

T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE KARACİĞERİNDE ÇEŞİTLİ
ETKENLER İLE OLUŞTURULAN DOKU
HASARLARINDA GSH, GST ve SELENYUM
TAYİNLERİ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

Ecz. Ayfer YALÇIN
Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Sermet ERLAÇIN

İZMİR — 1993

Doktora çalışmalarıma başlama fırsatını veren, çalışmalarım sũresince ilgi, yardım ve desteklerini gũrdũğũm değerli hocalarım Prof.Dr. Sermet **ERLAÇIN**, Prof.Dr.Aysen **KARAN** ve Prof.Dr.Taner **ONAT**'a teřekkũrlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarımın ilgili bũlũmlerindeki yardımları için E.ũ. Tıp Fakũltesi, Patoloji Anabilim Dalı Őđretim Őyesi Prof.Dr.Gũl **YUCE**, Biyokimya Uzmanı Dr. Eser **YILDIRIM SŐZMEN** ve Kĩmya Mũh.Dr.Nermin **ARIKAN**'a teřekkũr ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BÖLÜM I	
GİRİŞ ve AMAÇ	1
BÖLÜM II	
GENEL BİLGİLER	3
II.1. GLUTATYON (GSH)	3
II.1.1. Glutatyonun Yapısal Özellikleri ve Biyosentezi	3
II.1.2. Glutatyon Metabolizması	4
II.1.3. Glutatyon Biyosentezinin İnhibitörleri	9
II.1.4. Glutatyonun Biyolojik Önemi	10
II.1.5. Glutatyona Bağımlı Enzimler	11
II.1.6. Glutatyon Tayin Yöntemleri	14
II.2. GLUTATYON S-TRANSFERAZ	16
II.2.1. GSH-Transferazların Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri	16
II.2.2. GSH-Transferazların Detoksifikasyondaki Önemi ve İşlevi	18
II.2.3. GSH-Transferazın İnhibitörleri	25
II.2.4. GSH-Transferaz Enzimlerinin Klinik Önemi	25
II.2.5. GSH-Transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	26
II.3. AFLATOKSİN	27
II.3.1. Aflatoksinlerin Oluşumu	27
II.3.2. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	29
II.3.3. Aflatoksinlerin Biyolojik Etkileri	30
II.3.4. Aflatoksinlerin Metabolize Edilmeleri	33

	Sayfa No
II.4. SELENYUM	34
II.4.1. Selenyumun Klinik Önemi	35
II.4.2. Selenyum Miktar Tayini Yöntemleri	36
BÖLÜM III	
ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	38
III. KULLANILAN MADDELER	38
III.2. KULLANILAN ALETLER	38
III.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	38
III.2.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler	38
III.3.2. Protein Miktarının Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	39
III.3.3. GSH Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	40
III 3.4. GST Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	40
III.3.5. Selenyum Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	40
III.3.6. Aflatoksin B ₁ Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	41
III.3.6.1. Aflatoksin Standartlarının Hazırlanması	41
III.4. ÇALIŞMA MATERYALİ	42
III.4.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması ve Örneklerin Hazırlanması	42
III.5. YÖNTEMLER	43
III.5.1. Doku Homojenizasyonu	43
III.5.2. Protein Miktarının Ölçümü	43
III.5.3. GSH Miktar Tayini	44
III.5.4. GST Aktivitesinin Ölçülmesi	45
III.5.5. Selenyum Miktar Tayini	45
III.5.6. Aflatoksin B ₁ Miktar Tayini	46
III.5.6.1. HPLC Yönteminin Çalışma Prensibi	46

	Sayfa No
III.5.6.2. HPLC Alet ve Ekipmanı	47
III.5.6.3. Örneklerin HPLC'ye Uygulanabilir Hale Getirilmesi	47
III.5.6.4. AFB ₁ Miktarının Hesaplanması	48
III.5.7. İstatistiksel Değerlendirme	48
BÖLÜM IV	
BULGULAR	49
BÖLÜM V	
TARTIŞMA ve SONUÇ	60
ÖZET	68
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	84

GİRİŞ ve AMAÇ

CCl_4 (karbontetraklorür), hepatotoksik özellikleri iyi bilinen bir hidrokarbon bileşiğidir ve sıçanlar üzerinde CCl_4 uygulamasının karaciğer glutatyon (GSH) ve GST (Glutatyon S-transferaz) enzimlerinin düzeylerini etkilediği bildirilmektedir (23, 37, 64). Bilindiği gibi GSH hücre sel detoksikasyon olaylarında önemli görevler üstlenen bir tripeptid'dir (33). GST'lar ise glutatyonun konjugasyona girdiği pek çok bileşiği substrat olarak kullanan çok fonksiyonlu bir enzim grubunu temsil etmektedir (41) ve CCl_4 'ün detoksikasyonunda GST'ların doğrudan bir ilişkisi bulunmadığı düşüncesi ileri sürülmektedir (37).

CCl_4 'den nitelik olarak farklı olmakla birlikte karaciğer üzerinde toksik etkileri kesin olarak belirlenen Aflatoksin B_1 (AFB_1) ise *Aspergillus flavus* genusunun hepatokarsinojenik bir metabolik ürünüdür (31). Organizmaya temel giriş yolu besinler olan AFB_1 üzerindeki detoksikasyon çalışmalarında AFB_1 - GSH konjugasyonunun önemi vurgulanmaktadır (15, 40, 58).

Ayrıca metabolizması tam olarak bilinmeyen bir iz element olan selenyumun GSH ve GST'lar ile ilişkilerine dikkati çeken yayınlar bulunmaktadır (27, 55, 78).

Bu çalışmada, CCl_4 ve AFB_1 gibi karaciğer üzerinde toksik etkileri bilinen iki bileşik seçilerek deneysel olarak sıçanlarda karaciğer hasarı oluşturmak ve iç içe bir ilişki sergileyen GSH, GST'lar ve Selenyumun düzey-

leri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca fenobarbital (PB) gibi özellikle GST'lar üzerinde indüksiyon etkisi bilinen bir bileşikde bazı deney gruplarına uygulanarak karşılaştırma olanağı sağlanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen sonuçların kontrol grubu ile karşılaştırılarak ilgili yayınlar ışığında tartışılması ve özellikle hücresel işlevleri çok iyi bilinmeyen selenyumun üzerinde durulmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. GLUTATYON (GSH)

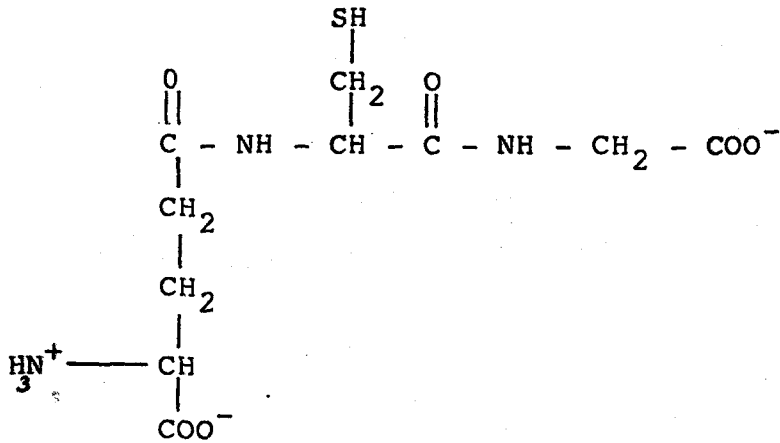
Glutasyon (gamma-glutamil-sisteinilglisin) adıyla bilintriptidin yapısını aydınlatmak amacıyla yapılan ilk çalışmalar 1890 yıllarına dayanır (79).

İlk kez, de Rey-Pailhade tarafından, Philothion olarak adlandırılan glutasyon, RH_2 formülü ile gösterilmiştir. 1907 yılında Heffter, R'nin sistein olabileceğini ve tiyol taşıyan bu bileşiğin hücre sel oksidasyon olayları için önemli bir fenomen olduğunu ifade etmiştir. 1921 yılında ise Hopkins, bileşiği Glutasyon şeklinde isimlendirerek, glutamat ve sistein'den oluşmuş bir dipeptid olduğunu belirtmiştir (79).

Glutasyonun bu gün bilinen tripeptid yapısı, 1929 yılında Hopkins ve kendisinden bağımsız olarak Kendall ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. 1935 yılında ise Harington ve Mead glutasyonu laboratuarda sentezlemeyi başarmışlardır (47).

II.1.1. GSH'ın Yapısal Özellikleri ve Biyosentezi

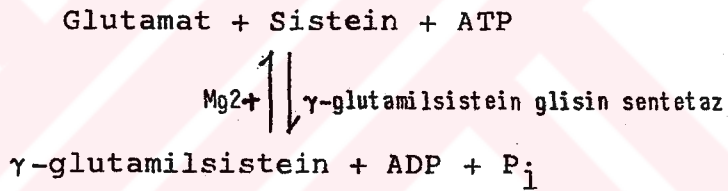
GSH bütün canlı hücrelerinde 0.1-mM derişiminde bulunur (74). Glutasyon molekülü, gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu şeklinde iki kısımdan meydana gelmiştir (Şekil 1).



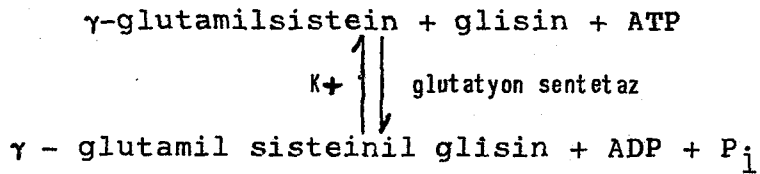
Şekil 1. GSH Molekülü

Glutatyon biyosentezi, aşağıda gösterildiği gibi, iki aşamada sitozol içerisinde meydana gelir:

(1)



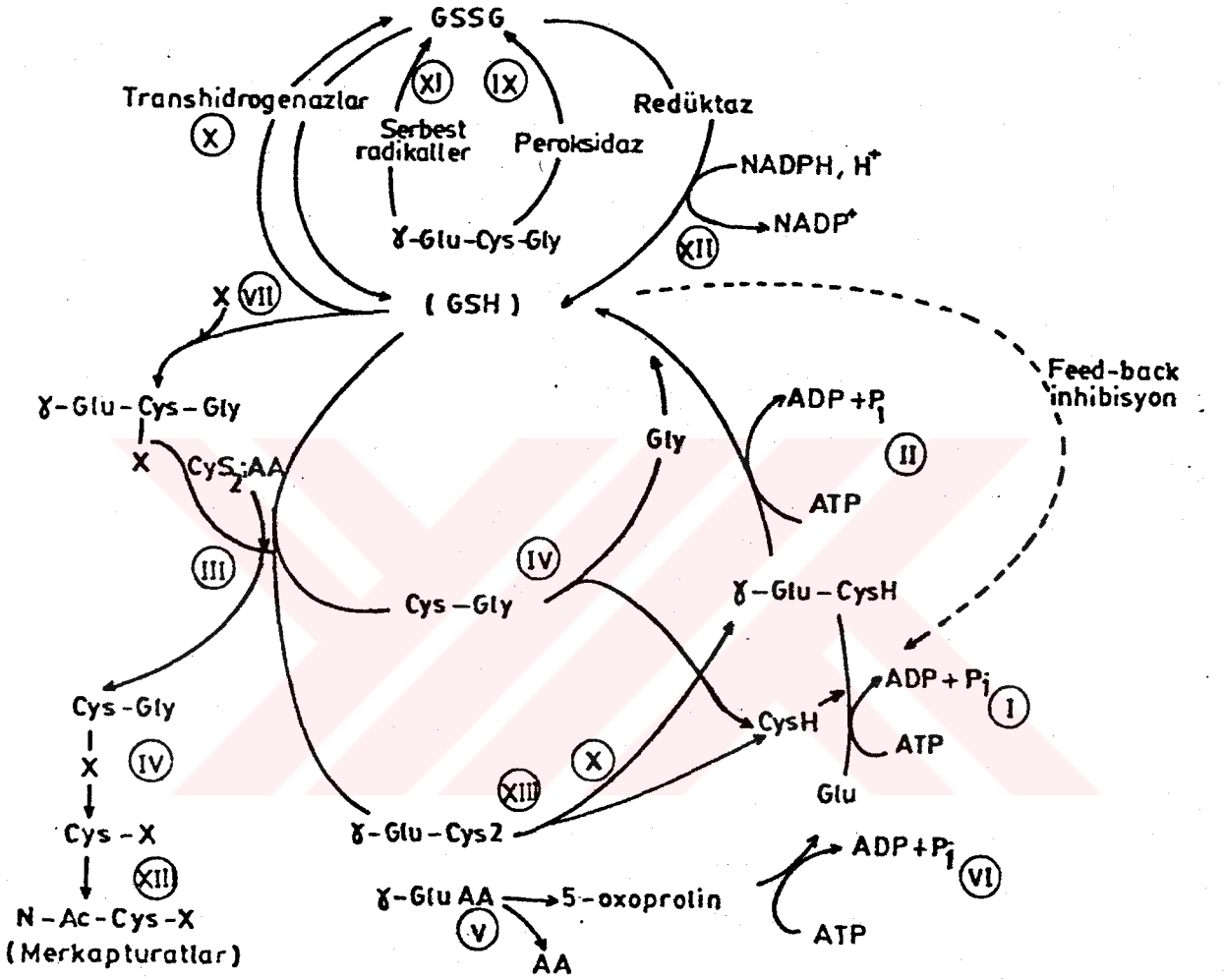
(2)



Glutatyon, doku ve hücre içi düzeylerinin düzenlenmesi amacıyla, γ -glutamil sistein sentetazı, non-allosterik feedback inhibisyon yoluyla, kontrol etmektedir (76).

II.1.2. Glutatyon Metabolizması

GSH metabolizması genel olarak aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Şekil 2) (79).



Şekil 2. GSH Metabolizması

AA: Amino Asitler, X: GSH ile konjugat oluşturan bileşikler
 I: γ -glutamil sistein sentetaz, II: GSH sentetaz, III. γ -glutamil transpeptidaz, IV: Dipeptidazlar, V: γ -glutamil siklotransferaz
 VI: 5-oksoprolinaz, VII: GSH transferaz, VIII: N-Asetiltransferaz
 IX: GSH peroksidaz, X: GSH tiyol transferaz, XI: GSH ile reaksiyona giren serbest radikaller, XII: Glutatyon disülfid (GSSG) redüktaz, XIII: γ -glutamil (sistein)₂ taşınımı

GSH'in sentez ve yıkımını gösteren genel reaksiyonlar (I-VI) arasındadır. Meister döngüsü olarak da bilinen gammaglutamil döngüsü ile amino asitlerin hücre zarlarından transportu sağlanır. Prolin hariç nötral amino asitlerin hücre içine taşınmasının en önemli yollarından biri olan bu döngünün çalışması için enerji gerekir (VI). GSH ve (GSSG ve konjugatlarının) yıkımı membrana bağlı bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz (GGTP) (III) tarafından başlatılır. Bu reaksiyonda γ -glutamil-aminoasitleri, γ -glutamil glutatyon ve glutatyon meydana gelir (V).

Böbrek ve büyük olasılıkla diğer organ hücreleri γ -glutamil aminoasitleri için serbest aminoasitlerden farklı bir transport sistemine sahiptir. γ -glutamil aminoasitleri serbest aminoasitlere oranla böbreğe daha hızlı taşınırlar. Böbreğe ulaşan γ -glutamil aminoasitler, γ -glutamil siklotransferaz (V) ile serbest aminoasitler ve 5-oksoprolin'i oluştururlar. 5-oksoprolin ATP'ye bağımlı bir reaksiyon ile (VI) glutamat'a dönüşür. Bu yolun total aminoasit transportuna relatif katkısı henüz pek çok hücre tipi için açık değildir, fakat γ -glutamil transpeptidaz için en aktif akseptör aminoasidin sistin, daha sonra glutamin ve metiyonin olduğu ifade edilmiştir.

Şekil 2'nin üst bölümünde GSH ve GSSG arasındaki etkileşmelerin yer aldığı reaksiyonlar görülmektedir. GSH'in oksidasyonu (XI) ya enzimatik olmayan şekilde gerçekleşir yada glutatyon tiyol transferaz (X) ve glutatyon peroksidaz (IX) enzimlerinin aktivitelere bağlıdır.

Glutatyon disülfid redüktaz (XII) tarafından katalizlenen reaksiyon ile GSH transferaz enzimleri için substrat, peroksidaz ve tiyol transferazlar için de indirgeyici güç sağlanmış olur.

Glutatyonun okside ve redükte formları (GSSG, GSH) bazı endojen ve eksojen bileşikler ile konjuge olurlar (VII) ve oluşan S-konjugatlarının glutamat kalıntıları γ -glutamil

transpeptidaz etkisi ile uzaklaştırılırken (III) parçalanmayı takiben meydana gelen dipeptid (IV) asetilasyon ile S-substitue bir bileşik olan merkapturat'a (VIII) dönüşür. Merkaptürik asit sentezi olarak da adlandırılan bu metabolik yan yol ile, asetillenebilen bazı ilaçların GSH tarafından zehirsizleştirilmesi sağlanır (24).

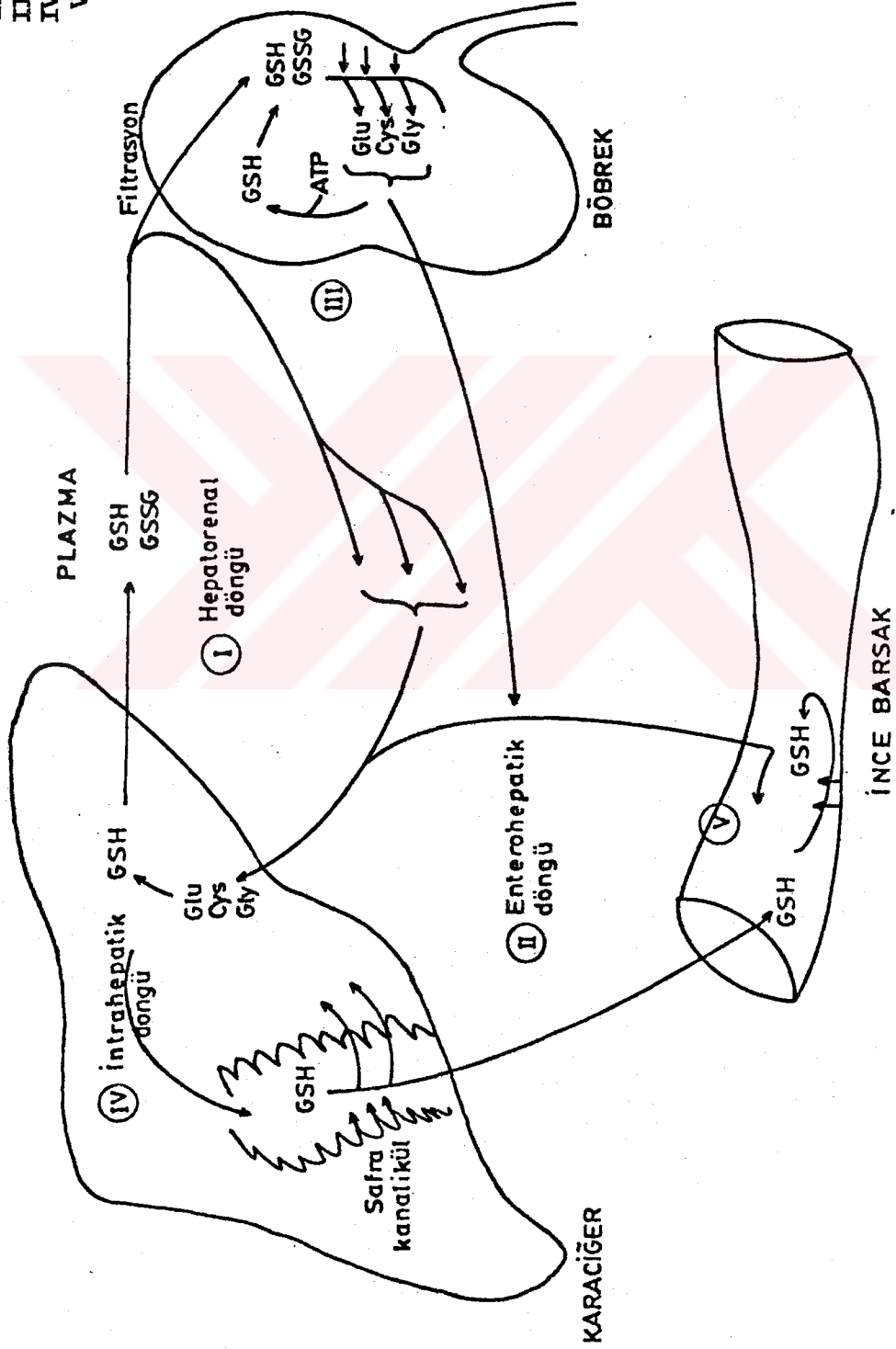
GSH'ın γ -glutamil transpeptidazın doğal substratı olması nedeni ile, dokulardaki düzeyinin düzenlenmesinde enzimin rolü olduğu düşünülmektedir. GGTP aktivitesinin yüksek olduğu bir hücrede sentezlenen glutatyon, enzime doğru hareket eder ve zara bağlı enzim tarafından kullanılır. GGTP aktivitesi göstermeyen bir hücrede sentezlenen glutatyon ise, zarlarında GGTP bulunan diğer hücrelere taşınmak üzere dolaşıma verilir. GSH'ın karaciğerdeki sentezi ve böbrek dokusu GGTP'ı tarafından yıkımı arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge vasıtası ile GSH'ın dolaşımında kararlı düzeyde (steady-state) kalması sağlanır (7).

GSH'ın fonksiyonlarının esasını, membranları oksidasyon ve diğer tipteki hasarlardan korumak amacı belirler. Kan plazmasında glutatyon düzeyleri normalde oldukça düşüktür. fakat salgılanma olayına bağlı olarak interstisyel sıvı GSH düzeyleri periferel plazma düzeylerinden yüksektir (79).

GSH ile ilgili bileşiklerin metabolizması organ içi ve organlar arası döngülerle süreklilik kazanırken, etkili olan organlar arasında karaciğer, böbrek ve ince barsak yer almaktadır (Şekil 3) (79). İntraselüler GSH, böbrek hücreleri tarafından membrana bağlı γ -glutamil transpeptidaz enzimi vasıtası ile dışarı atılır. Plazma GSH düzeyinin artışı, genelde karaciğerden kaynaklanmak ile birlikte, böbrek transpeptidaz aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerin ortak katkısına bağlıdır (24)

Karaciğer, zayıf bir transpeptidaz aktivitesine sahip olmasına rağmen plazma ve safra içine GSH salgılayan temel organdır. GSH sekresyonu bir "carrier-mediated" mekanizma ile meydana gelir (7).

- I . Hepatorenal
- II . Enterohepatik
- III . Böbrekiçi
- IV . İntra hepatic
- V . İntra intestinal



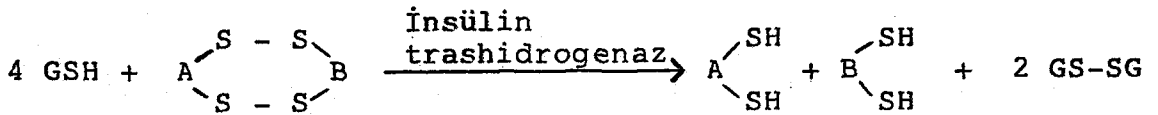
Şekil 3. GSH'in Organ İçi ve Organlar Arasındaki Döngüleri

Bir deneysel gözleme dayanılarak varılan önemli bir sonuçta ise; GSH transportunda görevli γ -glutamil transpeptidaz inhibe edildiğinde glutatyonüri meydana gelmesidir. Ayrıca plazma glutatyon düzeyleri artarken, glutatyon biyosentezinin oldukça azaldığı da bildirilmiştir (79).

Gözdeki lens dokusu glutatyonun en zengin kaynaklarından biridir ve 100 g dokunun 600 mg kadarı glutatyondur. Göz dokusunda glutatyonun oftalmik ve noroftalmik asit gibi bazı analogları az miktarda da olsa bulunur. Glutatyon analoglarında sistein kalıntısının yerdeğiştirmesi sözkonusudur. Oftalmik asitte, sistein α -amino - n - bütirik asit, noroftalmik asitte ise alanin amino asidi, sistein yerine geçmiştir. Diğer glutatyon analogları S-sülfoglutatyon ve S-(α , β - dikarboksi etil) sisteindir; bu tripeptidlerin biyolojik önemleri henüz bilinmemekle birlikte oftalmik asidin glioksilaz enziminin güçlü bir inhibitörü olduğu ifade edilmiştir (76).

Glutatyon, dokularda geniş yayılım gösteren prostaglandin endoperoksit izomeraz enzimlerinin kofaktörü olarak da görev yapmaktadır (3).

Ayrıca, glutatyoninsülin metabolizmasında da yeralır ve önemi insülin transhidrogenaz enzimi ile ilişkisinden gelir. Bilindiği gibi bu enzim karaciğer dokusunda bulunur ve insülinin inaktivasyonunu sağlar. Enzim kataliz sırasında indirgenmiş glutatyon kullanarak insülinin disülfid bağlarını koparır (76).



II.1.3. GSH Biyosentezi İnhibitörleri

GSH biyosentezinde inhibitör etkili bir bileşik olan bütionin sülfoksimin, γ -glutamilsisteinil sentetaz enzimini inhibe etmektedir. Bütionin sülfoksimin, bir konvulsant ajan

ve glutamin sentetaz inhibitörü olan metionin sülfoksimin analogudur. Metionin sülfoksim, γ -glutamil sistein sentetaz enzimini de inhibe eder. Metiyonin sülfoksimin ATP tarafından fosforillenerek enzimin aktif bölgesine irreversibl olarak bağlanmaktadır (79).

γ -glutamil sentetazı inhibe eden diğer bileşikler arasında S-(n-pentil) homosistein sülfoksimin, γ -metilen-D-glutamat sayılabilir (3).

Deneysel olarak farelere bütionin sülfoksimin uygulandığında karaciğer, böbrek ve diğer dokularda hücre içi GSH düzeyleri azalır fakat GSH trnsportu etkilenmez. Uygulama devam eder ise GSH sentezi çok büyük ölçüde inhibe olur. Karaciğer, böbrek, iskelet kası, kalp, akciğer ve lenfositlerde hücre içi GSH'nın azalması iki fazlıdır. Bu durumun mitokondrilerden GSH salgılanışına bağlı olduğu düşünülmektedir. Mitokondrilerden salgılanan GSH buraya sitoplazmadan taşınan GSH'dır. Zira, mitokondri içinde GSH biyosentezini katalizleyen enzimlerin yokluğu nedeni ile GSH sentez edilemez. Ancak, mitokondrilerin normal fonksiyonları için GSH'a gereksinimleri vardır ve GSH düzeylerine karşı duyarlıdırlar (79).

II.1.4. Glutatyonun Biyolojik Önemi (76)

Glutatyonun biyolojik önemi, üstlenmiş olduğu bazı görevlerden ileri gelmektedir. GSH'un biyolojik görevleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yıkımı.
2. Proteinlerdeki (-SH) grubunun korunması.
3. Bazı enzimler için koenzim görevi yapması.
4. Zararlı bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlaması (Aflatoksinin detoksifikasyonu gibi).

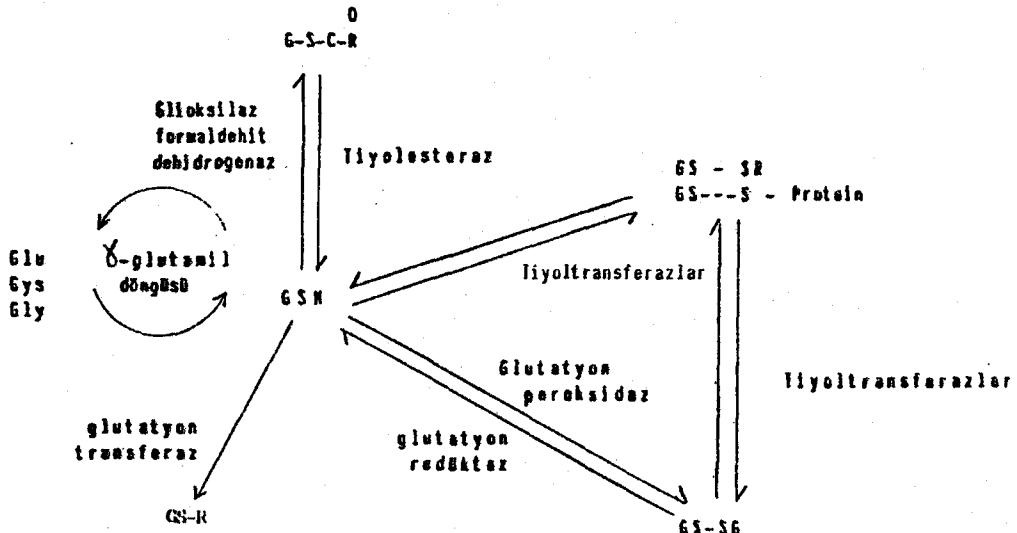
5. Aminoasitlerin membran transportunda rol oynaması,
6. Disülfid değişim reaksiyonlarına katılması.

Lipitlerin polidoymamış yağasit zincirlerinin oksijen varlığında oluşturdukları hücre membranına zarar veren bileşikler hidroperoksitler olarak bilinmektedir. Fakat fosfolipaz enzimi tarafından membran lipidlerinden açığa çıkartılan yağasit hidroperoksitleri GSH tarafından önce alkole indirgenirler, daha sonra lizofosfatidinin yeniden esterleşmesi ile membranın tamiri gerçekleşebilir (79).

Bazı endojen elektrofiller, GSH ile oluşturdukları konjugatları yolu ile fizyolojik açıdan önemli roller üstlenirler. Örneğin, araşidonik asitten lipoksigenaz yolu ile oksitlenerek, lökotrien C_4 'e dönüşür ve parakrin bir hormon gibi davranarak inflamasyonda çok önemli etkilerde bulunur (93).

II.1.5. Glutatyona Bağımlı Enzimler (79,96)

GSH, biyolojik materyallerde indirgenmiş sülfür kaynağı olarak bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle oksijen metabolizması sırasında meydana gelen toksik ve reaktif kimyasal bileşiklerindetoksifikasyonunda GSH ve GSH'a bağımlı enzimlerin önemi büyüktür. GSH'a bağımlı enzimleri genel olarak aşağıdaki şekilde gösterebiliriz.



1. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon redüktazın katalitik aktivitesi GSH biyokimyasının merkezi rolünü üstlenir. Glutasyon redüktaz aktivitesi ile glutasyon biyolojik önemi büyük olan indirgenmiş şekilde tutulabilir. Glutasyon metabolizmasındaki boşluklar eritrositlerdeki bazı metabolik olayları da engeller. Eritrositlerde fosfoglukonat yolu ile glukozun oksidasyonu ile oluşan NADPH'ler hücre içinde GSH'un indirgenmiş halde tutulması için zorunlu faktörlerdir. Glutasyon eritrositlerde aminoasitlerden sentezlenir ve GSH indirgenmiş proteinlerin tiyol gruplarının korunması amacı ile disülfid değişim reaksiyonlarında görev alır. P-S-S-R olarak ifade edilen karışık bir disülfid yapısı, protein ve RSH'ın birleşmesi ile oluşmuştur.

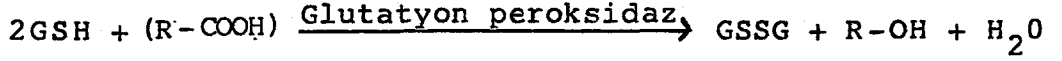
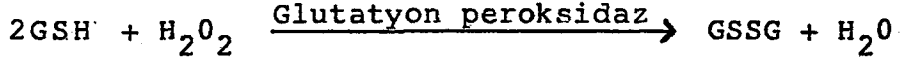


GSSR oksitlenmiş glutasyon da olabilir (GSSG).



Glutasyon redüktaz enziminin katalitik aktivitesi iki reaksiyon ile açıklanabilir: NADPH tarafından enzimin indirgenmesi ve GSSG tarafından indirgenen enzimin yeniden oksitlenmesi. Glutasyonun indirgenmiş durumda tutulmasının dışında glutasyon redüktazın H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve süperoksit anyonu gibi yükseltgen bileşikleri oluşturan redoks döngülerinde de görevi vardır. Redoks döngüsü aromatik nitro bileşikleri varlığında oluşabilmektedir.

Glutasyon peroksidaz enzimi ise, peroksit (H_2O_2) ve yağ asit hidroperoksitleri (R-COOH) karşısında indirgenmiş glutasyonu yeniden GSSG'ye yükseltir.

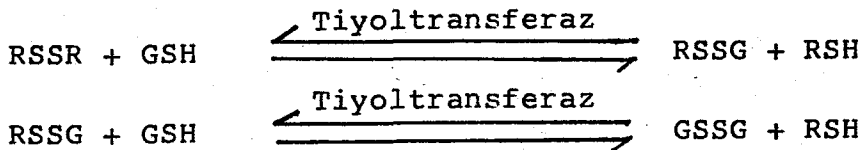


Oksitlenmiş glutatyon da yeniden glutatyon redüktaz tarafından indirgenmiş şekline dönüştürülür.

Glutatyon peroksidaz enzimi molekül ağırlığı 84.000 olan, dört altbirimden meydana gelmiştir. Dört altbirimin bir tanesi selenosistein yapısındadır. Bu yapı, sistein molekülünde kükürt atomlarından birinin yerine selenyum atomu geçmesi ile meydana gelmektedir. Glutatyon peroksidaz, ilk kez eritrositlerde saptanmış olup, GSH ile ilişkisi peroksit ve hidroperoksitlerin glutatyon peroksidaz tarafından oksitlendikleri sırada zarar lipidlerini ve hücre içi Hb'nini korumasından ileri gelmektedir.

2. Tiyoltransferazlar

Oksijen varlığında proteinlerin tiyol grupları oksidasyona hedef olurlar. Tiyol grupları hücre içerisinde daima indirgenmiş durumda tutulurlar. Sistein aminoasidi ve CoA'nın protein sentezi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda bulunmaları gerekir. Disülfidlerin (RSSR) tiyollere (RSH) indirgenmesi glutatyon varlığında meydana gelir:



Oksijen etkisi ile bazı enzim ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksidatif değişiklikleri gerçekleşir. Oksidasyon ya direkt olarak oksijen ile ya da diğer tiyollerin yükseltgenmesi ile oluşan disülfidler ile sağlanır. Örneğin pirüvat kinaz ve fosfofruktokinaz gibi enzimler bu tip istenmeyen

değişiklikler yüzünden inaktive olurlar. Bu enzimlerin oksidatif inaktivasyonunun tiyoltransferazlar varlığında GSH tarafından geri döndürüldüğü bildirilmiştir.

3. Formaldehit ve Gliksilaz I

Formaldehit ve gliksilaz I enzimleri reaktif aldehitlerin inaktivasyonunu katalizlerler. Reaksiyon sırasında glutatyonun tiyol grubu ile aldehit arasında bir tiyohemiasetal türevi meydana gelir. Glutatyon türevi, enzimatik reaksiyon ile bir tiyol esterine dönüştürülür. Bu dönüşümde aldehit grubunun yükseltgenmesi karboksilik asit yükseltgenme düzeyine eşdeğerdir. Serbest karboksilik asitlerin glutatyon tiyolesterlerinin tiyolesterazlar tarafından glutatyonun yeniden kazanılması amacıyla meydana getirildiği ifade edilmektedir. Kinetik çalışmalarına göre glutatyon formaldehit dehidrogenaz enziminin katalitik mekanizmasında esas aktivatör olarak görünmektedir. Spektroskopik çalışmalar, glutatyon türevlerinin proteinde (enzimde) konformasyonel bir değişime neden olduğunu ve yapısal değişimin katalizin esasını oluşturduğunu ortaya koymuştur.

4. Glutatyon Transferazlar

Çalışmamızın konusu olduğu için daha geniş olarak bilgi verilecektir.

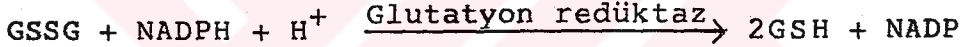
II.1.6. Glutatyon Tayin Yöntemleri (19, 33, 63, 82)

Spektrofotometrik Tayin

Dokularda geniş bir dağılım gösteren ve bazı önemli biyolojik fonksiyonlara sahip GSH ve türevlerinin miktar tayini çalışmaları GSH'un ilk keşfedildiği yıllara kadar dayanır. Glutatyon (GSH) indirgenmiş halde sülfidril ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) olarak da disülfid gruplarına sahip iki şekilde bulunur.

GSH'in sülfidril grubunun asitte çözünür tiyol grubunun enzimatik veya kimyasal işlemler ile ölçülmesi bu bileşiğin miktar tayininin temelini oluşturur.

GSSG'nun miktar tayini GSH'a göre daha güçtür ve bunun nedeni de GSSG'nun normalde hücreler içerisinde ve düşük miktarlarda bulunuyor olmasıdır. GSSG'nun tayini genel olarak GSSG'nun kimyasal, elektrolitik veya enzimatik olarak indirgenip GSH'a dönüştürülmesi ve oluşan GSH üzerinden saptanması esasına dayanır. Enzimatik indirgenme NADH veya NADPH tarafından maya glutatyon redüktazı varlığında oluşturulur. Daha sonra oluşan GSH 2-nitro-5-tiyobenzoik asit ile kromoforik bir bileşik meydana getirir ve bu bileşiğin 412 nm'de spektrofotometrik olarak (ng) düzeyinde bile saptanması mümkündür.



HPLC ile Miktar Tayini

GSH, izokratik ters faz HPLC metodu ile tümör hücrelerinden sağlanan biyopsi materyalinde ölçülebilmektedir. Materyal sülfosalisilat çözeltisi ile ön işlemden geçirilir. GSH için konjugatlarını elde etmek amacı ile monobromobiman kullanılır ve fluorosans özellikli GSH konjugatları ters faz oktadesilsilan kolonundan elde edilir. İzokratik koşullar asetonitril/amonyum fosfat tamponu-tetrabutylamonyum hidroksit ile sağlanır.

Fluorometrik Tayin

GSH ve GSSG'nin fluorometrik tayinini o-ftalaldehit (OPT) gibi bir fluorosans bileşik kullanarak Hissin ve Hilf (44) geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, GSH OPT ile pH 8, GSSG OPT ile pH 12 de reaksiyona girer, GSH N-etilmaleimit ile kompleks meydana getirir, bu durumda GSSG ölçümünde GSH'un girişimi engellenmiş olur. B yöntemde GSH ve GSSG için verim %91-110 oranındadır.

II.2. GLUTATYON S. TRANSFERAZ

1879 yılında Baumann ve Preusse (79) ve ayrıca Jaffé tarafından brombenzil merkaptürik asit'in köpek idrarından izole edilmesi ile dolaylı da olsa Glutatyon S-transferaz enzimlerinin varlığı farkedilmiştir. Çünkü, glutatyonun bazı konjugasyon ürünlerinin en son aşaması olan merkaptürik asit oluşumunda Glutatyon S-transferaz enzimleri görevlidir. GSH konjugatlarının GST'lar tarafından gerçekleştirilen kataliz reaksiyonlarının esasını 1959 yılında Barnes ve diğerleri ve ayrıca Bray'in tanımladığı bildirilmiştir (73). GST'lar 1974 yılında ilk kez Habig ve diğerleri (26) tarafından saflaştırılmışlardır. İlk adı glutatyon S-transferaz B (glutatyon 1-1 ve 1-2) olan GST'ları ligandin adı ile Jakoby 1985 yılında ifade etmiştir (41).

Glutatyon S-transferaz (GSH-transferaz, GST, GST(s), (EC. 2.5.18) ve izoenzimleri, lipofilik yapılı-elektrofilik merkeze sahip çeşitli bileşiklerin GSH ile nükleofilik reaksiyonunu katalizleyen, hücre içinde lokalize olmuş bir enzim grubudur (71).

II.2.1. GSH-Transferazların Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri

GST'lar canlılarda iki şekilde bulunurlar:

1. Suda çözünür
2. Membrana bağlı

GST'lar molekül ağırlığı 22.500 ve 27.700 dalton arasındaki altbirimlerin oluşturduğu dimer yapıları enzimlerdir (71).

GST'ların suda çözünebilir (sitozolik) türünün fiziko-kimyasal, immünolojik, enzimatik ve yapısal özellikleri esas alındığında izoenzimler üç grupta toplanırlar. Bu izoenzimler izoelektrik noktalarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmışlardır GST(s) (35):

1. GST π (asidik, pH \approx 4.8)
2. GST μ (nötral, pH \approx 6.6)
3. GST α (bazik, pH \approx 9.9)

Memelilerde en az yedi izoenzimi tanımlanan GST'ların insan karaciğer dokusunda α ve μ türleri yaygın iken, π türü temel olarak böbrek, plasenta ve fetal karaciğerde bulunur.

GST (s)'lar homo ve heterodimer olarak yedi altbirimden meydana gelirler. GST (s)'ların farklı kromozomlar üzerinde yerleşiminden az üç multigen ailesi oluşturmaktadır (30,35).

GST'da homo veya heterodimer oluşturmak üzere yapıya katılan altbirimler:

Altbirim	1	: Y _a
	2	: Y _c
	3	: Y _{b1}
	4	: Y _{b2}
	6	: Y _n
	7	: Y _p
	8	: Y _k

GSH transferazların aktif merkezi iki alt bölgeden oluşmuştur. G-bölgesi olarak bilinen bölge kısmen hidrofobik olup GSH'u bağlar, ikinci bölge ise, H-bölgesi olarak tanımlanır ve elektrofilik substratları bağlamaktadır.

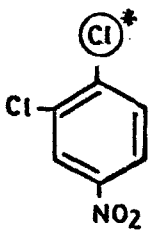
GSH transferaz izoenzimlerine hemen hemen bütün memeli ve omurgalı türlerinde rastlanmıştır. Bitkilerde de GSH transferaz enzim aktivitesi bulunmaktadır. İnsanda GSH transferaz aktivitesi böbrek, karaciğer, adrenal bez, kas, pankreas, testis ve beyinde yüksek iken deri ve eritrositlerde oldukça düşüktür. Ratlarda ise GSH-transferaz aktivitesinin en yoğun olduğu dokuların karaciğer ve daha sonra testis, böbrek ve beyin olduğu belirtilmiştir (22,60,73).

II.2.2. GSH - Transferazların Detoksifikasyondaki Önemi ve İşlevi

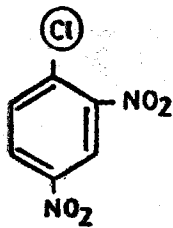
GST (s)'lar sitozolik II. faz detoksifikasyon enzim grubu içinde yer alırlar. Temel olarak, ksenobiyotik bileşiklerin, ilaçların, karsinojenlerin, pestisit, herbisit gibi çevre kirleticilerin detoksifikasyonundan sorumludurlar (73).

GST (s)'lar ilaçlar, steroid hormonlar, safra asitleri ve bilirubin gibi lipofilik bileşikleri bağlayarak hücre içinde taşıyıcı ve bağlayıcı proteinler olarak da görev yaparlar (57).

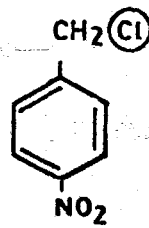
GST (s)'ların reaksiyona girdiği substratlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 5) (26).



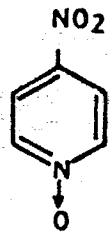
(1,2-dikloro-4-nitro) benzen



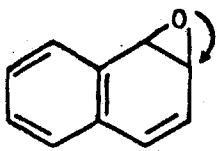
(1-kloro-2,4-di-) nitrobenzen



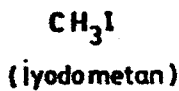
(p-nitrobenzil) klorür



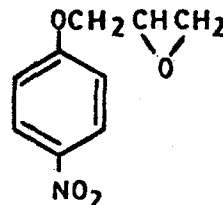
(4-nitropiridin-N-oksit)



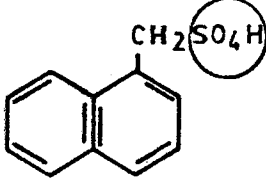
(1,2 naftalenoksit)



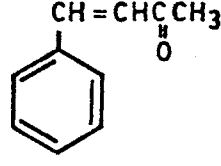
(iyodometan)



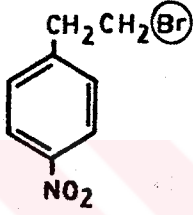
(1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan)



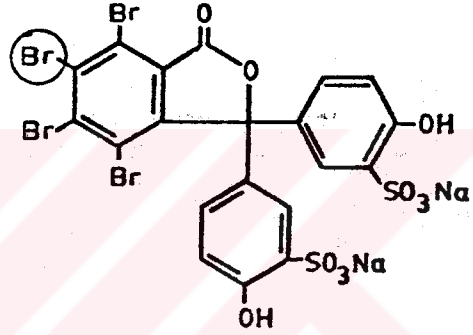
(1-menaftil sülfat)



(trans-4-fenil-3-buten-2-on)



(p-nitrofenetil bromit)



(Bromsülfotalein)

Şekil 5. GST'lerin reaksiyona girdiği gruplar

(*) Daire içine alınan gruplar bileşikten ayrılan grubu, oklar ise GSH'un alken ve epoksitlere katıldığı bölgeleri ifade etmektedir.

GST'lerin katalizlediği temel reaksiyonlar arasında nükleofilik yerdeğiştirme, oksiran halkasının nükleofilik açılımı, polarize çift bağlara Michael katımı gibi reaksiyonlar yer almaktadır (73).

<u>Reaksiyon Tipi</u>	<u>Substrat</u>
1. Michael Katımı	N-asetilbenzokinonmin 4-hidroksinon-2-enal
2. Oksiran halkasına atak	1-nitropiren-4,5 oksit
3. Nükleofilik yerdeğiştirme	Brom izovalerilüre İyodometan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
4. Organik hidroperoksitin indirgenmesi	Linoleik asit hidroperoksit 5-hidroperoksimetil-urasil
5. Organik nitratın indirgenmesi	Nitrogliserin ve türleri

Reaksiyonları katalizleme açısından GST izoenzimleri farklılıklar gösterirler. GST (α) grubu yüksek peroksidaz aktivitesine sahip olduğu için organik hidroperoksitler ile reaksiyona girerler. GST (μ) izoenzimleri ise çeşitli epoksidasyon reaksiyonlarına ilgi duyarlar. GST (π) türü için ise henüz reaksiyona girmeyi tercih ettikleri özgün bir gruptan sözedilememektedir (26).

GST'lar ile reaksiyona giren bileşikler arasında N-asetil, p-benzokinonimin, Aflatoksin B₁-8,9-oksit (AFB₁), benzo-piren-4,5-oksit, α -bromizovalerilüre de yer almaktadır. Bu bileşikler, karsinojenler ve ilaçlar tarafından oluşturulmuş elektrofilik bileşiklerdir ve GST'lar yardımı ile zehirsizleştirilirler (73).

Bazı endojen elektrofiller sitotoksik veya genotoksik etki göstermektedirler. Örneğin mutajenik bir bileşik olan kolesterol oksit GST (s) tarafından zararsız hale getirilir. Polidoymamış yağ açıl hidroperoksitlerin ayrışmasından oluşan hidroalkenaller de GST (s) için güçlü substratlardır (16).

Ayrıca prostaglandin H₂, Lökotrien C₄, trinitrogliserin gibi bazı kimyasal mediatörlerin biyosentezlerinde GST (s)'lar görev yapmaktadır. Lökotrien A₄'ün GSH konjugasyonunu Glutatyon

s-transferaz katalizler ve Lökotrien C_4 meydana gelir (50).

GSH ile konjugasyona girerek GST'lar için substrat olarak ortaya çıkan ksenobiyotik elektrofilik bileşikleri kısaca özetlemek gerekirse (73):

1. Kimyasal sanayi ürünleri

a. Plastik sanayi ürünleri: Vinil klorür ve stiren oksit

b. Pestisit ve herbisitler: Alaklor, diazinon, atrazin

c. Boya endüstrisinde kullanılan aromatik aminler

2. Farmasotik Ürünler : Parasetamol, melfalan, karmustin, misanidazol.

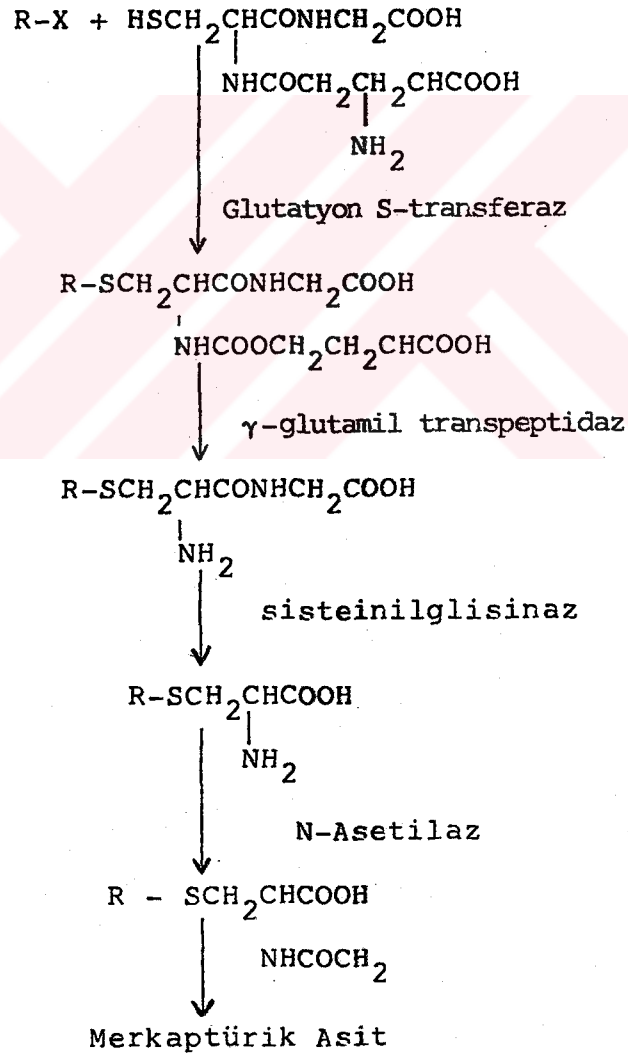
3. Petrokimyasal ve diğer organik madde kaynaklı çevre kirleticiler: Benzo [a] piren, 2-naftilamin.

4. Doğal Ürünler : Kateşoller, aflatoksin, aminoasit piroliz ürünleri, lipid oksidasyon ürünleri.

GSH transferazlar, Se-bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesine sahiptirler. Bu özellikleri ile lipid ve nükleik asit hidroperoksitlerinin zehirsizleştirilmesinde önemli görevleri vardır. Selenyum yokluğu, bütün GSH transferaz altbirimlerini indükler. Selenyum'a bağımlı GSH peroksidaz düzeyleri azaldığında veya Se içeren toksik diyet uygulamasında da Se'dan bağımsız olarak GSH peroksidaz düzeyleri kompensasyon amacı ile artar (73).

Glutatyon-S-transferazlar karaciğerde bilirubin ile bağlı halde bulunurlar (79). Lökotrien A_4 'ün (LTA_4) Lökotrien C_4 'e (LTC_4) değişimi glutatyon S-transferaz enzimi ile sağlanır. Bu reaksiyon bazofil, mast, lökosit ve duyarlı akciğer hücrelerinde gösterilmiştir. LTC_4 anafilaksinin yavaş ilerleyen bileşiğidir ve bir eikozatetraenoik asit-glutatyon konjugatıdır (76).

Glutatyon S-transferazlar, bazı bileşiklerin glutatyonun (-SH) grubu ile reaksiyonunu katalizleyerek elektrofilleri nötralize ederler, suda çok çözünen konjugatlarını meydana getirirler. Glutatyon konjugatları, glutamat ve glisin kalıntılarının parçalanması ile metabolize olur en, sisteinil kalıntısının asetilasyonunu takiben son ürün olarak merkaptürik asit meydana gelir. Merkaptürik asit, N-asetilsisteinin S-alkil türevidir. Bu durumda GST'lara merkaptürik asit oluşumunun ilk enzimatik aşaması da denmiştir (26) (Şekil 7).

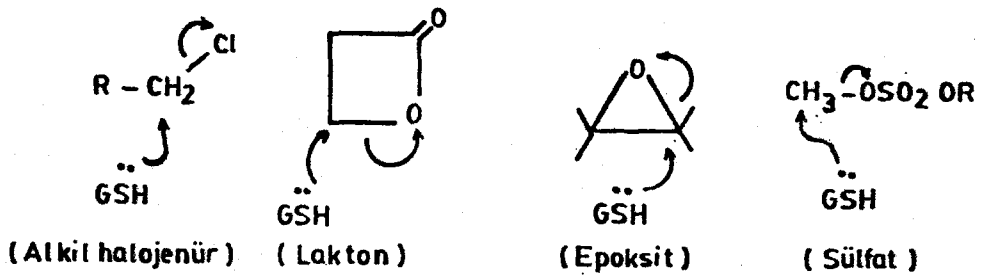


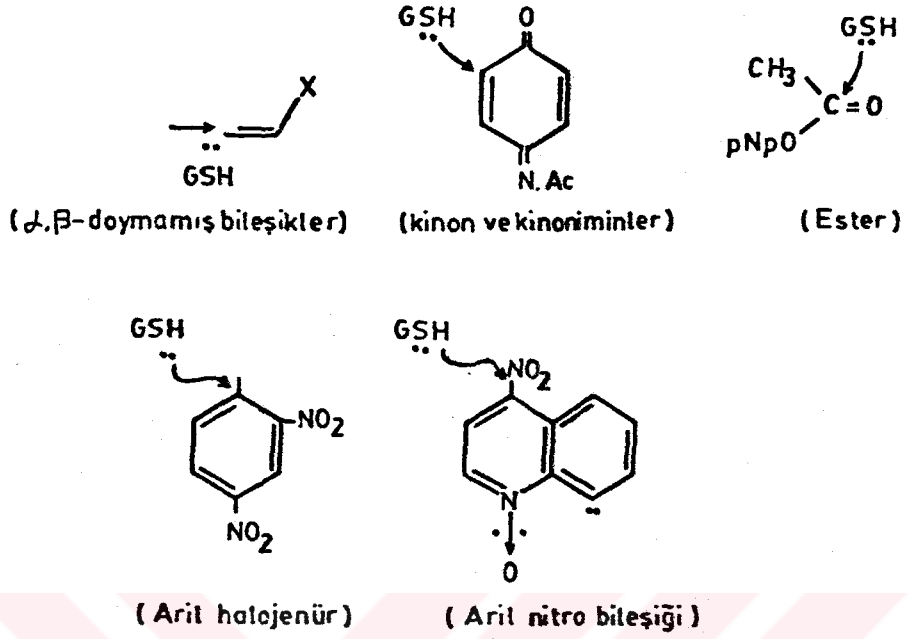
Şekil 7. Merkaptürik asit oluşumu

Detoksikasyon reaksiyonlarında, GST'in substratı olan bileşikler, P-450'ye bağımlı monooksijenaz sisteminin etkisiyle oluşan metabolitlerdir (79). Alkilleyici kemoterapötik bileşiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerde GST'dir. Ayrıca, nitrojen mustard, alkil sülfonat, aziridin, nitrozüre gibi bu tip bileşiklerin fonksiyonel olmadan önce metabolik aktivasyon işlemlerinden GSH sorumludur. GSH'un detoksifikasyon işlemlerindeki önemi, iki amaca yöneliktir: çok reaktif elektrofillerin uzaklaştırılması ve lipofilik bileşiklerin çözünürlüğünü artırmak (73) (Şekil 8).

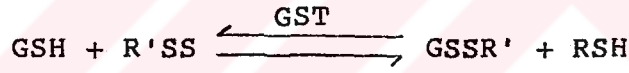
GST'lar peroksidazlar gibi fonksiyon göstererek mitomisin C, adriamisin-bleomisin karbon tetraklorür (CCl_4) ve X, γ radyasyonuna karşı hücre membranlarını hasardan korurlar. Membran peroksidasyonuna neden olan reaktif alken ve aldehitlerin detoksifikasyonundan da GST'lar sorumludur (73). Ayrıca, bir DNA hidroperoksidi olan indirgen timin hidroperoksitin DNA'ya peroksidatif zararını engelleyici bir rol üstlenmiştir, bu açıdan bakıldığında GST'lar DNA tamir edici enzimlerin yeni bir sınıfı olarak düşünülmektedir (78). Tüm bu fonksiyonlarının yanı sıra GST'ların metal ve antibiyotiklerin detoksifikasyonlarında kovalent olmayan ligand etkileşmeleri şeklinde görevli olabilecekleri ifade edilmektedir (73).

GST'ların GSH-konjugasyonunu katalizlediği reaksiyonlara katılan gruplar ve reaksiyon şekilleri (Şekil 8) (73):





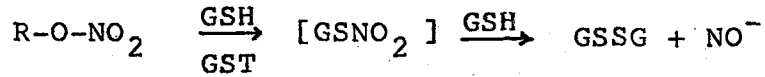
- Disülfid değişimi reaksiyonu:



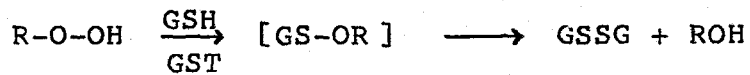
- Tiyosiyanatlar ile reaksiyonu:



- Azot (nitro) grubu reaksiyonu:



- Organik hidroperoksitler ile reaksiyonu:



Şekil 8. GST'ların GSH konjugasyonunu katalizlediği reaksiyona katılan gruplar

İlaçların detoksifikasyonunda GST'ların, hücre içindeki düzeylerini düzenleyen en önemli faktör baskı-yanıt mekanizmalarıdır (stress-response mechanism). GST düzenleme çalışmaları genellikle karaciğer üzerinde yoğunlaşmıştır ve karaciğer dışındaki enzim düzeyleri konusundaki bilgiler pek açıklayıcı değildir. Hepatik GST düzeylerini etkileyen faktörleri şu şekilde belirtmek mümkündür (73): Dış kaynaklı indirgen bir ajana maruz kalmak, hormonlar, interferon ve lenfokinler.

Hepatik GST düzeyini etkileyen ajanlar arasında GST substratları, kimyasal karsinojenler, tümör promoter'ları sentetik fenolik oksidanlar ve iz elementler de bulunabilir. Bu konuda, iyi bilinen indükleyiciler ise 3-metil kolantren, 2-asetilaminofloren, fenobarbital, dietilnitrozamin ve trans-stilben oksit'tir (6).

II.2.3. Glutasyon S-Transferazın İnhibitörleri

GSH S-transferaz aktivitesi bir dizi endojen ve eksojen bileşiğin inhibitör etkisine duyarlıdır. Eksojen bileşikler arasındaki trialkil kalay tuzları, tetrabromsülfoftalein sayılabilir. İn vivo olarak enzim aktivitesini modüle eden bileşikler arasında ise hematin, safra tuzları, doymamış yağasitleri ve lökotrien C yer almaktadır (73).

II.2.4. GSH-Transferaz Enzimlerinin Klinik Önemi

GST izoenzimlerinin genetik yoksunluğunun, bazı riskleri beraberinde getirdiği ifade edilmiştir. Örneğin, Kafkas toplumunda %50 gibi bir oranda GST- μ izoenziminin yokluğu saptanmıştır. Bu izoenzim gerçekte güçlü bir mutajen epoksit olan trans-stilben oksidin detoksifikasyonunda etkilidir. Genetik olarak GST- μ izoenzimi açısından yetersiz kişilerin sigara kaynaklı akciğer kanseri riski altında bulunduğu ifade edilmektedir (90). Ayrıca, dokulardaki malignansi ile GST- μ serisi arasında bir ilişki vardır. Örneğin, rat GST-P veya

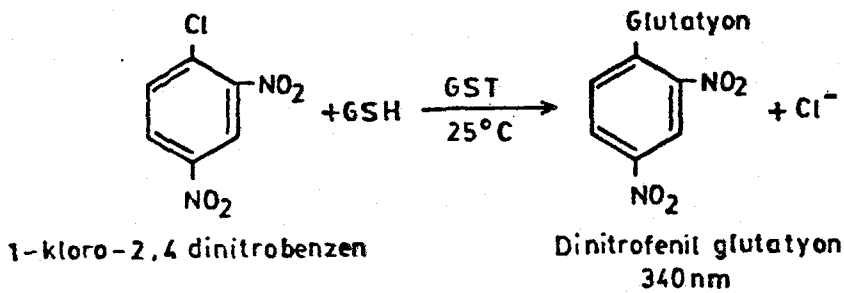
diğer adı ile Y_p rat hepatomaları veya hiperplazik nodüllerinde yüksek düzeyde bulunurken, normal karaciğerlerde böyle bir durum sözkonusu değildir. Benzer şekilde, insanda GST- π serisinin hepatomalar, barsak ve mide tümörlerinde düzey yüksekliği sözkonusu olmuştur. GST- π türünün serumda analizi henüz rutin olarak çalışılmamakla beraber, bu izoenzimin serum analizinin ovaryum tümörleri, akciğer adenokarsinom'u ve mide-barsak tümörleri için potansiyel bir tümör marker'i olabileceği ifade edilmektedir (34, 47, 57, 60, 85).

II.2.5. GSH-Transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

1. Spektrofotometrik Yöntem (25,26):

Glutatyon S-transferaz aktivitesi, Habig ve diğerlerinin (34), geliştirmiş olduğu spektrofotometrik yöntem ile saptanabilmektedir. GST enzim aktivitesinin tayini, GST'a özgül substrat'ın, GSH ile konjugasyonu, sonucunda oluşan bileşiğin renk şiddetinin ölçülebilmesi temeline dayanır.

GST enzimlerinin fiziksel özellikleri ve substrat özgülükleri farklıdır. GST aktivite tayininde temel olarak, 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) kullanılmak ile birlikte, 1,2-dikloronitrobenzen, 4-nitropiridin-N-oksit, p-nitrobenzil klorür, 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan etakrinik asit gibi substratlarda kullanılabilir (Şekil 9).



Şekil 9. GST Miktar tayini

2. İmmünoradiyometrik Ölçüm (35):

GST'lerin aktivite tayinini serum ve doku örneklerinde radyoimmünassay ile yapmak mümkün olmuştur. Önce serum GST(π) enzimleri immünabsorbsiyon ile saflaştırılarak anti-GST π antikorları elde edilmiş ve kloramin T metodu ile iyotla işaretilenip, jel filtrasyon ile saflaştırmayı takiben gamma sayıcıda ölçümler yapılmıştır. Radyoimmün ölçüme geçmeden önce saflaştırmaları anyon değiştirici kromatografi ile de yapmak mümkün olmuştur.

II.3. AFLATOKSİN

II.3.1. Aflatoksinlerin Oluşumu

İnsanlar, ilk çağlardan bu yana yiyecekleri olgunlaştırmak amacı ile küflerden yararlanmışlardır. Doğada geniş bir yayılım gösteren küflerin, bir kısmı saprofit, bir kısmı parazit, bir kısmı da simbiyotik bir yaşam içersindedirler. Günümüzde küflerden olumlu yönde yararlanım sürerken aflatoksin gibi bazı küf bileşiklerinin insan sağlığını tehdit ettiği ortaya konmuştur (61).

Genelde mikotoksin olarak isimlendirilen bu bileşikler, küf mantarlarının madde değişimi ile oluşan sekonder bileşikleridir ve özel olarak oluşturuldukları küfe göre adlandırılırlar (13).

Aflatoksinler bilinen en toksik mikotoksinlerdir ve *Aspergillus Flavus* ve *Aspergillus Parasitikus* gibi küf mantarlarının ürettiği bileşiklerdir. Aflatoksin adı, *Aspergillus Flavus*'un A ve F harflerinden türetilmiştir (38). Bu gün toplam on üç ayrı Aflatoksin tanımlanmış olmasına karşın, bunlardan önemli olanları şöyle sınıflandırılabilir:

- a. Major Aflatoksinler : AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂
 b. Metabolitleri : AFM₁, AFM₂, Aflatoksikol

Aflatoksinler, özellikle hububat, yağlı tohumlar (fındık, fıstık, ceviz, badem, antep fıstığı, pamuk tohumu), pirinç, mısır, peynir, uzun süre dayanıklı et ürünleri ve yemlerde oluşur (1). Besinler, özellikle hayvansal kaynaklı olanlar, aflatoksinle direkt kontaminasyon yada uygun olmayan saklama koşulları nedeniyle aflatoksin bileşiklerine sahip olurlar (38).

Aspergillus Flavus'un toksikojenik türü 365 nm UV lamba altında mavi floresans veren AFB₁ ve AFB₂'yi, Aspergillus Parasitikus'un toksikojenik türü aynı dalga boyunda yeşil floresans veren AFG₁ ve AFG₂'yi üretmektedir (18). Toksin oluşumu için gerekli optimal şartlar şu şekilde sıralanabilir (13, 38):

1. Yüksek oranda karbohidrat içeriği
2. Yüksek ortam sıcaklığı: Optimal sıcaklık 28-32 °C arasındadır, sıcaklık 20°C'nin altına düştüğünde toksin üretimi durur.
3. Relatif nem: %85-99 arası atmosfer nemi toksin üretimi için uygundur. Nem %80'nin altına düşünce üretim azalır.
4. pH: 5 değeri optimal düzeydir.
5. Aerobik koşullar: Ortamdaki oksijen miktarı azaltılıp, karbondioksit miktarı arttırılınca aflatoksin üretimi azalır.

Aflatoksin oluşumunda bölgesel özellikler önemlidir. Ilık ve nemli bölgelerde, sosyo-ekonomik düzeyi düşük yörelerde küfler kolayca oluşabilmektedir. Primer karaciğer kanseri oranı bu bölgelerde yaşam düzeyi yüksek bölgelere oranla 500 kat daha fazladır. Aflatoksinlerin en fazla görüldüğü yerler Uzak Doğu ve Güney Afrika Ülkeleridir (21).

Ayrıca besinlerdeki protein, lipid ve A vitamini düzeylerinin aflatoksinlerin etkilerinde rolü olduğu da bildirilmiştir. Besinlerdeki düşük lipid oranı akut toksisiteyi azaltırken, kanserojen etkiyi arttırmakta, düşük protein oranı ise akut toksisiteyi arttırmaktadır (62).

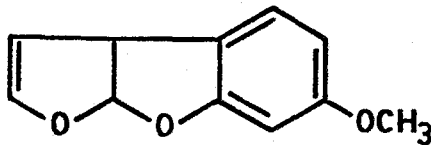
II.3.2. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (21)

1. Fiziksel Özellikler: Erime noktalarının üzerine çıkıldığında bozulurlar. Nemli ortamda, nem oranı ve sıcaklığa bağlı olarak parçalanma ürünlerine dönüşürler. Aflatoksinlerin hepsi kuvvetli alkali ve yükseltgen maddelerle dönüşümsüz olarak değişmektedirler. Su ve petrol eteri dışında kloroform, etanol, metanol, benzol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi polar çözücülerde kolayca çözünürler.

2. Kimyasal Özellikler: Bütün aflatoksinler ortak olarak yapılarında bifuranokumarin halkası taşırlar. Bu halkaya bağlı olan substitüente göre iki bölümde incelenebilirler (Şekil 10).

a. Siklopentanon halkası taşıyan B grubu aflatoksinler: AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFB₂ (Şekil 11).

b. Lakton halkası taşıyan G grubu aflatoksinler: AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}, AFGM₁ (Şekil 12).



Şekil 10. Bifuranokumarin (furan furan kumarin) yapısı

oluşan dihidrofurofuran halkası taşıyan AFB₂ ve AFG₂, AFB₁ ve AFG₁'e göre daha az toksiktir. Aflatoksinler içerisinde en toksik olanı AFB₁'dir. AFB₁ toksisitesi 1 kabul edilirse, diğer aflatoksinlerin toksisite dereceleri aşağıda gösterildiği gibidir (71,31).

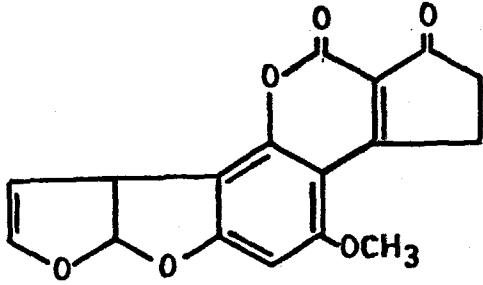
<u>Aflatoksin Türü</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>
AFB ₁	1
AFB ₂	1/4
AFG ₁	1/2
AFG ₂	1/8
AFM ₁	1/2
AFM ₂	1/4
Aflatoksikol	Çok düşük

II.3.3. Aflatoksinlerin Biyolojik Etkileri

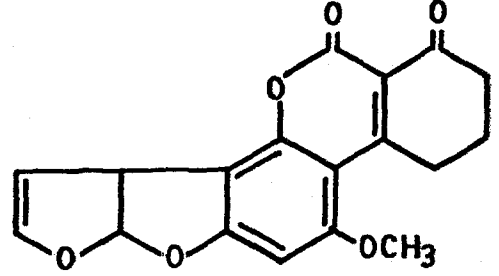
Aflatoksinlerin başlıca biyolojik etkileri arasında; akut toksisite, karsinojenite, mutajenite ve teratojenite yer alır (31).

Aflatoksinlerin organizma üzerindeki biyolojik etkileri; alınan besinlerdeki aflatoksin türü, alınan aflatoksin miktarı ve aflatoksin ile karşılaşma süresi gibi faktörlere göre değişir. Bu faktörlere bağlı olarak yüksek dozlarda, yüksek toksisite oluşturan aflatoksin alımı akut zehirlenmeye yolaçarken, düşük dozlarda dolaylı olarak düşük toksisite oluşturarak bu durum zaman içerisinde kronik zehirlenme meydana getirir (13).

Aflatoksinlerin biyolojik etkilerinin ortaya çıkabilmesi için tür, cinsiyet, yaş ve beslenme durumu gibi organizmaya ait faktörlerin de gözönünde tutulması gerekir. Yapılan hayvan denemelerine göre malnutrisyon, bazı spesifik vitamin



Şekil 11. B grubu aflatoksinlerin ortak yapısı



Şekil 12. G grubu aflatoksinlerin ortak yapısı

AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ orijinal olarak toksik yerkıstıklarından elde edilebilirler: AFB₂, AFB₁'in; AFG₂, AFG₁'in dehidro türevleridir. AFM₁ ve AFM₂ ise AFB₁ ve AFB₂'nin hidrok-silasyonu sonucu oluşan metabolik ürünlerdir. AFM, toksik yerkıstığı yiyen hayvanların ürünlerinden elde edilir, ilk olarak inek sütünden elde edilmiştir, M simgesi de Milk kelimesinin ilk harfidir (13).

Aflatoksinlerin biyolojik aktiviteleri ile kimyasal yapıları arasında şöyle bir ilişkiden sözedilmektedir:

1. Kumarin yapısına bağlı siklopentanon halkası, aflatoksin toksisitesi için gerekli bir parçadır. Siklopentanon halkası taşıyan AFB₁'in, lakton halkası taşıyan AFG₁'e göre daha toksik olması bu durumdan kaynaklanır. AFB₁'in indirgenme metaboliti olan Aflatoksikolde ise siklopentanon halkası hidrok-silasyon ile keton'a dönüşür ve toksisitesi AFB₁'e oranla daha düşüktür (13).

2. Birbirine bağlı iki furan halkası da toksisite için gerekli parçalardır. Bifuran halkasının dehidrok-silasyonu ile

eksiklikleri (A vitamini gibi) ile, bazı iz element eksikliklerinin (çinko gibi) aflatoksinlere olan hassasiyeti arttırdıkları gösterilmiştir (93).

Aflatoksinlerin önemli metabolik etkileri şunlardır (9,31,65):

1. DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu - hipoalbuminemi,
2. Bazı enzim aktivitelerinin inhibisyonu
3. Glukoz metabolizmasının depresyonu
4. Pıhtılaşma faktörlerinin sentezlerinin inhibisyonu
5. İmmünoşpresyon
6. Lipid sentezi ve transportunun inhibisyonu
7. Fibrozis ve safra kanalı proliferasyonuna bağlı olarak karaciğerde lipid dejenerasyonu.

Bir çok hayvan türünde aflatoksinlerin toksik ve karsinogenik etkileri saptanmıştır. İnsanlarda da benzer etkileri olabileceği düşünülmüştür fakat insanlar üzerinde çalışma yapmanın güçlüğü gibi nedenlerle aflatoksinin letal toksik dozunu saptamak mümkün olmamıştır. Başta tropikal bölgeler olmak üzere dünyanın pek çok yerinde bildirilen zehirlenme olaylarının büyük bir kısmında Aflatoksinlerin etiyolojik bir ajan olduğu düşünülmektedir. Etiyolojik bir ajan olarak aflatoksinlerin sorumlu olduğu hastalıklar şöyle ifade edilebilir (48,70,95):

1. Akut hastalıklar: Akut Aflatoksikoz, hepatit olgularında artış, Reye sendromu.
2. Kronik hastalıklar (66): Primer karaciğer kanseri, siroz, kolon ve akciğer kanseri.

Aflatoksin konusunda yapılan en önemli etiyolojik çalışmalar kwashiorkor üzerinde yoğunlaşmıştır. Afrika'da çeşitli ülkelerde kwashiorkor'lu çocukların serumlarında normal ve marasmik çocuklara göre daha sık ve yüksek düzeyde aflatoksin saptanmıştır (31). Bu çocuklarda aflatoksin metaboliz-

ması da bozulmuştur. Kwashiorkor; yiyeceklerin aflatoksinlerle kontamine olabildiği bölgelerde, özellikle de aflatoksin oluşum olasılığının arttığı yağmurlu mevsimlerde sık görülür. Bu hastalık ile aflatoksin arasındaki mutlak ilişkinin nereden kaynaklandığı tartışma konusudur. Tartışılan konu Kwashiorkorda karaciğer fonksiyon bozukluğunun aflatoksin toksisitesine olanak sağlayıp sağlamadığı veya aflatoksinin Kwashiorkor patogeneğinde rolü olup olmadığı şeklindedir (14,31).

Sudan, Gana, Nijerya ve Kenya'da yapılan çalışmalarda anne sütünde aflatoksin saptanma oranı %30 olarak bulunmuş ve bunun da büyük bir kısmının nontoksik AFM₁ olduğu bildirilmiştir (44, 54).

Aflatoksinlerin transplasental geçişi de gösterilmiştir (11). Hamileliği sırasında serumlarında aflatoksin saptanan kadınların bebekleri, aflatoksin saptanmayan kadınların bebeklerine oranla daha düşük doğum ağırlığına sahip bulunmuştur (18).

II.3.4. Aflatoksinlerin Metabolize Edilmeleri (15,36,40,51,73)

Aflatoksin-B₁ (AFB₁), güçlü bir primer hepatoselüler karsinojendir ve karaciğer hücrelerinde, mikrozomal P-450 sisteminde epoksidasyon yolu ile metabolize edilir. Bilinen metabolitleri arasında; AFM₁, AFO₁ ve Aflatoksikol yer alır.

AFB₁'in karsinojenik metaboliti olan AFB₁-8,9 oksit güçlü bir elektrofildir ve hücre içerisinde DNA gibi makromoleküller ile etkileşir. AFB₁-8,9 oksit DNA'da guaninin 7 no'lu azotuna bağlanır. Oluşan yapı kararsız bir bileşiktir ve apürinik bir bölge olarak DNA'dan kopar yada imidazol halkası açık bir AFB₁-FAPy'ye türevine dönüşür.

AFB₁-8,9 oksit metabolitinin GSH ile konjugasyonu çok önemlidir. AFB₁-GS konjugatı, GSH-transferaz enzimleri

için substrat'tır. AFB₁-8,9 oksit-DNA etkileşmesinin karaciğer faz I ve II detoksikasyon enzimlerini uyardığı ve faz II grubunun en önemli enzimleri olan GSH-transferazların AFB₁'in detoksifikasyonundaki önemi açıkça ifade edilmektedir.

II.4. SELENYUM

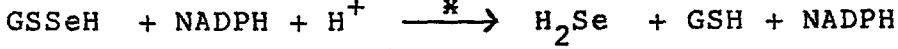
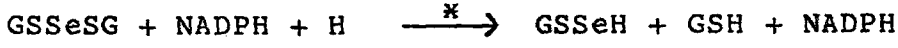
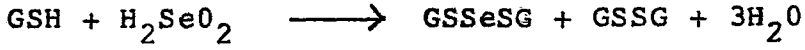
Selenyum (Se) 1930'lu yıllara değin toksik bir element olarak kabul ediliyordu. Ratlar'a kazeinden yoksun proteinli diyet uygulandığında yaklaşık bir ay sonra hepatik nekroz'a bağlı ani ölümler meydana gelmiştir, fakat bazı doğal besinlerin bu olaya karşı koruyucu olduğu gözlenmiş ve içerikleri araştırıldığında selenyum taşıdıkları saptanmıştır (68).

1957 yılında Schwartz ve Foltz (69), karaciğer nekrozuna karşı koruyucu etkili organik bir bileşik olan faktör 3'ün yapısında selenyum'un yeraldığını bildirmişlerdir.

Beyaz ırkta, siyah ırka göre daha yüksek olan selenyum düzeyinin, alkolik kişilerde azaldığı öne sürülmüştür. E vitamini ile ilişkili olarak selenyum içeren diyetin dişlerde meydana gelen sararmaları önlemede etkili olduğu ifade edilmiştir (68). Ayrıca, diyetle yeterli E vitamini bulunduğu durumlarda selenyumun büyüme etkeni olduğu bildirilmektedir. Bu etkisini formikdehidrogenaz enzimi üzerinde gösteren selenyumun, ayrıca immün sistem ve ATP biyosentezindeki önemi de tartışılmaktadır.

Beslenmede esansiyel bir iz element olan selenyumun diyetteki normal miktarı ve toksisitesi arasındaki sınır pek belirgin değildir. Yetişkin bir insanın günlük diyetinde 60 µg selenyum'a gereksinim olduğu belirtilmiştir. Toksik düzey bu değer 10-30 katı olabilir (76). Normal kabul edilen selenyum düzeyleri, tam kanda 58-234 µg/L, serumda 46-143 µg/L ve idrarda 7-160 µg/L'dir (81).

Selenyum'un insanda en fazla bulunduğu dokuların böbrek korteksi, karaciğer, pankreas ve hipofiz bezi olduğunu açıklanmıştır.



* : Glutasyon redüktaz

II.4.1. Selenyumun Klinik Önemi (8, 39, 68, 88, 92)

Bazı selenyum bileşiklerinin memeli hücre gelişmesinde (özellikle tümör hücrelerinde) inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Fakat ilk kez 1956'da hayvanlarda antitümör tedavide Se kullanılmıştır. Selenyum bileşiklerinin fizyolojik ve antiproliferatif etki mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemekle birlikte en önemli antiproliferatif mekanizması GSH ile etkileşmesidir.



Bu etkileşimde meydana gelen selenodiglutasyon (GS-Se-SG) neoplastik hücrelerin gelişmesini inhibe eden en etkin selenyum bileşiği olarak tanımlanmaktadır. GSSeSG memeli dokularında inorganik Se'un oluşturduğu temel metabolit olarak kabul edilir ve glutasyon redüktaz tarafından GSH ve GS-Se⁻'a indirgenirken NADPH yükseltgenir. Ayrıca, selenodiglutasyon ve tiyoredoksin sistemi (Tr(x)SH₂= indirgenmiş tiyoredoksin ve Tr(x)S₂= yükseltgenmiş tiyoredoksin) arasındaki etkileşmelerin memeli hücrelerinde fizyolojik bir düzenleyici mekanizma olabileceği bildirilmiştir. Göğüs kanserlerinde kan düzeyi düşük bulunan Se'nun akciğer ve hematopoetik sistem kanserleri ile ilişkisi olduğu da düşünülmektedir.

Sığır ve koyun kaslarında selenyum taşıyan bir proteinin varlığından sözedilmektedir. Ayrıca, bazı bakteri tRNA'larındaki tiyöürasil kalıntılarında selenyuma rastlanmıştır. Yüksek dozlarının çok toksik olduğu bilinen selenyumun, zengin olduğu topraklarda yetişen bitkilerin metiyonin ve sistein aminoasitlerindeki kükürt ile değişime girmesi sonucu A.B.D.'lerinin bazı bölgelerinde bir halk sağlığı ve tarımsal sorun yarattığı bildirilmektedir. Öteyandan, selenyum içeriği düşük topraklara sahip bölgelerde yaşayan hayvan türlerinde zayıf gelişme, müsküler distrofi gibi E vitamini yetersizliğini hatırlatan durumlar gözlenmektedir (76). GSH-Px gibi peroksit metabolizasyonunda görevli GST'lar selenyuma bağımlı olmayan bir enzim grubudur fakat selenyum eksikliğinin hem GSH-Px, hemde GST'ların aktivitelerini düşürdüğü belirtilmektedir (32).

Toksik bir iz element olarak kabul edilen selenyumun şiddetli yetersizliği durumları, yani kardiyomiyopati olarak bilinen kalp kası dejenerasyonu öldürücü olabilmektedir. Yaklaşık elli yıl önce Çin'de çocuk ve genç kadınlarda tanımlanan Keshan hastalığı selenyum yetersizliğine bağlı miyopatik bir olgudur (94). 500 µg düzeyindeki haftalık selenyum gereksinimi oral olarak sodyum selenit şeklinde karşılandığında Keshan'da miyopati yatkınlığının önemli ölçüde düştüğü bildirilmiştir (49). Selenyum'un ilişkili olduğu diğer patolojik olgular arasında Kwashiorkor, çocuklarda ani-ölüm sendromu, kanser türleri ve multipl sklerozis'in bulunduğu varsayılmaktadır (43).

Se'un biyokimyasal fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte organizmadaki en önemli fonksiyonu glutatyon peroksidaz enziminin (GSH-Px (EC.1.11.1.9) yapısına girmesidir (76). GSH-Px yapısında Se, sistein kalıntılarındaki kükürt atomunun yerine geçerek selenosistein şeklinde bulunmaktadır. Bilindiği gibi GSH-Px hidrojen peroksit'i metabolize eden temel enzimdir. Hücrelerin oksidatif hasardan korunması sırasında aşağıda gösterildiği gibi selenit indirgenirken GSH oksidasyonu ve selenodiglutatyon meydana gelir (GS-Se-SG).

II.4.2. Selenyum Miktar Tayini Yöntemleri

Selenyum miktar tayininde kullanılan yöntemler arasında nötron-aktivasyon analizi, fluorometri ve atomik absorpsiyon spektroskopisi sayılabilir (49,52). Nötron-aktivasyon analizi ise klinik laboratuvarlarda uygulanabilirliği olmayan bir yöntemdir. Selenyum'un atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile tayininde, buhar fazında uyarılmış olan bir atomun yayabildiği dalga uzunluğu yine aynı sıcaklık derecesinde soğurulmaktadır. Atomik absorpsiyon ile selenyum tayininde 10^2-10^{-3} ppm duyarlığında ölçüm yapılabilir ve Dr. Massman tarafından geliştirilen grafit fırın tekniği ile daha güçlenen atomik absorpsiyon spektrofotometresinde Selenyum tayinleri daha iyi sonuçlar vermektedir (28,83).

Selenyum'un fluorometrik tayininde ise selenyum tayin edilecek örneğin asit ile dijestiyonunu takiben selenatın selenit'e indirgenmesi sağlanmakta ve piazselenol kompleksi oluşturularak meydana gelen fluorosansın şiddeti ölçülmektedir (43).

BÖLÜM III**ARAÇ , GEREÇ ve YÖNTEMLER****III.1. KULLANILAN MADDELER**

CCl₄- (Merck, AG-Darmstadt)
AFB₁- (Sigma Chem. U.S.A.)
Fenobarbital (Sigma Chem. U.S.A)
Bovine serum albumine (Sigma Chem. U.S.A.)
Folin-Ciocalteu (Sigma Chem. U.S.A.)
Glutasyon (glutamil sisteinilglisin) (U.S.A.)
GST (Glutathione S-transferase) (U.S.A.)
Selenium standart (Sigma Chem. U.S.A.)
DTNB (5,5'- Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)
CDNM (1-chloro-2,4-Dinitrobenzen) Sigma

Deneylerde kullanılan diğer maddeler amaca uygun saflıktadır.

III.2. KULLANILAN ALETLER

Homojenizatör (Braun-Potter S)
pH metre (Schott CG 840)
Hassas terazi (Sartorius 2442)
Magnetik karıştırıcı (Kottermann)
Santrifüj (Nüvefuj 615)
Ultrasantrifüj (Beckman L2-50)
Spektrofotometre (Shimadzu UV-VIS 160 A)
Fluorometre (Aminco-Bowman)
High pressure liquid chromatography (HPLC) (Varian 500)

III.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER**III.3.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

- 0.1 M Potasyum fosfat tamponu / 0.15 M potasyum klorür çözeltisi (pH: 7.4):

17.418 g K_2HPO_4 ve 13.609 g KH_2PO_4 tartılıp bir miktar 0.15 M potasyum klorür (11.475 g/L) çözeltisinde çözündürülür. Çözeltinin pH'ı NNaOH ile magnetik karıştırıcıda pH: 7.4'e ayarlanır ve 0.15 M KCl çözeltisi ile L'ye tamamlanır.

III.3.2. Protein Miktarının Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler (81)

A. %2 Na_2CO_3 çözeltisi (0.1 N NaOH içinde)

2 g Na_2CO_3 tartılarak 0.1 N NaOH çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

B. %1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisi:

1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ tartılarak su ile 100 ml'ye tamamlanır.

C. %2 Na-K tartarat çözeltisi:

2 g Na-K tartarat tartılarak su ile 100 ml'ye tamamlanır.

D. Protein renk reaktifi:

50 ml B çözeltisine önce 0.5 ml %2 Na-K tartarat çözeltisi, sonra 0.5 ml %1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisi ilave edilerek deney günü taze hazırlanır.

E. Folin-Ciocalteu çözeltisi:

Kullanılacağı zaman 1:1 oranında sulandırılarak hazırlanır.

F. Stok protein standart çözeltisi (%0.05 g sığır serum albümini çözeltisi):

0.05 g sığır serum albümini 100 ml suda çözülerek hazırlanır ve $0^\circ C$ 'de saklanır.

III.3.3. GSH Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler (23)

- 0.1M Fosfat Tamponu: Doku homojenizasyonundaki gibi hazırlanır. 5 mM EDTA çözeltisi ilave edilerek, pH'ı NNaOH ile 8'e ayarlanır.

- 5 μ M DTNB çözeltisi (Ditiyobisnitrobenzen): 99 mg DTNB 500 ml distile su içinde çözülerek hazırlanır.

- GSH Standartları: 20, 50, 75 ve 100 mg/dl GSH olacak şekilde distile suda çözülerek deney gününde hazırlanır.

- 5 mM EDTA Çözeltisi

- %5'lik TCA Çözeltisi (Triklorasetik asit): 5 ml TCA alınır ve distile su ile 100ml'ye tamamlanır.

II.3.4. GST Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler (25)

- 30 mM CDNB (klorodinitrobenzen) Çözeltisi: 1.550 g CDNB 250 ml etanolde çözülerek hazırlanır.

- 30 mM GSH Çözeltisi: 800 mg GSH 100 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

- 100 mM Potasyum-fosfat Tamponu (pH: 6.5): 1.741 g K_2HPO_4 ve 1.360 g KH_2PO_4 distile su içerisinde çözülür ve N NaOH ile pH 6.5 ayarlanır ve L'ye tamamlanır.

III.3.5. Selenyum Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler (43)

1. Diaminonaftalen 2.HCl (DAN) Çözeltisi: 1 L 0.1 HCL çözeltisi içinde 4 g çözülerek deney gününde taze hazırlanır.

2. Buffer Çözeltisi: 1 L'de 7.44 g EDTA, 10 mg brom krezol moru ve 114 ml NH_4OH içerir.

3. 5 M HCl Çözeltisi

4. Derişik NNO_3

5. Sikloheksan

6. $HClO_4$

III.3.6. Aflatoksin B₁ Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler (97)

1. Distile edilmiş mavi bantlı metanol, benzen, asetonitril, aseton.
2. HPLC Çözgeni: Su-Asetonitril-metanol (70-170-170 v/v).
3. Trifluoroasetik asit (TFA): %99'lük.
4. Susuz sodyum sülfat
5. Aflatoksin standartları (10 µg/ml): Benzen-asetonitrilde (98:2) film halindeki stok standartlar 10 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanır.

III.3.6.1. Aflatoksin Standartlarının Hazırlanması (97)

Sıkıca kapatılan standart aflatoksin kabı tüp çalkalayıcıda 1 dk süreyle şiddetle çalkalanır. Hazırlanan standart çözelti ile benzen - asetonitril karışımı 330-370 nm arasındaki dalga boyları taranarak 350 nm civarında en yüksek absorbanı veren dalga boyunda çözeltinin absorbanı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanır. 1.0 mikrogr/ml B₁, B₂ ve 0.5 mikrogr/ml G₁, G₂ konsantrasyonlarından her birinden 1 ml alınır ve 10 ml'lik volumetrik balona aktarılır. Evapore edilir. Kuruluğa kadar azot gazı geçirilerek 100 mikrolitre TFA (trifluoroasetik asit) ilave edilerek toksinler ıslatılır, 30 sn vibratörde karıştırılır. Su - asetonitril karışımı (9+1) ilave edilerek hacim tamamlanır. Çok iyi bir şekilde karıştırılmalıdır.

Hazırlanan bu HPLC standart çözeltisi kullanılmadığı zaman karanlık ve soğuk bir yerde saklanmalıdır.

TFA ilavesi sadece AFB₁ ve AFG₁ toksinlerinin fluoresans şiddetini artırarak pgr seviyesinde ölçülmelerini sağlar. AFB₁, AFB_{2a}'ya ve AFG₁, AFG_{2a}'ya dönüşürler.

III.4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Bu çalışmada, denek olarak seçilen sıçanlarda CCl_4 ve AFB_1 , etkisi ile oluşturulan doku hasarının GSH, GST ve Se ile ilişkilerini araştırmak üzere deneyler yapılmıştır.

DeneySEL çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve İzmir Tarih Ar-Ge'de gerçekleştirilmiştir.

III.4.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması ve Örneklerin Hazırlanması

Denek olarak seçilen ve her biri 225 ± 3 g ağırlığında standart hayvan besi yemi ile beslenen 47 adet Swiss-Albino türü sıçan deneylere sekiz haftalık iken alınmışlardır. Deney süresi sonuna kadar üç hayvan kaybı olmuştur.

I. Grup : Dördü dişi olmak üzere 9 sıçandan oluşmuştur ve bu gruba haftada 2 kez oral olarak 1 ml/kg CCl_4 uygulanmıştır.

II. Grup: Dördü dişi olmak üzere 11 sıçandan oluşmuştur ve bu gruba I. gruba uygulanan dozdaki CCl_4 'ün yanısıra birer hafta ara ile fenobarbitalin %0.1 g'lık dozu eşit miktarlarda günlük içme sularına konulmak sureti ile oral olarak uygulanmıştır.

III. Grup: Biri dişi olmak üzere altı sıçandan oluşmuştur. Bu gruba AFB_1 'in 1 ppm'lik- asetonitrildeki çözeltisi haftada bir kez oral olarak uygulanmıştır.

IV. Grup: Üçü dişi olmak üzere yedi sıçandan oluşmuştur. Bu gruba IV. Gruba uygulanan AFB_1 'nin yanısıra birer hafta arayla fenobarbitalin %0.1 g'lık dozu eşit miktarlarda günlük içme sularına konulmak sureti ile oral olarak uygulanmıştır.

Kontrol Grubu: 14 sıçandan oluşmuştur ve dördü dişidir. Bu hayvanların beslenmelerinde herhangi bir değişiklik uygulanmamış olup, standart koşullar sağlanmıştır.

Sekiz hafta süre ile gruplar izlenmiş ve bu süre içinde birinci gruptan iki ve üçüncü gruptan bir kayıp verilmiştir. Deney süresi sonunda, kloroform anestezisi altında diseksiyon yapılmıştır.

Karaciğer dokuları porsiyonlara ayrılarak, ayrı ayrı koyu renk şişelere gruplandırılarak, -70°C 'de saklanmıştır. Bir kısım doku histolojik inceleme için %10'luk formol çözeltisi içinde saklanmıştır.

III.5. YÖNTEMLER

III.5.1. Doku Homojenizasyonu (77)

Doku parçalarının yaş doku ağırlıkları saptanarak, bistüri ile daha küçük parçalara ayrılmış ve bir miktar distile su ile yıkanmıştır. Homojenizasyon tüpünde işgal ettikleri miktarın dört katı 0.1 M fosfat tamponu ile yüksek devirde 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de homojenize edilmiş ve homojenatlar bekletilmeden $16.500 \times g$ 'de 30 dakika ultrasantrifüje tabii tutularak, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra deney gününe kadar -70°C 'de saklanmıştır.

III.5.2. Protein Miktarının Ölçümü (81)

Bu yöntem, proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüre tepkimesi vermesi esasına dayanır. Peptid bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluşturur. Aynı zamanda protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenir.

Standart olarak %0.05 g sığır serum albümini içeren çözeltiden 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050 ml ve numune olarak doku homojenatından 0.005 ml ayrı ayrı tüplere mikropipetler ile pipetlenir. Hacimleri 0.075 ml'ye su ile tamamlanır. Her bir tübe 1.5 ml protein renk reaktifi eklenir. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Karışımlara 1:1 oranında sulandırılmış Folin-Ciocalteu çözeltisinde 0.15 ml konur ve karıştırılır. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okunur. Kör tüpleri ise numune yerine su konarak hazırlanır ve numunelerle aynı işlemlere tabi tutulur. Sonuçlar mg protein/ml doku homojenatı olarak değerlendirilir.

III.5.3. GSH Miktar Tayini (23)

Santrifüj tüplerine doku homojenat süpernatantından 1 ml alınır ve 4 ml %5'lik TCA ilave edilerek 5 dakika bekletilir. 1000x g'de 15 dakika santrifüjlenir.

		<u>Kör Tüpü</u>	<u>Deney Tüpü</u>
Süpernatant	(μ l)	-	200
Fosfat tamponu	(pH ~8) (ml)	2	2
DTNB çözeltisi	(ml)	0.25	0.25
Distile su	(μ l)	200	-

Yukarıda belirtildiği şekilde çalışılır ve karışımlar 3-4 dakika içerisinde 412 nm'de spektrofotometrede okunur.

GSH Standartları da aynı deney protokolü izlenerek çalışılır ve standart eğri çizilerek, miktar tayini gerçekleştirilir.

III.5.4. GST Aktivitesinin Ölçülmesi (25)

	<u>Kör</u>	<u>Deney</u>
GSH çözeltisi (ml)	0.1	0.1
CDNB çözeltisi (ml)	0.1	0.1
Potasyum-fosfat tamponu (ml)	2.2	2.2
Süpernatant (ml)	0.6	0.6
Potasyum-fosfat tamponu (ml)	0.6	

Yukarıda belirtildiği şekilde çalışılarak 340 nm'de karışımların absorbansları saptanır (A_1). 5 dakika sonra yeniden okuma yapılır (A_2); absorbans farkı alınarak aşağıdaki formül ile spesifik aktivite hesaplanır.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Absorbans değişimi } (A_2 - A_1) / 5}{\text{Glutasyon ekstinksiyon sabiti } (m\mu^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{Küvetteki protein konsantrasyonu } (mgml^{-1})}$$

Spesifik Aktivite = μ mol min mg protein

Glutasyon ekstinksiyon sabiti = $9.6 \text{ m}\mu^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir.

Küvetteki protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile paralel olarak tayin edilmiştir.

III.5.5. Selenyum Miktar Tayini (43)

Fluorometrik olarak selenyum miktar tayinin yapıldığı bu yöntemde, 0.4 ml doku homojenat süpernatantı üzerine $d.HNO_3$ ve $HClO_4$ ilave edilir. Karışım alüminyum blok üzerinde $150^\circ C$ 'de 30 dakika, daha sonra sıcaklık $190^\circ C$ 'ye getirilerek 2 saat süreyle ısıtılır. Tüpler soğutulur ve 6 M HCl çözelti-

sinden 0.2 ml ilave edilir, 150 °C'de 5 dakika yeniden ısıtılarak dijestiyon işlemi sağlanır.

Tayinin ikinci aşaması, selenatin selenite indirgenmesi olayıdır. Tüpler üzerine 2 ml buffer çözeltisi ilave edilerek, 140 °C'de sarı renk gözlenene kadar bekletilir. Daha sonra tüpler soğutulur ve 0.1 M HCl'den 5 ml ilave edilerek, karışım hacmi distile su ile 10 ml'ye getirilir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 24 saat bekletilir.

Tayininin üçüncü aşamasında plazselenol kompleksinin oluşturulması gerçekleştirilir. Örneklerde 0.5 ml DAN çözeltisi ilave edilerek bir süre karanlıkta bekletilir, daha sonra 40°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilir. 5 ml siklohekzan ilave edilerek ekstraksiyon yapılır. Ekstrakte edilen kısım 3 ml'lik küvetlere alınır ve eksitasyon dalga boyu 360 nm'e, emisyon dalga boyu ise 520 nm'e ayarlanarak okuma yapılır. Sonuçlar standart grafiğinden hesaplanır.

III.5.6. Aflatoksin-B₁ Miktar Tayini Yöntemi (84)

III.5.6.1. Yüksek Basıncılı Likit Kromatografisi (HPLC)

Yönteminin Çalışma Prensibi

Aflatoksin B₁ miktar tayini için kullanılan yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC), örnek bileşenlerinin likit ve solid faz arasında farklı derecelerde absorpsiyonu ile birbirinden ayrılması temeline dayanmaktadır. Likit kromatografisi; solventrezervuar, pompa, enjektör, kromatografik kolon, dedektör ve yazıcı olmak üzere altı bölümden meydana gelmektedir. Çözgen (solvent), mobil fazı oluşturmakta ve pompa ile belirli bir hızda kolondan geçişi sağlanmaktadır. Enjektör kısmından örnekler sisteme verilmektedir. Sabit faz olarak genelde silika kolon kullanılır ve dedektör ile kolondan geçen madde teşhis edilerek, yazıcı ile konsantrasyonuna uygun pik elde edilir. HPL analitik teknik olarak oldukça gelişmiş ancak pahalı bir yöntem olduğu

için rutin olarak kullanılamamaktadır. Ayrım ve kantitatif tayininde hızlı ve pek çok madde için geçerli olduğundan dolayı kullanım alanı geniştir.

III.5.6.2. HPLC Alet ve Ekipmanı

1. Likit Kromatografi: Varian 5000 - Rheydna 7125 enjektör sistemi.

Flourichrom fluorosans dedektörü; 7-54 ve 7-60 eksitasyon filtreleri (360 nm), 3-73 ve 4-76 cam emisyon filtreleri (440 nm) yerleştirilmiş flow cell'e sahiptir.

İntegratör (Varian 4290): 0.25 cm/min kağıt hızı, tungsten lamba, lamba konumu LOW, gain konumu HIGH, atanasyon konumu 20, range konumu 2 olarak ayarlanmıştır.

2. LC Kolonu: 15 cm x 4.6 mm Chrompack LC-18, 5 µm çaplıdır.

3. Enjektörler (Hamilton): 10-100-1000 µl.

4. Vibrofix

III.5.6.3. Örneklerin HPLC'ye Uygulanabilir Hale Getirilmesi (Temizleme - Ekstraksiyon İşlemi)

1 ml'lik örneğe (doku süpernatantı) 1 ml heksan ilave edilerek 2 dakika vibrofix'de karıştırıldıktan sonra 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki heksan fazı atılır. Bu işlem, örneğe iki kez 1 ml heksan ilave edilerek tekrarlanır.

Örnekdeki lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla 4 kez 1 ml kloroform ilave edilerek 4 dakika çalkalanır ve 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilir. Kloroform fazı her defasında toplanır.

Derivatizasyon işlemi için, kloroform azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulup her bir ekstrat şişesi 50 µl TFA ilave edilir. Amaç AFB₁, AFG₁ toksinlerinin fluoresans şiddetini artırmak, teşhisin güvenilirliğini sağlamaktır.

TFA'lı örnekler 5 dakika bekletildikten sonra yine azot gazı altında uçurulup su - asetonitril (9+1)'den oluşan ineksiyon solventinden 500 µl ilave edilerek vibrofix'de karıştırılır. Sonra bu örnekten 10 µl alınıp HPLC'ye inceleme edilir.

III.5.6.4. AFB₁ Miktarının Hesaplanması

HPLC kromatogramlarına göre AFB₁ miktarları aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanır.

$$AFB_1 \text{ (ppb)} = \frac{\text{Örneğin pik alanı (h)} \times \text{Standart konst. (1µgr)} \times \text{Standart inj. hacmi (1µl)}}{\text{Standartın pik alanı (L)} \times \text{Örneğin inj. hacmi (4 µl)} \times \text{Effektif ağırlık (EW) (0.866 g)}}$$

III.5.7. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel analizleri, hazır paket programlar (ANOVA) kullanılarak bilgisayar ile yapılmıştır.

BÖLÜM IV**BULGULAR**

Deneysel olarak sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada, CCl_4 ve AFB_1 ile oluşturulan karaciğer doku hasarında GSH, GST ve Selenyum düzeyleri araştırılmıştır. Bunun için biyokimyasal olarak doku GST enzim aktivitesi, GSH ve Selenyum tayinleri, histolojik olarak ışık mikroskopunda incelemeler yapılmıştır.

Kontrol grubuna yönelik biyokimyasal bulgular Tablo 1'de, histolojik bulgular Resim 1'de sunulmuştur. Resim 1'de görüldüğü gibi karaciğer patolojik olmayan bir görünümde-dir.

Sadece CCl_4 uygulanan I. gruba yönelik biyokimyasal bulgular Tablo 2'de sunulmuştur. Tablo 2'de görüldüğü gibi doku GSH, GST ve Selenyum düzeylerinde belirgin artışlar saptanmıştır. Bu gruptaki GSH ile GST düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmış ($r = 0.383$, $p < 0.05$) ve Şekil 13'deki regresyon grafiği ile gösterilmiştir. CCl_4 uygulanan gruba ait histolojik bulgular Resim 2 ve 3'de sunulmuştur. Bu grupta diseksiyon sırasında dokuların ikterik ve pütürlü bir görünüm sergilediği ve CCl_4 uygulamasının nükleer vakualizasyon ve fokal yağlanma oluşturduğu saptanmıştır.

CCl_4 ve PB uygulanan II. deney grubuna yönelik biyokimyasal bulgular Tablo 3'de sunulmuştur. Bu grupta GSH ve Se arasındaki korelasyon Şekil 14'de gösterilmiştir.

Sadece AFB₁ uygulanan III. gruba ait biyokimyasal bulgular Tablo 4'de, AFB₁ yanısıra PB uygulanan IV. gruba yönelik bulgularda Tablo 5'de sunulmuştur. III. gruptaki ortalama GSH değeri 13.35 ± 0.73 $\mu\text{mol/g}$ doku olarak saptanmış ve bütün gruplar arasında kontrole göre en yüksek artışı göstermiş bulunmaktadır. Ayrıca bu grupta GSH ve Se arasında saptanan anlamlı korelasyon ($r= 0.518, p<0.05$) Şekil 15'de gösterilmiştir.

AFB₁ + PB uygulanan IV. grupta GSH ve GST arasında saptanan anlamlı ve negatif korelasyon ($r= 0.429, p<0.05$) Şekil 16'da, GSH ve Se arasındaki ilişki ise ($r= 0.487, p < 0.05$) Şekil 17'de sunulmuştur.

AFB₁ uygulanan gruplarda elde edilen histolojik bulgulara göre minimal düzeyde bir doku harabiyeti saptanmıştır. Nükleer vakualizasyon ve centrilobuler konjestiyon oluşumu Resim 3 ve 4'de sunulmuştur.

AFB₁ uygulanan gruplarda AFB₁ tayini HPLC ile yapılmış ve kontrol grubu örneklerinde AFB₁'de rastlanmamıştır. III. ve IV. grupta saptanan ortalama AFB₁ değeri (6.046 ± 0.204 ppb) dir. Şekil 18'de AFB₁ tayininde standart ve bir doku örneğine ait HPLC kromatogramları görülmektedir.

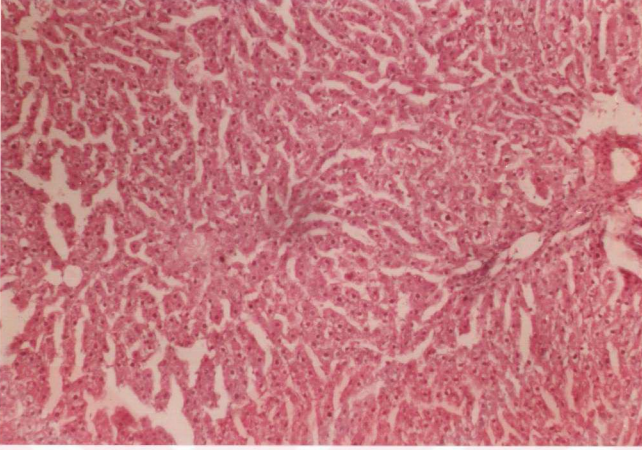
Tablo 1 . Kontrol Grubu GSH, GST ve Se Düzeyleri

Örnek No	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$)*	GST (nmol min mg protein)**	Se (ng/g doku)*
1	7.39	2597	0.65
2	8.08	1476	0.71
3	8.0	3125	0.62
4	6.95	2238	0.71
5	6.34	3842	0.61
6	7.30	5032	0.56
7	5.65	3417	0.75
8	4.86	2694	0.87
9	6.60	2025	0.62
10	5.91	1704	0.65
11	7.39	3459	0.68
12	7.82	2276	0.50
13	7.65	3450	0.62
14	6.69	3877	0.75
Ort. \bar{x} S.H.	6.90 \bar{x} 0.18	2944 \bar{x} 3.87	0.66 \bar{x} 0.05
Ort. \bar{x} S.S.	6.90 \bar{x} 0.92	2944 \bar{x} 944	0.66 \bar{x} 0.09

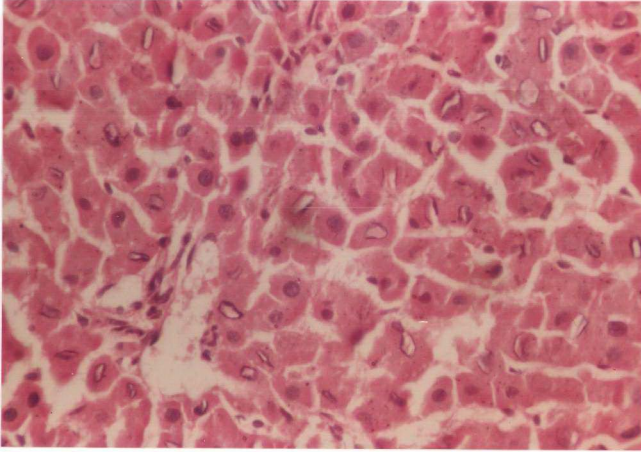
* Total yağ doku ağırlığı ort. 2.6 g'dır.

** Total protein ort. 25.02 \bar{x} 0.35Ort. + S.H.= Ortalama \bar{x} standart hata

Ort. + S.H.= Ortalama + standart sapma



Resim 1. Kontrol grubunda normal görünümlü hücreler



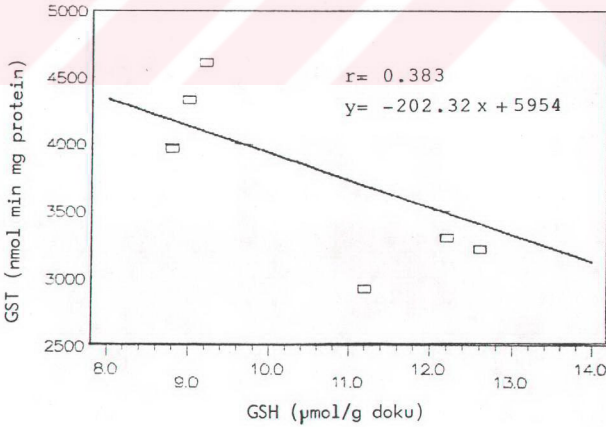
Resim 2. Centrilobuler konjestiyon yapısı gösteren karaciğer hücreler

Tablo 2 . CCl_4 Uygulanan (I. grup) GSH, GST ve Se Düzeyleri

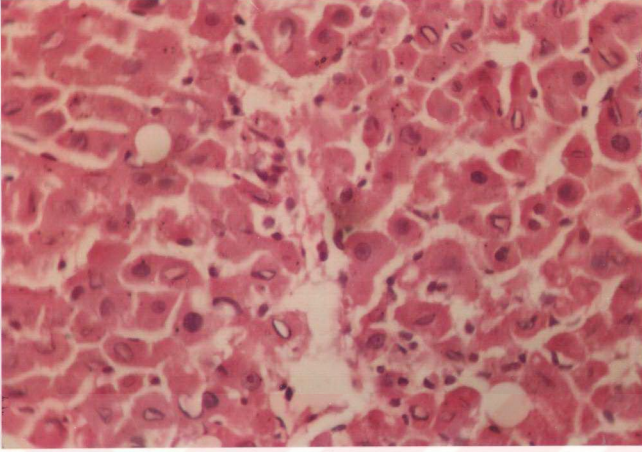
Örnek No	GSH ($\mu\text{mol/g}$ doku)*	GST (nmol min mg protein)**	Se (ng/g doku)*
1	13.34	3976	0.82
2	8.97	4328	0.90
3	8.74	3964	1.10
4	11.34	2926	1.87
5	9.11	4606	1.22
6	12.23	3207	1.72
7	12.67	3220	0.80
Ort. \pm S.H.	10.91 \pm 0.47	3747 \pm 8.74	1.20 \pm 0.15
Ort. \pm S.S.	10.91 \pm 1.80	3747 \pm 588	1.20 \pm 0.40

* Total yaş doku ağırlığı 3.05 \pm 0.24 g'dır.

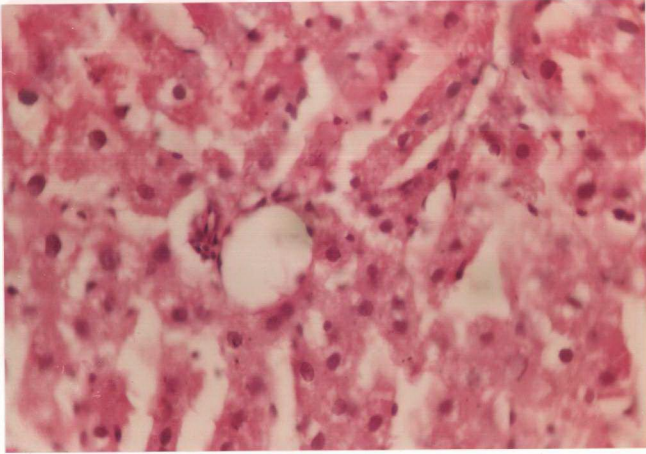
** Total protein 30.6 \pm 0.79 mg/ml'dir.



Şekil 13. CCl_4 Uygulanan I. grupta GST ve GSH arasındaki regresyon grafiği



Resim 3. Nükleer vakualizasyon, fokal nekroz gösteren karaciğer hücreleri



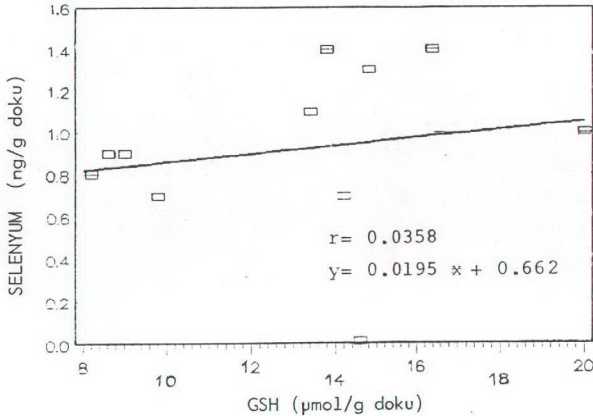
Resim 4. Fokal yağlanma (yağ vakuolleri) ve centrilobuler konjestiyon gösteren hücreler

Tablo 3 . CCl_4 + PB Uygulanan II. grup GSH, GST ve Se Düzeyleri

Örnek No	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$)*	GST (nmol min mg protein)**	Se (ng/g doku)*
1	14.67	4949	-
2	20.09	5668	1.02
3	8.6	4634	0.95
4	9.86	4156	0.70
5	14.82	4127	1.25
6	16.38	4466	1.35
7	8.89	5430	0.87
8	14.23	4095	0.70
9	13.27	4269	1.07
10	8.15	4822	0.80
11	13.86	4849	1.37
Ort. \pm S.E.	12.98 \pm 0.32	4679 \pm 6.21	0.92 \pm 0.08
Ort. \pm S.S.	12.98 \pm 3.56	4679 \pm 504	0.92 \pm 0.37

* Total yaş doku ağırlığı 3.05 \pm 0.24 g'dır.

** Total protein 30.3 \pm 0.50 mg/ml'dir.



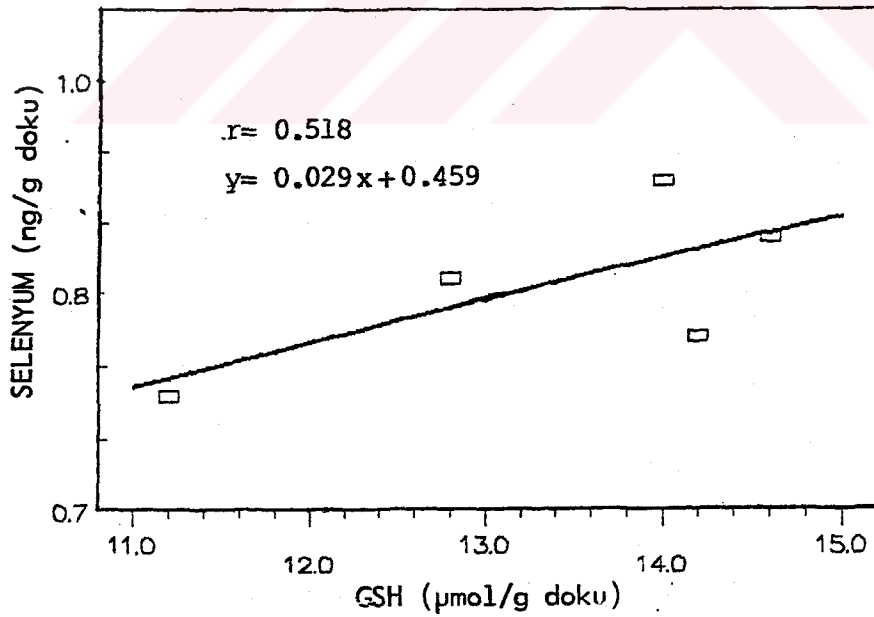
Şekil 14. CCl_4 + PB Uygulanan II. grupta Selenyum ve GSH arasındaki regresyon grafiği

Tablo 4 . AFB₁ Uygulanan III. Grup GSH, GST ve Se Düzeyleri

Örnek No	GSH (μmol/g doku)*	GST (nmol min mg protein)**	Se (ng/g doku)*
1	14.08	3784	0.82
2	11.12	3619	0.78
3	14.08	3570	0.93
4	14.67	3995	0.89
5	12.80	3918	0.86
Ort. ± S.H.	13.35 ± 0.73	3777 ± 12.2	0.86 ± 0.18
Ort. ± S.S.	13.35 ± 1.27	3777 ± 164	0.86 ± 0.05

* Total yaş doku ağırlığı ort. 3.05 ± 24 g 'dır.

** Total protein 30.4 ± 1.10 mg/ml'dir. '



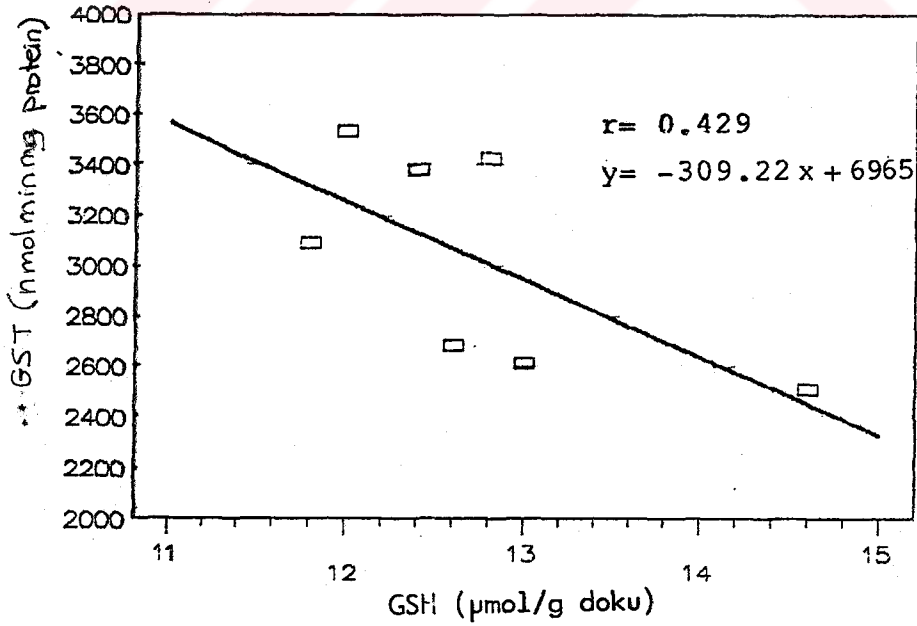
Şekil 15. AFB₁ Uygulanan III. grupta selenyum ve arasındaki regresyon grafiği

Tablo 5 . AFB₁+ PB Uygulanan IV. Grup GSH, GST ve Se Düzeyleri

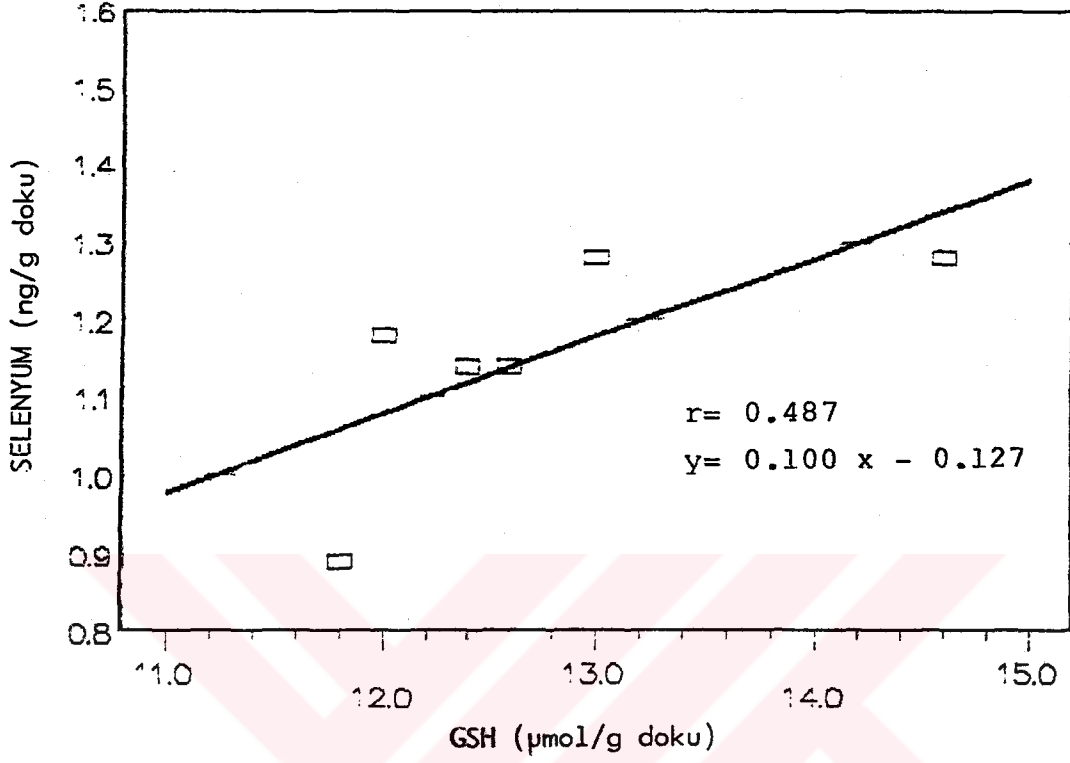
Örnek No	GSH (µmol/g doku)*	GST (nmol min mg protein)**	Se * (ng/g doku)
1	12.6	2683	1.14
2	11.78	3091	0.89
3	14.60	2507	1.28
4	12.45	3380	1.14
5	12.90	2612	1.28
6	12.08	3532	1.18
7	12.61	3427	1.14
Ort.± S.H.	12.72 ± 0.50	3033 ± 7.86	1.15 ± 0.15
Ort.± S.S.	12.72 ± 0.84	3033 ± 397	1.15 ± 0.12

* Total yaş doku ağırlığı 3.05 ± 0.24 g'dır.

** Total protein 32.6 ± 0.81 mg/ml'dir.



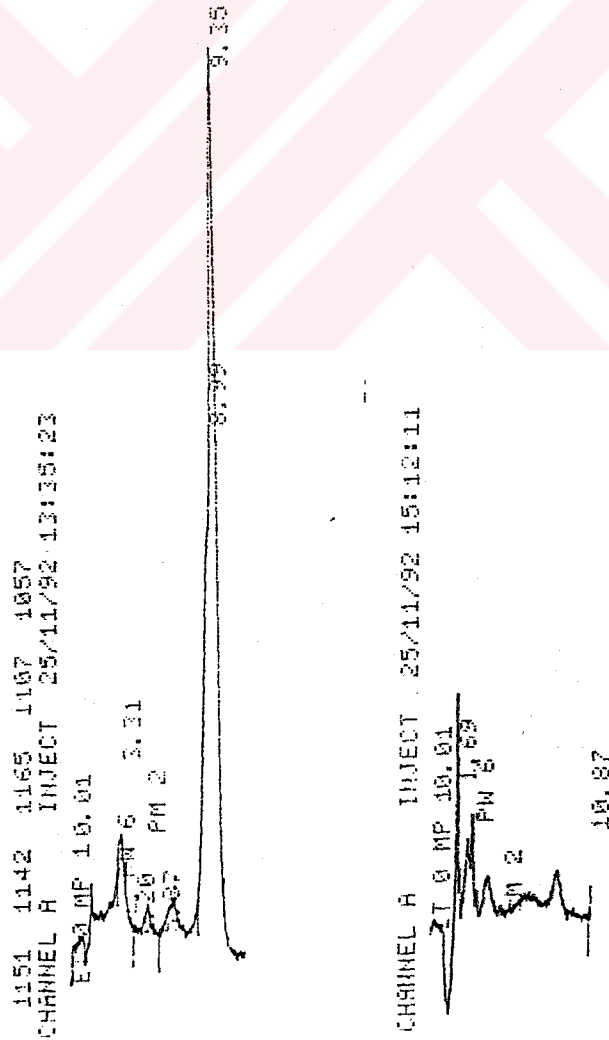
Şekil 16. AFB₁ + PB Uygulanan IV. grupta GST ve GSH arasındaki regresyon grafiği



Şekil 17. AFB₁+ PB Uygulanan IV. grupta Selenyum ve GSH arasındaki regresyon grafiği

Tablo 6. III. ve IV. grupta AFB₁ düzeyleri

Örnek No	Aflatoksin B ₁ (ppb)
1	0.937
2	16.571
3	4.170
4	4.488
5	6.061
6	7.648
7	3.982
8	0.947
9	0.682
10	7.526
11	5.851
12	13.689
Ort. ± S.H	6.046 ± 0.204

Şekil 18. AFB₁ 'e ait HPLC kromatogramları

BÖLÜM V

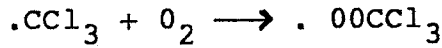
TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın amacı; CCl_4 ve AFB_1 'in sıçan karaciğeri üzerindeki toksik etkilerini GSH, GST ve Selenyum gibi parametreleri inceleyerek karşılaştırmak idi. Ayrıca, fenobarbital (PB) gibi karaciğer ikinci faz enzimleri üzerinde indüksiyon etkisi beklenen bir bileşik seçilerek, bazı deney gruplarında uygulanmış ve indüksiyonun karaciğer harabiyeti üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Deney gruplarına yönelik sonuçları aşağıdaki şekilde incelemek ve tartışmak yararlı olacaktır.

A. (CCl_4 Uygulanan) I. Grup ve (CCl_4 + PB uygulanan)

II. Gruba Yönelik Tartışma

CCl_4 'ün sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminde metabolize edilmesi aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir (67):



($\cdot O_2CCl_3$) reaktif metaboliti etkin olarak doymamış yağ asitleri ile kovalent bağlarla etkileşir ve lipid peroksidasyonu, CCl_4 tarafından meydana getirilen karaciğer dejenerasyonunun esasını oluşturur (64, 67). CCl_4 gibi halojen hidrokarbonlarla zehirlenme hepatik centrilobuler hemorajik nekroz ve nötral lipidlerin birikimi (karaciğer yağlanması) ile karakterizedir (11, 58, 72).

Çalışmamızda bu grupta yapılan histolojik incelemelere göre nükleer vakualizasyon, fokal yağlanma ve centrilobuler konjestiyon meydana gelmiş bulunmaktadır (Resim 1,2 ve 3). Bu

patolojik sonuçlara bakıldığında tam bir nekroz tablosu elde edilemese bile, CCl_4 uygulaması ile karaciğer üzerinde amaçlanan toksik etkileri sağlamış olduk.

İncelediğimiz parametreler arasında yeralan GSH'ın metabolizması organ içi ve organlar arasındaki döngülerle süreklilik kazanırken, GSH sentezi temel olarak karaciğerde gerçekleştirilir (3).

GSH, aralarında CCl_4 'ünde bulunduğu bazı ksenobiyotiklerin detoksikasyonunda önemli görevler üstlenir (72). GSH'ın mikrozomal inkübasyon sistemine sızması sonucunda CCl_4 metabolitlerine özgü bazı GSH türevleri oluşması yoluyla etki gösterdiği ve bu türevlerden birinin diğlutatyon karbonat olduğu bildirilmektedir (64).

Hücre içi GSH düzeyleri; GSH sentezinin kontrolü, hücre dışında taşınması, redoks olayları ve detoksikasyon işlemlerine katılımı ile düzenlenir (12). Bu açıdan bakıldığında kontrol grubuna göre CCl_4 uygulanan I. ve II. gruptaki ortalama GSH düzeylerindeki artış anlamlıdır (Tablo 1, 2, 3).

Bir çalışmada, 1 mg/kg i.p (%20 zeytinyağı- CCl_4) uygulaması ile karaciğer harabiyeti oluşturulmuş sıçan karaciğer dokularındaki GSH düzeylerinde 24 saat içerisinde kontrol grubuna oranla %47-65'lik artışlar gözlenmiştir (87). Aynı şartlar altında başka bir çalışmada bu artış %80 olarak saptanmıştır (23).

CCl_4 'ün toksik etkileri incelenirken 24 saat gibi kısa sürelerin seçilmesi yerine uzun süre CCl_4 'e maruz kalmanın daha anlamlı sonuçlar vereceğini düşünmüştük. Zira, eğer akut bir zehirlenme sözkonusu değilse CCl_4 veya benzeri bileşiklerle uzun süreli temasta sözkonusu bileşiklerin toksik etkileri süreklilik kazanmaktadır. Bu şekilde

incelendiğinde kontrol grubuna göre II. grupta elde edilen GSH değerlerindeki %88.8'lik artış, uzun süreli CCl_4 uygulamasında GSH düzeylerinde sürekli bir yükselişe neden olduğunu göstermektedir.

GSH-S-transferazlar, toksik bileşikler olarak nitelenen ilaçlar ve karsinojenlerin detoksikasyonlarında rol oynayan çok fonksiyonlu, karmaşık bir enzim grubudur(10).

CCl_4 uygulamasının, sıçanlarda yağlı karaciğer ve nekroz oluşturma yanısıra, NADH'a bağımlı karaciğer mikrozomal enzimlerinin etkilerini de zayıflattığı bildirilmektedir (11). Srivastava ve diğ. (77), CCl_4 uygulamasının karaciğer GSH-S transferaz aktivitesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Benzer şekilde Harisch ve diğ. (19), aynı durumu gözlemişlerdir.

GSH-S-transferazların bağlanma bölgesi hidrofobik yapılıdır ve bu nedenle hidrofobik özellik taşıyan bileşikler bu enzim grubu için iyi birer substrat olarak görünmektedirler (45). CCl_4 'de hidrofobik bir bileşik olarak GSH-S-transferazlar için bir substrat adayıdır. Fakat, GSH'a bağımlı enzimler arasında yer alan GSH-S-transferazlar CCl_4 metabolizması ile direkt ilişkili değildirler (67) ve muhtemelen CCl_4 uygulamasından kaynaklanan değişikliklere bağlı olarak GSH metabolizmasında meydana gelen değişimden etkilenmeleri olasıdır.

Çalışmamızda, yalnızca CCl_4 uygulanan I. grubun GSH ve GST düzeyleri arasında anlamlı, *negatif* bir korelasyon gözlenmiştir ($r= 0.383$, $p < 0.05$) (Şekil 13).

(CCl_4 + PB) uygulanan II. grupta kontrol grubuna göre GST aktivitesinde indüksiyon etkisi saptanmıştır. Sırasıyla, kontrol, I ve II. grup GST aktiviteleri; 2944 ± 3.87 ,

3747 \pm 8.74 ve 4679 \pm 6.21 nmol min mg proteindir. Tablo 2'de de gösterildiği gibi GST düzeylerinin kontrol'e göre yükselmeye devam ettiği ve CCl₄ uygulamasının enzim açısından etkili olmadığı, II. grup GST düzeylerine bakıldığında da fenobarbitalin indüksiyon etkisini gösterdiği anlaşılabilir.

GSH ve GSH-S-transferaz enzimlerinin katıldığı bazı metabolizasyon olaylarında, selenyum elementinin etkisi; eksikliğinde glutatyon peroksidaz enziminin kaybına bağlı olarak oksidatif hasar ve hepatik fibroz'a yatkınlığı arttırması açısından incelenmeye değer bir parametre olarak düşünülmüştür.

Uzun süren Se yetersizliğinin sıçan ve farelerde karaciğer, böbrek ve ince barsak mukozasında GSH-S transferaz aktivitesini arttırdığı bildirilmektedir (4).

Se yetersizliği, karaciğer hem metabolizması, GSH-S-transferaz ve bir kısım ilaç-metabolize eden enzimlerin aktivitelerini de etkilemektedir. Ayrıca, bu elementin eksikliğinin karaciğer GSH sentezini ve kana verilmesini arttırarak, plazma GSH konsantrasyonunu yükselttiği belirtilmektedir (32).

Bazı GSH-S-transferaz tipleri 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) gibi elektrofilik bileşikleri katalizlemenin yanısıra glutatyon peroksidaz enzim aktivitesine de sahiptirler (non-Se-GSH P_x). Yani, alternatif bir peroksidaz yolu olarak düşünülen bu durumda substrat olarak organik hidroperoksitler ile etkileşirler. Gerçek GSH P_x'dan farklı olarak H₂O₂'i katalizleme yetenekleri yoktur (4).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz Se düzeyleri kontrol grubunda 0.66 \pm 0.05, I. grupta 1.20 \pm 0.15 ve II. grupta 0.92 \pm 0.08 ng/g yaş doku olarak saptanmıştır.

Bir çalışmada, sıçan karaciğer dokusunda nötron aktivasyon analiz yöntemi ile saptanan Se değeri 1.29 ± 0.03 mg/kg yaş dokudur (6).

Sadece CCl_4 uygulanan I. grupta GST ile Se arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($r=0.288$, $p<0.05$) II. grupta da pozitif olmakla birlikte çok zayıf bir korelasyon gözlenmiştir ($r= 0.011$, $p <0.05$).

Kontrol ve I. ve II. grup Se değerlerine bakıldığında deney hayvanlarında çok belirgin bir Se yetersizliği durumu yoktur.

Selenyum ve kükürt içeren aminoasitlerin CCl_4 toksitesine karşı koruyucu olduğu ve bu durumun GSH-S transferazların Se ile ilişkilerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (27).

Se yetersizliğinde, GSH-S-transferaz aktivitesindeki artışın, doku hasarına bağlı olarak GSH- P_x aktivitesindeki azalmayı kompanse etmek üzere ortaya çıkan bir yanıt olduğu ileri sürülmektedir (4).

Se-GSH ilişkisi açısından bakıldığında ise II. grupta zayıfta olsa bir korelasyon elde edilmiştir ($r= 0.0358$, $p<0.05$) (Şekil 14).

Selenyumun temel eliminasyon yolu idrarla atılımdır ve normal diyet uygulanan sıçanlarda idrarla atılan selenyum hayvanın selenyum düzeyinin bir göstergesidir (7). Biz çalışmalarımız sırasında deney hayvanlarının idrarlarından, deney süresinin sekiz haftayı kapsamaması nedeniyle yararlanamadık. Fakat bir karşılaştırma sağlaması açısından idrar ve doku Se düzeylerinin birlikte saptanmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz sonuçlar bu konudaki yayınlarla uyum sağlamıştır. Ayrıca, selenyum

analizlerinde genelde tercih edilen atomik absorpsiyon spektrofotometresi yerine kullanmış olduğumuz spektrofluorometrik yöntemin başarılı sonuçları da olumlu bir durumdur.

B. (AFB₁) Uygulanan III. Grup ve (AFB₁+ PB) Uygulanan

IV. Gruba Yönelik Tartışma

Aspergillus genus'unun bazı türlerinin sekonder metaboliti olan AFB₁, Fischer cinsi sıçanlarda hepatoselüler karsinomların etkili bir indükleyicisidir. Epidemiyolojik verilere göre bu mikotoksinin insanlarda da karsinom oluşturduğu belirtilmektedir (15).

III. ve IV. deney gruplarında yapılan patolojik incelemelere göre karaciğer dokularında minimal düzeyde değişiklikler olduğu gözlenmiştir (Resim 3 ve 4). Bu duruma neden olarak uyguladığımız AFB₁ dozunun yüksek olmaması düşünülebilir. AFB₁'in uygulama dozunu seçerken, AFB₁'in çok güçlü toksik etkileri olan bir bileşik olduğu gözönünde tutulmuş ve on haftalık süre içerisinde deney hayvanlarının kaybına neden olmayacak 1 ppm'lik dozu tercih edilmiştir.

AFB₁'in hücrelerde nükleer ve sitoplazmik lokalizasyona sahip olduğu bildirilmiştir (98).

Bilindiği gibi, kimyasal karsinojenler ve mutajenlerin etkileri DNA gibi makromoleküller ile kovalent etkileşmeleri sonucunda ortaya çıkar. AFB₁ gibi güçlü bir karsinojenin hücre sel makromoleküllerle kovalent etkileşmesi mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyonuna bağlıdır. AFB₁'in *invivo* olarak monooksijenazlar ile veya *invitro* olarak peroksi asitlerle aktivasyonu sonucunda oluşan AFB₁-8,9 oksit bileşiği AFB₁-Guanin'i oluşturur. Bu bileşikde imidazol halkası açık bir guanin yapısı olarak AFB₁-FAP y'e

dönüşür. AFB₁-FAB_y bileşiğinin süreklilik kazanması AFB₁ hepatokarsinogenezinde önemli rol oynar (15, 36).

DNA ile etkileşerek karsinogenezini başlatan AFB₁ - epoksit bileşiği sitozolik GSH-S-transferaz enzimleri ile inaktive edilirken AFB₁-SG konjugatları meydana gelir (40). Bir çalışmada, AFB₁ uygulanan sıçanların safrasında AFB₁ - GSH konjugatlarının varlığı saptanmış ve bu konjugatların karaciğer kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Kitle spektral analizi ve N.M.R çalışmalarına göre AFB₁-GSH konjugatının yapısı 8,9-dihidro-8-(S-glutatyonil)-9-hidroksi aflatoksin B₁ şeklinde açıklanmıştır (58).

Çalışmamızda III. ve IV. gruptaki GSH artışları kontrole göre oldukça fazladır (Tablo 4 ve 5). GSH-S-transferaz aktiviteleri ise kontrol, III. ve IV. grupta sırasıyla; 3747 ± 8.74 , 3777 ± 12.29 ve 3033 ± 7.86 nmol min mg protein'dir.

İkinci faz ilaç-metabolize edici enzimler arasında yeralan GSH-S-transferazlar bütil hidroksianisol (BHA), bütil hidroksi toluen (BHT) ve fenobarbital (PB) gibi bileşikler tarafından indüklenebilmektedir (40).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre GSH-S transferaz enziminin PB ile sağlamaya çalıştığımız indüksiyondan etkilenmediği gözlenmektedir. Bu durumun nedeni, %0.1 g'lık PB dozunun CCl₄ uygulanan gruplarda da aynı olması ve bu gruplar için yeterli olan sözkonusu dozun AFB₁ için geçerli olmadığı şeklinde düşünülebilir.

Bu konuda yapılan bir çalışmada, %0.1'lik PB çözeltisi bir hafta süreyle deney hayvanlarının içme suyuna karıştırılarak indüksiyon sağlanmıştır. GSH-S-transferaz enzim aktivitesi PB uygulanan grupta kontrol grubuna oranla iki kat yüksek bulunmuştur. Enzim aktivite tayininde

substrat olarak CDNB'nin yanısıra DCNB, NBC ve alkil epoksit kullanılmıştır. Alkil epoksitin substrat olarak kullanıldığı analizlerde enzim aktivitesinin oldukça yüksek bulunduğu belirtilmiştir (51). Biz ise çalışmamızda CDNB substratını yaygın kullanımından dolayı tercih etmiştik.

III. ve IV. grupta GSH ve GST arasında I. ve II. grupta olduğu gibi anlamlı ve negatif korelasyonlar saptanmıştır. GSH ve GST arasındaki korelasyonlar III. grupta ($r = 0.158, p < 0.05$) ve IV. grupta ($r = 0.429, p < 0.05$) (Şekil 15).

AFB₁ ile selenyum arasında doğrudan bir ilişkiye yönelik herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Sırasıyla, kontrol, III. ve IV. grup selenyum değerleri şu şekilde saptanmıştır: 0.66 ± 0.09 , 0.86 ± 0.05 ve 1.15 ± 0.12 ng/g doku. Ayrıca bu gruplarda GSH ile selenyum arasında oldukça anlamlı, pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Korelasyon katsayıları III. grupta ($r = 0.518, p < 0.05$) IV. grupta ise ($r = 0.487, p < 0.05$) (Şekil 16 ve 17).

Sonuç olarak, sıçanlar üzerinde yapmış olduğumuz bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre CCl₄ ve AFB₁ gibi toksik etkili iki bileşiğin karşılaştırmasını yaparken GSH, GSH-S-transferaz enzimlerinin tam anlamı ile yeterli olduğunu söyleyemeyiz. Fakat, bilinenlerin dışında karaciğer üzerindeki toksik etkilerini araştırdığımız sözkonusu iki bileşiğin selenyum ile ilişkilerinin belirlenmesinde özellikle GSH açısından bulgularımızın yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET

Bu çalışmada, CCl_4 ve AFB_1 'in sıçan karaciğeri üzerindeki toksik etkileri GSH, GSH-S-transferaz ve selenyumun karaciğer dokusundaki düzeyleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Ayrıca, fenobarbital (PB) gibi karaciğer ikinci faz enzimleri üzerinde (GSH-S transferazlar gibi) indüksiyon etkisi gösterebilen bir bileşik bazı deney gruplarına uygulanmıştır.

Deneyler beş grupta, dişi ve erkek Swiss-Albino türü sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplardan biri kontrol olarak seçilmiştir. Birinci gruba haftada iki kez sadece (1 ml/kg) CCl_4 , ikinci gruba aynı dozdaki CCl_4 ve %0.1 g PB, üçüncü gruba 1 ppm AFB_1 , dördüncü gruba ise AFB_1 'in yanısıra %0.1 g PB sekiz hafta süreyle, oral olarak uygulanmıştır. Tüm gruplarda doku GSH analizi Ellman, GST aktivitesi Habig ve Selenyum analizi spektrofotometrik yöntem ile yapılmıştır. AFB_1 miktar tayini ise HPLC ile gerçekleştirilmiştir.

CCl_4 uygulanan grupların patolojik incelemelerinde bu dokularda centrilobuler konjestiyon, nükleer vakualizasyon ve fokal yağlanma gözlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama GSH düzeyi 6.09 ± 0.18 $\mu\text{mol/g/g}$ doku, GST aktivitesi 2944 ± 3.87 nmol min mg protein, Selenyum 0.66 ± 0.05 ng/g doku olarak saptanmıştır. CCl_4 uygulanan birinci grupta ise sırasıyla 10.91 ± 0.47 $\mu\text{mol/g}$ doku, 3747 ± 8.74 nmol min mg protein, 1.20 ± 0.15 ng/g dokudur. Bu grupta GSH ile GST arasında anlamlı ve negatif bir korelasyon saptanmıştır ($r= 0.383$, $p<0.05$). CCl_4 + PB uygulanan ikinci grupta ise GSH düzeyi 12.98 ± 0.32 , GST aktivitesi 4679 ± 6.21 , Se düzeyi ise 0.92 ± 0.08 olarak saptanmıştır. Bu grupta kontrol ve birinci gruba göre GST aktivitesindeki artış ile PB'nin indüksiyon etkisi gözlenmiştir.

Sıçanlarda hepatoselüler karsinomların indükleyicisi olan AFB₁'in metabolizasyonunda GSH ve GST birlikte görev yaparlar. AFB₁ uygulanan gruplarda patolojik incelemelere göre minimal düzeyde toksik etkiler saptanmıştır ve bunun nedeni uyguladığımız dozun düşüklüğü olabilir. Sadece AFB₁ uygulanan üçüncü grupta ortalama GSH düzeyi 13.35 ± 0.73 $\mu\text{mol/g}$ doku, GST aktivitesi 3777 ± 12.2 n mol min mg protein, selenyum 0.86 ± 0.18 ng/g doku olarak saptanmıştır. AFB₁ + PB uygulanan dördüncü grupta aynı ölçümler sırasıyla 12.72 ± 0.50 $\mu\text{mol/g}$ doku'dur. GSH ile GST arasındaki korelasyonlar üçüncü grupta ($r= 0.158$, $p<0.05$), dördüncü grupta ($r= 0.429$, $p<0.05$) olarak saptanmıştır.

Selenyum, gerek CCl₄, gerekse AFB₁ uygulanan gruplarda kontrole göre yüksek değerlerde saptanmıştır. Özellikle AFB₁ uygulanan gruplarda GSH ile selenyum arasında pozitif ve anlamlı korelasyonlar gözlenmiştir, üçüncü grupta ($r= 0.518$, $p<0.05$), dördüncü grupta ($r= 0.487$, $p<0.05$).

Sonuç olarak, CCl₄ ve AFB₁'in neden olduğu doku harabiyetine bağlı olarak GSH, GST ve selenyum değerlerindeki artışlar sözkonusu parametrelerin detoksikasyondaki önemlerini ortaya koymuştur. Ayrıca, metabolizması tam olarak bilinmeyen bir iz element olan selenyumun CCl₄ ve AFB₁ tarafından oluşturulan doku harabiyetindeki koruyucu işlevinin GSH-S-transferaz enziminden çok GSH ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

In this study, the toxic effects of CCl_4 and AFB_1 on rat hepatic tissue have been compared by investigating the levels of GSH, GSH-S-transferase enzyme and selenium. Also, phenobarbital (PB), a compound inducing second phase hepatic enzymes (such as GSH-S-transferase) was treated to some experimental groups.

Male and female Swiss-Albino rats have been used and experiments were carried out the five groups. One of the group was selected as a control group. The first and the second groups were treated by CCl_4 (1 ml/kg) twice a week but PB was added to the second group (%0.1 g). The third and the fourth groups were treated by AFB_1 (1 ppm), but to the fourth group PB was added as the same dose of the second group. All of the groups have been treated per oral for eight weeks period. The levels of GSH and GSH-S-transferase have been measured by Ellman and by Habig methods, respectively. A spectrofluorometric method has been used for selenium, and AFB_1 has been quantified by HPLC.

Pathological investigations showed that centrilobular congestion, nuclear vacualisation and focal fatty accumulation occurred in hepatic tissue obtained from CCl_4 treated groups. In the control group the mean levels were as GSH $6.09 \pm 0.18 \mu\text{mol/g}$ tissue, GSH-S-transferase activity $2944 \pm 3.87 \text{ nmol min mg protein}$ and selenium $0.66 \pm 0.05 \text{ ng/g}$ tissue. Same parameters were respectively, $10.91 \pm 0.47 \text{ mol/g}$ tissue, $3472 \pm 8.74 \text{ nmol min mg protein}$, $1.20 \pm 0.15 \text{ ng/g}$ tissue in the first group. In this group a ~~negative~~ and significant correlation between GSH and GSH-S-transferase has been observed ($r = 0.383$, $p < 0.05$). In the CCl_4 and PB treated second group GSH, GSH-S-transferase and selenium mean levels has been found as follows, GSH $12.98 \pm 6.21 \text{ nmol min mg protein}$, selenium $0.92 \pm 0.08 \text{ ng/g}$

tissue. An induction which dealing with PB on GSH-S-transferase activity has been in the second group but not found the control and the first groups.

AFB₁ is an effective inducer for hepatocellular carcinomas on rats and GSH and GSH-S-transferase work together in its metabolisation. Histologically, the hepatic tissue damage has been found minimum level due to AFB₁ in the third and the fourth groups. The low treatment dose of AFB₁ might cause to this observation. In the third group the mean levels were as GSH 13.35 ± 0.73 mol/g tissue, GSH-S-transferase activity 3777 ± 12.2 nmol min mg protein, selenium 0.86 ± 0.18 ng/g tissue. The correlation coefficients between GSH and GSH-S-transferase were ($r= 0.158$, $p < 0.05$) in the third group and ($r= 0.429$, $p < 0.05$) in the fourth group.

Selenium levels have been determined at higher values in CCl₄ and AFB₁ treated groups than the control. There was a positive and significant correlation between GSH and selenium in AFB₁ treated groups. The correlation coefficients were ($r= 0.518$, $p < 0.05$) for the third group, ($r= 0.487$, $p < 0.05$) for the fourth group.

As a result, the increased levels of GSH, GSH-S-transferase activity and selenium in hepatic tissue damage due to CCl₄ and AFB₁ show that these parameters are measure of detoxication. And, selenium, as a trace element which metabolism is not known clearly, the function of it in detoxication of CCl₄ and AFB₁ is more related with GSH rather than GSH-S-transferase.

KAYNAKLAR

1. Alperden I. "Gıdalarda Küfler ve Mikotoksinler". Tübitak Araştırma Projesi Çalışmaları-II., (1985), Gebze-Kocaeli, MBEAE Matbaası.
2. Anderson, M.E., Nielsen, G.M., Noganuma, A., and Meister, A., The FASEB J.2, (1988), A 1545.
3. Anderson, M.E., Bridges, R.J. and Meister, A., "Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves γ -glutamyl transpeptidase", Biochem. Biophys. Res. Commun., 96/2, (1980), 848-853.
4. Arthur, J.R., Morrice, P.C., Nicol, F., Beddows, S.E., and et. al, "The effects of selenium and copper deficiencies on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rat liver", Biochem. J., 248, (1987), 539-544.
5. Askelöf, P., Exelsson, K., Eriksson, S., Mannervik, B., Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide interchange. Thioltransferases rather than transhydrogenases", FEBS Lett., 38/3, (1974), 263-267.
6. Behne, D. and Wolters, W., "Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat", J. Nutr., 113, (1983), 456-461.
7. Behne, D. and Höfer-Bosse, T., "Effects of low selenium status on the distribution and retention of selenium in the rat", J. Nutr., 114, (1984), 1289-1296.
9. Björnstedt, M., Kumar, S., and Holmgren, A., "Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin

- and a substrate for mammalian thioredoxin reductase", *J. Biol. Chem.*, 267-12, (1992), 8030-8034.
9. Busby, W.F., Wogan, G.N., *Aflatoxins*, CRC Press, 2, 1981, 3-37.
 10. Carder, P.J., Hume, R., Fryer, A.A., et. al., "Glutathione S-transferase in human brain", *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 16, (1990), 293-303.
 11. Castro, J.A., Sasame, H.A., Sussman, H., and Gillette, J.R., "Diverse effects of SKF 525-A and antioksidants on carbon-tetrachloride-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism", *Life Sci.*, 7, (1968), 129-136.
 12. Chung, P.M., Cappel, R.E., Gilbert, H.F., "Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione", *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, (1991), 48-53.
 13. Concon, J., *Food Toxicology Contamitants and Additives*, N.Y., Marcel Dekker, 1988.
 14. Coulter, J.B.S., Hendrickse, R.G., Lamplugh, S.M., Macfarlane, S.B.J., et al., "Aflatoxins and kwashiorkor: clinical studies in Sudanese children", *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene.*, 80, (1986), 945-951.
 15. Croy, R.G., and Wogan, G.N., "Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of Aflatoxin B₁", *Cancer Res.*, 41, (1981), 197-203.
 16. Danielson, U.H., Esterbauer, H., Mannervik, B., "Structure activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases", *Biochem. J.*, 247, (1987), 707-713.

17. Detroy, R.W., Hesseltine, C.W., "Isolation and biological activity of a microbial conversion product of Aflatoxin B₁", *Nature*, 219, (1968), 967.
18. De Vries, H.R., Maxwell, S.M., Hendrickse, R.G., "Foetal and neonatal exposure to aflatoxins", *Acta. Paediatr. Scand.*, 78, (1989), 373-378.
19. Ellman, G., Lysko, H., "A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups", *Anal. Biochem.* 93, (1979), 98-102.
20. Ersöz, B., *Biyokimya Ders Notları*, Ege Üniv., Basımevi, İzmir, 1985.
21. Evliya, B., Var, I., "Çerezlik yerfıstıklarında aflatoksin saptanması", *Gıda*, 13(3), (1988), 217-222.
22. Faulder, C.G., Hirrell, P.A., Hume, R., Strange, R.C., "Studies of the development of basic, neutral and acidic isoenzymes of glutathione S-transferase in human liver, adrenal kidney and spleen", *Biochem. J.*, 241, (1987), 221-228.
23. Ferreyra E.C., Bernacchi, A.S., Castro, J.A., "Increased glutathione (GSH) content in livers of control and carbon tetrachloride poisoned rats treated with the anticarcinogenic drug trifluoperazine (TFP)", *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 53-3, (1986), 399-402.
24. Foye, W.O, *Principles of Medicinal Chemistry*, Third Ed, Lea-Febriger, 1989, 102.
25. Gibson, G.G., Skett, P., *Introduction to drug metabolism*, Chapman and Hall, 1986, 262-3.

26. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., "Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation", *J. Biol. Chem.*, 249/22, (1974), 7130-7139.
27. Hafeman, D.G., Hoekstra, F.G., "Protection against carbon-tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, Selenium and Methionine as measured by ethane evolution", *J. Nutr.*, 107, (1977), 656-665.
28. Hansson, L., Pettersson, J., Eriksson, L., Olin, A., "Atomic absorption spectrometric determination of selenium in human blood components", *Clin. Chem.* 35/4, (1989), 537-40.
29. Harisch, G., Mayer, W., "Studies on tissue distribution of glutathione and on activities of glutathione-related enzymes after carbon tetrachloride-induced liver injury", *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 47/3, (1985), 399-414.
30. Hayes, J.D., Mantle, T.J., "Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Y_f , Y_k , Y_a , Y_n/Y_b and Y_c subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues", *Biochem. J.*, 233, (1986) 779-788.
31. Hendrickse, R.G., "Kwashiokor: The hypothesis that incriminates aflatoxins", *Pediatrics*, 88/2, (1991), 376-79.
32. Hill, K.E., Burk, R.F., Lane, J.M., "Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione dependent enzymes in the rat", *J. Nutr.*, 117, (1987), 99-104.
33. Hissin, P.J., Hilf, R., "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues", *Anal. Biochem.*, 74, (1976), 214-26.

34. Howie, A.F., Douglas, J.G., Fergusson, R.J., Beckett, G.J., "Measurement of glutathione S-transferase P_i isoenzyme in plasma, a possible marker for adenocarcinoma of the lung", Clin. Chem., 36/3 (1990), 453-56.
35. Howie, A.F., Hayes, J.D., Beckett, G.J., "Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement", Clin. Chim. Acta., 177, (1988), 65-76.
36. Hsieh, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S., Santella, R.M., "Immunological detection of Aflatoxin B₁-DNA adducts formed in vivo", Cancer. Res., 48, (1988), 6328-331.
37. Igarishi, T., Muramatsu, H., Ohmori, S., Ueno, K., et, al. "Plasma glutathione S-transferase in carbon tetrachloride treated rats and its association to hepatic cytosolic isozymes", Japan, J. Pharmacol, 46, (1988), 211-16.
38. İshakoğlu, M., "Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığına etkileri, ekonomik açıdan önlemleri ve önlenmeleriyle ilgili çalışmalar", Tariş AR-GE Müd., 1987, İzmir.
39. Jacobson, B.E., Lockitch, G., "Direct determination of selenium in serum by graphite-furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: Age-specific reference ranges", Clin, Chem., 34/4, (1988), 709-14.
40. Jhee, E.C., Ho, L.L., Lotlikar, P.D., "Effect of butylated hydroxyanisole pretreatment on in vitro hepatic aflatoxin B₁-DNA binding and Aflatoxin-B₁-glutathione conjugation in rats", Cancer. Res., 48 (1988), 2688-2692.
41. Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B." Mechanism for the glutathione S-transferases", J. Biol. Chem., 251/20, (1976) 6183-88.

42. Kudo, H., Mio, T., Kokunai, T., Tamaki, N., et. al. "Quantitative analysis of glutathione in human brain tumors", *J. Neurosurg.*, 72, (1990), 610-15.
43. Lalonde, L., Jeon Y., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., et. al. "Fluorometry of selenium in serum or urine", *Clin. Chem.*, 28/1, (1982), 172-74.
44. Lamplugh, S.M., Apeagyei, F., Mwanmut, D., Hendrickse, R.G., "Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and serum of pregnant women", *Br. Med. J.*, 296 (1988), 968.
45. Lawrence, R.A., Parkhill, L.K., Burk, R.F., "Hepatic cytosolic non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency", *J. Nutr.*, 108, (1978), 981-87.
46. Lawrence, R.A., Burk, R.F., "Species, tissue and subcellular distribution of non-se-dependent glutathione peroxidase activity", *J. Nutr.*, 108, (1978), 211-15.
47. Lee, F.Y.F., Vessey, A., Rofstad, E., Siemann, D.W., et. al. "Heterogeneity of glutathione content in human ovarian cancer", *Cancer. Res.*, 49, (1989), 5244-48.
48. Ling, K.H., et. al. "Acut aflatoxicosis in Taiwan", *J. Formosen. Med. Assoc.*, 66, (1967), 517.
49. Lloyd, B., Holt, P., Delves, H.T., "Determination of selenium in biological samples by hydride generation and atomic absorbtion spectroscopy", *Analyst*, 107, (1982), 927-33.
50. Loscalzo, J., Freedman, J. "Purification and characterization of human platelet glutathione-S-transferase", *Blood*, 67/6, (1986), 1595-99.

51. Lotlikar, P.D., Rāj. H.G., Bohm, L.S., Ho, L.L., et al., "A mechanism of inhibition of aflatoxin-B₁-DNA binding in the liver by phenobarbital pretreatment of rats", *Cancer, Res.*, 49 (1989), 951-57.
52. Macpherson, A.K., "Comparison of methods for the determination of selenium in biological fluids", *Analyst*, 113, (1988), 281-83.
53. Manoharan, T.H., Glick, A.M., Puchalski, R.B., Servais, et. al., "Structural studies on human glutathione S-transferase " *J. Biol. Chem.*, 267/26, (1992), 19840-45.
54. Maxwell, S.M., Apeagyei, F., De Vries, H.R., Mwanmut, D., et. al. "Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and sera of pregnant women", *Toxicol Toxin Rew.*, 8, (1989), 19-29.
55. Mehlert, A., Diplock, A.T., "The glutathione S-transferases in selenium and vitamin E deficiency", *Biochem J.*, 227, (1985), 823-31.
56. Mezzetti, A., D. Ilio, C., Calafiore, A.M., Aceto, A., et. al., "Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery, vein and heart", *J. Mol., Cell. Cardiol.*, 22, (1990), 935-38.
57. Moscow, J.A., Fairchild, C.R., Madden, M.J., Ransom, D.T., et al. "Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors", *Cancer. Res.*, 49 (1989), 1422-28.
58. Moss, E.J., Judah, D.J., Praybylski, M., Neal, G.E., "Some mass-spectral and n.m.r. analytical studies of glutathione conjugate of aflatoxin B₁" *Biochem. J.*, 210, (1983) 227-233.

59. Muth, O.H. "Carbon tetrachloride poisoning of ewes on a low selenium ration" *Am.J. Vet. Res.*, (Jan) (1960), 86.
60. Niitsu, Y., Takahashi, Y., Saito, T., Hirata, Y., et al. "Serum glutathione-S-transferase- \uparrow as a tumor marker for gastrointestinal malignancies", *Cancer* 63/2 (1989), 317-23.
61. Öner, M., Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, 1986, İzmir.
62. Pamuk, F., Sungur, S., "Aflatoksinler, kimyasal ve biyolojik özellikleri" *Doğa Tar. Kim. D.*, 10/3, (1986), 144-153.
63. Rahim, A.A, Arthur, J.R., Mills, C.F., "Effects of dietary copper, cadmium, iron, molybdenum and manganese on selenium utilization by the rat", *J. Nutr.*, 116, (1986), 403-411.
64. Reiter, R., Burk, R.F. "Formation of glutathione adducts of carbon tetrachloride metabolites in a rat liver microsomal incubation system", *Biochem. Pharmacol.* 37/2, (1988), 327-31.
65. Richard, J.L., Thurston, J.R., Pier, A.C., "Effects of mycotoxins on immunity" Pergamon Press, 1978, 801-807, Oxford.
66. Robinson, P., "Aflatoxins in indian childhood cirrhosis" *Clin. Ped.*, 6/57 (1967).
67. Ruch, R.J., Klauing, J.E., Schultz, N.E., Askari, A.B., "Mechanisms of chloroform and carbon tetrachloride toxicity in primary cultured mouse hepatocytes", *Environ. Health Perspec.*, 69 (1986), 301-305.
68. Seward, C.R., Vaughan, G., Hove, E.L. "Effect of selenium on incisor depigmentation and carbon tetrachloride poisoning in vitamin E-deficient rats" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121, (1966), 850-52.

69. Schwarz, K., Foltz, C.M., "Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration", *J. Am. Chem. Soc.*, 79, (1957), 3292.
70. Shank, R.C., et al "Aflatoxins and Reye Syndrome" *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, (1971), 227.
71. Shea, T.C., Kelley, S.L., Henner, W.D. "Identification of anionic form of glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines", *Cancer. Res.*, 48, (1988), 527-33.
72. Shimuzu, M., Morita, S., Yamano Tetsuo, Yamada, A., "Relationship between hepatic glutathione content and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo", *Toxicol. Lett.*, 47, (1989), 95-102.
73. Sies, H., Ketterer, B., *Glutathione Conjugation: Mechanism and biological significance.* Academic Press, 1988.
74. Smith, M.T., Loveridge, N., Wills, E.D., Chayen, J. "The distribution of glutathione in the rat liver lobule" *Biochem. J.*, 182 (1979), 103-108.
75. Smith, M.T., Evans, C.G., doane-Setaer, P., Castro, V.M., "Denitrosation of 1,3-Bis (2-kloroetil)-1-nitrosoourea by class mu glutathione transferases and its role in cellular resistance in rat brain tumor cells" *Cancer. Res.* 49, (1989). 2621-25.
76. Smith, E. L, Hill, R.L., *Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry*, Mc Graw Hill Co., 1986, Singapore.
77. Srivastava, S.P., Singh, K.P., Saxena, A.K., Seth, P.K., et. al. "In vivo protection by protein A of hepatic microsomal mixed function oxidase system of CCl₄-administered rats", *Biochem. Pharmacol.*, 36/23, (1987), 4055-58.

78. Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., "Tyrosine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes" FEBS Lett. 207/2, (1986), 231-33.
79. Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A., Glutathione Centennial: Molecular perspectives and clinical implications, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1989.
80. Tew, K.D., Bomber, A.M., Hoffman, S.J., "Ethacrynic acid and piriprost as enhancers of cytotoxicity in drug, resistant ant sensitive cell lines" Cancer. Res., 48, (1988), 3622-25.
81. Tietz, N. W., Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., 1986, Philadelphia, U.S.A.
82. Tietze, F., "Enzymic method for quantitative determination for nanogram amounts of total and oxidized glutathione" Anal. Biochem., 27 (1969), 502-22.
83. Tulley, R.T., Lehmann, H.P., "Flameless atomic absorption spectrophotometry of selenium in whole blood" Clin. Chem. 28/7, (1982), 1448-50.
84. Tsuboi, S., Nakagawa, T., Tomita, M., Seo, T., et al. "Detection of aflatoxin B₁ in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography" Cancer. Res., 44, (1984), 1231-34.
85. Tsuchida, S., Sekine, Y., Shineha, R., Nishihira, T., et al. "Elevation of the placental glutathione S-transferase form (GST- π) in tumor tissues and the levels in sera of patients with cancer" Cancer. Res., 49, (1989), 5225-29.

86. Vandenberghe, Y., Tee, L., Rogiers, V., Yeoh, G., "Transcriptional-and post-transcriptional-dependent regulation of glutathione S-transferase expression in rat hepatocytes as a function of culture conditions", FEBS Lett., 313/2 (1992), 155-59.
87. Villaruel, M.C., Ferreyra, E.C., Bernacchi, A.S., Castro, J.A., "Glutathione (GSH) content in livers from control and carbon tetrachloride poisoned rats treated with the calmodulin inhibitors thioridazine, imipramine or chlorpromazine", Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 60/3, (1988), 397-400.
88. Warren, H.W., "Geology trace elements and health" Soc. Sci. Med., 29.8, (1989), 923-6.
89. Wartholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B., Von Bahr C., "Purification of a new glutathione S-transferase (transferase μ) from human liver having high activity with benzo (α) pyrene-4,5-oxide" Biochem. Biophys. Res. Commun., 98/2, (1981), 512-9.
90. Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., Lamela, R.A., Toscano, W.A., "Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage", Cancres. Res. 50, (1990), 1585-90.
91. Wild, C.P., Jiang, Y., Sabbioni, G., Chapot, B., "Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment" Cancer, Res., 50, (1990), 245-51.
92. Willet, W., Polk, F.B., Morris, S. et al. "Prediagnostic serum selenium and risk of cancer", Lancet, 16, (1983),
93. World Health Organization (WHO): Environmental Health Criteria 2, Genova, 1979.

94. Xia, Y., Hill, K.E., Burk, R.F., "Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-induced glutathione release from the isolated perfused rat heart", J. Nutr., 115, (1985), 733-42.
95. Yadgiri, B., et. al. "An outbreak of hepatitis" Amer. J. Clin. Nutr., 23, (1970), 94.
96. Yenson, M., İnsan Biokimyası, Beta Yayım, 1988, İstanbul.
97. Yücel, N., Aflatoksinle karşılaşma riski açısından anne sütü ve formül mama ile beslenme, Uzmanlık Tezi, 1992, SSK İzmir.
98. Zhank, Y., Chen, C., Haghghi, B., Yang, G., et. al." Quantitation of aflatoxin B₁-DNA adducts in woodchuck hepatocytes and rat liver tissue by indirect immunofluorescence analysis" Cancer, Res., 51, (1991), 1720-25.

ÖZGEÇMİŞ

23.4.1963 tarihinde İzmir de doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi İzmirde tamamladım. 1985 yılında E.Ü.Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. Aynı yılda aynı fakültenin Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans çalışmalarına başladım ve 1987 yılında Biyokimya Bilim Uzmanı ünvanını aldım. 1988 yılında E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora çalışmalarına başladım Aynı yılda E.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim. Evliyim ve bir çocuk sahibiyim.