

44810

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DAMİNOZİD UYGULANMIŞ CİVCİVLERDE
İNCE BAĞIRSAK VE KARACİĞER
GLUTATYON - S- TRANSFERAZ ENZİMLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ


V. Kenan ÇELİK

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. Atilla ATALAY

44810

SİVAS-1995



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 5/1/1984 tarih ve 84/1 No'lu kararı ile kabul edilen Tez Yazma Yönergesine göre hazırlanmıştır.



TEŐEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleőtirilmesinde ve yetiőtmemde değerli katkılarını esirgemeyen sayın Hocam Prof.Dr. Atilla ATALAY'a en içten teőkükürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DAMİNOZİT	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
2.2. GLUTATYON	5
2.2.1. Biosentezi, Hücresel Dağılımı	5
2.2.2. Glutatyon Konjügasyonu	5
2.2.3. Glutatyon Bağımlı Enzimler	8
2.3. GLUTATYON - S- TRANSFERAZ	10
2.3.1. Yapısı, Adlandırılması ve Sınıflandırılması	10
2.3.2. GST'ler tarafından katelizlenen konjügason reaksiyonları	12
2.3.3. GST'lerin ksenobiyotik biyotransformasyonundaki rolleri	14
2.3.4. GST'lerin inhibisyonu	17
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler	19
3.2. Döletli yumurtaların sağlanması ve deneye hazırlık.	19
3.2.1 Homojenizasyon	20
3.2.2. Santrifügasyon	20
3.2.3. Diyaliz	20
3.2.4 Affinite kromatografisi	20
3.2.5 Aktivite Tayini	21
3.2.6 Kromatofokusing	21
3.2.7. Protein Tayini	21

3.2.8. Sodyum dodesil sülfat-Poli akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)	22
3.2.9. Optimum pH	22
3.2.10. Substrat doygunluk eğrisi ve özgül aktivitelerin saptanması	22
3.2.11. Ni ve Cd iyonlarının GST aktiviteleri üzerine etkileri	22
4- BULGULAR	23
4.1. GST'lerin glutasyon agaroz kolonundan saflaştırılması	23
4.2 GST'lerin safıkları ve molekül ağırlıklarının saptanması	24
4.3. Optimum pH belirlenmesi	25
4.4. Km ve Vmax'ların saptanması	27
4.5. Ni ve Cd İyonlarının GST aktiviteleri üzerine etkileri	30
5- TARTIŞMA ve SONUÇ	35
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Daminozid'in hidroliz reaksiyonu	4
Şekil 2: Glutatyonun sentezi	5
Şekil 3: GSH konjugatının yıkım metabolizması	7
Şekil 4: α - ketoaldehitlerin yıkım metabolizması	8
Şekil 5: Organik hidroperoksik ve hidrojen peroksitlerin indirgenmesi	9
Şekil 6: Okside glutatyonun indirgenmesi	9
Şekil 7: Formaldehit yıkım mekanizması	9
Şekil 8: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi	14
Şekil 9: Intraselüler bağlanma ve taşınım yol ağı	15
Şekil 10: Reaktif oksijen ve lipid hidroperoksitlerin GST-P tarafından detoksifikasyonu	17
Şekil 11: Standard proteinler ve saflaştırılan GST'lerin SDS-PAGE kesikli jel üzerinde gösterimi	24
Şekil 12: Karaciğer GST'lerin optimum pH grafikleri	26
Şekil 13: İnce Bağırsak GST'lerin optimum pH grafikleri	26
Şekil 14: Karaciğer kontrol eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	27
Şekil 15: Karaciğer LD ₁₀ - 1 eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	27
Şekil 16: Karaciğer LD ₁₀ - 2 eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	28
Şekil 17: Karaciğer LD ₃₀ eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	28
Şekil 18: İnce bağırsak kontrol eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	29
Şekil 19: İnce bağırsak LD ₁₀ , eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	29
Şekil 20: İnce bağırsak LD ₃₀ , eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği	30
Şekil 21: Karaciğer kontrol GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	31
Şekil 22: Karaciğer LD ₁₀ 1 GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	31

Şekil 23: Karaciğer LD ₁₀ 2 GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	32
Şekil 24: Karaciğer LD ₃₀ GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	32
Şekil 25: İncebağırsak kontrol GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	33
Şekil 26: İnce bağırsak LD ₁₀ , GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	33
Şekil 27: İnce bağırsak LD ₃₀ GST-CdSO ₄ inhibisyon grafiği	34

TABLULARIN DİZİNİ

Tablo 1: Çözünür GST'lerin adlandırılması ve sınıflandırılması	11
Tablo 2: Çeşitli insan dokularından saflaştırılan GST'ler	11
Tablo 3: GST'lerin yeni adlandırılması	12
Tablo 4: GST tarafından metabolize edilen ilaçlar (82-98).	16
Tablo 5 : Affinite kolonundan alınan GST'lerin saflaştırma verileri	23
Tablo 6: Saflaştırılan GST'lerin molekül ağırlıkları.	25

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan daminozid (süksinik asit, 2,2-dimetilhidrazid) gibi herbisitler (ot öldürücüler) ve pestisidler, (böcek öldürücüler) verimi artırmak amacı ile tarım alanlarında oldukça fazla miktarda kullanılmaktadır (1,2,3,4,5).

Yağmurlarla akarsu ve göllere taşınan ve besin maddeleri ile tüm canlılara ulaşan daminozid, canlılarda değişik toksik etkiler oluşturmaktadır. Cıvcivlerde teratojenik etkileri olduğu ve fare kemik iliği hücrelerinde mikroçekirdek oluşturduğu bilinmektedir (6,7).

Fare karaciğerinde yapılan çalışmada daminozid'in DNA'yı metillediği bildirilmiştir. Ayrıca daminozid 1,1-dimetilhidrazine (unsymmetrical dimethyl hydrazine, UDMH) ayrışmaktadır. UDMH ise bilinen karsinojenlerdendir (8).

Glutasyon-S-Transferaz (GST, EC:2.5.1.18) karsinojen ve mutagenleri içeren elektrofillerin, glutasyonun (GSH) tiol (SH) grubu ile konjugasyonunu katalizleyen çok işlevli enzim grubudur (9). GST detoksifikasyon (zehirsizleştirme) görevini GSH'ın SH grubu ile ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederek yapar. Oluşan suda çözünür ürün merkaptürik asittir ve vücuttan idrar ile atılır (10,11,12).

Farklı GST formları çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Her bir GST izoenzimi homo ve heterodimerik iki altbirimden oluşur. Yapısal, immünolojik özellikleri ve substrat özgüllükleri temel alınarak insan dokularında α (asidik), μ (nötral), π (bazik) ve mikrozomal olmak üzere 4 grup GST belirlenmiştir. Bunlar

GST₁, GST₂ ve GST₃ gibi en azından 3 gen lokusunun ürünleridir. İnsan sitozolik GST'si molekül ağırlıkları 23.000 ve 26.000 dalton arasında değişen farklı altbirimden oluşan dimerik proteinler olarak tanımlanmıştır (13,14,15).

Normal erişkin sıçan karaciğeri önemli 7 GST izoenzimi taşır. Kimyasal karsinogenez sırasında bu enzimlerle ilgili önemli değişimlerin olduğu bildirilmiştir (16, 17, 18).

Glutasyon -S-transferazların çeşitli hayvan ve insan dokularındaki formları çalışılmış ve karakterize edilmiştir. Cıvcivlerde ise yalnızca karaciğer enzim formları bilinmektedir. Ayrıca daminozid'in bu enzim sistemi ile etkileşip etkileşmediği de bilinmemektedir.

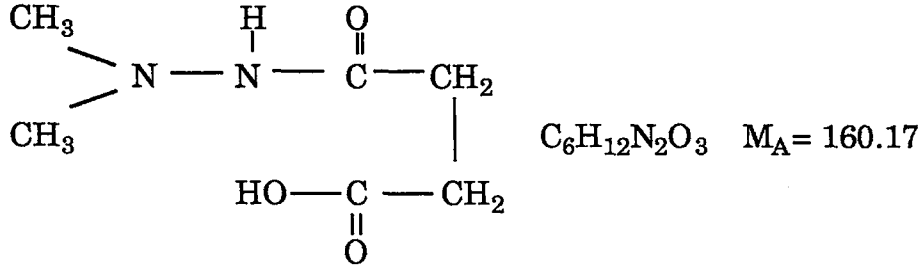
Diğer taraftan piliç insanlar için önemli bir besin kaynağıdır. Cıvcivlerdeki bu enzim sistemleri ilaç tarafından etkilenirse canlılarda gelişme bozukluğu, hastalık, verim düşüklüğü olabilir. Bu da üretimde ekonomik kayıplara yol açabileceği gibi sağlıklı besin tüketmeleri sonucu insanlar için de zararlı olabilir.

Bu konuda şüpheli ve karanlıkta kalan yönleri açığa çıkarmak amacı ile besin zinciriyle canlılara ulaşan daminozid'in cıvciv glutasyon-S-transferaz enzimlerinin sentez ve aktivite düzeylerine etkisinin ince bağırsak ve karaciğerde karşılaştırmalı olarak incelenmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Daminozid

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Süksinik asit 2,2 - Dimetil hidrazid

Görünümü: Açık sarı, kristalize

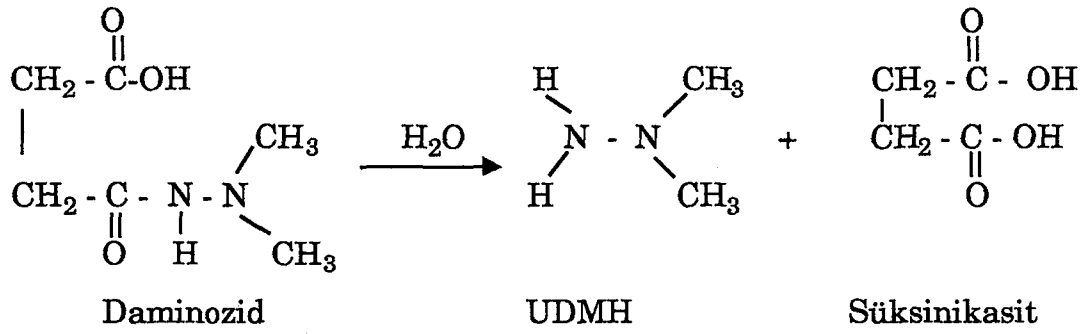
Kaynama Noktası: 154- 155°C

Çözünürlüğü: Suda %10, Asetonda %2.5, Metanolde %5.

Butanedioik asit mono (2,2- dimetil hidrazid), N - (dimetilamino) süksinamik asit, B-9, B-995, Alar, B-nine, kylar gibi çeşitli isimler altında anılmakta olup hidrazinler grubunda yer alır (19).

Daminozid, sebze ve meyvelerde özellikle elmalarda verimi ve kaliteyi artırmak amacı ile 1960'lı yılların sonlarından itibaren geniş çapta uygulanmaktadır (20,21,22). Daminozid'in bitki büyüme düzenleyici aktivitesi püskürme ile yapraktan absorpsiyonuna bağlıdır bu da bitki ve meyvelerde kalıntı bırakmaktadır (1).

Fizyolojik koşullar altında olduğu kadar meyve işleme proseslerinde kullanılan ısı, daminozid'in %1-5 oranında UDMH'ya dönüşümünü sağlamaktadır (23).



Şekil 1: Daminozid'in hidroliz reaksiyonu

Daminozid, asidik çözelti içerisinde nitritle reaksiyona sokulduğunda N-nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-nitrodimetilamin (NTDMA) gibi karsinojenlere dönüştüğü bilinmektedir. Daminozidin hidroliz ürünü UDMH'da aynı ürünleri vermektedir (24).

1.1-Dimetilhidrazin (19 mg/kg), dimetilnitrozamin (0.1 mg/kg) Daminozid (37 mg/kg) uygulanmış farelerin karaciğerinde yapılan DNA metilasyon çalışmalarında, her üçünün de DNA'yı metillediği bildirilmiştir (8). Daminozid'in hidroliz ürünü UDMH ve diğer metabolitleri (NDMA, NTDMA) karsinojen potansiyele sahip olmalarından dolayı Dünya Çevre Örgütü tarafından kullanımı yasaklanmıştır (24).

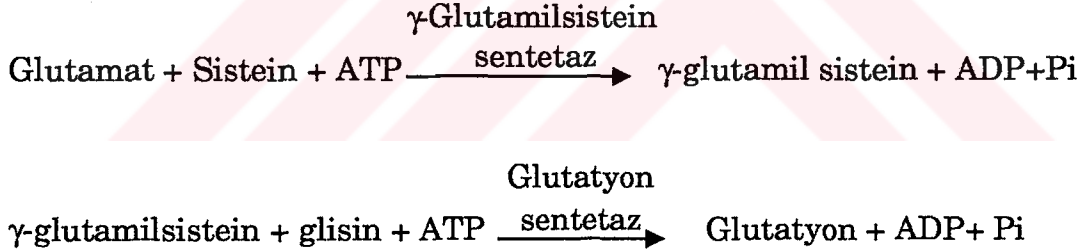
Daminozid 1980'li yıllarda kullanıma sunulmuş, 1989 yılında yasaklandığı Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığınca ifade edildiği halde, bununla ilgili resmi bir bültene ve bugüne kadar kullanım miktarına ilişkin istatistiksel veriler bulunmamaktadır (25).

LD₅₀ doz belirleme çalışmalarında daminozid uygulanan civcivlerde, teratojenik (ekstremitte bozukluğu, felç, gelişme geriliği) etkiler oluştuğu, baş bölgelerinde tümöre benzer oluşumlar gözlenmiştir (6).

2.2. GLUTATYON

2.2.1. Biyosentezi, Hücresel Dağılımı

Glutatyon (GSH), L-glutamik asit, L-sistein ve glisin amino asitlerini içeren bir tripeptit'dir. GSH biyosentezi iki basamaklı bir reaksiyonda yer alır. İlk basamak, L-glutamatin γ karboksil grubu, γ -glutamilsistein sentetaz tarafından L-sisteine takılır. Bu ilk basamak GSH oluşumunda hız belirleyici basamaktır. İkinci basamakta, L-glutamil-L-sistein dipeptidi glutatyon sentetaz tarafından glisine takılarak GSH oluşturur (Şekil 2). Her iki basamakta ATP bağımlıdır. GSH sitozolde sentezlenir, buradan mitokondri ve çekirdeğe dağılır. Plazmadaki GSH, önemli miktarda γ -glutamiltranspeptidaz içeren böbreklerde yıkılır. GSH karaciğerde 5-10 mM kadar yüksek olarak bulunmakla birlikte diğer dokularda da düşük düzeylerde bulunmaktadır (26).



Şekil 2: Glutatyonun sentezi

2.2.2. Glutatyon Konjügasyonu

Ksenobiyotiklerin (canlı için yabancı) birçoğu kısmen lipofiliktir. Bunlar gastrointestinal yoldan ya da akciğerleri geçerek kolayca absorbe edilirler. İnsanlar ve diğer canlılarda absorbe edilen ksenobiyotikleri daha çok hidrofilik metabolitlere dönüştürürler. Biyokimyasal işlemler altındaki bu dönüşümler "biyotransformasyon" olarak adlandırılmaktadır

ve genellikle doğada enzimatik olarak oluşturulur.

Geleneksel olarak, biyotransformasyon reaksiyonları 2 gruba ayrılır. Faz I reaksiyonları: Oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz. Faz II reaksiyonları: Glukronidasyon, sülfasyon, glutatyon konjügasyonu, amino asit konjügasyonu, metilasyon ve asetilasyondur (27).

Birçok substratın GSH ile konjügasyonu 3 gruba ayrılabilir:

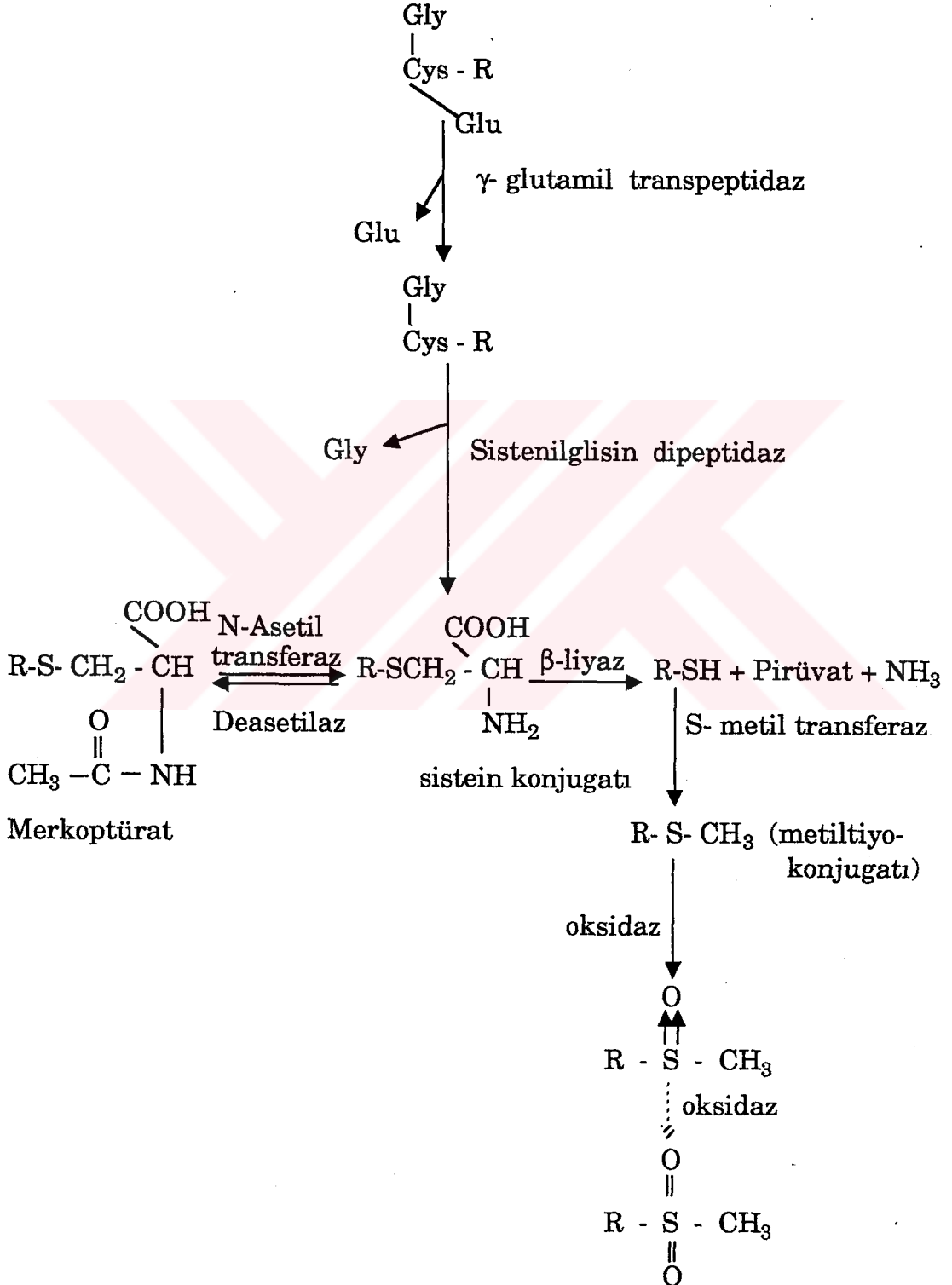
a- Aromatik ve alifatik epoksitlerin [(sitrenoksit ve benzo (a) piren oksit)] gergin oksiran halkası üzerine nükleofilik atakla GSH'a konjüge olurlar.

b- Alkenler ve diğer doymamış bileşikler (etakrinik asit, izotiyosiyanat, dimetil maleat vb.) çift bağa mişel katılımı ile konjüge edilirler.

c- Halojenlenmiş aromatik ve alifatik bileşiklerin [1-kloro-2,4 - dinitrobenzen (CDNB), 2-bromoizovaleril üre, bromosulfoftaleyin, melfalan, klorambusil vb) halojen bileşeni ile nükleofilik yer değiştirmeye konjüge edilirler (28,29,30).

Mevcut eletrofiller, proteinlerdeki tioller ve GSH ile reaksiyona girerler, fakat protein ve nükleik asitlerdeki N,C ve diğer nükleofilik merkezlerdeki S ile de zayıf ilişkiye girerler. Böylesi elektrofiller eğer anahtar enzimlerin aktif merkezlerindeki tioller ile reaksiyona girerlerse (mebrana bağlı reseptörler ya da transport proteinler) sitotoksik olabilirler. Diğer taraftan GSH ile reaksiyonları zayıf olan elektrofiller protein ve nükleik asitlerdeki tiol olmayan aktif merkezler (S-metiyonin ve nükleofilik C,N ve O) ile reaksiyona girerlerse genotoksik olabilirler (27).

Eritrosit, lens ve karaciğer gibi insan dokularında GSH'ın önemli rollerinden biri de indirgenmiş atmosferi sürekli kılmak, doku proteinlerini, lipidleri, hidrojen peroksit ve hidroperoksit gibi oksidanlardan korumaktır (31).

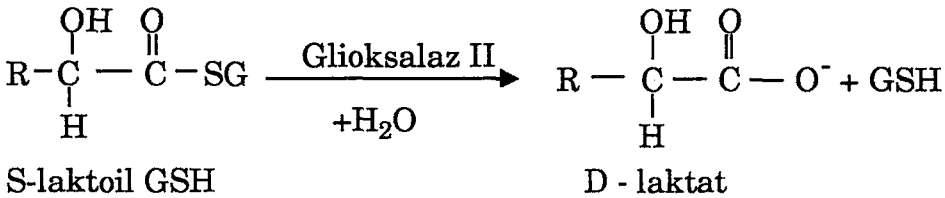
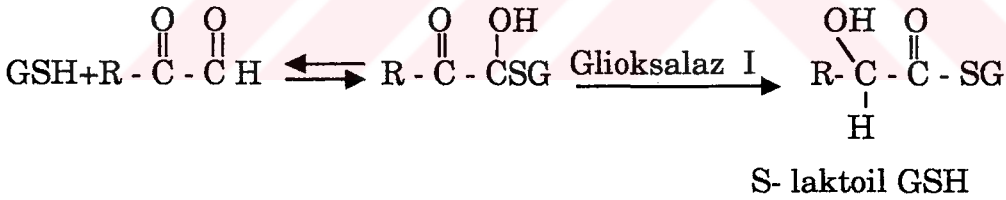


Şekil 3. GSH konjugatının yıkım metabolizması

GSH konjügasyonu hücre içerisinde oluşur, daha sonra safra ya da genel dolaşıma salınır. Safraya salınan konjügasyon ürünü enterohepatik sirkülasyona uğrayarak tekrar emilebilir. Kana geçen konjüгатlar karaciğer ya da böbrekte γ -glutamiltanspeptidaz aktivitesi ile sisteinil konjüгатına yıkılarak N-asetilsisteinil (merkaptürik asit) konjüгатı oluşturulur. GSH konjügasyonun bu son ürünü böbrek tarafından idrarla atılır. Çok az olarak sisteinil konjüгатları böbrekteki β -liyaz ya da bağırsak mikroflorasındaki C-S-liyaz'la C-S-bağı ayrıştırılarak S-metilasyon ve oksidasyona uğraması sonucu S-metilsülfoksi konjüгатları oluşturulabilir (Şekil 3) (32,33).

2.2.3. Glutatyon Bağımlı Enzimler

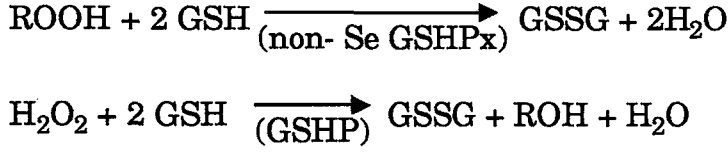
Glioksalaz I ve II, oksidatif stres süresince oluşturulan α - ketoaldehitleri iki basamakta GSH ile konjüge ederek D-laktata dönüştürür (Şekil 4).



Şekil 4: α - ketoaldehitlerin yıkım metabolizması

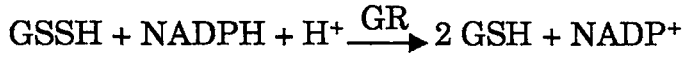
Oksidatif sitresten türeyen ve okstidatif membran hasarlarına yol açan organik hidroperoksit ve hidrojen peroksitler sırasıyla selenyum ba-

ğimsız peroksidaz (non-Se GSHP_x) ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSHP_x) tarafından katalizlenir (34).



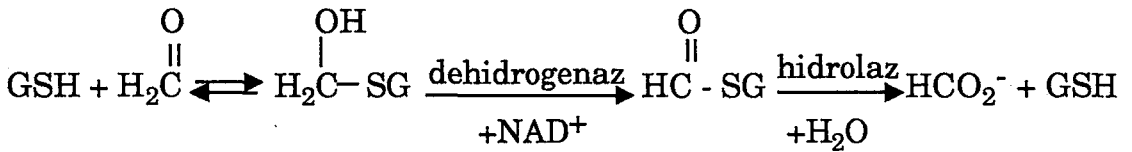
Şekil 5. Organik hidroperoksit ve hidrojen peroksitlerin indirgenmesi

Oluşan okside glutatyon (GSSG) glutatyon redüktaz tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



Şekil 6. Okside glutatyonun indirgenmesi

C =C çift bağlarının cis-trans izomerizasyonu da GSH bağımlı çeşitli enzimler tarafından katalizlenir. Maleil izomeraz, maleil asetoasetat ya da maleil - prüvat cis-trans izomerizasyonunda GSH kofaktör olarak gereklidir. Ayrıca formaldehit dehidrogenaz da GSH bağımlıdır ve formaldehitin oksidasyonunu katalizler (35).



Şekil 7. Formaldehit yıkım mekanizması

2.3. GLUTATYON - S- TRANSFERAZ

2.3.1. Yapısı, Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Glutatyonun birçok elektrofille reaksiyonu GST olarak tanımlanan çok işlevli kompleks enzim grupları tarafından katalizlenmektedir. Farklı GST formları çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Tablo 1). Her bir GST izoenzimi homo ve heterodimerik iki altbirimden oluşur (10,14,36).

Rat sitozolik GST'ler için genel olarak kabul edilen adlandırma da altbirim kompozisyonu temel alınmıştır. Herbir altbirime bir numara verilmiştir. Çift numaralandırma GST enzimlerinin iki altbirimini içeren homo ya da heterodimer olduğunu göstermektedir. Rat GST'lerin amino asit kompozisyonu, triptik haritası ve pepdit dizilim analizleri yapılmış, farklı GST sınıfları arasında çok az homoloji gözlenmiştir (33,37,38,39).

İnsan GST'leri ise latin alfabesi (α , β , γ , σ , Σ , μ , Ψ , π) ile gösterilmektedir. B₁₁ ve B₁₂ şeklindeki gösterimde ise izoelektrik noktaları ve altbirim kompozisyonları temel alınmıştır. Bir başka gösterim de sodyum dodesilsülfat (SDS) poliakrilamid jel (PAGE) elektroforezindeki göçlerine göre Ya, Yb, Yc şeklindedir (14,40,41,42).

Tablo 1: Çözünür GST'lerin adlandırılması ve sınıflandırılması

TÜR	α	μ	π	adlandırılmamış
Sıçan	1.1,1.2,2.2 8.8, 10.10	3.3, 3.4, 3.6 4.4, 4.6 6.9, (6.6?) 11.11	7.7	5.5
İnsan	α (B1B1) β, γ, σ (B1B2) Σ (B2B2) deri 9.9	μ, Ψ	π	
Fare*	N4.4	N1.1, C1.1 D.1., C2.2	N 3.3	

* N, C ve D harfleri fare soyunu göstermektedir.

Şimdiye kadar çeşitli insan dokularında saptanan çözünür GST'ler tablo 2'de özetlenmiştir. Mikrozomal GST ve çözünür GST'ler α , μ , π ve teta olmak üzere yeniden sınıflandırılmış ve isimlendirilmiştir (Tablo 3) (43).

Tablo 2: Çeşitli insan dokularından saflaştırılan GST'ler

DOKU	SINIF		
	α	μ	π
Karaciğer (16,44-48)	++	+ / -	+ / -
Akciğer (49)	+ / -	+ / -	++
Böbrek (50,51)	++	+ / -	++
İnce bağırsak (47,52,53)	++	+ / -	++
Adrenal (50)	++	+ / -	-
Mide (49)	+ / -	+ / -	++
Dalak (50)	+ / -	+ / -	++
Eritrosit (31,54,55,56)	-	-	++
Testis (57)	++	+ -	++
Uterus (58)	++	++	+

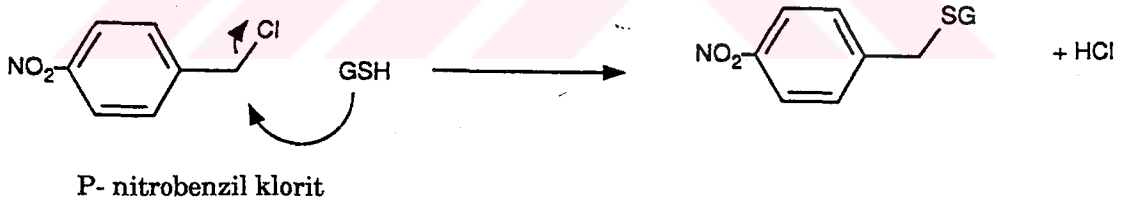
Tablo 3: GST'lerin yeni adlandırılması

GST olarak önceki tanımlama	Sınıf	Yeni adlandırma
Σ , B ₁ B ₁ , GST2 tip 1, Ha (Subünit 1), $\alpha_x \alpha_x$	Alfa	GSTA 1-1
γ , B ₂ B ₂ , GST2 tip 2, Ha (Subünit 1), $\alpha_y \alpha_y$	Alfa	GSTA 2-2
μ , GST1 tip 2, Hb (Subünit 4)	Mu	GSTM 1a-1a
Ψ , GST1 tip 1	Mu	GSTM 1b-1b
Kas, GST4	Mu	GSTM 2-2
Beyin GST5	Mu	GSTM 3-3
π , GST3	Pi	GSTP 1-1
GST Q	Teta*	
Mikrozomal GST	Mikrozomal	

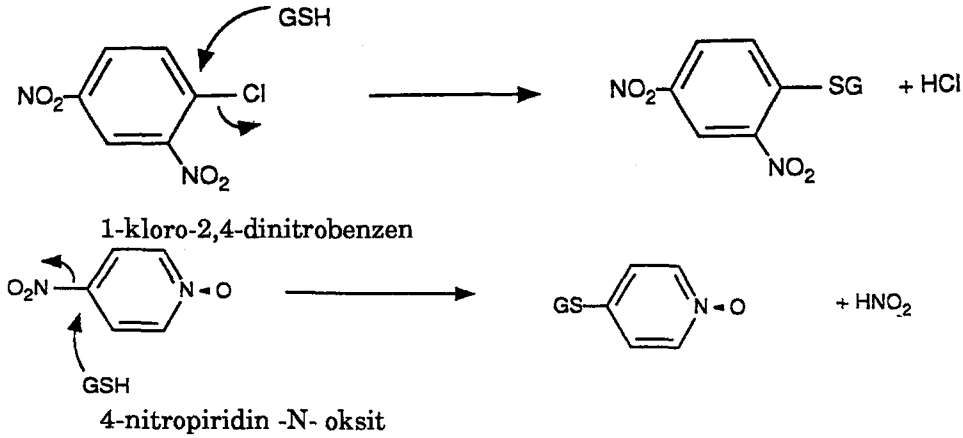
* Amino asit kompozisyonu belirlendiğinde isimlendirilecek.

2.3.2. GST'ler tarafından katelizlenen konjügason reaksiyonları

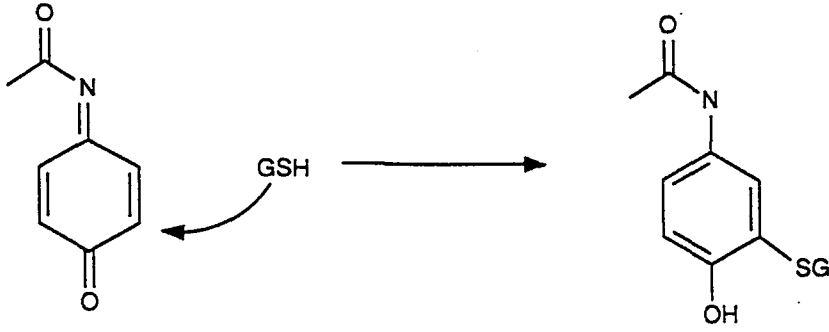
a) Doymuş karbondan nükleofilik yerdeğiştirme



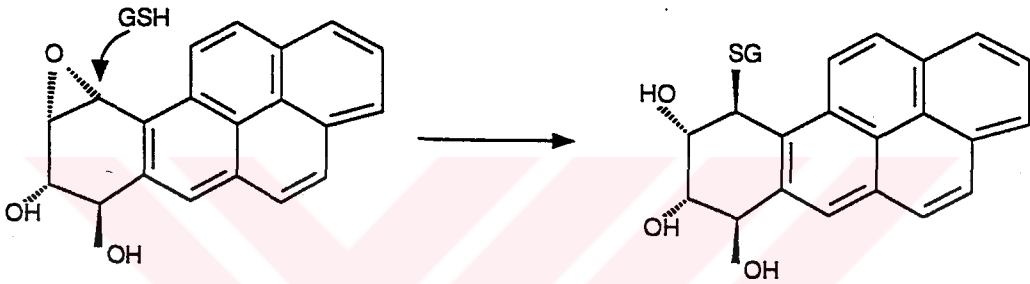
b) Aromatik karbondan nükleofilik yerdeğiştirme



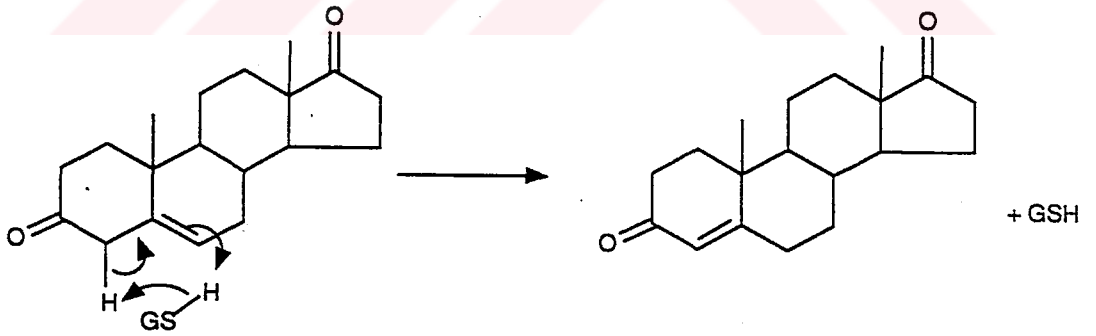
c) Çift bağa Mişel katılımı



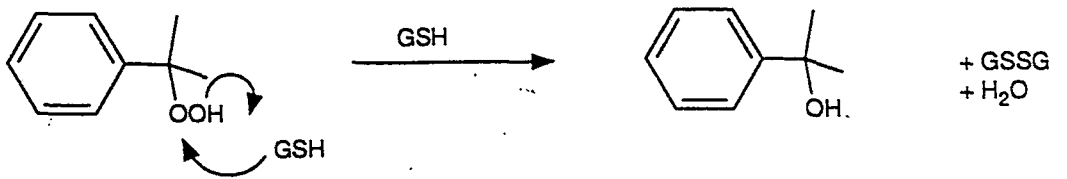
d) Gergin oksiran halka açılımı



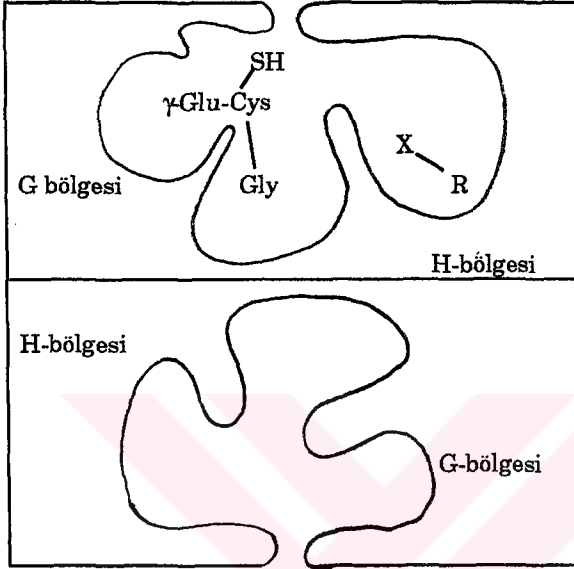
e) İzomeraz aktivitesi



f) Peroksidaz aktivitesi (se-bağımsız)



GST'ler tarafından GSH'nin elektrofilik ksenobiyotiklerle konjgasyonu, enzim üzerindeki G ve H olmak üzere iki farklı bölge ile katalizlenmektedir. G bölgesi, GSH'nin bağlanma bölgesi, H bölgesi ise elektrofilik bileşiklerin bağlanma bölgesi (Şekil 8) (59,60,61,62,63).



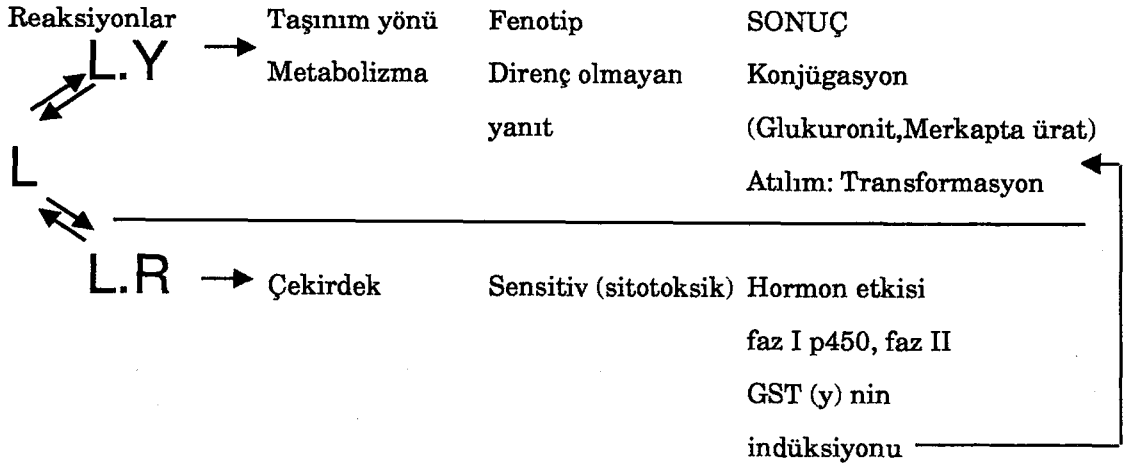
Şekil 8: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi

2.3.3. GST'lerin ksenobiyotik biyotransformasyondaki rolleri

GST'lerin başlıca fonksiyonu, ekzojen ve endojen kaynaklı elektrofillerin glutatyon ile konjügasyonu katalizlemesidir. Genelde GSH konjügasyonu detoksifikasyon yol ağını akla getirirse de bazı bileşikler (halo alkan ve alkenler, alkilnitrozoguanidinler) GSH konjügasyonu ile toksik bileşiklere dönüşmektedir (64).

GST'lerin katalitik rollerine ek olarak glutatyon - S- transferazlar substratı olmayan bir seri lipoflik bileşikleri [B (a) P ve Aflatoksin B₁ gibi bazı karsinojenleri (65), bilürubin (66), safra ve yağ asitleri (67,68), steroid hormonlar tiroid hormonlar ve bazı ksenobiyotikler (69,70)] bağlayarak bunların hücre membranıyla etkileşimini ve yığılımı-

nı önleyerek sitotoksik etkilerini engellemektedir. Ayrıca bu bileşiklerin hedef organlara taşınmasında da görev almaktadır (Şekil 9) (71,72).



Şekil 9: Intraselüler bağlanma ve taşıma yol ağı R: kendi reseptörü, Y: GST, L: steroid ve tiroid hormonlar, bilirubin, hem, safra asitleri, ksenobiyotikler

Glutasyon -S- Transferazlar yalnızca GSH konjügasyon reaksiyonlarını katalizlemez, aynı zamanda bir seri reaksiyonlarda da (redoks, izomerizasyon) görev alır (73). Redoks reaksiyonlarında, DNA ve lipidlerde oksijen varlığında serbest radikal hasarı oluşturan endojenik elektrofilleri, Lipid ve DNA hidroperoksitler dahil, lipid hidroperoksitlerin dekompozite olmaları ile açığa çıkan alkan, alken, aldehit ve alkenalları detoksifiye ederek oksidatif sitrese karşıda korur (74,75,76,77,78). İzomeras aktivitesi ile de prostaglandin biyosentezine katılmaktadır (32).

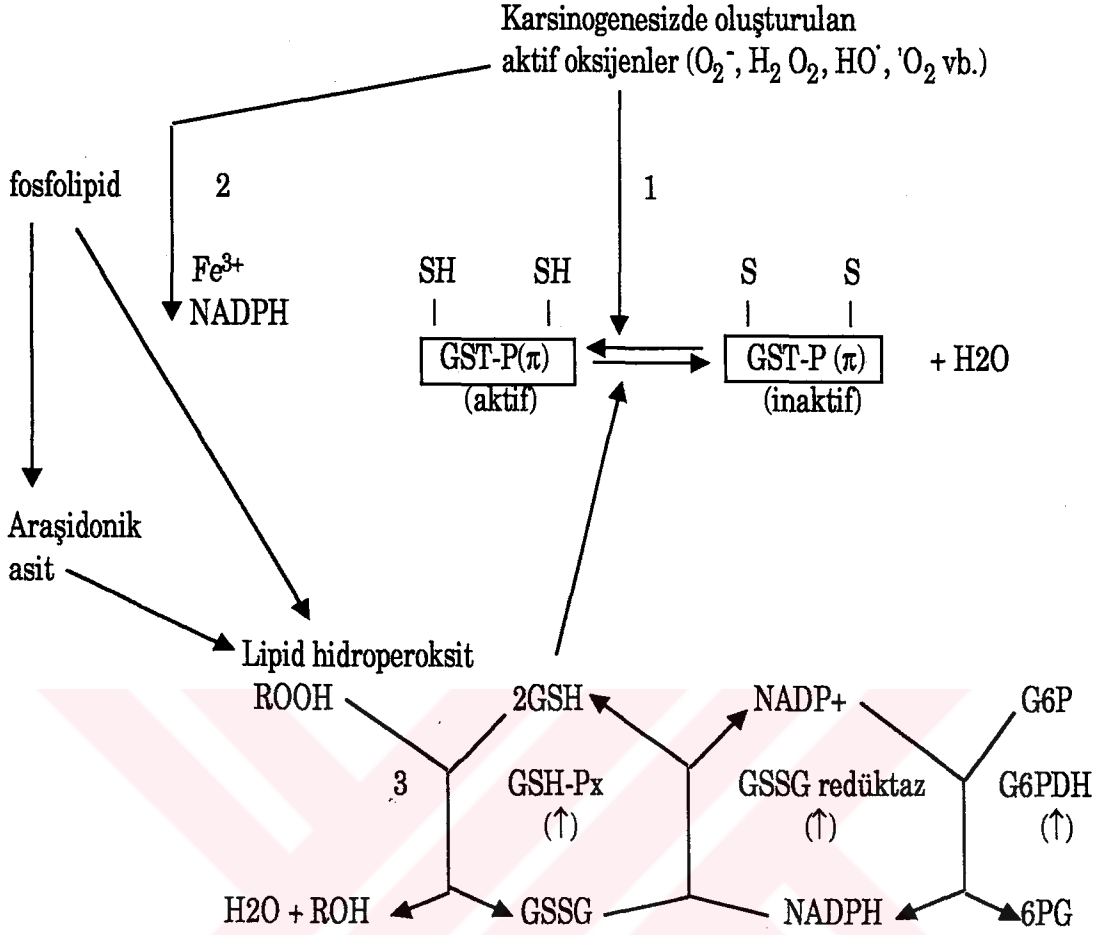
GST'lerin DNA'da radikal hasar sonucu oluşan timin hidroperoksit kalıntısının tamirinde rol alan enzimlerin (5-hidroksimetil-urasil ve timin glikol DNA gliksilazlar, endonükleaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz) ardışık etkilerini gerektiren sistemin de bir parçası olduğu ileri sürülmektedir (47,79).

GST'lerin çok işlevli enzim grubu olması ve geniş spektrumlu substrat özgülüğü (Tablo 4) göstermeleri, potansiyel olarak toksik olan kimyasallara (ilaçlar, çevre kirleticileri ve diğer ksenobiotikler) maruz kalan canlı organizmalara, bu kimyasalların zararlı etkilerine karşı bir savunma mekanizması oluşturmaktır (80,81).

Tablo 4: GST tarafından metabolize edilen ilaçlar (82-98).

Antibiyotik: Fosfomisin	Narkotikler:	Bromokarboksilik asit
Herbisit: S-Triazin		ve türevleri
Tridifan		Hekzaklorobenzen
Fluorodifen		fenobarbital
Prophachlor		3-metil konantren
Thiocarbomat	Antikanser ilaçlar:	Melfalan
2-4-D		Klorambusil
Pikolin ve türevleri		Nitrosovre
Insektisit: DDT	Karsinojenler:	Benzo (a) piren
Lindane		Aflatoksin B ₁
Dichlorous		Nitropiren
Paration		4-Nitropuenol üre
Diazinon		Allil izotiyosiyanat
Organo fosfat		PAH
ve türevleri		
Vazodilatör: Nitrogliserin	Analjezik:	Fenoasetin
İzosorbitdinitrat		

Sato ve arkadaşları pre (neo) tümör hücrelerinde GST-P izoenzimin kanserin erken teşhisinde bir tümör marker olabileceğini açıklamışlardır (99,100,101). Daha sonraları GST-P'nin gastrointestinal tümörler için de bir marker olabileceği belirtilmiştir. (102,103,104,105,106). Son zamanlarda tümör oluşumunda önemli rol oynayan lipid peroksidasyonunu engellemesi GST-P'nin önemini daha da artırmıştır (Şekil 10) (107).



Şekil 10: Reaktif oksijen ve lipid hidroperoksitlerin GST-P tarafından detoksifikasyonu

2.3.4. GST'lerin inhibisyonu

GST'lerin çeşitli kimyasallara karşı hücrelerce kazandırdığı savunma mekanizmaları sağlıklı hücreler için bir avantaj sağlarken, kanserli hücre ya da dokuların sağaltımında kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç oluşturması, kanserle mücadelede karşımıza bir dezavantaj olarak çıkmaktadır (95,108,109,110).

Araştırmacılar GST'lerin kanserli doku ya da hücrelerde anti-

kanser ilaçlara karşı oluşturduğu direnci kırmak amacı ile GST'leri inhibe etme yoluna gitmişlerdir (63,111,112).

Bu amaçla yapılan inhibisyon çalışmalarında, bazı diüretik ilaçlar (etakrinik, tienilik ve idakrinik asitler, bumetanid furosemid) (113), substrat olmayan ligandlar (Bütürik, krotonik asitler ve bilürubin) GST'lere tersinir olarak (66,114), Glutatyon analogları GST'leri tersinir olarak (115), tetraklorobenzoquinon ve türevleri GST'leri tersinmez olarak inhibe etmektedir (116).

Bir seri inorganik anyonlar ($C10_4^-$, SCN^- , NO_3^- , Br^-) GST'leri değişik oranlarda inhibe ederken (117), Metal iyonları (Pb, Cd, Zn, Mn, Cu, Mg, Be) %40-60 oranında inhibisyon göstermektedir (118).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

Daminozid, Glutasyon, Glutasyon agaroz, polibuffer exchanger 94 (PBE 94), polibuffer 96-HCl, polibuffer 74-HCl, ve CDNB Sigma firmasından, deneyde kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Merk firmasından sağlanmıştır.

-Etüv, Nüve FN 500

-Terazi, Bosch S 2000, Sauter S 2000

-Elektronik ısı kontrollü, kaydedicili spektrofotometre.

Hitachi 220

-Homojenizatör, B.Braun. Tip 85 3202

-Santrifüjler. Beckman Model J2-21

Beckman ultrasantrifüj model

L5-75 B

-Kolon kromatografi seti: LKB-Bromma

-Elektroforez-Bio-RAD: Mini-Protan cell

10-0,75 mm. Kat. no. 165-2940

3.2. Döletli yumurtaların sağlanması ve deneye hazırlık.

Ross Pm-3 ırkı döletli tavuk yumurtaları Kayseri Köy-Tür A.Ş'den sağlandı. 100'erlik 3 gruba ayrılan yumurtalar, nem oranı %70-80 olan ve 35° C ye ayarlı etüvde kuluçkaya yatırıldı. 5 gün sonra embriyo oluşumu gözlenen yumurtaların hava keseleri iğne ile delinerek kontrol grubuna serum fizyolojik, ikinci gruba daminozid'in LD₁₀ (3 mg/ml) dozu, üçüncü gruba ise LD₃₀ (9 mg/ml) dozları 100'er µl enjekte edildi (6). 21 gün sonra yumurtadan çıkan civcivlerin karaciğer ve ince

bağırsakları çıkarılarak %0,9 luk serum fizyolojik içerisinde alındı ve dokular küçük parçalara kesilerek serum fizyolojik uzaklaştırıldı.

3.2.1 Homojenizasyon

Her bir doku 1/3 (w/v) oranında 250 mM sukroz, 1mM EDTA ve 4mM β -merkaptotanol içeren 0.2 M potasyum fosfat pH=7,0 (Tampon A) tamponuna alındı. Karaciğer dokusu 1500 devir/dk'da 3 vuruşla, ince bağırsak dokusu 1500 devir/dk'da 5 vuruşla homojenize edildi (119).

3.2.2. Santrifügasyon

Homojenatlar 12.000 g'de 4°C de 15 dak Santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 105.000 g'de 4°C de 1 saat santrifüj edilerek sitozolik kısım elde edildi. Üstte toplanan yağlı kısım gazlı bez arasına yerleştirilen pamuktan geçirilerek uzaklaştırıldı (119).

3.2.3. Diyaliz

Diyaliz torbalarına alınan sitozolik kısımlar 4°C de sukroz içermeyen tampon A (A¹)ya karşı 1 gece diyaliz edildi.

3.2.4 Affinite kromatografisi

Diyaliz edilen örnekler daha önce tampon A' ile dengelenen glutatyon agaroz (1x10 cm) kolonuna uygulandı. Akış hızı 10ml/saat olacak şekilde 100 ml tampon A' geçirildi. Daha sonra kolon 100 ml 50 mM KCl içeren tampon A' ile yıkanarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. Kolon 100 ml 50mM tris-HCl pH=9,6 tamponu (tampon B) ile yıkandı. Aktivite gösteren kısımlar toplandı. Son olarak 5 mM GSH içeren 100 ml tampon B kolondan geçirildi. Aktivite gösteren kısımlarda protein tayinleri ve aktivite ölçümleri yapıldı (Tablo 5) (120).

3.2.5 Aktivite Tayini

500 µl 0.2 M sodyum fosfat pH=6.5 tamponu, 50 µl 20mM GSH, 50 µl 20mM CDNB, 50 µl enzim ekstresi ve hacim 1 ml'ye distile su ile tamamlandı. 340 nm'de 30°C de köre karşı absorbanlarındaki artış alınarak aktiviteleri hesaplandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 30°C'de 1 dakikada 1 µmol ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır (121).

3.2.6 Kromatofokusing

a) Affinite kolonundan alınan fraksiyonlar, 25 mM Tris-HCl pH=8.3 (tampon C) tamponla önceden dengelenen PBE 94 (1x30 cm) kolonuna uygulandı. Kolon 1:13 oranında seyreltilen ve 1M HCl ile pH=6,0'ya ayarlanan polibuffer 96 HCl ile yıkandı. Aktivite gösteren kısımlar toplandı.

b) Kolon 25 mM imidazol-HCl pH=7,4, tamponu ile yıkanarak dengelendi. 1:8 oranında seyreltilen ve 5 M HCl ile pH=4,0'e ayarlanan polibuffer 74-HCl ile yıkandı. Aktivite gösteren kısımlarda protein ve aktivite tayinleri yapıldı (55,120).

3.2.7. Protein Tayini

a) Affinite kolonundan alınan örneklerde protein tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (122).

b) Kromatofokusig kolonundan alınan örneklerde protein tayini Coomassi brilliant blue yöntemine göre yapıldı (123).

3.2.8. Sodyum dodesil sülfat-Poli akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

SDS-Poliakrilamid jel elektroforez sistemi Laemmli yöntemine göre hazırlandı (124). Standart proteinler olarak tripsinojen MA=24,000, β -Laktoglobulin MA=18,400, Lizozim MA=14,300, örneklerinde 25 μ l'si %0,4'lük ve %12'lik kesikli poliakrilamid jel plakalarına uygulandı. 200 volt sabit akımda 45' yürütüldü. Plakalar gümüş boyama yöntemi ile boyanarak proteinlerin molekül ağırlıkları standart proteinlere göre saptandı.

3.2.9. Optimum pH

Kromatofokusing kolonundan alınan SDS-PAGE'de molekül ağırlıkları saptanan GST'lar 6 değişik (pH=6; 6.5; 7,0; 7.5; 8,0; 8,5) pH'da optimum pH tayinleri yapıldı.

3.2.10. Substrat doygunluk eğrisi ve özgül aktivitelerin saptanması

Optimum pH'ları saptanan örneklerin, CDNB'nin 7 farklı (50, 100, 200,400,600,800,1000 μ M) derişimlerine karşı aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar Lineweaver-burk grafiğine alınarak km ve Vmax değerleri saptandı.

3.2.11. Ni ve Cd iyonlarının GST aktiviteleri üzerine etkileri

Ni ve Cd iyonlarının 5 farklı (200, 400, 600, 800, 1000 μ M) derişiminde, GST aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Cd iyonlarının etkileri grafiksel olarak değerlendirildi.

4- BULGULAR

4.1. GST'lerin glutatyon agaroz kolonundan saflaştırılması.

Glutatyon agaroz kolonundan alınan örneklerin volüm aktivitele-ri ve spesifik aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar tablo 5'de özetlendi.

$$\text{Volüm aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t \text{ (U/ml)}$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t \text{ (U/mg)}$$

V= Son hacim

ϵ = Molar soğurma katsayısı ($10 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d= Işık yolu (cm)

v= Enzimin kullanılan hacmi

$\Delta E / \Delta t$ = Birim zamanda abzorpsiyon farkı ($\Delta \epsilon_2 - \Delta \epsilon_1 / \Delta t_2 - \Delta t_1$)

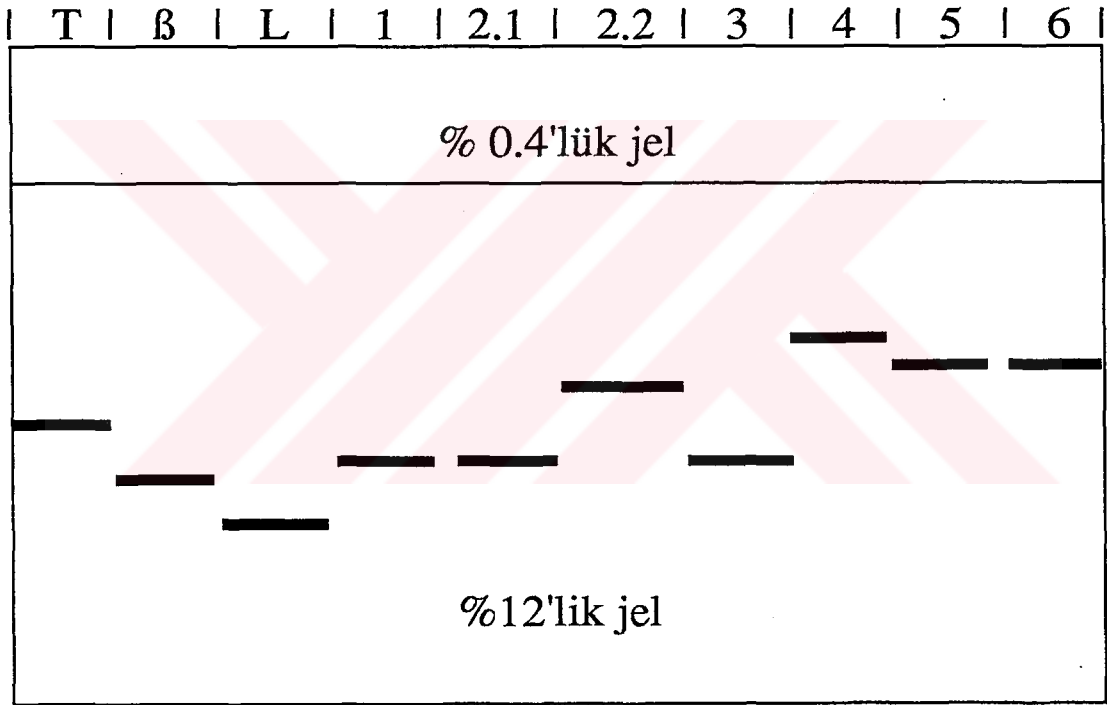
C_{protein} = Enzim derişimi (mg/ml)

Tablo 5 : Affinite kolonundan alınan GST'lerin saflaştırma verileri

	Toplam Hacim ml	Protein Derişimi mg/ml	Toplam Protein mg	Volüm Aktivite U/ml	Spesifik Aktivite mmol/dk mg	Toplam Aktivite Unite
AFFİNİTE KROMATOGRAFİSİ						
Karaciğer Kontrol	20,5	0.185	3,793	0,422	2.284	8,651
Karaciğer LD ₁₀	22.5	0.437	9.833	0,222	0.509	4,995
Karaciğer LD ₃₀	18,5	0.340	6,290	0,356	1,047	6,586
İnce bağırsak kontrol	19,5	0,100	1,950	0,071	0,710	1,385
İnce bağırsak LD ₁₀	20,0	0,242	4,840	0,019	0,079	0,380
İnce bağırsak LD ₃₀	16,0	0,233	3,728	0,010	0,043	0,160

4.2 GST'lerin saflıkları ve molekül ağırlıklarının saptanması

SDS-PAGE'de yürütülen standard proteinlerin molekül ağırlıklarına göre alıkonma faktörleri (Rf) hesaplandı (Şekil 11). Bulunan değerler yarı logaritmik grafik kâğıdına geçirilerek molekül ağırlığına göre standard eğri grafiği çizilerek buradan örneklerin Rf değerlerine göre molekül ağırlıkları saptandı (Tablo 6).



Şekil 11: Standard proteinler ve saflaştırılan GST'lerin SDS-PAGE

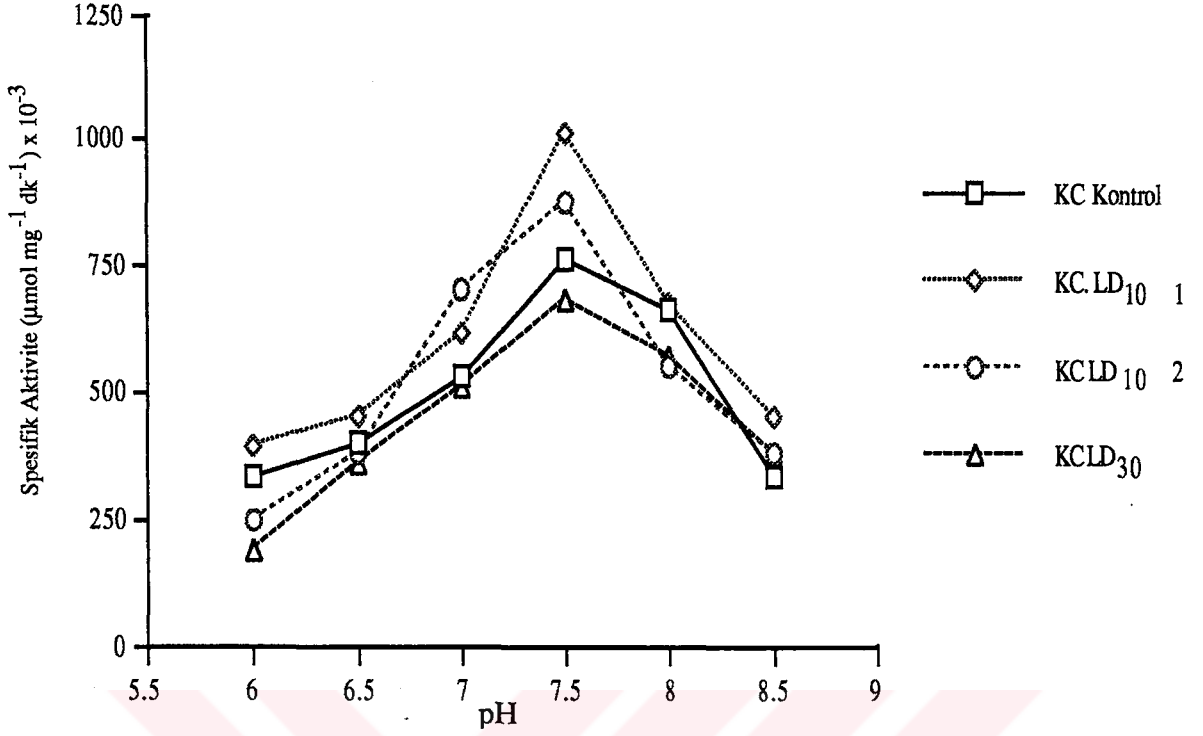
kesikli jel üzerinde gösterimi: T=Tripsinojen β = β -Laktoglobulin, L=Lizozim, 1=Karaciğer kontrol, 2,1ve 2,2=Karaciğer LD₁₀, 3=Karaciğer LD₃₀; 4=İnce bağırsak kontrol, 5= İnce bağırsak LD₁₀, 6= İnce bağırsak LD₃₀

Tablo 6. Saflaştırılan GST'lerin molekül ağırlıkları.

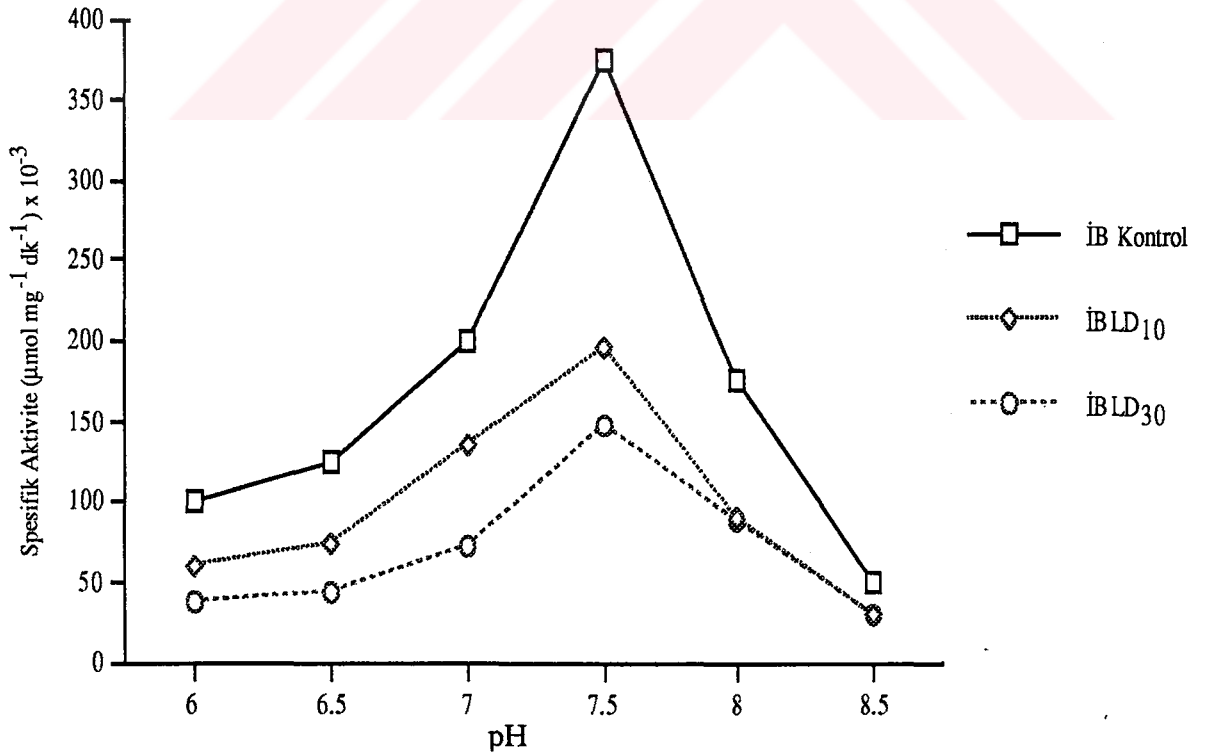
Örnekler	Rf	Molekül Ağırlığı
Tripsinojen	0,665	24.000
β .Laktoglobulin	0,754	18.000
Lizozim	0,823	14.300
Karaciğer kontrol	0,661	23.400
Karaciğer LD ₁₀ 1-	0,661	23.400
2-	0,572	26.500
Karaciğer LD ₃₀	0,661	23.400
İnce bağırsak kontrol	0,522	28.100
İnce bağırsak LD ₁₀	0,550	27.200
İnce bağırsak LD ₃₀	0,550	27.200

4.3. Optimum pH belirlenmesi

Affinite kolonunu takiben kromatofokusing sonrası saflaştırılan ve molekül ağırlıkları saptanan her bir GST için GSH ve CDNB'nin 1000 μ M sabit derişimlerinde 6 farklı pH'da (pH= 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) optimum pH çalışması yapıldı. Her bir örnek pH=7,5'de maksimum aktivite gösterdi ve optimum pH grafikleri çizildi.



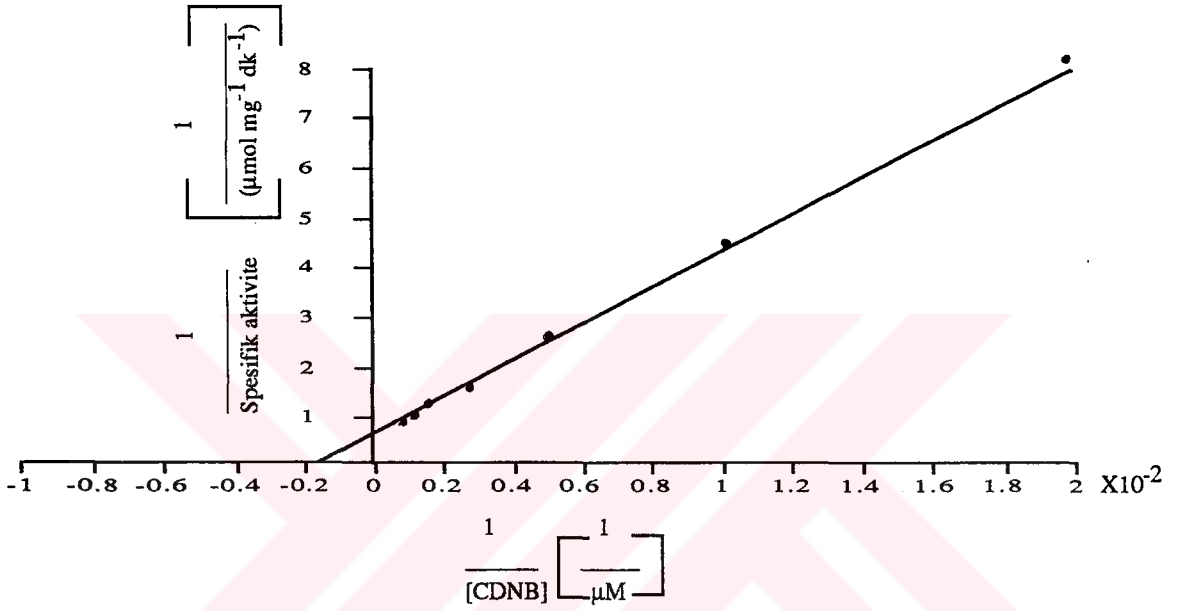
Şekil 12: Karaciğer GST'lerin optimum pH grafikleri (KC: Karaciğer)



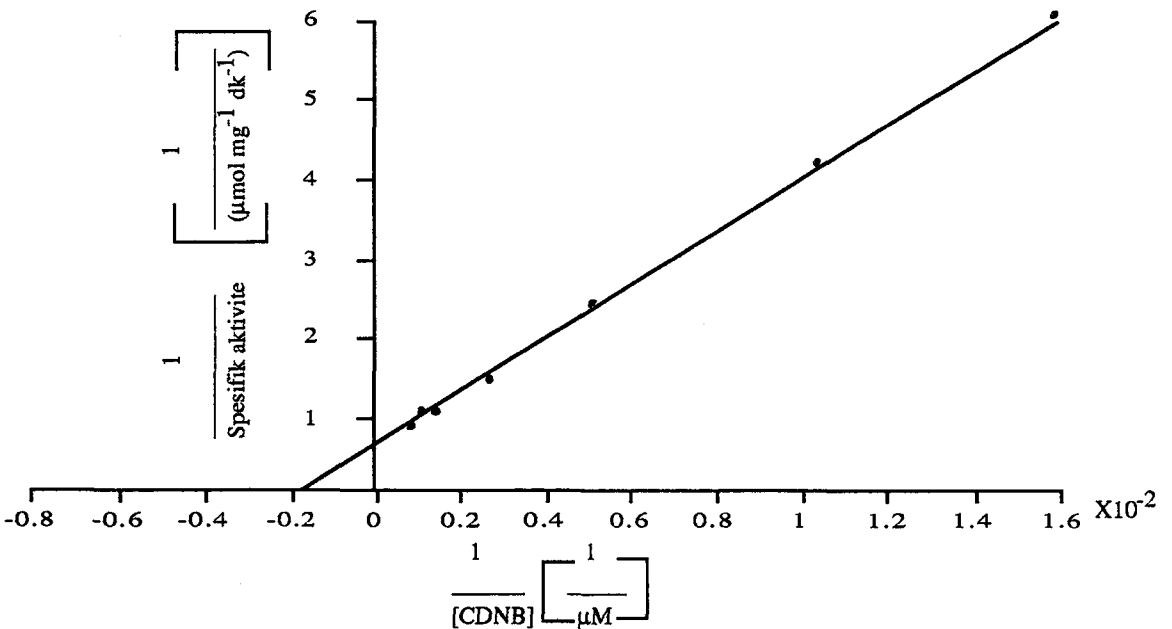
Şekil 13: İnce Bağırsak GST'lerin optimum pH grafikleri (İB: İnce bağırsak)

4.4. Km ve Vmax'ların saptanması

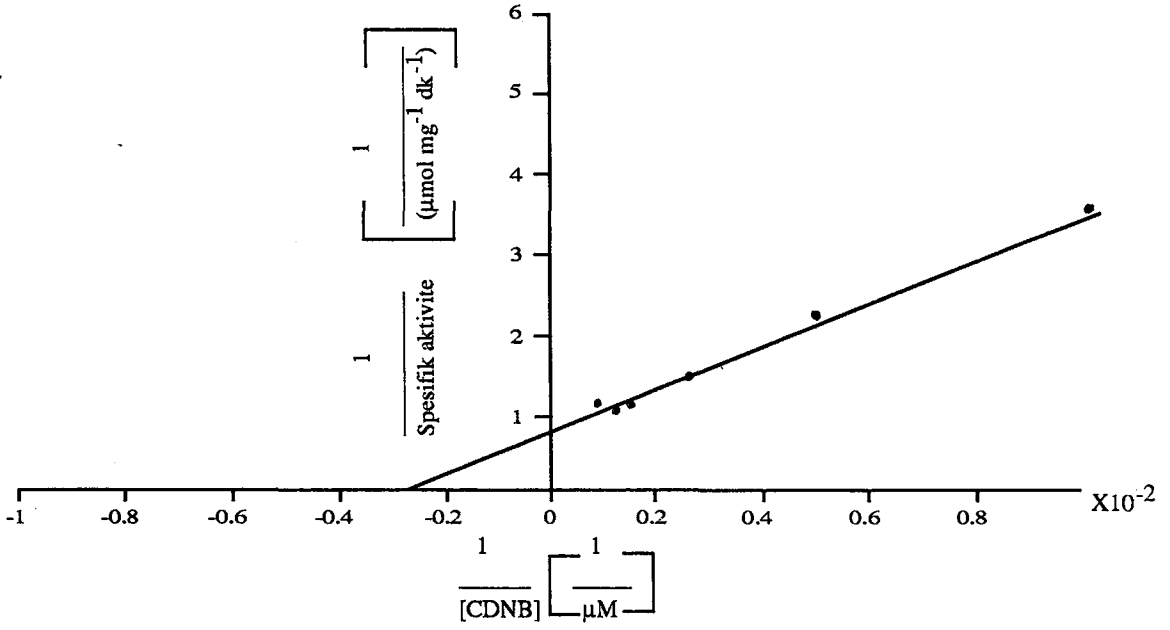
Optimum pH'ları belirlenen örnekler. CDNB'nin 7 farklı derişiminde (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 μM) aktivite ölçümleri yapıldı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek herbir örneğin Km ve Vmax değerleri belirlendi.



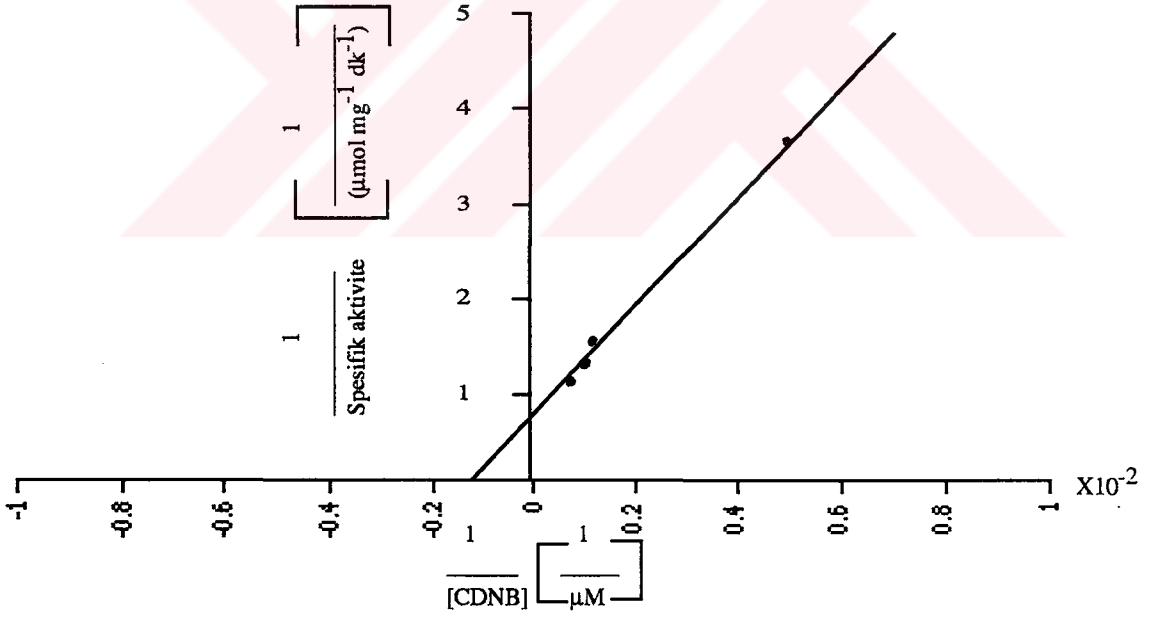
Şekil 14: Karaciğer kontrol eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği



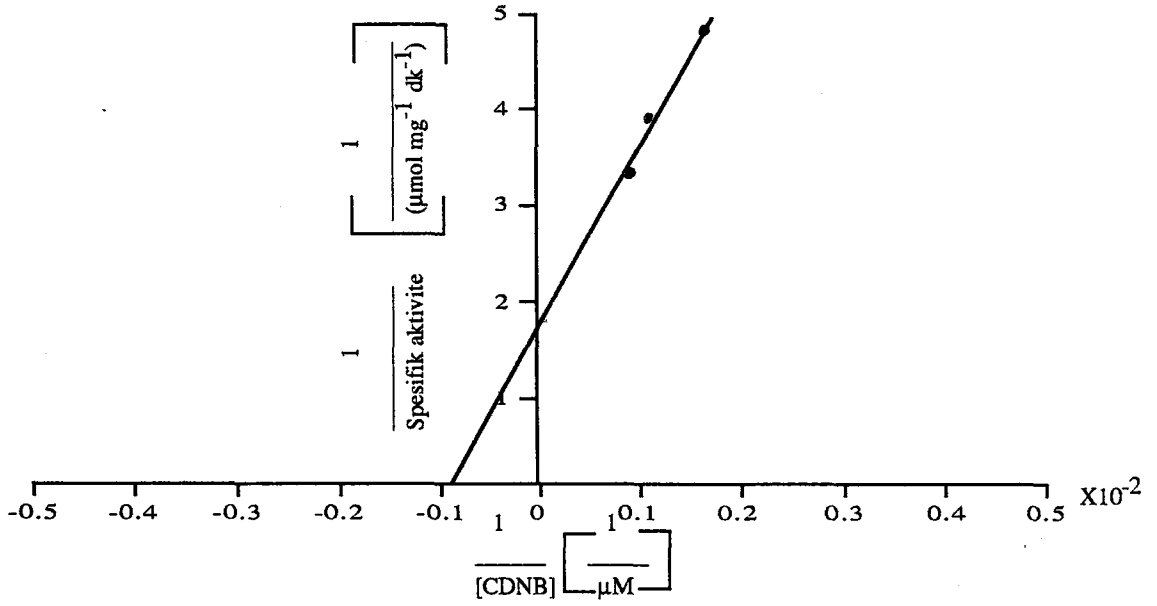
Şekil 15: Karaciğer LD₁₀ - 1 eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği



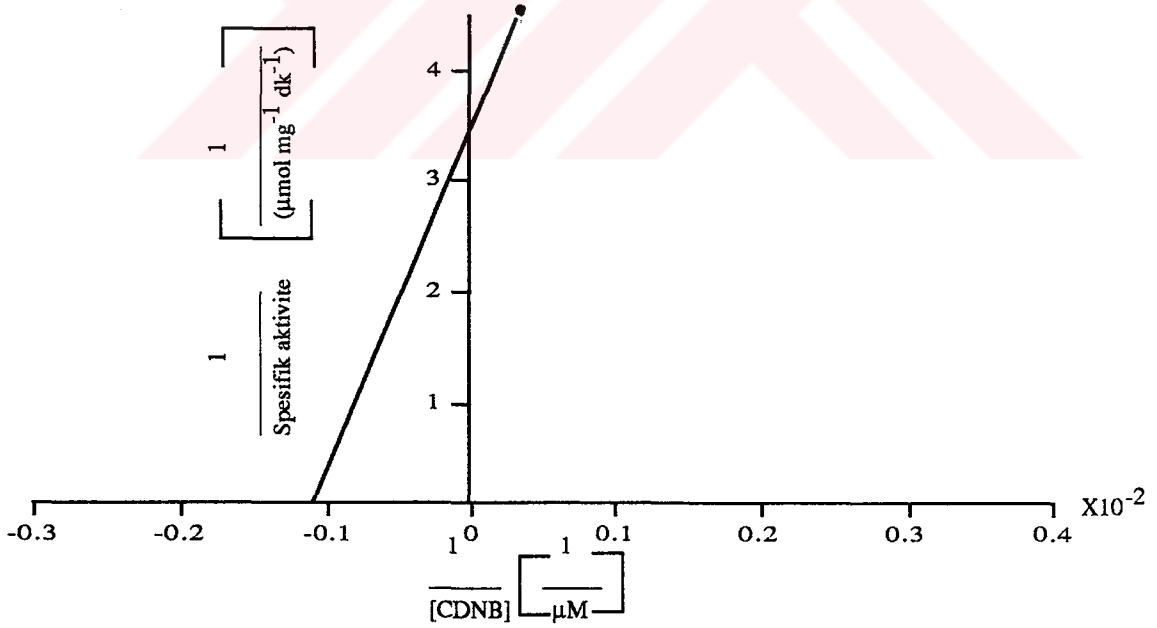
Şekil 16: Karaciğer LD₁₀ - 2 eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği



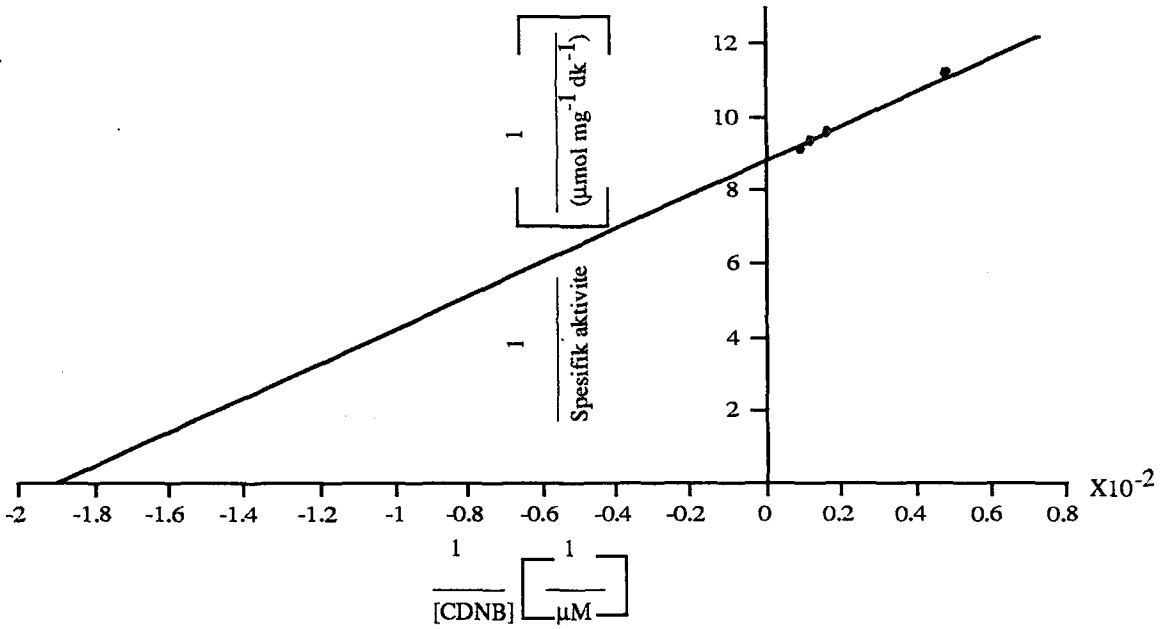
Şekil 17: Karaciğer LD₃₀ eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği



Şekil 18: İnce bağırsak kontrol eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği



Şekil 19: İnce bağırsak LD₁₀, eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği

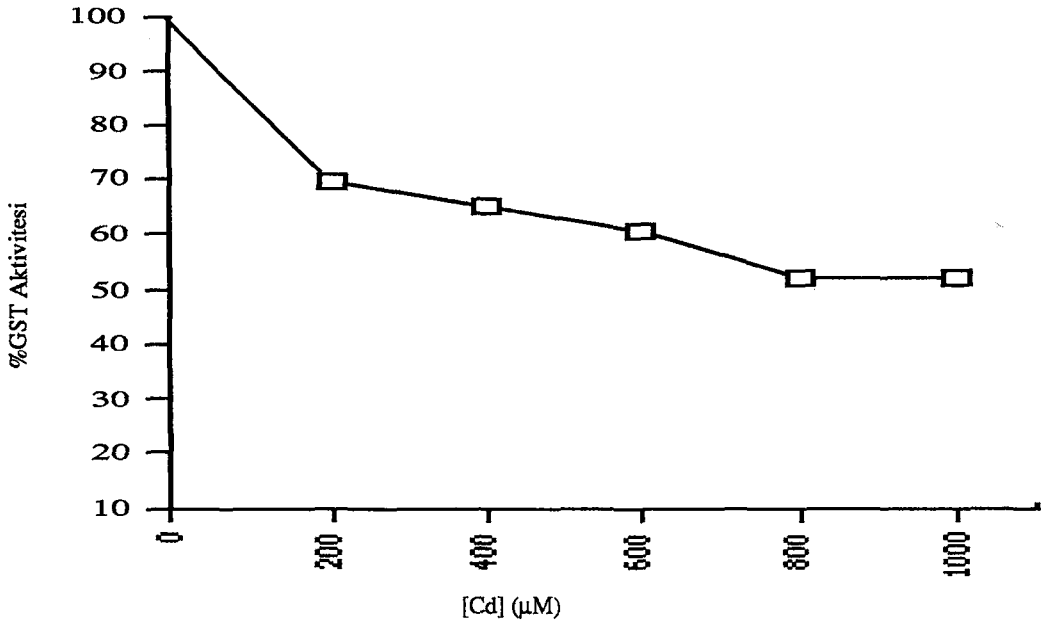


Şekil 20: İnce bağırsak LD₃₀, eğrisinin Lineweaver-Burke grafiği

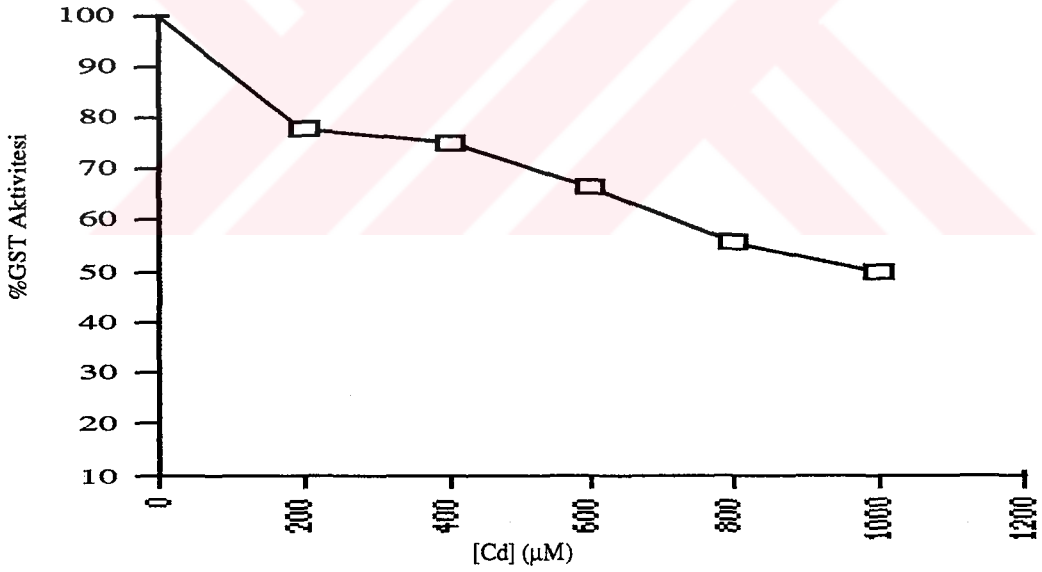
4.5. Ni ve Cd İyonlarının GST aktiviteleri üzerine etkileri

NiCl₂'nin 5 farklı derişiminde (200, 400, 600, 800, 1000 µM) yapılan deneylerde GST aktiviteleri üzerinde anlamlı bir etki gözlenmedi. NiCl₂'nin bazı derişimleri GST aktivitesini artırırken, bazı derişimlerinde inhibisyon gözlendi.

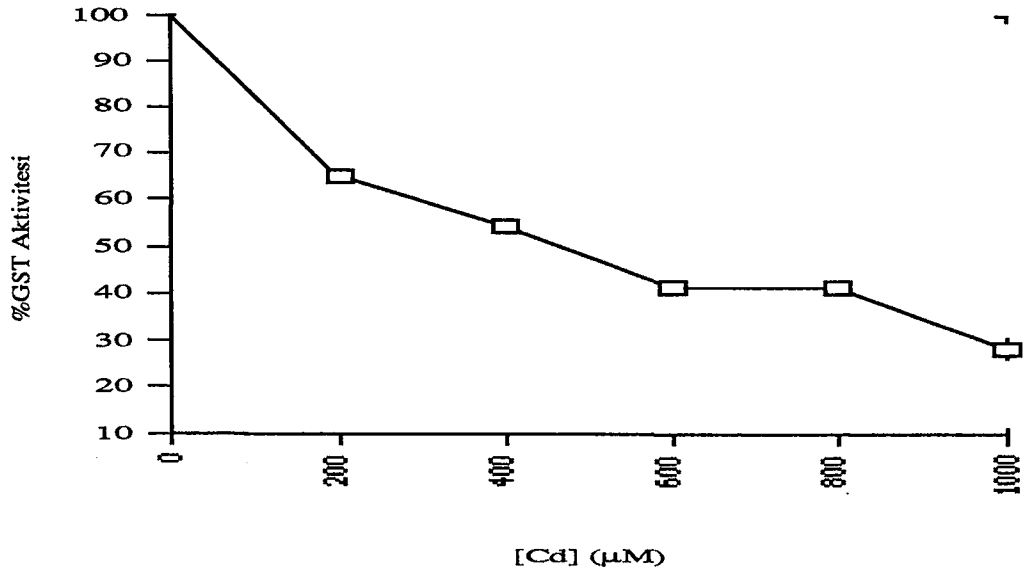
Cd'SO₄'ın 5 farklı derişimlerinde (200, 400, 600, 800, 1000 µM) herbir derişim GST aktivitelerini %50-70 arasında inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuçlar % aktivite olarak grafiklenmiştir.



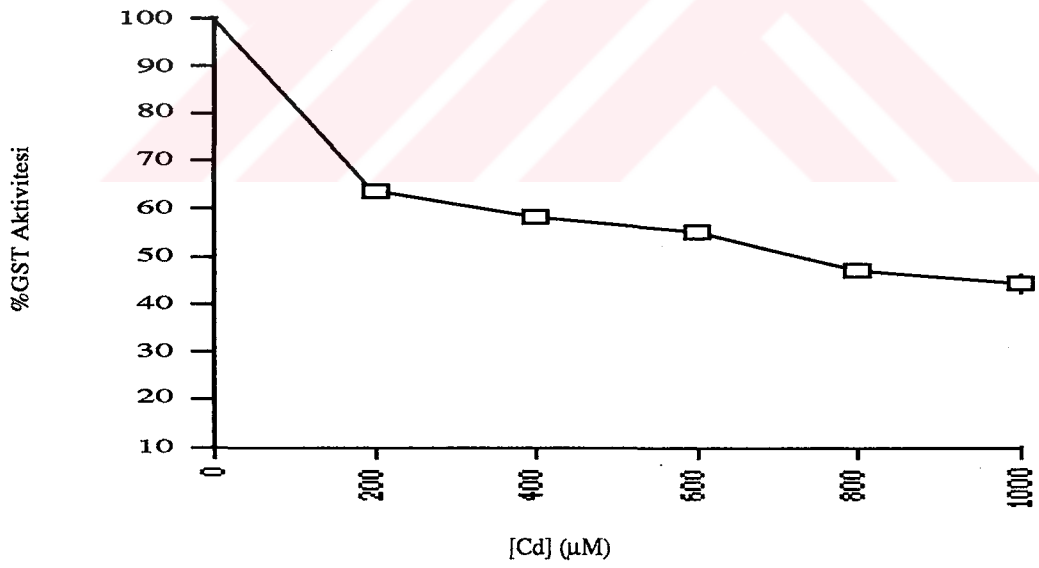
Şekil 21: Karaciğer kontrol GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



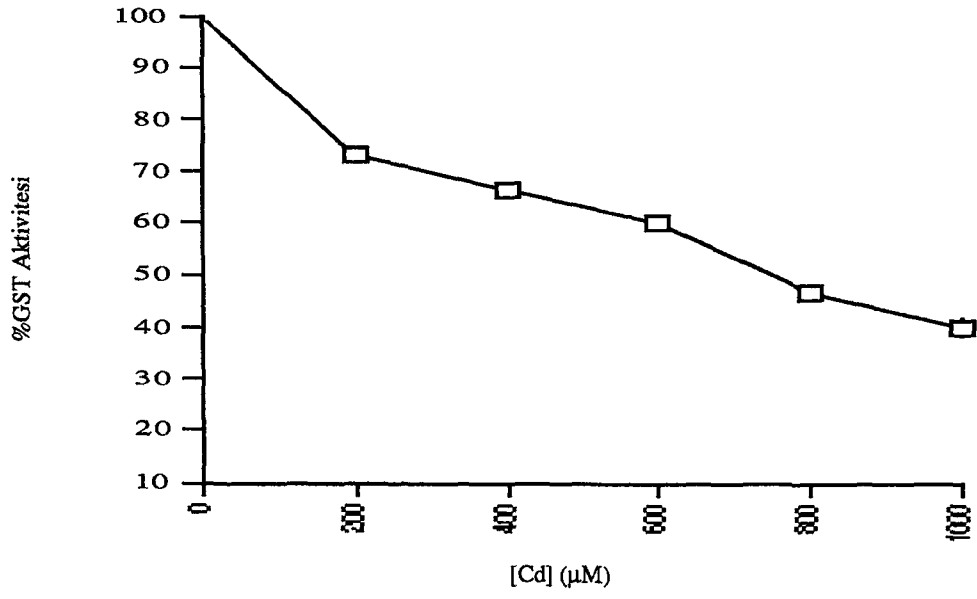
Şekil 22: Karaciğer LD₁₀ 1 GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



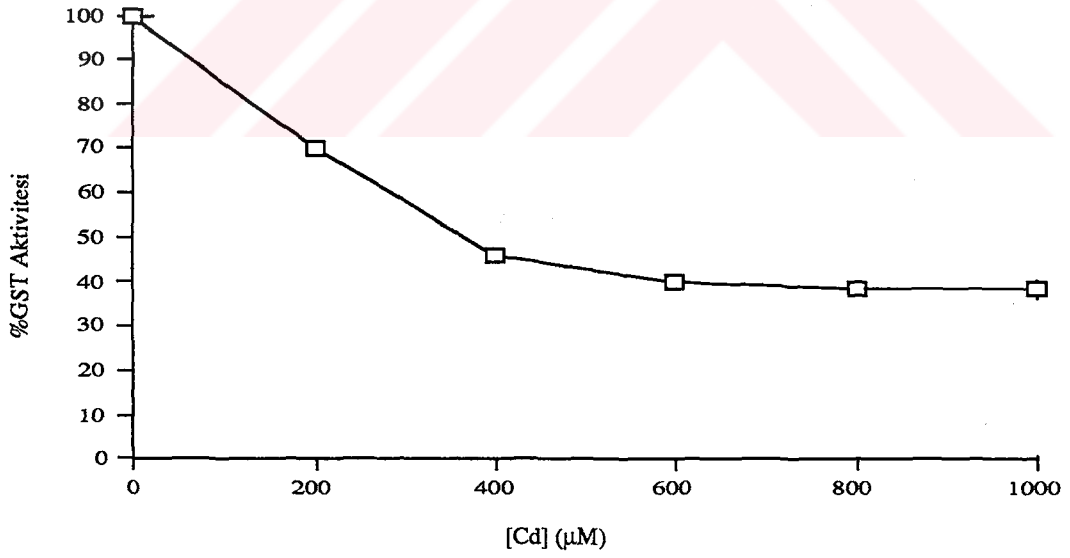
Şekil 23: Karaciğer LD₁₀ 2 GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



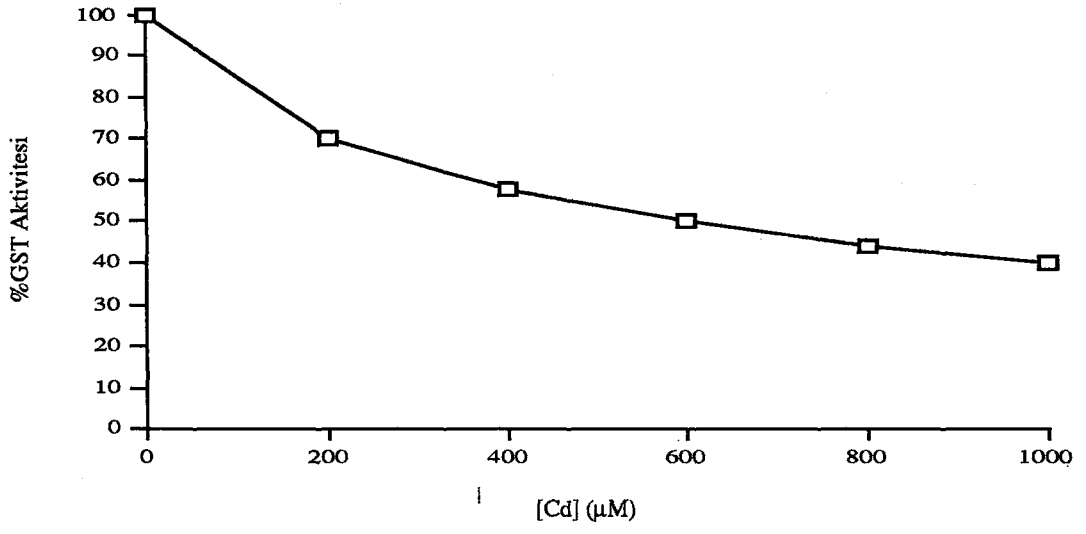
Şekil 24: Karaciğer LD₃₀ GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



Şekil 25: İncebağırsak kontrol GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



Şekil 26: İnce bağırsak LD₁₀, GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği



Şekil 27: İnce bağırsak LD₃₀ GST-CdSO₄ inhibisyon grafiği

5- TARTIŞMA ve SONUÇ

GST'lerin geniş spektrumlu substrat özgülüğü göstermeleri çok işlevli kompleks bir enzim grubu olmalarından ileri gelmektedir. Ksenobiyotikler ve çevre kirleticisi birçok bileşiklerin kendileri ya da aktif metabolitleri GST'lerin bazı formlarını indüklerken bazı formlarını da inhibe etmektedir. Pirazin ve pikolin (herbisit) GSTM1 izoenzimini kuvvetli bir şekilde etkileyerek aktivitesini azaltırken GSTA1 izoenzimi pikolin'in etkisiyle indüklenmektedir (83,84,85).

2,4-Diklorofenoksi asetat (2,4-D) ve 2,4,5-triklorofenoksiasetat (2,4,5-T) gibi herbisitler rat karaciğer GST izoenzimlerinden YbYb' ve YbYb formlarını tamamiyle inhibe etmiştir (84).

Bir grup nitrozaminlerle [Dietilnitrozamin (DNA), Dimetilnitrozamin (DMN) ve N-nitrozopirolidin (NPYR)] insan plasentasından saflaştırılan GSTP enzimi in vitro olarak etkileştirildiğinde, nitrozaminlerin artan dozları Km'i değiştirmezken Vmax'da azalmaya neden olmuştur. Bu da nitrozaminlerin GSTP'yi non-kompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir (125).

H₂ reseptör blokörü ve amino alkol furan türevi olan ranitidin, duodenum ve mide ülserlerinin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Ranitidin'in 2 mg/kg olarak ratlara uygulanan dozları karaciğer GST aktivitesini artırırken, böbrek GST enzimlerini de çok az indüklemiştir (126).

Bazı antikanser ilaçların [melfalan, 1,3-bis (2-kloroetil)-1-nitrozoure (BCNU) ve siklofosfamid] GST'ler için çok iyi substrat oldukları bilinmektedir (95).

Ksenobiyotiklere ve bunların olumsuz etkilerine karşı hücrelere eşsiz bir savunma mekanizması sağlayan GST'ler kanserle mücadelede büyük bir engel oluşturmaktadır (127).

Günümüzde antikanser ilaçlarla kanserin sağaltımında çalışmalar yapan araştırmacıların karşılaştıkları en büyük sorunlardan biri, kanserli doku ya da hücrelerin bu kimyasallara karşı oluşturulan dirençte en önemli rolü GST'lerin göstermiş olmasıdır (77,128, 129,130,131).

Bazı antineoplastik ilaçlar (Doxorubicin, vincristine, vinblastine, vindesine, siklofosfamid, mitomisin C ve idarubicin) insan plasentasından saflaştırılan GSTP 1-1 izoenzimine bağlanmaktadır (132). Antrasiklin grubundan bir antineoplastik ilaç olan idarubicin tarafından GSTP'yi kompetitif olarak, kinan grubuna dahil olan mitomisin-C'de non-kompetitif olarak inhibe etmektedir (133).

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak bilinen daminozid'in 100 mg/kg dozu intraperitoneal yolla farelere verildikten sonra karaciğer ve böbrek alkalen fosfataz aktivitesi çalışmalarında, en fazla etkinin böbrekte olduğu, enzimin aktivitesinin arttığı gösterilirken, karaciğer dokusundaki alkalen fosfataz etkilenmemiştir (134). Daminozid'in fare karaciğer ve kas glikojen seviyelerine etkisi incelendiğinde her iki dokuda da glikojen seviyeleri kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın karaciğerde kas dokusuna göre daha anlamlı olduğu tespit edilmiştir (135).

Daminozid'in 100, 200 ve 400 ppm'lik dozları aromatik (fenilalanin, triyonin, triptofan, tirozin) ve alifatik (alanin, arjinin, glisin, glutamik asit, izolösin, valin) amino asitleri ile in vitro olarak etkileştirildiğin-

de, kontrol grubuna göre nötral alifatik amino asitlerin (glisin, valin, alanin) Rf değerleri artarken, aromatik aminoasitlerin (triptofan, tirozin) Rf değerleri azalmıştır. Bu da daminozid'in metabolize edilmeden direkt olarak proteinlerin yapıtaşları ve enzimlerin fonksiyonel gruplarını oluşturan amino asitlere bağlanabileceğini göstermektedir (136).

Bu çalışmada, bitki büyüme düzenleyicisi olarak bilinen daminozid'in LD₁₀ ve LD₃₀ dozları uygulanan civcivlerin karaciğer ve ince bağırsak GST enzimleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelendi.

Glutasyon agaroz affinite kolonunda saflaştırılan GST'lerin ölçülen spesifik aktiviteleri sırasıyla;

Karaciğer Kontrol	2,284	unite/mg dk		
Karaciğer LD ₁₀	0,508	"	"	"
Karaciğer LD ₃₀	1,407	"	"	"
İnce bağırsak Kontrol	0,710	"	"	"
İnce bağırsak LD ₁₀	0,079	"	"	"
İnce bağırsak LD ₃₀	0,043	"	"	" olarak bulundu.

Tablo 5'e göre protein derişimleri her iki doku için kontrol gruplarına göre kıyaslandığında daminozid uygulanan civcivlerin protein miktarlarında artış gözlenmektedir. Buna karşın her bir grubun kontrol grubuna göre spesifik aktivitelerinde azalma gözlenmektedir. Protein derişimlerindeki artış LD₁₀ dozunda her iki doku için 2 kat olurken, LD₃₀ dozunda 1 kat artmıştır. Spesifik aktivitelerdeki azalış anlamsız protein sentezine bağlı olabilir.

Glutatyon agaroz kolonunu takiben kromatofokusing kolonundan alınan örneklerin Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanan Km ve Vmax değerleri sırasıyla řu şekildedir.

	Vmax ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{dk}^{-1}$)	Km (μM)
Karaciğer Kontrol	1,31	588
Karaciğer LD ₁₀ 1)	1,41	575
2)	1,29	357
Karaciğer LD ₃₀	1,24	833
İnce bağırsak kontrol	0,562	1111
İnce bağırsak LD ₁₀	0,286	909
İnce bağırsak LD ₃₀	0,113	53

Karaciğerde daminozid'in LD₁₀ dozu, molekül ağırlıkları 23.400 (kontrol grubu ile aynı) ve 26.500 olan iki farklı proteinin saflaştırılmasına neden olmuştur.

Ayrıca daminozid'in LD₁₀ dozu, karaciğerde kontrol grubuna göre GST aktivitesini indüklerken, LD₃₀ dozu GST aktivitesini artan Km değerine göre azaltmıştır.

İnce bağırsak GST aktiviteleri LD₁₀ dozunda yaklaşık %20 artış göstermektedir. LD₃₀ dozunda saptanan Km değerine göre bu artış yaklaşık 20 kat olmuştur.

Daminozid'in LD₃₀ dozu karaciğerde kontrol grubuna göre %50 inhibisyon oluştururken, ince bağırsakta 20 katı GST aktivitesini artırması, embriyonik dönemde karaciğerin sindirim sistemine göre

daha erken olgunlaşmasından dolayı, kimyasalla çok daha önce ve ince bağırsağa göre çok daha fazla miktarda karşılaşmasından ileri gelebilir.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezine göre GST'lerin saptanan molekül ağırlıkları karaciğer için 23.400 ile 27.000, ince bağırsak için 27.200-28.100 arasındadır.

Chang ve arkadaşları 1 günlük civcivlerin karaciğer sitozolik fraksiyonunda 5 değişik GST saflaştırmışlardır. Bunlardan CL2 (chicken liver) CL3 ve CL5'in homodimer olduğu, CL1 ve CL4'ün, CL1-2 ve CL3-4 gibi heterodimer olduğu gösterilmiştir. CL1'den CL4'e kadar saptanan molekül ağırlıkları 24.5-27 kDa arasındadır. Bizim saptadığımız molekül ağırlıkları, Chang ve arkadaşlarının değerleriyle oldukça yaklaşık değerlerdir. Chang ve arkadaşlarının saflaştırdıkları GST'lerin CDNB'ye karşı spesifik aktiviteleri $10-20 \mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ değerleri arasında değişmektedir. Bu bulgular bizim glutatyon agaroz kolonundan saflaştırdığımız GST'lerin spesifik aktivitelerinin yaklaşık 8-10 katıdır. Bunun nedeni Chang ve arkadaşlarının ardıl affinite kolonu uygulamalarından ileri gelebilir (137).

Koyun karaciğerinden saflaştırılan GST'nin CDNB için Km değeri $436 \mu\text{M}$ olarak (138), rat karaciğerinden saflaştırılan GST'nin CDNB için Km değeri $180 \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır (139). Biz bu değerleri civcivlerin karaciğerinde $588 \mu\text{M}$, incebağırsakta ise $1111 \mu\text{M}$ olarak saptadık.

Artan daminozid dozuna göre aktivasyonu azalan GST enzimleri sağlıklı dokuyu potansiyel olarak riskli hale getirmektedir. Azalan detoksifikasyon işlemi zararlı metabolitlerin bu dokuda birikimine buna paralel olarak da sitotoksik ve genotoksik olayları kaçınılmaz olarak

beraberinde getirecektir.

Bir diğer yönden artan daminozid dozuna göre indüklenen GST enzimleri sağlıklı doku ya da hücreler için bir savunma mekanizması oluştururken pre (neo) plastik hücrelerin de bir habercisi olabilmektedir.

Sonuç olarak daminozid, civcivlerden saflaştırdığımız karaciğer GST enzimlerini doza bağlı olarak inhibe etmiştir. İnce bağırsak GST enzimlerini ise doza bağlı olarak indüklemiştir.

Daminozid ve benzeri kimyasalların bilinçsizce ve aşırı olarak kullanmak bir yandan doğayı kirletirken diğer taraftan bu tür kimyasallara maruz kalan canlı sistemlerindeki ilaç metabolizmasından (aktivasyon ve detoksifikasyon) sorumlu sistemlerde olumsuz değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle böylesi kimyasalların kullanımında çok daha seçici olmak, tüketici ve üreticileri bu konuda bilinçlendirmek toplum sağlığı açısından önem taşımaktadır.

ÖZET

Bu karşılaştırmalı çalışmada, bir bitki büyüme düzenleyicisi olarak bilinen daminozid'in LD₁₀ ve LD₃₀ dozlarının Ross Pm-3 civcivlerin karaciğer ve ince bağırsak GST enzimleri üzerindeki etkileri incelendi.

Karaciğer ve ince bağırsak GST enzimleri affinite ve kromatofocusing kolonundan saflaştırıldı. Bu enzimlerin izoenzimleri kromatofocusing kolonundan alındı. Her bir farksiyondaki enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak saptandı. Affinite kolonundan saflaştırılan her iki dokudaki enzim aktivitelerini daminozid'in LD₁₀ ve LD₃₀ dozlarının azalttığı gözlemlendi. Daminozid'in LD₁₀ dozu kromatofocusing kolonundan ayrıştırılan karaciğerdeki enzim aktivitesini artırırken daminozid'in LD₃₀ dozu enzim aktivitesi üzerinde azaltıcı bir etkiye neden olmaktadır. Diğer taraftan, daminozid'in her iki dozu ince bağırsaktaki enzim aktivitesinde artışa neden olurken bu etki LD₃₀ dozunda daha fazladır.

Cd iyonları, karaciğer ve ince bağırsaktan saflaştırılan GST enzimlerinin aktivitelerinde yaklaşık %50-60 inhibisyon gösterdi.

Civcivlerin karaciğer ve ince bağırsak GST'lerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 23.000-27.000 ve 27.200-28.100 dalton arasında olduğu bulundu. Proteinler SDS.PAGE'de ayrıştırıldı.

Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki daminozid, civciv karaciğerinden saflaştırılan GST enzim aktivitelerini doza bağlı olarak azaltırken, ince bağırsak GST enzimlerini ise doza bağlı olarak indüklemiştir.

SUMMARY

In this comparative study the effects of LD₁₀ and LD₃₀ doses of Daminozide, known as a plant growth regulator, on glutathione-S-transferases in liver and small intestine of the chicks (Ross Pm-3) have been investigated.

GST enzymes of liver and small intestine were purified by affinity column. Chromatofocusing isozymes of these enzymes were eluted by chromatofocusing column. Enzyme activities in each fraction were detected as spectrophotometrically. Enzyme activities in both tissues purified by affinity column were shown to be decreased by LD₁₀ and LD₃₀ doses of daminozide. LD₁₀ dose of daminozide was demonstrated to stimulate enzyme activity in liver samples separated by chromatofocusing column while LD₃₀ dose of daminozide had a decreasing effect on the activity of the separated enzymes. On the other hand, both doses of daminozide caused increase on enzyme activity in samples from small intestine with being higher in LD₃₀ treated ones.

It was observed that Cd ions inhibited approximately 50-60% of the activities of the GST enzymes separated from liver and small intestine.

Molecular weights of the chicks liver and small intestine GST's were found to be in the range of 23.000-27.000 and 27.200-28.100 daltons respectively. Proteins were resolved by a SDS-PAGE.

The results obtained indicate that, depending on the dose of daminozide, GST activity purified from chick liver decreased while GST activity purified from chick small intestine increased.

KAYNAKLAR

- 1- Kvien, C.S. DePalma, R.A. Raczynski, A.R. and Helman, L.M.: Effect of soil and foliar daminozide applications on residue levels in peanut. **J.Agric.Food Chem.** 37: 200-203, 1989.
- 2- Drake, S. R. Baranowski, J. D. and Williams, M. W.: Response of "Top Red Delicious" apples to daminozide. **Jornal of Food Quality** 12: 193-202, 1989.
- 3- Gao, Y. and Cahoon, G.A.: Nitrogen fertilization and daminozide effects on growth, yield, and quality of concord grapes. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, 22 (15&16): 1547-1557, 1991.
- 4- Hasegawa, R. Cabral, R. Hoshiya, T. Hakoi, Kazuo. Ogiso, T. Boonyaphiphat, P.: Carcinogenic potential of some pesticides in a medium-term multi-organ bioassay in rats. **Int. J. Cancer.** 54: 489-493, 1993.
- 5- Gao, Y. and Cahonn, G.A.: Arginine in concord grape as affected by high soil nitrojen fertilization and daminozide. **Journal of plant nutrition.** 13 (12): 1479-1488. 1990.
- 6- Korkmaz, M. Göze, İ.: Daminozid'in civciv embriyosu üzerine teratojenik etkilerinin ve LD₅₀ dozunun belirlenmesi. **Doğa Türk Biyoloji dergisi.** 19: 1995 (baskıda).
- 7- Korkmaz, M.: Farelerin kemik iliği hücrelerinde in vivo olarak kısa süreli mikronükleus testi ile daminozid'in (succinic acid 2,2-dimethylhidrazide) etkisinin incelenmesi. **Yüksek Lisans tezi, C.Ü. Sağ. Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Sivas-1992**

- 8- Sagelsdorff, P. Lutz, W.K. and Schlatter C.: DNA methylation in rat liver by daminozide, 1,1 - Dimethylhydrazine, and dimethylnitrosamine. **Fundamental and Applied Toxicology**. 11: 723-730, 1988.
- 9- Ketterer, B.: Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. **Xenobiotica**. 16 (10-11): 957-973, 1986.
- 10- Vermeulen, N.P.E.: Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies. "**Glutathione-S-transferases and Drug Resistance**" Taylor and Francis London 1: 141-153, 1990.
- 11- Snel, C.A.W. Zhao, Y. Mulder, G.J. Pang, K.S.: Methods for the quantitation of bromosulphophthalein and its glutathione conjugate in biological fluids. **Anal. Biochem**. 212: 28-34. 1993.
- 12- Zhao, Y. Snel. C.A.W. Mulder, G.J. and Pang, K.S.: Localization of glutathione conjugation activities toward bromosulphophthalein in perfused rat Liver: Studies with the multiple indicator dilution technique. **Drug Metab. Dispos**. 21: 1070-1078. 1993.
- 13- Suzuki, T. Shaw, D.C. and Board, P.G.: Purification and Characterization of acidic glutathione-S-transferase 6 from human brain. **Biochem J**. 274: 405-408, 1991.
- 14- Stockman, P.K. McLellan, L.I. and Hayes. J.D.: Characterization of the basic glutathione-s-transferase B₁ and B₂ subunits from human liver. **Biochem J**. 224: 55-61. 1987.
- 15- Laisney, V. Cong, N.V. Gross, M.S. Frezal. J.: Human genes for glutathione-S-transferase. **Human Genetics**. 68: 221-227, 1984

- 16- Soma, Y. Satoh, K. and Sato, K. : Purification and subunit structural and immunological characterization of five glutathione-S-transferases in human Liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. **Biochimica et Biophysica Acta**. 869: 247-258, 1986.
- 17- Mannervik, B. and Jensson, H.: Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione-S-transferases in rat Liver cytosol. **The Journal of Biological Chemistry**. 257: 9909-9912, 1982.
- 18- Kitahara, A. Satoh, K., Nishimura, K. Ishikawa, . Ruike, K., Sato, K. Tusuda, H. and Ito, N.: Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione-S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. **Cancer Research**. 44: 2698-2703. 1984.
- 19- Windholz, M. Budavari, S. Blumetli, R.F. Otterbein, E.S.: The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Tenth edi. **Merck and Co, inc. Rahway, N.J. U.S.A** 406, 1983.
- 20- Lewis, J.C. Ju, H.Y.: The effect of foliar application of five plant growth regulators on the growth and yield of lowbush blue berry. **Can. J. Plant Sci.** 73: 607-610, 1993.
- 21- Mclaughlin, J.M. and Greene, D.W.: Fruit and hormones influence flowering of apple: I. Effect of cultivar. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 116 (3): 446-449, 1991.
- 22- McLaughlin, J.M. and GreEne G.W.: Fruit and hormones influence Glowering of apple: II. Effect of hormones. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 116 (3): 450-453.1191.

- 23- Narayanan, V.A. Begun, G.M. Bello, J.M. Stoke, D.L. Vo-Dinh, T.: Analysis of the plant growth regulator alar (daminozide) and its hydrolysis products using Raman spectroscopy, **Analisis**. 21: 107-112. 1993.
- 24- Pylypiw, H.M. JR. Harrington, G.W. Kozenauskas, R. and Diaz D.: The formation of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrodimethyl amine from the plant growth regulator daminozide (alar). **Journal of Food Protection**. 55 (3): 218-219, 1992.
- 25- Anonim, T.C. Tarım Orman Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Müd. Ruhsatlı zirai mücadele ilaçları bülteni, EK LİSTE - VIII. Zirai mücadelede kullanılan diğer maddeler. 1988.
- 26- Zubay, G.: The metabolic fate of amino acids. **Biochemistry**. thirth edi. Kolombia Univ. chap 19: 540, 1993.
- 27- Murray, R.K. Mayes, P.A, Granner, D.K. Rodwell. V.W.: Ksenbiyotiklerin metabolizması. **Harper'ın biyokimyası** böl 60: 811-817, 1993.
- 28- Jernström, B. Martinez, Martinez, M and Dock, L.: Glutathione transferase catalyzed conjügation of benzo (a) pyrene diol-epoxide with glutathione in rat hepatocytes. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance Taylor and Francis London** 1: 111-120, 1990.
- 29- Milbert, U. Wörner, W. Thomas, H and Oesch, F.: The role of the glutathione transferases in detoxifying carcinogens: Further characterisation of rat hepatic and renal glutathione transferases. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance, Taylor and Francis London** 3: 139-140, 1990.

- 30- Snel, C.A.W.: Glutathione conjugation of bromosulphothalein in the rat in vivo. Disposition and role of glutathione availability. **Doktora tezi, Amsterdam Center for Drug Research, Leiden Univ, Leiden. The Netherlands 1995.**
- 31- Awasthi, Y.C. Misra G. Rassin, D.K and Srivastava, S.K: Detoxification of xenobiotics by glutathione-S-transferases in erythrocytes: the transport of the conjugate of glutathione and 1-chloro-2,4- di-nitrobenzene. **British Journal of Haematology.** 55: 419-425, 1983.
- 32- Polhuijs, M. Tergau, A.C. and Mulder, G.J.: Chiral inversion and stereoselective glutathion conjugation of the four 2-Bromo -3-Methylvaleric acid stereoisomers in the rat in vivo and in vitro. **J. Pharmacol. Exp. ther.** 260: 1349-1354, 1992.
- 33- Pickett, C.B.: Glutathione-S-Transferases: Gene structure, regulation, and biological function. **Anv. Rev. Biochem** 58: 743-764, 1989.
- 34- Aceto, A. Ilio, C.D. Angelucci, S. Tenoglia, R. Zezza, A. Caccuri, A.M. and Federici, G.: Glutathione-related enzyme activities in testis of patients with malignant diseases . **Clinical chimica Acta.** 183: 83-86, 1989.
- 35- Mannervik, B. The isoenzymes of glutathione transferase. **Adv. Enzymol.** 57: 357-417, 1985.
- 36- Danielson, U.H. Esterbauer, H. and Mannervik, B.: Activity profiles of different mammalian glutathione transferases for A homologous series of 4-hydroxy alk-2-enals. **Glutathione-S-transferases and drug resistance: Taylor and Francis London** 3: 61-62, 1990.

- 37- Boyer, T.D.: The glutathione-S-transferases: An update. **Hepatology** 9 (3): 486-496, 1989.
- 38- Mannervik, B. and Jensson, H.: Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione-S-transferases in rat liver cytosol. **The Journal of Biological Chemistry** 257 (17): 9909-9912, 1982.
- 39- Beale, D. Meyer, D.J. Taylor, J.B. and Ketterer B.: Evidence that the Yb subunits of hepatic glutathione transferases represent two different but related families of polypeptides. **Biochemistry**. 137: 125-129, 1983.
- 40- Jakoby, W.B.: Glutathione Transferases. An overview. **Methods in Enzymology**. 113: 495-499, 1985.
- 41- Jakoby, W.B. Ketterer, B. and Mannervik, B. Glutathione Transferases: Nomenclature. **Biochemical Pharmacology**. 33 (16): 2539-2540, 1984.
- 42- Mannervik, B. and Guthenberg, C.: Glutathione Transferase (Human Placenta). **Methods in Enzymology**. 77: 231-235, 1981.
- 43- Mannervik, B. Awasthi, Y.C. Board, P.G. Hayes, J.D. Ilo, C.D. Ketterer, B. Listowsky, I. Morgenstern, R. Muramatsu, M. Pearson, R.W. Pickett, B.C. Sato, K. Widersten, M. and Wolf, C.Rc: Nomenclature for human glutathione transferases. **Biochem J**. 282: 305-308, 1992.
- 44- Stocman, P.K. Mclellan, L.I. and Hayes, J.D.: Characterization of the basic glutathione-S-transferase B₁ and B₂ subunits from human liver. **Biochem J**. 224: 55-61, 1987.

- 45- Singh, S.V. Dao, D.D. Partridge, C.A. Theodare, C. Srivastova, S.K. and Awosthi, Y.C.: Different forms of human Liver glutathione-S-transferases arise from dimeric combinations of at least four immunologically and functionally distinct subunits. **Biochem J.** 232: 781-790, 1985.
- 46- Worholm, M. Gutenberg, C. and Mannervik, B.: Molecular and catalytic properties of glutathione transferase μ from human liver: An enzyme efficiently conjugating epoxides. **Biochemistry** 22: 3610-3617, 1983.
- 47- Hayes, P.C. Harrison, D.J. Bouchier, I.A.O. Mclellan, L.I. and Hayes, J.D.: Cytosolic and microsomal glutathione-S-transferase isoenzymes in normal human liver and intestinal epithelium. **Gut.** 30: 854-859, 1989.
- 48- Hussey, A.J. Stockman P.K. Beckett, G.J and Hayes, J.D.: Variations in the glutathione-S-transferase subunits expressed in human Livers. **Biochemica et Biophysica Acta.** 874: 1-12, 1986.
- 49- Pacifici, G.M. Franchi, M. Colizzi, C. Giuliani, L. and Rane, A.: Glutathione-S-transferase in humans: development and tissue distribution. **Arch Toxicol** 61: 265-269, 1988.
- 50- Habig, W.H.: Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. **Methods Enzymol** 77: 398-405, 1981.
- 51- Ilo, C.D. Aceto, A. Zezza, A. Ricci G. and Federici. G.: Electrophoretic and immunological analysis of glutathione transferase isoenzymes of human kidney carcinoma. **Biochemical Pharmacology.** 38 (7): 1045-1051, 1989.
- 52- Peters, W.H.M. Roelofs, H.M.J. Magengast, F.M. and Van Tangeren, H.M.: Human intestinal glutathione-S-transferases. **Biochem J.** 257: 471-476, 1989.

- 53- Peters, W.H.M.: Purification and partial characterization of human intestinal glutathione-S-transferases. **Biochemical Pharmacology**. 37 (11): 2288-2291, 1988.
- 54- Board, P.G.: Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in Man. **Am. J. Human Genet.** 33: 36-43, 1981.
- 55- Hirell, P.A. Hume, R. Fryer, A. A. Coilins, M.F. Drew, R. Bradwell, A. R. and Strange, R.C.: Studies of the developmental expression of glutathione-S-transferase isoenzymes in human heart and diaphragm. **Biochemical et Biophysica Acta** 915: 371-377, 1987.
- 56- Boccio, G.D. Casalone, E. Sacchetta, P. Penelli, A. and Ilio, C.D: Isoenzyme patterns of glutathione transferases from mammalian erythrocytes. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**. 36: 306-312, 1986.
- 57- Aceto, A. Ilio, C.D. Angelucci, S. Felaco, M. and Federici, G.: Glutathione transferase isoenzymes from human testis. **Biochemical pharmacology** 38 (21): 3653-3660, 1989.
- 58- Ilio, C.D. Aceto, A. Boccio, G.D. Casalone, E. Pennelli, A. and Federici, G.: Purification and characterization of five forms of glutathione transferase from human uterus. **Evr. J. Biochem.** 171: 491-496, 1988.
- 59- Adang, A.E.P.: The glutathione binding site in Glutathione-S-transferases. **Doktora tezi. Division of toxicology center for biopharmaceutical sciences. Uni. of Leiden, The Netherlands**, 1990.

- 60- Mulder, G.J. Adang, A.E.P. Brussee, J. Ketterer, B. Meyer, D.J. and Van der Gen, A.: The glutathione binding site of glutathione-S-transferase isoenzymes from the rat: selectivity toward tripeptide analogues of glutathione. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance" Taylor and Francis London 1: 75-86, 1990.**
- 61- Adang, A.E.P. Moree, W.J. Brussee, J. Mulder, G.J. and Van der Gen, A.: Inhibition of glutathione-S-transferase 3-3 by glutathione derivatives that bind covalently to the active site. **Biochem J. 278:63-68, 1991.**
- 62- Adang, A.E.P. Brussee, J. Van der Gen, A. and Mulder, G.J.: Inhibition of rat liver glutathione-S-transferase isoenzymes by peptides stabilized against degradation by γ -glutamyl transpeptidase. **The journal of biological chemistry. 266 (2): 830-836, 1991.**
- 63- Waxman, D.J. Glutathione-S-transferases: Role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy. a review. **Cancer Research 50: 6449-6454, 1990.**
- 64- Vos, R.M.E, Snoek, M.C. Berkel, W.J.H.U. Muller, F and Bladeren, P. J.V.: Differential induction of rat hepatic glutathione-S-transferase isoenzymes by hexachloro benzene and benzyl isothiocyanate. **Biochemical pharmacology. 37(6): 1077-1082, 1988.**
- 65- Awasthi, Y.C. and Singh, S.V.: Binding of benzo (a) pyrene to rat lung and liver glutathione-S-transferases: In vivo and In vitro studies. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance" Taylor and Francis, London 3: 227-230, 1990.**
- 66- Fukai, F. Yatomi, S. Norita, T. Nishizawa, S. Nagai, T and Katayama, T.: Protection of glutathione-S-transferase from bilirubin inhibition. **J. Biochem 105: 968-973, 1989.**

- 67- Meyer, D.J. and Ketterer, B. Interaction of rat glutathione transferases 3-3 and 4-4 with fatty acids and a fatty acid hydroperoxide in the micromolar range. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance" Taylor and Francis. London 3: 53-56, 1990.**
- 68- Dierickx, P.J. In vitro binding of butyric acid and Crotonic acid by the soluble glutathione-S-transferases from rat Liver. **Research communications in chemical pathology and pharmacology. 45(3): 471-474, 1984.**
- 69- Ishigaki, S. Abramowitz, M. and Listowsky, I.: Glutathione-S-transferases are major cytosolic thyroid hormone binding proteins. **Archives of biochemistry and biophysics. 273 (2): 265-272, 1989.**
- 70- Stolz, A. Sugiyama, Y. Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N.: Identification and purification of a 36 kDa bile acid binder in human hepatic cytosol. **FEBS 177 (1): 31-35, 1984.**
- 71- Listowsky, I. Abramowitz, M. Homma, H. and Nutsu, Y.: Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. **Drug metabolism Reviews. 19 (384): 305-318, 1988.**
- 72- Boyer, T.D. Vessey, D.A. Holcomb, C. and Soley, N.: Studies of the relationship between the catalytic activity and binding of non-substrate ligands by glutathione-S-transferases. **Biochem J. 217: 179-185, 1984.**
- 73- Tew, K.D. Schisselbaver, J.C. Clapper, M.L. and Kuzmich, S.: Glutathione-S-transferases and resistance to alkylating agent. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance" Taylor and Francis, London 2: 309-317, 1990.**

- 74- Ketlerer, B. Meyer, D.J. Taylor, J.B. Pemble, S. Coles, B. and Fraser, G.: Glutathione-s-transferases and protection against oxidative stress. **"Glutathione-s-transferases and Drug resistance"** Taylor and Francis London 1: 97-107, 1990.
- 75- Jakoby, W.B.: Reactions of glutathione transferases: A pattern for the enzymes of detoxication. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance"** Taylor and Francis London 1: 87-96, 1990.
- 76- Ketlerer, B. Tan, K.H. Meyer, D.J. and Coles, B.: Glutathione transferases: A possible role in the detoxication of DNA and lipid hydroperoxides. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance"** Taylor and Francis. London 3: 149-164, 1990.
- 77- Wolf, C.R. Lewis, A.D. Carmichael, J. Ansell, J. Adams, D.J. Hickson, I.J. Harris, A. Balkwill, F.R. Griffin, D.B. and Hayes J.D. : Glutathione-S-transferase expression in normal and tumour cells resistant to cytotoxic drugs. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance"** Taylor and Francis London 3: 199-212, 1990.
- 78- Cholon, A. Giaccia, A.J. Lewis, A.D. Hickson, I. and Brown; J.M.: What role do glutathione-s-transferases play in the cellular response to ionizing radiation. **Raduation, Oncology. Biol. phys** 22: 759-763, 1991.
- 79- Watabe, T. Hiratsuka, A. and Ogura, K.: Sulphotransferase mediated covalent binding of the carcinogen 7,12- dihydroxymethyl benz [a] anthracene to thymus DNA and its inhibition by glutathione transferase. **Carcinogenesis** 8 (3): 445-453, 1987.
- 80- Hayes, J.D. Pickett, C.B. and Mantle T.J.: The glutathione-S-transferases and their contributions to drug resistance in nature. **"Glutathione-S-transferases and Drug resistance"** Taylor and Francis, London 1: 3-16, 1990.

- 81- Vos, R.M.E and Bladeren, P.F.O.: Glutathione-S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. **Chem. Biol. Interactions**. 75: 241-265, 1990.
- 82- Dauterman, W.C.: The role of glutathione-S-transferases in herbicide tolerance and resistance. "**Glutathione-S-transferases and Drug resistance**. Taylor and Francis, London. 2: 347-356, 1990.
- 83- Clark, A.G.: The glutathione-S-transferases and resistance to insecticides. "**Glutathione-S-transferases and Drug resistance**. Taylor and Francis, London 2: 370-378, 1990.
- 84- Vessey, D.A. and Boyer, T.D: Differential activation and inhibition of different forms of rat liver glutathione-S-transferase by the herbicides 2,4- dichlorophenoxy-acetate (2,4-D-) and 2,4,5-trichlorophenoxy acetate (2,4,5-T) **Toxicology and Applied Pharmacology**. 73: 492-499, 1984.
- 85- Dierickx, P.J.: The influence of picolines on glutathione transferase activity and subunit composition in human liver derived Hep G 2 cells. **Biochemical Pharmacology**. 48 (10): 1976-1978, 1994.
- 86- Polhuijs, M.: Glutathione conjugation of 2-bromo-carboxylic acids and their urea derivatives. Stereoselectivity and chiral inversion. **Doktora tezi, Division of Toxicology, Center for Bio-Pharmaceutical Sciences, Sylvius Laboratories, University of Leiden, The Netherlands**. 1992.
- 87- Polhuijs, M. Lankhaar, G. and Mulder, G.J.: The relation between hepatic glutathione concentration and the pharmacokinetics of 2-bromoiso valerylurea (BIU) glutathione conjugation in the rat in vivo. **Biochem. J**. 285: 401-404, 1992.

- 88- Mulders, T.M.T.: In vivo characterization of glutathione conjugation in humans. **Doktora tezi. Division of Toxicology and pharmacology of the leiden, Umsterdam for Drug Research. Leiden University. The Netherlands. 1995.**
- 89- Venizelos, V. Irth. H. Tjaden, U.R. Vander Greef, J. Breimer, D.D. Mulders, T.M.T. and Mulder, G.J.: Enantio selective determination of R- and S- (α -bromoisovalery) ürea in plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction. **J. Chromatogr. 573: 259-264, 1992.**
- 90- Mulders, T.M.T. Venizelos, V. Schoemaker, R. Colen, A.F. Breimer, D.D. and Milder, G.J.; Characterization of glutathione conjugation in humans. stereoselectivity in plasma elimination pharmacokinetics and Urinary excretion of (R-) and (S) -2- bromoisovalerylürea in healthy volunteers. **Clin. Pharmacol Ther. 53: 49-58, 1993.**
- 91- Van Bladeren, P.J. Scheffer, A.G. Vos, R.M.E. Bruggeman, I.M. and Temmink, J.H.M.: The interaction of allyl and benzyl isothiocyanate and rat liver glutathione -S- transferasas. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance. Taylor and Francis, London 3: 235-238, 1990.**
- 92- Kenkare, S.R. Han, C. and Benet, L.Z.: Correlation of the response to nitroglycerin in rabbit aorta with the activity of the mu class glutathione-s-transferase **Biochemical Pharmacology. 48 (12): 223-2235, 1994.**
- 93- Yeates, R.A.: Possible Mechanisms of activation of soluble guanylate cyclase by organic nitrates. **Drug. Res 42 (11): 1314-1317, 1992.**

- 94- Zimmermann, T. Leitold, M. and Yeates, R.A.: Comparison of isobutyl nitrate and isobutyl nitrite: tolerance and cross-tolerance to glyceryl trinitrate. **European Journal of pharmacology**, 192: 181-184, 1991.
- 95- Ketterer, B. Protective role of glutathione and glutathione-S-transferases in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research** 202: 343-361, 1988.
- 96- Ogura, K. Nishiyama, T. Okada, T. Kajital, J. Narihata, H. Watabe, T. Hiratsuka, A. and Watabe, T. Molecular cloning and amino acid sequencing of rat liver class theta glutathione-S-transferase yrs-yrs inactivating reactive sulfate esters of carcinogenic arylmethanols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 181 (3): 1294-1300, 1991.
- 97- Lotlikar, P.D. Graj, H. Prasanna, H.R. Cho, E.L. and Magee N.: Role of glutathione and glutathione-S-transferases in conjugation of reactive metabolites of chemical carcinogens. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics** 24: 6-43, 1987.
- 98- Coles, B. Djuric, Z. Howard, P. Beland, F. and Ketterer, B.: Detoxification of 1-nitropyrene metabolites by glutathione conjugation. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance, Taylor and Francis, London** 3: 241-244, 1990.
- 99- Sato, K. Satoh, K. Tsuchida, S. Hatayama, I. Shen, H. Yokoyama, Y. Yamada, Y. and Tamai, K.: Specific expression of glutathione-S-transferase P: forms in (Pre) neoplastic tissues: Their properties and functions. **Tohoku. J. Exp. Med.** 168: 97-103, 1992.

- 100- Sato, K. Kitahara, A. Yin, Z. Ibina, T. Satop, K. Tsuda, H. Ito, N. and Dempo, K.: Molecular forms of glutathione-S-transferase and UDP- glucuronyltransferase as hepatic preneoplastic marker enzymes. *417: 213-223, 1983.*
- 101- Satoh, K. Kitahara, A. Soma, Y. Inaba, Y. Hatoyoma, I. and Sato, K.: Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci 82: 3964-3968, 1985.**
- 102- Peters, W.H.M. Nagengast, F.M. and Wobbes, T.: Glutathione-S-transferases in normal and cancerous human colan tissue. **Carcinogenesis. 10 (12): 2371-2374, 1989.**
- 103- Nitsu, Y. Tshigaki, S. Takahashi, Y. Hirata, Y. Saito. T. Arisato, N. Hosoda, K. Watanabe, N. Kohgo, Y.: GST- π assay for serodiagnosis of malignancy. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance. Taylor and Francis, London. 2: 409-418, 1990.**
- 104- Shiratori, Y. Soma, Y. Maruyama, H. Sato, S. Takano, A and Sato, K.: Immunohistochemical detection of the placental form of glutathione-S-transferase in dysplastic and neoplastic human uterine cervix lesions. **Cancer research. 47: 6808-6809,1987.**
- 105- Kodate, C. Fukushi, A. Narita, T. Kuda, H. Soma, Y. and Sato, K.: Human placental form of glutathione-S-transferase (GST- π) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. **Jpn. J. Cancer Res. 77: 226-229, 1986.**

- 106- Ikawa, E. Tsuda, H. Sakata, T. Masui, T. Satoh, K. Sato, K. and Ito, N.: Modification potentials of ethyl alcohol and acetaldehyde on development of preneoplastic glutathione-S-transferase p-form-positive liver cell foci initiated by diethylnitrosamine in the rat. **Cancer Letters**. 31: 3-60, 1986.
- 107- Schöffer, J. Gallay, O. and Ladenstein, R.: Glutathione transferase from bovine placenta: Preparation, biochemical, characterization, Crystallization, and preliminary crystallographic analysis of a neutral class Pi enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**. 263 (33): 17405-17411, 1988.
- 108- Shea, T.C. and Henner, W.D.: Glutathione transferase in human tumors. "Glutathione-S-transferases and Drug resistance. **Taylor and Francis, London** 3: 227-230, 1990.
- 109- Pitot, C.H. Sato, K.: U.S - Japan cooperative cancer research program conference "Meeting Report". **Cancer Research**. 48: 6249-6251, 1988.
- 110- Sato, K.: Glutathione-S-transferases and hepatocarcinogenesis. **Jpn. J. Cancer Res**. 79: 556-572, 1988.
- 111- Ford, J.M. Haita, W.N. Matlin, S.A. and Benz, C.C.: Modulation of resistance to alkylating agents in cancer cell by gossypol enantiomers. **Cancer letters**. 56: 185-194, 1991.
- 112- Nishihara, T. Maeda, H. Okamoto, K.I. Oshida, T. Mizoguchi, T. and Terada, T.: Inactivation of human placenta glutathione-S-transferase by SH/SS exchange reaction with biological disulfides. **Biochemical and biophysical research communications**. 174 (2): 580-585, 1991.

- 113- Ahokas, J.T. Nicholls, F.A. Rovencroft, P.J. and Emmerson, B.T.: Inhibition of purified rat liver glutathione-S-transferase isozymes by diuretic drugs. **Biochemical Pharmacology**. 34 (12): 2157-2161, 1985.
- 114- Maruyama, H. Arias, I.M. and Listowsk. I.: Distinctions between the multiple cationic forms of rat Liver glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**. 259 (20): 12444-12448, 1984.
- 115- Blanderen, P.J.V. and Ommen, B.V.: The inhibition of glutathione S-transferases: Mechanisms, toxis consequences and therapeutic benefits- **Pharmac. Ther.** 51: 35-46, 1991.
- 116- Ommen, B.V. Ploemen, J.H.T.M. Bogaards, J.J.V.: Irreversible inhibition of rat glutathione s-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. **Biochem J**. 276: 661-666, 1991.
- 117- Clark, A.G. Hamilton, J.F. and Marshall, S.N.: Inhibition by inorganic anions of glutathione-S-transferases from insect and mammalian sources. **Biochem J**. 278: 193-198, 1991.
- 118- Freundt, K.J. and Ibrahim, H.A.: Influence of Pd. Cd., 2n, Mn, Uc, Hg or Be salts on the glutathione-S-transferases of the rat liver. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 46: 618-624, 1991.
- 119- Ahmad, H. Singh, S.V. Medh, R.D. Ansari, G.A.S. Kurosky, A. and Awosthi, Y.C.: Differential expression of α , μ and classes of iso-enzymes of glutathione-S-transferase in bovine lens, cornea and retina. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 266 (2): 416-426, 1988.

- 120- Dierickx, P.J.: Purification and characterization of glutathione-S-transferase from the human hepatoma derived PLC/PRF-S cell Line. **Biomedical Research**. 10 (4) 301-306, 1989.
- 121- Warholm, M. Guthenberg, C. Bohr. C.V. and Mannervik, B.: Glutathione transferases from human Liver. **Methods In Enzymology** 113: 499-504, 1985.
- 122- Scopes, R.K.: Methods for measuring protein concentration. **Protein Purification Principles and Praticce**. Caph.8.5. 240-241, 1982.
- 123- Scopes, R.K.: Methods for measuring protein concentration. **Protein Purification Principles and Praticce**. Caph.8.5. 242-243, 1982.
- 124- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London). 227: 680-685, 1970.
- 125- Tüken, F.: Bazı nitrozaminlerin glutatyon-S-transferaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. Doktor tezi. **C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fak. Biyokimya A.B.D.** Sivas.
- 126- Çetinkaya, S. Pınarbaşı, H. Pınarbaşı, E. Çetinkaya, Ö. Atalay, A.: Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon -S-transferaz aktiviteleri. **C.Ü.Tıp Fak. Dergisi**. 15 (2): 113-115, 1993.
- 127- Bladeren, P.S.V. Scheffer, A.G. Vos, R.M.E. Bruggemen, I.M. and Temmink, J.H.M.: The interaction of allyl and benzyl isothiocyanate and rat liver glutathione-s-tarnsferasese. **Glutathione-s-transferases and Drug resistance**. Taylor and Francis, London 3: 235-238, 1990

- 128- Clapper, M.L. Buller, A.L. Smith, T.M. and Tew, K.D.: Glutathione s-transferases in alkylating agent resistant cells. **Glutathione S-transferases and Drug resistance. Taylor and Francis, London 3: 213-224, 1990.**
- 129- Harris, A.L.: Mechanisms of anticancer drug resistance. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance Taylor and Francis, London 2: 283-293, 1990.**
- 130- Wolf, C.R. Wareing, C.J. Black, S.M. and Hayes, J.D.: Glutathione S-transferases in resistance to chemotherapeutic drugs. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance. Taylor and Francis, London 2: 295-308, 1990.**
- 131- Tew, K.D, Schisselbauer, J.C. Clapper, M.L. and Kuzmich, S.: Glutathione s-transferases and resistance to alkylating agents. **Glutathione-S-transferases and Drug resistance. Taylor and Francis, London 2: 309-317. 1990.**
- 132- Ünsal, İ. Ögüş, İ.H. Kansu, E. Özer, N.: İnsan plasenta glutatyon-S-transferazına antineoplastik ilaçların bağlanması. **Biyokimya Dergisi. Özel Sayı, 17, B-91, 1992.**
- 133- Ulusu, N. Ünsal, İ. Ögüş, İ.H. Kansu, E. Özer, N.: İnsan plasenta glutatyon - S-transferazının kinetik özellikleri ve mitomycin-C ve idarubicin tarafından inhibisyonu. **Biyokimya Dergisi, Özel Sayı 17, E-23, 1992.**
- 134- Dere, E. Bakır, S. Aker, A.: Daminozid'in fare (Mus musculus) karaciğer ve böbrek alkalin fosfataz aktivitesi üzerine etkisi. **C.Ü. Tıp Fak. Dergisi 17 (1), 6-10, 1995.**
- 135- Dere, E. Metin, K.: Daminozid'in erkek farelerin karaciğer ve kas glikojen seviyelerine etkisi. **C.Ü. Fen Ed.Fak.Fen.Bil.Dergisi. 17, 153-161, 1994.**

- 136- Dağ, Ő.: Daminozid'in bazı amino asitler üzerine in vitro etkisi. **Yüksek Lisans Tezi, C..Fen. Bil. Ens. Biyoloji A.B.D. Sivas, 1995.**
- 137- Chang, L.H. Chuang, L.F. Tsai, C.P. Tu, C.P.D. and Tam, M.F.: Characterization of glutathione-S-transferases from day -old chick livers. **Biochemistry. 29: 744-750, 1990.**
- 138- Hijlch, A.A. ve IŐcan, M.: Koyun karaciğer ve böbrek glutatyon-S-transferazlarının bazı zellikleri. **Biyokimya Dergisi, zel Sayı. 17, E-03, 1992.**
- 139- Serafini, M.T. and Romeu, A.: Cu (II) and Cd (II) inhibition of rat liver glutathione-S-transferase. A steady -state kinetic study. **Biochemistry International. Vol 24 (3), 497-505, 1991.**

ÖZGEÇMİŞİM

1962 yılında Sivas'ta doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladım. 1987 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım. 1989 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladım. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olmaya hak kazandım. 1990 yılında Doktora eğitimine başladım ve devam etmekteyim.