlarındaki Eritromisin N-demetilaz aktivite artışı en fazladır. Diğer balık gruplarında artış düzenlidir. Çipura (*Sparus aurata*) balık yavrularının belli dönemlerde hastalanmaktadır ve tedavi amaçlı olarak bir çok ilaç kullanılmaktadır. Bu kullanılan ilaçlar CYP3A27 geninin indüksiyonunu artırmakta bununla bağlantılı olarak, Eritromisin N-demetilaz aktivitesinde de artış gözlenmektedir. Eritromisin N-Demetilaz'ın, 1,5 aylık balıklardaki aktivitesi $0,009 \pm 0,006$ nmol/dakika/mg protein iken 24 aylık balıklardaki aktivitesi, $0,189 \pm 0,008$ nmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar eritromisin N-demetilaz aktivitesinin yaklaşık 21 kat attığını göstermiştir.

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, eritromisin N-demetilaz aktivitesinde değişim görülmemiştir. Bu da eritromisin N-demetilaz aktivitesinde beslenme dışında bir çok faktörün etkisi olduğunu göstermektedir. Atlarla yapılan bir çalışmada da, bizim sonuçlarımızla benzer olarak eritromisin N-demetilaz aktivitelerinde yaş artışı ile birlikte artış gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitelerinin değişiminde, tür, cinsiyet, yaş ve beslenme faktörlerin rol oynadığı bulunmuştur.

Farklı yaş grubundaki (1,5, 4, 8, 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktiviteleri ölçülmüş ve bu yaş grubundaki balıklardaki aktivite azalışı sırası ile birbirine göre; 1,14 / 1,48 / 0,88 / 1,5 /

1,27 / 1,1 / 2 kat olarak belirlenmiştir. En fazla azalış 20-24 aylık gelişim periyodunda görülmüştür. Genel olarak; kafein N-demetilazın 1,5 aylık balıklardaki aktivitesi, $0,438 \pm 0,014$ nmol/dakika/mg protein ve 24 aylık balıklardaki aktivitesi $0,069 \pm 0,012$ nmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar kafein N-demetilaz aktivitesinin yaklaşık 6 kat azaldığını göstermiştir. Vücudumuzda kafein evrimsel olarak vardır ve CYP1A2 geninin indüksiyonu neticesinde zamanla metabolize edilmektedir. Yapılan ölçümlerde göstermektedir ki yaş ilerledikçe, kafein N-demetilaz enziminin aktiviteside azalmaktadır.

Değişik gelişim evresindeki (1,5, 4, 83 9, 11, 15, 20 ve 24 aylık) çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozumlarında, amino piren N-demetilaz aktiviteleri incelenmiş ve farklı yaş grubundaki balık mikrozomlarındaki aktivite azalışı sırası ile birbirine göre; 1,11 / 1,16 / 1,1 / 2,15 / 1,6 / 1,72 / 2,05 kat olarak belirlenmiştir. Aktivitedeki azalış yaş ilerledikçe artmaktadır. 9 aydan sonra gruplar arasında yaklaşık 2 kat azalma gözlenmektedir. Çeşitli azot içeren ilaç türlerinin genç balıkların hastalıklarının tedavisinde kullanılması sonucunda bu enzimin aktivitesi genç balıklarda daha fazladır ve zamanla metabolize edilmektedir. Bu ilaçlar muhtemelen balıklardaki CYP2C9 geninin indüksiyonunu artırmaktadır. Amino piren N-demetilazın 1,5 aylık balıklardaki aktivitesi, $0,944 \pm 0,024$ nmol/dakika/mg protein iken 24 aylık balıklardaki aktivitesi, $0,056 \pm 0,011$ nmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. Amino piren N-demetilaz aktivitesinde yaklaşık 17 kat azalma belirlenmiştir. Çalışmalarımız daha ileriki yaşlarda da devam etmiş olsaydı muhtemel olarak bu enzimin aktivitesi azalmaya devam edecekti. Bu enzimle yapılan bir başka çalışmada, yaşları 1 yıl ile 12 yıl arasında olan 50 dişi atın karaciğer mikrozomlarında, amino piren N-demetilaz aktiviteleri ölçülmüş ve dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir. Bu da bize bu enzimin aktivitesinde tür yaş faktörünün yanında tür ve cinsiyet faktöründe önemli olduğunu göstermiştir.

Farklı yaş grubundaki bu çipura (*Sparus aurata*) balıkları, karaciğer mikrozumlarında kafein N-demetilaz ve Amino piren N-demetilaz aktiviteleride incelendi. Bu enzimlerin aktivitelerinin her ikisinde de yaş artışıyla birlikte azalış gözlemlenmiştir. Kafein organizmalarda evrimsel olarak bulunmaktadır ve bu nedenledir ki zamanla vücutta metabolize olduğu için genç bireylerde daha fazla Kafein N-demetilaz aktivitesi görülmektedir. Bu yaş büyüdükçe azalmaktadır.

4-metilamino antipiren (Aminopiren) N-demetilaz aktiviteside yaş artışı ile azalış göstermiştir. Farklı bir tür ve cinsiyet olan dişi atlarla yapılan bir çalışmada, yaş artışı ile Aminopiren N-demetilaz aktivitesi incelenmiş ve dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre tür ve cinsiyet faktörünün bu enzim aktivitesinin değişiminde etkisinin olmuş olabileceği düşündürmektedir.

Bu çalışmada ölçülen enzim aktivitelerinin tamamı tablo 4.1 ve tablo 4.2’de verilmiştir. Yapılan çalışma literatür ile karşılaştırıldığında tür, beslenme, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerin, canlılarda, ilaçları metabolize eden enzimlerin aktivitelerinin değişiminde rol oynadığı bulunmuştur. Bu özellikle bizim denek hayvanımız olan ve büyük oranda gıda maddesi olarak tüketilen çipura (*Sparus aurata*) balığının yetiştiriciliğinde önemli rol oluşturmakta olup, bu değişimde beslemede kullanılan yem ve küçük yaşlardaki hasta balıklara verilen ilaç türlerinde etkisinin olmuş olabileceği düşünülerek insan gıdası olarak kullanımı sonucunda insan sağlığı açısından etkisi daha sonraki çalışmalarda incelenebilir.

Tablo 4.1 Ölçülen Enzim Aktiviteleri

Ölçülen Enzimler	Çipura (<i>sparus aurata</i>) 1-24 Aylık Gelişim Periyodundaki Enzim Aktivitesi Değerleri							
	1,5 aylık	4 aylık	8 aylık	9 aylık	11 aylık	15 aylık	20 aylık	24 aylık
Anilin 4-hidroksilaz (A4H) nmol/dakika/mg protein	0,003; 0,003; 0; 0,003	0,006; 0,006; 0,006; 0,009; 0,006; 0,006; 0,006; 0,006; 0,006; 0,009; 0,006; 0,006	0,009; 0,012; 0,009; 0,009; 0,009; 0,012	0,012; 0,015; 0,015; 0,012; 0,012; 0,018; 0,012; 0,015; 0,018; 0,012	0,030; 0,027; 0,030; 0,030; 0,030; 0,027; 0,030; 0,034; 0,030; 0,030; 0,030; 0,030; 0,027; 0,027; 0,031; 0,030; 0,027; 0,027	0,040; 0,037; 0,040; 0,040; 0,040; 0,037; 0,040; 0,037; 0,037; 0,040; 0,040; 0,037; 0,037; 0,040; 0,037; 0,040	0,049; 0,049; 0,036; 0,036; 0,030; 0,033; 0,049; 0,036; 0,036; 0,049	0,055; 0,058; 0,061; 0,055; 0,058; 0,061; 0,055; 0,058
Ortalama ± Standart Sapma	0,002 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,03 ± 0,002	0,039 ± 0,002	0,044 ± 0,006	0,058 ± 0,002
Eritromisin N-demetilaz (ERND) nmol/dakika/mg protein	0,012; 0; 0,012; 0,012	0,025; 0,025; 0,025; 0,038; 0,025; 0,025; 0,038; 0,063; 0,025; 0,025; 0,025; 0,025	0,050; 0,038; 0,063; 0,050; 0,050; 0,038	0,062; 0,050; 0,062; 0,050; 0,062; 0,050; 0,050; 0,062; 0,050; 0,062	0,062; 0,100; 0,138; 0,125; 0,112; 0,087 0,062; 0,112; 0,100; 0,112; 0,100; 0,100; 0,088; 0,088; 0,100; 0,100; 0,088; 0,100	0,125; 0,138; 0,125; 0,112; 0,138; 0,125; 0,112; 0,138; 0,138; 0,125; 0,125; 0,125; 0,125; 0,138; 0,125; 0,138	0,150; 0,150; 0,150; 0,112; 0,150; 0,150; 0,138; 0,138; 0,150; 0,150	0,188; 0,175; 0,188; 0,188; 0,200; 0,188; 0,200; 0,188
Ortalama ± Standart Sapma	0,09 ± 0,006	0,030 ± 0,010	0,048 ± 0,010	0,056 ± 0,006	0,099 ± 0,018	0,128 ± 0,008	0,144 ± 0,012	0,189 ± 0,008
N-nitrosodimetilamin N- demetilaz (NDMA-ND) nmol/dakika/mg protein	0,025; 0,012; 0,025; 0,012	0,038; 0,050; 0,050; 0,038; 0,038; 0,050; 0,050; 0,038; 0,025; 0,050; 0,050; 0,038	0,075; 0,088; 0,075; 0,075; 0,075; 0,088	0,088; 0,100; 0,075; 0,100; 0,100; 0,100; 0,075; 0,100; 0,088; 0,088	0,162; 0,150; 0,150; 0,150; 0,150; 0,162; 0,162; 0,162; 0,150; 0,162; 0,150; 0,150; 0,150; 0,162; 0,150; 0,150; 0,162; 0,162	0,188; 0,188; 0,200; 0,200; 0,188; 0,188; 0,188; 0,200; 0,188; 0,212; 0,200; 0,188; 0,212; 0,200; 0,188; 0,212	0,238; 0,238; 0,212; 0,225; 0,262; 0,268; 0,262; 0,238; 0,225; 0,275	0,300; 0,325; 0,338; 0,312; 0,325; 0,338; 0,312; 0,338
Ortalama ± Standart Sapma	0,019 ± 0,007	0,043 ± 0,008	0,079 ± 0,006	0,091 ± 0,008	0,156 ± 0,006	0,196 ± 0,01	0,241 ± 0,02	0,323 ± 0,014
Kafein N-demetilaz (CN3D) nmol/dakika/mg protein	0,450; 0,450; 0,425; 0,425	0,375; 0,400; 0,400; 0,400; 0,350; 0,350; 0,375; 0,350; 0,400; 0,375; 0,400; 0,350	0,275; 0,250; 0,250; 0,275; 0,250; 0,250	0,300; 0,275; 0,300; 0,275; 0,300; 0,225; 0,300; 0,275; 0,275; 0,300	0,175; 0,200; 0,175; 0,175; 0,150; 0,200; 0,250; 0,250; 0,175; 0,175; 0,200; 0,200; 0,175; 0,200; 0,225	0,150; 0,150; 0,125; 0,175; 0,100; 0,150; 0,175; 0,150; 0,150; 0,150; 0,150; 0,175; 0,150; 0,150; 0,150; 0,175	0,125; 0,125; 0,150; 0,175; 0,150; 0,125; 0,125; 0,175; 0,150; 0,150	0,075; 0,075; 0,050; 0,075; 0,075; 0,050; 0,075; 0,075
Ortalama ± Standart Sapma	0,438 ± 0,014	0,383 ± 0,025	0,258 ± 0,013	0,292 ± 0,017	0,193 ± 0,027	0,152 ± 0,020	0,145 ± 0,019	0,069 ± 0,012

Tablo 4. 1 Ölçülen Enzim Aktiviteleri Devamı

Ölçülen Enzimler	Çipura (<i>sparus aurata</i>) 1-24 Aylık Gelişim Periyodundaki Enzim Aktivitesi Değerleri							
	1,5 aylık	4 aylık	8 aylık	9 aylık	11 aylık	15 aylık	20 aylık	24 aylık
Aminopiren N-demetilaz (APND) nmol/dakika/mg protein	0,950; 0,925; 0,925; 0,975	0,825; 0,875; 0,875; 0,875; 0,825; 0,875; 0,825; 0,850; 0,875; 0,875; 0,875; 0,850	0,750; 0,725; 0,725; 0,750; 0,725; 0,725	0,700; 0,675; 0,675; 0,600; 0,675; 0,675; 0,675; 0,650; 0,675	0,325; 0,325; 0,300; 0,275; 0,325; 0,300; 0,300; 0,325 0,325; 0,300; 0,325; 0,300; 0,300; 0,325; 0,325; 0,300	0,225; 0,200; 0,175; 0,225; 0,200; 0,175; 0,200; 0,225; 0,150; 0,225; 0,175; 0,225; 0,175; 0,225; 0,175; 0,200	0,100; 0,100; 0,125; 0,125; 0,100; 0,125; 0,100; 0,125; 0,100; 0,125	0,050; 0,075; 0,050; 0,050; 0,050; 0,050; 0,050; 0,075
Ortalama ± Standart Sapma	0,944 ± 0,024	0,852 ± 0,027	0,733 ± 0,013	0,668 ± 0,026	0,311 ± 0,015	0,198 ± 0,025	0,115 ± 0,013	0,056 ± 0,011
7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) pmol/dakika/mg protein	yok	Yok	yok	89,6; 88,74; 89,13; 86,84; 87,47; 88,58; 89,60; 90,08; 87,16; 89,05	273,8; 286,5; 272,6; 288; 272,2; 274,9; 288,2; 272,9; 289,3; 273,5; 287,4; 274,5; 273,6; 275,1; 286,7; 288,9; 289,1; 287,4	421,6; 445,6; 399,5; 401,2; 416,8; 421,5; 404,4; 411,0; 450,2; 448,3; 439,6; 427,9; 403,6; 398,9; 426,2; 431,0; 447,0; 435,9	631,1; 630,6; 635,3; 628,8; 822,1; 637,2; 821,7; 628,7; 619,5; 619,3	989,3; 979,9; 1009,0; 1003,6; 996,6; 1001,0; 1013,4; 1021,1; 986,5; 983,4
Ortalama ± Standart Sapma				88,63 ± 1,11	280,8 ± 7,39	423,9 ± 18,0	667,4 ± 81,6	998,4 ± 13,7
Pentoksiresorufin O-depentilaz (PROD) pmol/dakika/mg protein	yok	Yok	yok	yok	yok	274,8; 286,5; 273,6; 288,0; 273,2; 275,9; 287,2; 275,6; 276,4; 275,5; 274,6; 275,1; 285,6; 287,8	319,9; 319,9; 342,8; 320,3; 411,2; 411,2; 357,8; 357,8; 357,9; 302,3	623,5; 629,6; 599,8; 609,4; 631,5; 627,0 587,9; 601,1; 624,2; 619,9
Ortalama ± Standart Sapma						285,6 ± 20,9	350,1 ± 37,5	613,7 ± 16,4
Metoksiresorufin O-demetilaz (MROD) pmol/dakika/mg protein	yok	Yok	yok	yok	yok	yok	7,58; 8,37; 19,89; 17,68; 19,89; 18; 8,37; 7,67; 19,26; 23,29	62,24; 59,67; 54,47; 65,21; 52,89; 55,79; 64,03; 54,63; 64,03; 55,34
Ortalama ± Standart Sapma							15,00 ± 6,22	58,83 ± 4,72
Benziloksiresorufin O-debenzilaz (BROD) pmol/dakika/mg protein	yok	Yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
Glutatyon S-tamsferaz (GST-CDNB) nmol/dakika/mg protein	17,92; 17,5; 17,08; 18,33	29,37; 27,08; 25,62; 25,42; 27,29; 25,62; 23,96; 25; 29,37; 27,29; 28,96; 26,67	36,2; 36,0; 38,8; 42,7; 43,7; 46,7	318,3; 319,2; 300,2; 275,4; 259,2; 262,3; 320,4; 321,2; 300,2; 275,4	571,2; 571,7; 510,2; 516,2; 573,3; 573,7; 525; 518,3; 450,2; 492,9; 563,1; 522,9; 565,2; 525; 432,1; 430,8; 434,2; 432,9	-	728,5; 703,5; 626,5; 645,2; 699,1; 715,2; 699,2; 715,2; 682,1; 694,2	-
Ortalama ± Standart Sapma	17,71 ± 0,54	26,81 ± 1,8	40,7 ± 4,3	295,2 ± 25,0	511,6 ± 54,3		690,9 ± 32,0	

5. SONUÇ

Yaşadığımız çevrede her geçen gün yeni bir ilacın üretilmesi ve bir çok kimyasal maddenin gıdalar dahil bir çok alanda kullanılması sonucu insanların bu maddelere maruz kalması, bu maddelerin vücutta nasıl metabolize edildiğini ortaya çıkarıcı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Deneyimizde; GST (glutasyon S-transferaz), EROD (etoksirezorufin O-Deetilaz), MROD (metoksirezorufin O-Demetilaz), PROD (pentiloksirezorufin O-Depentilaz), BROD (benziloksirezorufin O-Debenzilaz), anilin 4-hidroksilaz (A4H), N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND), eritromisin N-demetilaz (ERND), kafein N-Demetilaz (CN3D) ve aminopiren N-demetilaz (APND) aktiviteleri, 24, 20, 15, 11, 9, 8, 4 ve 1,5 aylık çipura (*Sparus aurata*) balıklarının karaciğer mikrozomlarında incelenip, elde edilen bilgiler doğrultusunda yaş değişimi tanımlanmıştır. Yaş artışı ile EROD, PROD, A4H, NDMA-ND ve ERND aktiviteleri artmış, CN3D ve APND aktiviteleri azalmış ve MROD ve BROD aktiviteleri gözlenmemiştir. Literatürde balıklarda; ilaçları metabolize eden enzimlerin yaş ile değişimine ilişkin çok kısıtlı bilgi mevcuttur bu nedenle bu çalışmanın katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışma sonuçları diğer literatür çalışmaları ile karşılaştırıldığında; ilaçları metabolize eden enzimlerin aktivitelerinin değişiminde tür, beslenme, cinsiyet ve yaş gibi parametrelerin etkili olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında önemli bir insan

gıdası olan çipura balığının yetiştiriciliğinde kullanılan yem ve ilaç türleri incelenip, bununla bağlantılı olarak insan sağlığı ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir..

KAYNAKLAR

- Adali, O. and Arinc, E. (1990). Electrophoretic, Spectral, Catalytic And Immunochemical Properties Of Highly Purified Cytochrome P450 From Sheep Lung. **Int. J. Biochem.**, 22: 1433-1444.
- Akahori, M., Takatori, A., Kawamura, S., Itagaki, S., Yoshikawa, Y. (2005). No Regional Differences of Cytochrome P450 Expression in the Liver of Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). **Exp. Anim.**, 54: 131-136.
- Amet, Y., Zerilli, A., Goasduff, T., Dreano, Y., and Berthou, F. (1997) Noninvolvement of CYP2E1 in the (ω -1)-hydroxylation of Fatty Acids in Rat Kidney Microsomes, **Biochem. Pharm.**, 54: 947-952.
- Arinc, E., Adali, O., Iscan, M., Giray T. (1991). Stimulatory Effects Of Benzene On Rabbit Liver And Kidney Microsomal Cytochrome P-450 Dependent Drug Metabolizing Enzymes. **Arch. Toxicol.** 65: 186-190.
- Arinc, E. and Philpot, R.M. (1976). Preparation And Properties Of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits. **J. Biol. Chem.**, 251: 3213-3220.

- Arinc, E., Adali, O., and Gencler-Ozkan, A. M. (2000). Induction Of N Nitrosodimethylamine Metabolism In Liver And Lung By In Vivo Pyridine Treatments Of Rabbits. *Arch. Toxicol.*, 74: 329-334.
- Arinc, E., Adali, O., and Gencler-Ozkan, A. M. (2000). Stimulation Of Aniline, P-Nitrophenol And N-Nitrosodimethylamine Metabolism In Kidney By Pyridine Treatments Of Rabbits. *Arch. Toxicol.* 74: 527-532.
- Arinc, E., and Sen, A. (1992). Induction of Liver 7-ethoxyresorufin O-deethylase in Gilthead Seabream by Benzo(a)pyrene and its Potential Use in Biochemical Monitoring the Environmental Pollutants, In *Proceeding of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms* (Gabrielides, G. P., Ed.), MAP *Technical Report Series.*, No. 69: 73-79.
- Arinc, E., and Sen, A. (1993). Characterization of Cytochrome P450 Dependent Mixed-Function Oxidase System of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*; Sparidae) Liver, *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B: 133-139.
- Arinc, E., and Sen, A. (1994). In Vivo Effects of Anesthetic Benzocaine, on Liver Microsomal Cytochrome P450 and Mixed-Function Oxidase Activities of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 107C: 399-404.
- Arinc, E., and Sen, A. (1999). Hepatic Cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin O-deethylase Induction in Mullet and Common Sole as an Indicator of Toxic Organic Pollution in Izmir Bay, Turkey, *Marine Environmental Research.*, 48: 147-160.
- Arinc, E., Sen, A., and Bozcaarmutlu, A. (2000). Cytochrome P4501A and Associated Mixed-Function Oxidase Induction in Fish as a Biomarker for Toxic Carcinogenic Pollutants in the Aquatic Environment., *Pure Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 6: 985-994.
- Arinc, E., Kocabiyik, S., and Su, E. (2001). Induced CYP1A mRNA, Protein and Catalytic Activity in the Liver of Feral Fish, Leaping Mullet. (*Liza saliens*) *Comp. Biochem. Physiol.*, 128C: 281-290.
- Arinc, E., and Bozcaarmutlu, A. (2003). Catalyzation of Cocaine N-Demethylation by Cytochromes P4502B, P4503A and P4502D in Fish Liver. *J. Biochem.Mol. Toxicol.*, 17: 169-176.
- Armstrong, R. N. (1997). Glutathione Transferases. In: Guengrecih, F. P. (Ed.), *Comprehensive Toxicology, Biotransformation. 3. Elsevier Science.*, Oxford, pp. 307-327.
- Arinc, E., ve Adalı, O. (1983). Alabalık Karaciğer Mikrozomlarından Kısmen Saflaştırılmış İki Farklı Sitokrom P450'nin Hazırlanması ve Özellikleri. *Biyokimya Dergisi.*, Cilt 8, Sayı 1: 1-27.
- Al-Ghais, S. M., and Ali, B. (1999). Inhibition of Glutathione S-Transferase Catalyzed Xenobiotic Detoxication by Organotin Compounds in Tropical Marine Fish Tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 207-213.
- Alpbaz, A.G. (1990). Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Yüksekokulu Yayınları No. : 20.
- Andersson, T. (1992). Purification, Characterization and Regulation of a Male-Specific Cytochrome P450 in the Rainbow Trout Kidney. *Mar. Environ. Res.*, 34: 109-112.
- Andersson, T., and Forlin, L. (1999). Regulation of the Cytochrome P450 Enzyme System in Fish. *Aquat. Toxicol.*, 24, 1-20.
- Bainy, A. C. D., Stegeman, J. J. (2004). Cloning And Identification Of A Full Length

- Pregnane X Receptor And Expression In Vivo In Zebrafish (Danio Rerio). *Mar. Environ. Res.*, 58: 133–134.
- Bend, J. R., and James, M. O. (1978). Xenobiotic Metabolism in Marine and Freshwater Species, In *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology* (Mallins, D. C. and Sargent, J. R., Eds.). *Academic Press.*, London. Vol. 4: 125-188.
- Brown-Borg, H. M., Rakoczy, S. G. (2005). Glutathione Metabolism In Long-Living Ames Dwarf Mice. *Experimental Gerontology.*, 40: 115-120.
- Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., and Jermiin, L. S., Zeta, A. (1997). Novel Class of Glutathione Transferases in a Range of Species from Plants to Humans. *Biochem.* 328: 929-935.
- Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. (1961). An Enzyme from Rat Liver Catalyzing Conjugation with Glutathione, *Biochem. J.*, 79: 516-525.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D. (2004). Response of Pasific oyster *Crassostrea gigas* to Hydrocarbon Contamination under experimental Conditions, *Gene.*, 329: 147-157.
- Bucheli, T. D., and Pent, K. (1995). Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.*, 25: 201-268.
- Bourrie, M., Meunier, V., Berger, Y., and Fabre, G. (1996) Cytochrome P450 Isoform Inhibitors as a Tool for The Investigation of Metabolic Reactions Catalyzed by Human Liver Microsomes. *J. Pharmacol. Experiment. Ther.*, 277, 32 1-332.
- Buhler, D. R., and Williams, D. E. (1989). Enzymes Involved in Metabolism of PAHs in fishes and Other Aquatic Animals, In U. Varanasi, *Metabolism of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment.* *CRC Press.*, (pp. 151-184), New York.
- Buhler, D. R. (1995). Cytochrome P450 Expression in Rainbow Trout: An Overview, In *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health*, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.). *Springer-Verlag.*, pp. 159-180 Heidelberg.
- Buhler, D. R., and Wang-Buhler, J. L. (1998). Rainbow Trout Cytochrome P450s: Purification, Induction and Role in Environmental Monitoring, *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 107-137.
- Buhler, D. R., Cristobal, L., Miranda, L., Deinzer, M. L., Griffin, D. A., Henderson, M. C. (1997). The regiospecific Hydroxylation of Lauric Acid By Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Cytochrome P450s, *Drug Met. Dispos.*, 2510: 1176-1183.
- Burke, M. D. , Thompson, S., Elcombe, C. R., Halpert, J., Haaparanta, T., and Mayer, R. T. (1985). Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P450. *Biochem. Pharm.*, 34: 3337-3345).
- Bulavin, D. V., Korpishchenko, A. I., Gubanov, A. L, and Rechetov, A. V. (1996). Glutathione S-transferase Pl-1 in Normal and Cancerous Lung Tissue: Properties, Function, and Possible Mechanisms for Regulating Activity, *Biokhimiia*, 61: 1015-1027.
- Bylund, J., Oliw, E.H. (2001). Cloning and characterization of CYP4F21: a prostaglandin E2 20-hydroxylase of ram seminal vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* 389: 123–129.
- Camus, P., Koutsikopoulos, A. (1984). Incubation experimentale et developpement embryonnaire de la daurade royale *Sparus aurata* (L.), a differentes temperatures. *Aquaculture.*, 42, 117-128.

- Capdevilla, J. H., and Falck, J. R. (2001). The CYP P450 Arachidonic acid Monooxygenases: From Cell Signaling to Blood Pressure Regulation, *Biochem. Physiol.*, 285: 571-576
- Capdevilla, J. H., Harris, R. C., and Falck, J. R. (2002). Microsomal cytochrome P450 and Eicosanoid metabolism, *Cell. Mol. Life Sci.*, 59: 780-789.
- Celander, M., and Förlin, L. (1991). Catalytic Activity and Immunochemical Quantification of Hepatic Cytochrome P450 in (3-naphthoflavone and Isosafrole Treated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Fish Physiol. Biochem.*, 9: 189-197.
- Chang, M., Hong, Y., Burgess, J. R., Tu, C. P. D., and Reddy, C. C. (1987). Isozyme Specificity of Rat Liver Glutathione S-transferases in the Formation of PGF₂ alpha and PGE₂ from PGH₂, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 548-557.
- Charty, S., Rodius, F., Vasseur, P. (2004). A Coparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic. Toxicol.*, 69: 81-93.
- Chervinski, J., Chanin, Y. (1985). Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) a Candidate for Culture in ponds- Laboratory Experiments. *Bamidgeh* 37 (2), 42.
- Clark, A. G. (1989). The Comparative Enzymology of the Glutathione S-Transferases from Non-Vertebrate Organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 926: 419-446.
- Cochin, J., and Axelrod, J. (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125: 105-110.
- Conides, A. (1992). Effects of salinity on growth, food conversion and maintenance of young gilthead sea bream, *S. auratus*. PhD thesis, University of Athens, Greece, 185 pp.
- Conney, A. H. (1982). Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Compounds and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Res.*, 42: 4875-4917.
- Correia, A. D., Costa, M. H., Luis, O. J., Livingstone, D. R. (2003). Age - related changes in antioxidant enzyme activities , fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journ. Env. Mar. Bio. Eco.*, 289: 83-101.
- Corley-Smith, G. E., Su, H. T., Wang-Buhler, J. L., Tseng H. P., Hu, C. H., Hoang T., Chung W. G., Buhler, D. R. (2006). CYP 3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. and physiology Research Commun.*, 340: 1039-1046.
- Dewaide, J. H. and Henderson, P. (1970). Seasonal Variation of Hepatic Drug Metabolism in the Roach. *Leuciscus rutilus L.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 489-497.
- Dorniney, R. J., Nimmo, I. A., Cronshaw, A. D., Hayes, J. D. (1991). The Major Glutathione S-Transferase in Salmonid Fish is Homologous to the Mammalian pi-class GST. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 93-98.
- Doyotte, A., Mitchelmore, C. L., Ronisz, d., Mcevoy, j., Livingstone, D. R. (2001). Hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase Activity in Eel (*Anguilla Anguilla*) from The Thames Estuary and Comparisons with other United Kingdom Estuaries. *Marine pollution Bulletin.*, 42: 1313-1322.
- Edwards, A. J., Addison, R. F., Willis, D. E., and Renton, K. W. (1988). Seasonal Variation of Hepatic Mixed Function Oxidases in Winter Flounder (*Pseüdopleuronectes americanus*). *Mar. Environ. Res.*, 26: 209-219.

- Egaas, E., and Varanasi, U. (1982). Effects of Polychlorinated Biphenyls and Environmental Temperature on In Vitro Formation of Benzo(a)pyrene Metabolites by Liver of Trout (*Salmo gairdneri*). **Biochem. Pharmacol.**, 31: 561-566.
- El-Kady, M. A., Mitsuo, R., Kaminishi, Y., Itakura, T. (2004). Isolation of cDNA of novel cytochrome P450 1B gene, CYP1B2, from Carp (*Cyprinus carpio*). **Environ. Sci.**, 11(6): 345-354.
- Elskus, A. A., and Stegeman, J. J., Susani, L. C., Black, D., Pruell, R. J., and Fluck, S. J. (1989). Polychlorinated Biphenyls Concentrations and Cytochrome P450E Expression in Winter Flounder from Contaminated Environments. **Marine Environ. Res.**, 28: 25-30.
- El-Hawari, A.M., and Plaa G.L. (1983). Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity alloxan and streptozotocin diabetic rats. **Toxicol. Lett.** 17: 293-300.
- Eaton, D. L., and Bammler, T. K. (1999). Concise Review of the Glutathione S-transferases and Their Significance to Toxicology. **Toxicol. Sci.**, 49: 156-164.
- Fouremant, G. L., Bend, J. R. (1984). The Hepatic Glutathione Transferases of the Male Little Skate, *Raja erinacea*. **Chem. Biol. Interact.**, 49: 89-103.
- Förlin, L., Haux, C., Karlsson-Norrgren, L., Runn, P., and Larsson, A. (1986). Biotransformation Enzyme Activities and Histopathology in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, Treated with Cadmium. **Aquatic. Toxicol.**, 51-64.
- Freddi, A., Berg, L., Bilio, M. (1981). Optimal salinity-temperature combinations for the early life stages of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. **J. World maric. Society.**, 12: 130-136.
- Fujita, Y., Ohi, H., Murayama, N., Saguchi, K., Higuchi, S. (2004). Identification of multiple cytochrome P450 genes belonging to the CYP4 family in *Xenopus laevis*: cDNA cloning of CYP4F42 and CYP4V4. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, 138: 129-136.
- Gadugbui, B. K. M., and James M. O. (2000). Activities of Affinity-Isolated Glutathione S-transferase (GST) from Channel Catfish Whole Intestine. **Aquat. Tox.**, 49: 27-37.
- George, S. G., Young, P. (1988). Purification and Properties of Plaice Liver Cytosolic Glutathione S-Transferases, **Mar. Environ. Res.** 24, 93-96.
- Gibso, G. G., Skett, P. (1994). Introduction to Drug Metabolism. **Blacki Academic & Professional**, London. Chapter 4.
- Gelboin, H. V. (1980). Benzo(a)pyrene Metabolism, Activation and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. **Physiol. Rev.**, 60: 1107-1166.
- Gallagher, E. P., and Di Giulio, R. T. (1992). A Comparison of Glutathione-Dependent Enzymes in Liver, Gills and Posterior Kidney of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 102C: 543-547.
- Godard, C. A. J., Goldstone, J. V., Said, M. R., Dickerson, R. L., Woodin, B. R., Stegeman, J. J. (2005). The new vertebrate CYP 1C family: Cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. **Biochem. and physiology Research Commun.**, 331: 1016-1024.
- Goksoyr, A., Solbakkaen, J. E., and Klungosyr, J. (1986). Regioselective Metabolism of Phenanthrene in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Studies on the Effects of Monooxygenase Inducers and Role of Cytochrome P450. **Chem. Biol., Interact.**, 60: 247-263.

- Goksoyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsoyr, J., Zhang, Y. S., and Forlin, L. (1987). Species Characteristics of the Hepatic Xenobiotic and Steroid Biotransformation System of Two Teleost Fish, Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89: 347-360.
- Goksoyr, A. (1985). Purification of Hepatic Microsomal Cytochromes P450 from p-naphthoflavone Treated Atlantic Cod (*Gadus morhua*), a Marine Teleost Fish, *Biochem. Biophys. Acta*, 840, 409-417.
- Goksoyr, A., Beyer, J., Husoy, A. M., Larsen, H. E., Westrheim, K., Wilhelmssen, S., and Klungsoyr, J. (1994). Accumulation and Effects of Aromatic and Chlorinated Hydrocarbons in Juvenile Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Caged in a Polluted Fjord (Sorfjorden, Norway). *Aquat. Toxicol.*, 29: 21-35.
- Goksoyr, A., and Forlin, L. (1992). The Cytochrome P450 in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring, *Scien. Total Env.*, 287,49-69.
- Gotoh, O. (1992). Substrate Recognition Sites in Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Proteins Inferred From Coparative Analysis of Amino Acid and Coding Nucleotide Sequences. *J. Biol. Chem.* 267: 83-90.
- Guo, Z., Wang, M., Tian, G., Burger, J., Gochfeld, M., Yang, C. S. (1993). Age- and Gender-Related Variations in The Activities of Drug-Metabolizing and Antioxidant Enzymes in The White-Footed Mouse (*Peromyscus Leucopus*). *GDA*, 57; 85-100.
- Haasch, M.L., Henderson, M.C., Buhler, R. D. (1998). Induction of lauric acid hydroxylase activity in catfish and bluegill by peroxisome proliferating agents. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121, 297-303.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974a). Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol.Chem.*, 249: 7130-7139.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974b). Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol.Chem.*, 246: 7139-7139.
- Hanasona, G.K., Witschi, H. and Plaa, GL. (1975). Potentiation of the hepatotoxic responses to chemicals in alloxan diabetic rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149: 903-907.
- Hayes, J. D., and Mantle, T. J. (1986b). Use of Immunoblot Techniques to Discriminate Between the Glutathione S-Transferase Yf, Yk, Yg, Yn/Yb and Yc Subunits and to Study Their Distribution in Extra-Hepatic Tissues. *Biochem. J.*, 233: 779-788.
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J. (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 6: 445-600.
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C, Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E., and Beaune, P. (1999). Human Cytochromes P450. *Mol. Aspect of Med.*, 20: 1-137.
- Heilmann, L. J., Sheen, Y-Y., Bigelow, S. W., and Nebeit, D. W. (1988). Trout P4501A1: cDNA and Deduced Protein Sequence, Expression in Liver, and Evolutionary Significance. *DNA*, 7: 379-387.
- Hong, J-Y., Pan, J., Gonzales, F.J., Gelboin, H.V. and Yang, C.S. (1987). The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting. *Biochern. Biophys. Res. Commun.*, 142, 1077-1083.

- Itakura, T., El-Kady, M., Mitsuo, R., Kaminishi, Y. (2005). Complementary DNA Cloning and Constitutive Expression of Cytochrome P4501C1 in The Gill of Carp (*Cyprinus Carpio*). *Environ. Sci.* 12(2): 111-120.
- Imai, Y., Ito, A., and Sato, R. (1966). Evidence for Biochemically Different Types of Vesicles in the Hepatic Microsomal Fraction. *J. Biochem.*, 60, pp. 417-428.
- James, M. O., Khan, M. A. Q., and Bend, J. R. (1979). Hepatic Microsomal Mixed-Function Oxidase Activities in Several Marine Species Common to Coastal Florida. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62C: 155-164.
- James, M. O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M. C. (2005). Properties and Regional Expression of a CYP3A-Like Protein in Channel Catfish Intestine. *Aquatic Toxicol.*, 72: 361-371.
- Jakoby, W. B., and Keen, J. H. (1977). A Triple-Threat in Detoxification: The Glutathione S-Transferases. *Trends Biochem. Sci.*, 2: 229-231.
- Jakoby, W. B., Ketterer, B., and Mannervik, B. (1984). Glutathione Transferases: Nomenclature. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 2539-2540.
- Jeffrey, A., and William R. B. (1997). Effect of Aging on Mixed-Function Oxidation and Conjugation by Isolated Perfused Rat Livers. *Biochem. Pharmacol.*, 54: 159-164
- Jakoby, W. B., and Habig, W. H. (1980). Glutathione Transferases, In: Jakoby, W. B. (Ed.), Enzymatic Basis of Detoxication. 2. *Academic Press*, New York, pp. 63-94.
- James, M. O., Loua, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M. C. (2005). Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. *Aquatic Toxicology.*, 72: 361-371.
- Kalinina, E. Y., Spiridanova, S. M., Saprin, A. N., and Berezov, T. T. (1988). Disulfiram and Butylhydroxyanisole Induction of Glutathione-S- and UDP Glucuronosyltransferase Activities in the Liver and its Role in Preventing the Toxic Action of Diethylnitrosamine in Rats. *Fartnakol. Toksikol.*, 51: 89-92.
- Kalinina, E. Y., Nechaev, V. N., and Saprin, A. N. (1988). Isolation and Comparative Analysis of Multiple Isoenzymes of Glutathione-S-transferase from the Liver of Intact Rats and Rats Administered Phenobarbital, 3-Methylcholanthrene and Butylhydroxytoluene. *Biokhimiia.*, 53: 133-142.
- Kamisaka, K., Habig, W. H., Ketley, J. N., Arias, M., and Jakoby, W. B. (1975). Multiple Forms of Human Glutathione S-Transferase and Their Affinity for Bilirubin. *Eur. J. Biochem.*, 60: 153-161.
- Kato, S., Bowman, E. D., Harrington, A. M., Blomeke, B., and Shields, P. G. (1995). Human Lung Carcinogen-DNA Adduct Levels Mediated by Genetic Polymorphisms. *J. Nat. Cancer Inst.*, 87, 902.
- Ketterer, B. (1980). Protective Role of Glutathione and Glutathione Transferases in Mutagenesis and Carcinogenesis. *Mutation Res.*, 202: 343-352.
- Ketterer, B., Meyer, D. J., and Clark, A. G. (1988). Soluble Glutathione Transferase Isozymes. in Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance. (Sies, H., and Ketterer, B., Ed.) *Academic Press*, London, pp. 73.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biol. Chem.*, 25: 6183-6188.

- Kim S.G., Shehin, S.E., States, J.C. and Novak, R.F. (1990). Evidence for Increased Translational Efficiency in The Induction Of P450 by Solvents: Anaiysis Of P4501 Mrna Polyribosomal Distribution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 767-774.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J., and Walsh, C. (1983). An Aryl Hydrocarbon Hydroxylating Hepatic Cytochrome P450 from the Marine Fish *Stenotomus chrysops*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226: 578-592.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Snowberger, E. A., Thomas, P. E., and Walsh, C. (1986). Cytochrome P450 Isozymes from the Marine Teleost *Stenotomus chrysops*: Their Roles in Steroid Hydroxylation and the Influence of Cytochrome b. *Arch. Biochem. Biophys.*, 249: 326-338.
- Kleinow, K. M., Melancon, M. J., and Lech, J. J. (1987). Biotransformation and Induction: Implication for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. *Environ. Health Persp.*, 71: 105-119.
- Kramer, H. J., Drenth, H., maas, R., Olinga, P., Groothuis, G., Seinen, W., Vadenberg, M. (2000). Metabolic Rate Constants of Igilec 141 Isomers and Polychlorinated Biphenyl Congeners Using Human Hepatic Microsomes and The Identification of Involved Cytochrome P450 Enzymes. *Org. Comp.*, 49: 299-303.
- Koivusaari, U., Harri, H., and Hanninen, O. (1981). Seasonal Variation of Hepatic Biotransformation in Female and Male Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 70C: 149-157.
- Koop, D. R. and Casazza J. P. (1985). Identification Of Ethanol-Inducible P-450 Isozyme 3a as The Acetone and Acetol Monooxygenase of Rabbit Microsomes. *J. Biol. Chem.*, 260, 13607-13612.
- Lasker, J. M., Chen, W. B., Wolf, I., Bloswick, B. P., Wilson, P.D., Powell, P.K. (2000). Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of CYP4F2 and CYP4A11. *J. Biol. Chem.*, 275, 4118– 4126.
- Lauren, D. J., Halarnkar, P. P., Hammock, B. D., and Hinton, D. E. (1989). Microsomal and Cytosolic Epoxide Hydrolase and Glutathione S-transferase Activities in the Gill, Liver, and Kidney of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Baseline Levels and Optimization of Assay Conditions. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 881-887.
- Laville, N., Aissa, S. A., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J. M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology.*, 196: 41-55.
- Leaver, M. J., and George, S. G. (1998). A Piscine Glutathione S-Transferase Which Efficiently Conjugates the End-Products of Lipid Peroxidation. *Marine Environmental Research.*, 46: 71-74.
- Leaver, M. J., and George, S. G. (2000). A cytochrome P4501B gene from a fish, *Pleuronectes platessa.*, *Gene.*, 256: 83-91.
- Lech, J. J., Vodicknick, M. J., and Elcombe, C. R. (1982). Induction of Monooxygenase Activity in Fish. *In Aquatic Toxicology*, (Weber, L. J., Ed.), pp. 107-148, Raven Press, New York.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fair, A. L., and Randal, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol Chem.*, 193: 265-275.

- Lyttle, M. H., Satyam, A., Hocker, M. D., Bauer, K. E., Caldwell, C. G., Hui, H. C., Morgan, A. S., Mergia, A., and Kauvar, L. M. (1994). Glutathione S-Transferase Activates Novel Alkylating Agents. *Med. Chem.*, 37: 1501-1507.
- Lu, A. Y. H., and Lewin, W. (1974). The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System. *Biochem. Biophys. Acta.*, 344: 205-240.
- Lu, A. Y. H., and Coon, M. J. (1968). Role of Hemoprotein P450 in Fatty Acid W-Hydroxylation in a Soluble Enzyme System From Liver Microsomes. *Biol. Chem.*, 243: 1331-1332.
- Listowsky, L., Abramovitz, M., Homma, H. and Niitsu, Y. (1988). Intracellular Binding and Transport of Hormones and Xenobiotics by Glutathione S-Transferases. *Drug Met. Rev.*, 19: 305-318.
- Machala, M., petcivalsky, M., Nezveda, K., ulrich, R., Dusek, L., Piacka, V., Svobodova, Z. (1997). Responses of Carp Hepatopancreatic 7-Ethoxyresorufin O-deethylase and Glutathione-Dependent Enzymes to Organic Pollutants-A Field Study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1410-1416.
- Magnusson, M. O., and Sandström, R. (2004). Quantitative analysis of eight testosterone metabolites using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spect.*, 18: 1089-1094.
- Martinez-Lara, E., Toribio, F., Lopez-Barea, J., and Barcena, J. A. (1996). Glutathione-S-transferase Isoenzyme Patterns in the Gilthead Seabream (*Sparus auratd*) Exposed to Environmental Contaminants. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 215-220.
- Mannervik, B. (1985a). Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.*, 113: 490-495.
- Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988). Glutathione Transferases- Structure and Catalytic Activity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 23: 283-337.
- Masfaraud, J. F., Devaux, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Malaveille, C., and Monod, G. (1992). DNA Adduct Formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase Induction in Primary Culture of Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro.*, 6: 523-531.
- Meucci, V., Arukwe, A. (2006). The Xenoestrogen 4-Nonylphenol Modulates Hepatic Gene Expression of Pregnane X Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor, CYP3A and CYP1A1 in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology.*, 142: 142-150.
- Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., and Ketterer, B. (1991). A New Class of Glutathione Transferases Purified From Rat and Man. *Biochem. J.*, 274: 409-414.
- Mikhailova, O. N., Gulyaeva, L. F., Filipenko, M. L. (2005). Gen Expression of Drug Metabolizing Enzymes in Adult and Aged Mouse Liver: A Modulation by Immobilization Stress. *Toxicol.*, 210: 189-196.
- Miller, K. A., Addison, R. F., Bandiera, S. M. (2003). Hepatic CYP1A level and EROD Activity in English sole: Biomonitoring of Marine Contaminants in Vancouver Harbour. *Marine Environmental Research.*, 57: 37-54.
- Miranda, C. L., Wang, J-L., Henderson, M. C., and Buhler, D. R. (1989). Purification and Characterization of Hepatic Steroid Hydroxylases from Untreated Rainbow Trout. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268: 227-238.

- Miranda, C. L., Wang, J-L., Henderson, M. C., Williams, D. E., and Buhler, D. R. (1990). Regiospecificity in the Hydroxylation of Lauric Acid by Rainbow Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures. *Methods in Enzymology*, 121: 497-509.
- Monod, G., Devaux, A., and Riviere, J. L. (1987). Characterization of Some Monooxygenase Activities and Solubilization of Hepatic Cytochrome P450 in Two Species of Freshwater Fish, the Nase (*Chondrostoma nasus*) and the Roach (*Rutilus rutilus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 88C: 83-89.
- Mosialou, E., Ekstrom, G., Adang, A. E. P., and Morgenstern, R. (1993). Evidence that Rat Liver Microsomal Glutathione Transferase is Responsible for Glutathione-Dependent Protection Against Lipid Peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 1645-1651.
- Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421.
- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987). P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R., and Waterman, M. R. (1987). The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, 6: 1-13.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujikuriyama, Y., Gonzales, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., and Waxman, D. J. (1991). The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10: 1-14.
- Nebbia, C., Dacasto, M., Carletti, M. (2003). Postnatal Development of Hepatic Oxidative, Hydrolytic and Conjugative Drug-Metabolizing Enzymes in Female Horses. *Life Sci.*, 74: 1605-1619.
- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., and Nebert D. W. (1993). The P450 superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12: 1-51.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996). P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, and Nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-43.
- Nelson, D. R. (2003). Comparison of P450s From Human and Fugu: 420 Million Years of Vertebrate P450 Evolution. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409(1): 18-24.
- Neilsen, P. S., de Pater, N., Okkels, H., and Autrup, H. (1996). Environmental Air Pollution and DNA Adducts in Copenhagen Bus Drivers: Effect of GSTM1 and NAT2 Genotypes on Adduct Levels. *Carcinogenesis*, 17: 1021.
- Nimmo, L. A. (1987). The Glutathione S-Transferases of Fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 3: 163-72.
- Novoa-Valinas, M. C., Perez-Lopez, M., and Melgar, M. J. (2002). Comparative Study of the Purification and Characterization of the Cytosolic Glutathione S-transferases from Two

- Salmonid Species: Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Brown Trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 131C: 207-213.
- Okita R.T. and Masters B.S.S. (1997). Biotransformation: The Cytochromes P450” in: Textbook of Biochemistry with elinical correlations (edited by Devlin T.M. A John Wiley and Sons INC., Publications, New York), 982-998.
- Oleksiak, M. F., Wu, S., Parker, C., Karchner, S. L., Stegeman, J. J., and Zeldin, D. C., (2000). Identification, Functional Characterization, and Regulation of a New Cytochrome P450 Subfamily, the CYP2Ns. **Biol. Chem.**, 275: 2312-2321.
- Oleksiak, M. F., Wu, S., Parker, Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., Stegeman, J. J. (2002). Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. **Arch. Biochem. Biophys.**, 411: 223-234.
- Omura, T., and Sato, R. (1964a). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes, I Evidence for its Hemoprotein Nature. **Biol. Chem.**, 239: 2370-2378.
- Orellana, M., Guajardo, V., Araya, L., Rodrigo, T. (2001). Oxidative Stress, Microsomal and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in The Liver of Rats Treated With Acetone. **Comp. Biochem. Physiol.**, 128: 503-509.
- Ozturk, O., Gumuslu, S. (2004). Age-Related Changes of Antioxidant Enzyme Activities, Glutathione Status and Lipid Peroxidation in Rat Erythrocytes After Heat Stress. **Life Sci.**, 75(13):1551-1565.
- Payne, J. F. (1976). Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a Monitor for Marine Petroleum Pollution. **Science**, 191: 945-946.
- Parkinson, A. (1995). Biotransformation of Xenobiotics. In: Klaassen CD, Editor, Casarett and Doull's Toxicology, New York, **McGraw Hill**, 113-186.
- Payne, J. F., Fancery, L. L., Kiceniuk, J., and Williams, U. (1985). Mixed Function Oxygenases as Biological Monitors Around Petroleum Hydrocarbon Development Sites: Potential for Induction by Diesel and Other Drilling Mud Base Oils Containing Reduced Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.**, 17: 328-332.
- Payne, J. F., Fancery, L. L., Rahimtula, A. D., and Porter, E. L. (1987). Review and Perspective on the Use of Mixed Function Oxygenase Enzymes in Biological Monitoring. **Comp. Biochem. Physiol.**, 86C: 233-245.
- Perez-Lopez, M., Anglade, P., and Bec-Ferte, M. P. (2000). Characterization of Hepatic and Extrahepatic Glutathione S- transferases in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their Induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. **Fish. Physiol. Biochem.**, 22: 21-32.
- Perdu-Durand, E. F., and Cravedi, J. P. (1989). Characterization of Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Sturgeon (*Acipenser baeri*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 93B: 921-928.
- Peters, L. D., Nascib, C. and Livingstone, D. R. (1998). Variation in Levels of Cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A Immunopositive Proteins in Digestive Gland of Indigenous and Transplanted Mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. **Marine Environmental Research.**, 46: 295-299.
- Pohl, R. J., Bend, J. R., Guarino, A. M. and Fouts, J. R. (1974). Hepatic Microsomal Mixed-Function Oxidase Activity of Several Marine Species From Coastal Marine. **Drug Metab. Disp.**, 2: 545-555.

- Porter T:D and Coon M.J. (1991). Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266: 13469-13472.
- Prohaska, J. R., and Ganther, H. E. (1977). Glutathione Peroxidase Activity of Glutathione S-Transferases Purified from Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76: 437-445.
- Rammage, P. I. N., and Nimmo, I. A. (1984). The Substrate Specificities and Subunit Composition of the Hepatic Glutathione S-Transferases of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B: 189-194.
- Raza, H., Lakhani, M. S., Ahmed, I., John, A., Morgenstem, R., and Montague, W. (1997). Tissue Specific Expression of Glutathione S-Transferases, Glutathione Content and Lipid Peroxidation in Camel Tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B: 829-835.
- Renton, K. W., and Addison, R. F. (1992). Hepatic Microsomal Monooxygenase Activity and mRNA in North Sea Dab (*Limanda limanda*) from Contaminated Sites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 65-69.
- Rouimi, P., Anglade, P., Debrauwer, L., Tulliez, J. (1996). Characterization of Pig Liver Glutathione S-Transferases Using HPLC-Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Biochem. J.*, 317: 879-884.
- Sabourault, C., Sousa, G., Amichot, M., Cauany, A., Rahmani, R., Salatin, J., Berge, J., Girard J., Lafauire, M. (1999). Tissue-specific induction and inactivation of cytochrome P450 catalysing lauric acid hydroxylation in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *C. Biochem. and physiology.*, 122: 253-260.
- Sabourault, C., Amichot, M., Pauron, D., Berge, J. B., Lafaurie, M., Girard, J. P. (1999). Cloning of CYP4F7, a Kidney- Specific P450 in the Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Biochem. and physiology Research Commun.*, 258: 155-161.
- Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I., and Sato, K. (1985). Purification Induction and Distribution of Placental Glutathione Transferase: A New Marker Enzyme for Preneoplastic Cells in the Rat Chemical Hepatocarcinogenesis. *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 82: 3964-3968.
- Schenkman, J. B., and Cinti, D. L. (1978). Preparation of Microsomes with Calcium. *Methods in Enzymology.*, 52: 83-89.
- Schenkman, J. B. (1991). Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase: An Overview, In Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds, (Arinc., E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-10, *Plenum Press*, New York.
- Schenkman, J. B., and Greim, H. (1993). Cytochrome P450, (Handbook Expl. Pharmacol. Vol. 105). *Springer-Verlag.*, Berlin, Heidelberg.
- Schenkman, J. B., and Jansson, I. (1995). Introduction to Cytochrome P450. In Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds (Arinc, E., Schenkman, J. B., and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-10, *Plenum Press*, New York.
- Schenkman, J. B. (1999). The Fate of Xenobiotics in the Body, In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-20, *Plenum Publishers.*, New York.
- Schleizinger, J. J., Parker, C., Zeldin, D. L., Stegeman, J. J. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 265-275.

- Sen., A., and Arinc, E. (1998a). Purification and Characterization of Cytochrome P450 Reductase from Leaping Mullet (*Liza saliens*) Liver Microsomes. ***Journal of Biochem. and Mol. Toxicol.***, 12: 103-113.
- Sen., A., and Arinc., E. (1998b). Preparation of Highly Purified Cytochrome P4501A1 from Leaping Mullet (*Liza saliens*) Liver Microsomes and its Biocatalytic, Molecular and Immunological Properties. ***Comp. Biochem. Physiol.***, 121C: 249-265.
- Shaw, J. P., A.T. Large, A.T., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., Peters, L.D. (2000). Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immuno identified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). ***Marine Environmental Researc.***, 50: 405-409.
- Sijm, D. T. H. M., and Opperhuizen, A. (1989). Biotransformation of Organic Chemicals by Fish: Enzyme Activities and Reactions, In: Hutzinger, O., (Ed.), ***Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes***, Vol. 2E, Springer, Berlin, pp. 163-235.
- Stegeman, J. J. (1981). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Their Metabolism in Marine Environment, In Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, (Gelboin, H. V. and P. O. P. Ts'o, Eds.), pp. 1-60. ***Academic Press.***, New York.
- Stegeman, J. J., and Kaplan, H. B. (1981). Mixed-Function Oxygenase Activity and Benzo(a)pyrene Metabolism in the Barnacle *Balanus eburneus* (Crustacea: Cirripedia). ***Comp. Biochem. Physiol.***, 68C: 55-61.
- Stegeman, J. J., Klotz, A. V., Woodin, B. R., and Pajor, A. M. (1981). Induction of Hepatic Cytochrome P450 in Fish and the Indication of Environmental Induction in Scup (*Stenotomus chrysops*). ***Aquatic Toxicol.***, 1: 197-212.
- Stegeman, J. J., Kloepper-Sams, P. J., and Farrington, J. W. (1986). Monooxygenase Induction and Chlorobiphenyls in Deep Sea Fish *Coryphaenoides armatus*. ***Science.***, 231: 1287-1298.
- Stegeman, J. J., Kloepper-Sams, P. J. (1987). Cytochrome P450 Isozymes and Monooxygenase Activity in Aquatic Animals. ***Environ. Health Persp.***, 71: 87-95.
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., and Goksoyr, A. (1988). Apperant Cytochrome P450 Induction as an Indication of Exposure to Environmental Chemicals in Flatfish *Platichthys flesus*. ***Mar. Ecol. Prog. Ser.***, 46: 55-60.
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., and Smolowitz, R. B. (1990). Structure, Function and Regulation of Cytochrome P450 Forms in Fish. ***Biochem. Soc. Trans.***, 18: 19-21.
- Stegeman, J. J., and Lech, J. J. (1991). Cytochrome P450 Monooxygenase System in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure. ***Environ. Health Persp.***, 90: 101-109.
- Stegeman, J. J., and Hahn, M. E. (1994). Induction of Cytochrome P4501A by Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists in Porcine Aorta Endothelial Cells in Culture and Cytochrome P4501A1 Activity in Intact Cells. ***Molec. Pharmacol.***, 47: 296-306.
- Stegeman, J. J. (1995). Diversity and Regulation of Cytochrome P450 in Aquatic Species, In Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E. Eds.), pp. 135-158. ***Springer-Verlag.***, Heidelberg.
- Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., and Arend, U. (1987). Glutathione Transferases in Aquatic and Terrestrial Animals from Nine Phyla. ***Comp. Biochem. Physiol.***, 86C(1): 73-82.

- Song, B.J., Matsunaga, T., Hardwick, J.P., Paik, S.S., Veech, R.L., Yang, C. S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1987). Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol. Endocrinol.*, 1: 542-547.
- Szotakova, B., Baliharova, V., Lamka, J., Nozinova, E., Wsol, V., Velik, J., Machala, M., Neca, J., Soucele, P., Susova, S., and Skalova, L. (2004). Comparison of *In Vitro* Activities of Biotransformation Enzymes in Pig, Cattle, Goat and Sheep. *Research in Veterinary Science.*, 76: 43-51.
- Takamatsu, Y., and Inaba, T. (1994). Inter-individual Variability of Human Hepatic Glutathione S-Transferase Isozymes Assessed by Inhibitory Capacity. *Toxicol.*, 88: 191-200.
- Tandler, A., Helps, S. (1985). The Effect of Photoperiod and Water Exchange Rate on Growth and Survival of Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) From Hatching to Metamorphosis in Mass Rearing System. *Aquaculture.*, 48, 71-82.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M. A. (2005). Sparus Aurata L. Liver EROD and GST Activities, Plasma Cortisol, Lactate, Glucose and Erythrocytic Nuclear Anomalies Following Short-Term Exposure Either to 17 β -Estradiol (E₂) Or E₂ Combined With 4-Nonylphenol. *Sci. Tot. Environ.*, 336: 57-69.
- Tsuchida, S., and Sato, K. (1992). Glutathione Transferase and Cancer, *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 27: 337-384.
- Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, P. E. (2003). Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, Vol. 13, Issue 2: 57-149.
- Varanasi, U., Collier, T. K., Williams, D. E., and Buhler, D. R. (1986). Hepatic Cytochrome P450 Isozymes and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in English sole (*Paraphrys vetulus*). *Biochem. Pharmacol.*, 35: 2967-2971.
- Vindimian, E., and Garric, J. (1989). Freshwater Fish Cytochrome P450-Dependent Enzymatic Activities: A Chemical Pollution Indicator. *Ecotoxicol Environ. Safety.*, 18: 277-285.
- Walton, D. G., Fancey, L. L., Gren, J. M., Kiceniuk, J. W., and Penrose, W. R. (1983). Seasonal Changes in Hepatic Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity of Marine Fish *Tautogolabrus adspersus* (Walbaum) with and without Petroleum Exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C: 247-253.
- Wang, T., Shankar, M., Ronis, M.J.J., Mehendale H.M. (2000). Potentiation of Thioacetamide Liver Injury in Diabetic Rats is Due to Induced CYP2E1. *The jour. Phar. Exp. Ther.*, 294: 473-479.
- Watkins J.B., Sanders R.A., Beck L.V. (1988). The Effect of Long Term Streptozotocin-Induced Diabetes on Hepatotoxicity of Bromobenzene and Carbon Tetrachloride and Hepatic Transformations in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93: 329-338.
- Whyte, J. J., Schmitt, C. J., and Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Cri. Rev. Toxicol.*, 30(4): 347-570.
- Wauthier, V., Verbeeck, R. K., Calderon, P. B. (2004). The Use of Percision- Cat Liver Slices From Male Wistar Rats as a Tool to Study Age-Related Changes in CYP3A Induction and in Information Of Paracetamol Conjugates. *Toxico. In Vitro.*, 18: 879-885.
- Williams, R. T. (1967). Comparative Patterns of Drug Metabolism. *Fed. Proc.*, 26: 1029-1039.

- Williams, D. E., and Buhler, D. R. (1984). Benzo(a)pyrene Hydroxylase Catalyzed by Purified Isozymes of Cytochrome P450 from β -naphthoflavone-Fed Rainbow Trout. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 3743-3753.
- Yamazaki, H., Oda, Y., Funae, Y., Imaoka, S., Inui, Y., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1992). Participation of rat liver cytochrome P450E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase overexpressing Salmonella typhimurium strain. *Carcinogenesis.*, 13: 979-985.
- Yamaori, S., Yamazaki, H., Iwano, S., Kiyotani, K., Matsumura, K., Honda, G., Nakagawa, K. (2004). CYP3A5 Contributes Significantly to CYP3A-mediated Drug Oxidations in Liver Mikrosomes from Japanese Subjects. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19: 120-129.
- Yang, C. S., and Hong, J. Y. (1993). Molecular aspects of cytochrome P450E1 and its roles in chemical toxicology. In: Arinc, E., Schenkman, J. B., and Hodson, E. (Eds.) NATO ASI Series. *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes.*, 90: 181-192.
- Yoo, J. S. H., Ning, S. M., Pantuck, C. B., Pantuck, E. J., and Yang C. S. (1991). Regulation of Hepatic Microsomal Cytochrome P450E1 Level by Dietary Lipids and Carbohydrates in Rats. *Journal of Nutrition.*, 121: 959-965.
- Zhang, Y. S., Goksoyr, A., Andersson, T., and Forlin, L. (1991). Initial Purification and Characterization of Hepatic Microsomal Cytochrome P450 from (3NF-Treated Perch (*Percafluviatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: 97-103.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Telefon (iş) : 0.258.2134030 – Dahili 1464

Telefon (ev) : 0.258.2125694 (ev)

Fax : 0.258.2125546

E-mail : hardag@pau.edu.tr

Web sayfası : -

İş adresi : Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, PK 286 20017, Denizli

Ev adresi : Bursa Caddesi Yunus emre Mahallesi
Pınar Apt. No:87 20070 Kınıklı/Denizli

Doğum yılı ve yeri : 13.09.1979 Hollanda

Evlilik durumu : Evli

EĞİTİM / ÖĞRETİM

Kimya Lisans (1996-2000) : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Denizli

Kimya Yüksek Lisans (2003-) : Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarındaki ilaçların metabolize eden enzimlerin yaş ile değişimi ve karakterizasyonu

Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli

DENEYİMLER

2000- : Biyokimya anabilim dalında Araştırma Görevlisi,
Pamukkale Üniversitesi, Kimya Bölümü, Denizli.

ÇALIŞMA ALANLARI

Ekstraksiyon teknikleri, Kromatografik ayırmalar, Sıvı kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

KATILDIĞI KURSLAR

“Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması-IV” 15-16 Mayıs, 2006 DENİZLİ, TÜRKİYE

PROJELER

Proje adı	Destekleyen kurum	Yıl

Menderes nehrinde organik kirliliğin su ve doku örneklerindeki polisiklik aromatik hidrokarbonlar'ın yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ölçümüyle tespit ve takibi	PAÜ - BAP	2001-2003
New Schiff Base and Oxime in Metal Complexes of Contain Azo Fonction Group Syntesis and Characterization	PAÜ - BAP	2002
Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarındaki ilaçlarınmetabolize eden enzimlerin yaş ile değişimi ve karakterizasyonu	PAÜ - BAP	2003 -

MAKALELER

1. B. Bozkuş, **H.A. Akdoğan**, A. Şen, M.Z. Özel, "Occurrence and Distribution of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water from Menderes River, Turkey" *Turkish Journal of Chemistry*,2006, incelemede.

ULUSLARARASI BİLDİRİLER

1. Changes of Drug Metabolizing Enzymes Activities in Senescent Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) 31th FEBS Congress (2006) İstanbul 24-29 Haziran
2. Assessment Of Aging On Monooxygenases and Glutathione S-Transferases in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) **Hatice Ardağ Akdoğan**, Alaattin ŞEN Microsomal Drug Oxidation (MDO) (2006) 3-7 Eylül Budapest, HUNGARY.

ULUSAL BİLDİRİLER

1. Analysis of (PAH)s in Dalaman River(River Basin of Bedirbey) with HPLC; **Hatice Ardağ Akdoğan**, M. Zafer ÖZEL, Alaattin ŞEN; Denizli/Turkey, December 2002

2. Determination of (PAH)s in Menderes River with HPLC; **Hatice Ardağ Akdoğan**, Mustafa. Zafer Özel ve Alaattin Şen; Chemistry Symposium, Kuşadası/Aydın/Turkey, 2005

3. Determination of Benzo(a)Pyrene in olive oil With HPLC; Demirhan Çıtak, **Hatice Ardağ Akdoğan**, Mustafa. Zafer Özel; Chemistry Symposium, Kuşadası/Aydın/Turkey, 2005