

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAZ KARACİĞERLERİNDE KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) ve ETİL
ALKOL (C₂H₅OH) İLE OLUŞTURULAN DOKU HASARLARINDA REDÜKTE
GLUTATYON (GSH), GLUTATYON S- TRANSFERAZ (GST) VE SELENYUM
(Se) DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Aysel GÜVEN
Biyokimya Anabilim Dalı

138198

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Necati KAYA

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Bu çalışma KAÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No. 018

2003-KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

.....*Siyolima*.....AD..... Doktora/ Yüksek Lisans programı çerçevesinde Arş. Gör. Aysel GÜVEN tarafından hazırlanmış olan "Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür (CCl₄) ve Etil Alkol C₂H₅OH ile Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutasyon (GSH), Glutasyon Transferaz (GST) ve Selenyum (Se) Düzeylerinin Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonucunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy*kırlı*.....ile... red/kabul kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 23/01/2003

Adı-Soyadı
Başkan : Prof. Dr. Necati KAYA (Danışman)
Üye : Doç. Dr. Fatmagül YUR
Üye : Doç. Dr. Şaban MARAŞLI
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayla Özcan
Üye : Yrd. Doç. Dr. Metehan Uzun

İmza
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

Bu tezin kabülü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
28.102.1.03. gün ve3/10.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

[Handwritten signature]
Yrd. Doç. Dr. Ayla Özcan
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Simge ve Kısaltmalar	I
Grafikler Dizini	III
Tablolar Dizini	VI
Şekiller Dizini	V
Resimler Dizini	VI
Önsöz	VII
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1.Kazlar Hakkında Genel Bilgi	1
1.1.2. Önemli Kaz Irkları	3
1.2. Serbest Radikaller	4
1.2.1. Serbest Radikallerin Kaynakları	6
1.2.2. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar	10
1.3. Karbon Tetraklorür (CCl ₄)	10
1.3.1. CCl ₄ 'ün Etki Mekanizması ve Karaciğere Etkisi	11
1.4. Etil Alkol ve Metabolizması	15
1.4.1. Karaciğer Yağlanması ve Etil Alkol	19
1.5. Selenyum (Se)	20
1.5.1. Se Metabolizması	23
1.5.2. Se Tayin Yöntemleri	25
1.6. GSH	25
1.6.1. GSH Metabolizması	28
1.6.2. GSH'a Bağlı Enzim Sistemleri	29
1.6.3. GSH'un Rol Aldığı Metabolik Reaksiyonlar	31
1.6.3.1. Endojen Peroksitler ve Radikallerin Yıkımı	31
1.6.3.2. Proteinlerdeki (-SH) Gruplarının Korunması	32
1.6.3.3. Aminoasitlerin Membran Transportundaki Rolü	33
1.6.3.4. Bazı Elektrofilik Ksenobiyotiklerin GSH ile Konjugasyonu	33
1.6.4. GSH Tayin Yöntemleri	36
1.6.4.1. Spektrofotometrik Yöntem	36
1.6.4. 2. HPLC Yöntemi	36
1.6.4. 3. Fluorometrik Yöntem	36

1.7. Glutasyon S- Transferaz (GST)	37
1.7.1. GST'ların Yapısal Özellikleri ve İzomerleri	38
1.7.2. GSH'ların Detoksifikasyon Mekanizmasındaki Önemi	39
1.7.3. GST'ların GSH Konjugasyonun Reaksiyonları	43
1.7.4. GST Enzimlerinin Klinik Önemi	44
1.7.5. GST Aktivitesinin Ölçüm Yöntemleri	44
1.7.5.1. Spektrofotometrik Yöntem	44
1.7.5.2. İmmünoradiyometrik Yöntem	45
1.7. Serbest Radikal, Se, Vitamin E ve GSH Arasındaki İlişki	45
1. MATERYAL VE METHOT	51
2.1. Materyal	51
2.1.1. Hayvan Materyali	51
2.1.2. Yem Materyali	52
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
2.1.4. Kullanılan Aletler	53
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler	54
2.1.5.1. Doku Homejenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler	54
2.1.5.2. Protein Miktarını Ölçmek İçin Kullanılan Çözeltiler	55
2.1.5.3. GSH Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	55
2.1.5.4. GST Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	55
2.1.5.5. Selenyum Tayininde Kullanılan Çözeltiler	55
2.2. METOT	56
2.2.1. Doku Homejenizasyonu	56
2.2.2. Protein Miktarının Ölçümü	56
2.2.3. GSH Miktar Tayini	58
2.2.4. GST Aktivasyon Ölçümü	58
2.2.5. Selenyum Miktar Tayini	59
2.2.6. İstatistiksel Hesaplama	61
3. BULGULAR	62
4. TARTIŞMA	71
5. ÖZET	82

6. SUMMARY	84
7. KAYNAKLAR	86
8. ÖZGEÇMİŞ	100
9. TEŞEKKÜR	101



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACK	Ayçiçek küspesi
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
CCl ₄	Karbon tetraklorür
DCP	Dikalsiyum fosfat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
CTNB	(1-kloro-2,4-dinitrobenzoik asit)
DTNB	5',5' Dithio-bis (2-nitro benzoik asit)
ER	Endoplazmik retikulum
FAD	Flavin adenin dinükleotid
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HP	Hidro peroksil
GGT	Gamma glutamil trans peptidaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSH	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon -S transferaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
G-6PDH	Glukoz altı fosfat dehidrogenaz
LOO.	Peroksil radikali
LOOH	Lipid hidroperoksit
LP	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit

II

NADPH	Nikotinamid adenindinükleotid fosfohidrojen
NMD	Nutrisyonel muskuler distrofi
RNA	Ribonükleik asit
Se	Selenyum
SFK	Soya fasulyesi küspesi
SH	Sülfidril grubu
SOD	Süperoksit dismutaz
WMD	White muscle disease (Beyaz kas hastalığı)

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 2.2.2.1 Protein standart eğrisi	57
Grafik 2.2.5.1 Selenyum standart eğrisi	60



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.3.1.1. Potansiyel hepatotoksik maddeler	12
Tablo 1.7.1. İnsan ve sıçan karaciğerlerinde GST enzimlerinin bazı yapısal Özellikleri	39
Tablo 1.7.2. GST'ların katalizlediği nükleofilik yer değiştirme, oksiran halkasının nükleofilik açılımı, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonlar	41
Tablo 2.1.2.1 Kazlara I. dönemde verilen yemin bileşimi	52
Tablo 2.1.2.2 Kazlara II. dönemde verilen yemin bileşimi	
Tablo 3.1. Kontrol grubuna ait GSH, GST ve Se düzeyleri	66
Tablo 3. 2 CCl ₄ (1ml/kg canlı ağırlık) uygulanan II. grup GSH, GST ve Se düzeyleri	67
Tablo 3. 3 CCl ₄ (1,5ml/kg canlı ağırlık) uygulanan III. grup GSH, GST ve Se düzeyleri	68
Tablo 3.4 %50'lik etil alkol (5ml/kg canlı ağırlık) uygulanan IV. grup GSH, GST ve Se düzeyleri	69
Tablo 3.5. Tüm grupların GSH, GST ve Se düzeylerinin istatistiksel sonuçları	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.3.1. CCl ₄ 'ün moleküler yapısı	11
Şekil 1.4.1. Etanol tarafından meydana getirilen toksisiteye katılan mekanizmaların özet	18
Şekil 1.6.1. Glutasyonun yapısı	26
Şekil 1.6.2. Glutasyon metabolizması	28
Şekil 1.6.2.1. Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri	30
Şekil 1 6. 3. 4. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu	35
Şekil 1.8. Selenyum vitamin E ve glutasyon arasındaki ilişki	50
Resim 3.1. 1 ml/kg CCl ₄ uygulanan II. Grupta 6. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	62
Resim 3.2 1.5 ml/kg CCl ₄ uygulanan III. Grupta 6. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	63
Resim 3.3 Etil alkol uygulanan III. Grupta 6. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	63
Resim 3. 4 1ml/kg CCl ₄ uygulanan II. Grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	64
Resim 3.5 1.5ml/kg CCl ₄ uygulanan III. Grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	64
Resim 3.6 Etil alkol uygulanan IV. Grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler	65
Resim 3.7 CCl ₄ (1ml/kg canlı ağırlık) Uygulanan II. Grubun	

karaciğer hücrelerindeki görünüm.	66
Resim 3.8. CCl ₄ (1,5 ml/kg canlı ağırlık) uygulanan III. grubun Karaciğer Hücrelerindeki Görünüm	67
Resim 3.9. %50'lik etil alkol (5ml/kg canlı ağırlık) uygulanan IV. grubun karaciğer hücrelerindeki görünüm	68
Resim 3.10. 1.5 ml CCl ₄ verilen IV. grupta omurgadaki değişimler	70



VII

ÖNSÖZ

Bütün dünyada hızlı sanayileşme ve nüfus artışına paralel olarak, hayvansal protein gereksiniminin kanatlı hayvanlardan sağlanması dönemi başlamıştır. Birkaç yıl gibi yeni olan bir süreçte tavukçulukla sınırlı olduğu düşünülen kanatlı hayvancılığında bugün kazların da önemli bir potansiyel olduğunun farkına varılmıştır.

Bazal koşullarda tüm aerobik hücreler, solunum, fagositoz, araşidonik asit metabolizması ve diğer normal fonksiyonları sırasında oksijeni metabolize ederken reaktif oksijen radikalleri oluştururlar. Bu radikaller normal bir organizmada antioksidan savunma sistemleri tarafından hızla temizlenirler. Ancak serbest radikallerin oluşumu, hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa metabolik ve fonksiyonel bir çok bozukluklar ortaya çıkar. Bu fonksiyonel bozuklukların başında kronik karaciğer hastalıkları gelir ve hepatosellüler hasar ile karakterize edilir, genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu gelmektedir. Kanda ve dokularda artan lipid peroksidleri doku veya organ hücrelerindeki membran hasarının göstergesi olup hastalığın şiddeti ile orantılıdır.

Karbon tetraklorür (CCl₄) ve alkol, deneysel karaciğer harabiyeti oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılan ve peroksidant aktivitesi bilinen maddelerdir. Bu doğrultuda çalışmada, kazlarda ilk kez çeşitli etmenlerle (CCl₄ ve alkol) karaciğer hasarı oluşturularak redükte glutatyon (GSH), glutatyon-s transferaz (GST) ve bu enzimlerle iç içe bir ilişki sergileyen selenyum düzeylerini belirlemesi amaçlanmıştır. Literatür taramalarında kazlar üzerinde bu konuda yapılmış çalışmalar yok denecek kadar az olduğu görülmektedir.

VIII

Ayrıca kanatlılarda özellikle kazlarda serbest radikal oluşturan kaynaklar, radikallerin rol oynadıkları tepkimeler ve hücrel savunma mekanizmalarının incelenmesi, henüz açıklık getirilmemiş bazı kanatlı patogenezisine de ışık tutabilecektir.



1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1.Kazlar Hakkında Genel Bilgi

Kazlar su kanatlıları içerisinde en önemli türlerden birisidir. Kazların evcilleştirilmesine M.Ö. 2000 yılında başlanmıştır (39). Mısır'da 4000 yıl önce evcilleştirildiği (56), Romalıların ise kaz yetiştiriciliğinde özellikle karaciğeri büyütmeğe yönelik beslenme yaptığı bildirilmektedir (41, 54).

İleri ülkelerde tavukçulukta olduğu gibi, su kanatlılarının et ve yumurta üretimi de giderek önem kazanmaktadır. Bu alanda Türkiye'de su kanatlıları, doğa koşulları ve tüketim olanakları ile orantılı olarak önemli bir geleceğe sahiptir. Kaz yetiştiriciliğinde yetiştiricilik yöntemleri, barnak, su gereksinimi, beslenme ve kuluçka randımanı düzeyine ilişkin bilgiler birçok literatürlerde verilmiştir (41, 54, 106, 132, 135).

Kanatlılar omurgalı ve sıcak kanlı hayvanlar olup vücut sıcaklıkları 40.6-41.7 °C arasındadır. Evcil su kanatlılarından kuğu, kaz ve ördekler, büyük ve küçük kentlerde yaşama koşullarına uyum sağlayarak kendiliğinden evcilleşme sürecine girmişlerdir. Yaşamlarını sularda ve karalarda sürdüren bu hayvanların anatomik özellikleri yüzmeye, uçmaya ve yürümeye uyumlu olarak geliştiği gibi, ayrıca iskelet kemikleri vücuda destek sağlayıcı ve yumurta üretimine uygun bir yapıda gelişmiştir. Bu hayvanların gaga ve ağızları her çeşit besinden yararlanmalarına uygun bir biçimindedir. Kazlar uzun boyunlarıyla daha ziyade sığ sularda beslenirler (41, 106).

Kazların sahip oldukları bazı avantajlar kaz yetiştiriciliğinin önemini artırmaktadır. Bu avantajları şöyle sıralanmaktadır (106, 132, 135);

- Hastalıklara karşı dirençli olmaları,
- Stres oluşturan faktörlerden kolay etkilenmemeleri,

- Kaba yemden iyi yararlanabilmeleri,
- Kumes gibi özel barınağa fazla gereksinim duymamaları,
- Soğuk ve yağışlı şartlardan etkilenmemeleri aksine performanslarının artması,
- Et, yumurta, karaciğer ve taşlık gibi içi organlarından yararlanılması,
- Tüyünden yararlanabilir olması,

Doğu ve İç Anadolu bölgeleri, kaz yetiştiriciliği bakımından önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle Doğu Anadolu bölgesinde kumes hayvancılığının başında hindi ve kaz yetiştiriciliği gelmektedir (135).

Kanatlılarda metabolizma, memelilere göre oldukça önemli farklar göstermesine rağmen, bu hayvanlar üzerinde yapılan bazı biyokimyasal çalışmalara ait verilerin memelilerden alınan çalışma sonuçlarına göre yorumlandığı görülmektedir (41). Oysa çalışmalarını kazlar üzerinde yoğunlaştıran birçok araştırmacı (23, 65) tarafından piliç ve kaz ırkları arasında bile metabolik parametrelerin değişkenlik gösterdiği belirtilirken, parametrelerdeki değişimlerin yorumlanmasının genellikle yapıyla ilintili olduğu ileri sürülmektedir (98, 65). Aynı zamanda çevre faktörlerinin etkisi, cinsiyet, yaş ve ırka göre da bir çok metabolik ve fizyolojik farklılıkların olduğu bilinmektedir. Kars yöresinde yapılan çalışmalarda, söz konusu etkenlerin metabolik parametreler üzerindeki değişikliğini görmek mümkündür (29, 98, 99).

Ülkemizde kaz yetiştiriciliği, yaygın bir hayvancılık etkinliği olmamakla beraber, bazı yörelerde yoğunluk kazanmıştır. Kars ve yöresi de iklim, su kaynakları ve bitki örtüsü bakımından son derece uygun koşulları taşımakta olup, et, ciğer, yağ ve tüylerinden yararlanılan kaz yörede yaygındır (41, 54, 99).

Diğer ülkelerde kaz yetiştiriciliği ve uygulanan besin maddeleri, çeşitli bilimsel araştırmalarla (65, 130, 163) değerlendirilirken, biyokimyasal çalışmalarla da desteklenerek yetiştirme ve besleme durumu arasındaki ilişkiler ortaya konmaktadır.

1.1.2. Önemli Kaz Irkları

Ticari kaz yetiştiriciliğinde dünyanın değişik ülkelerinde farklı kaz ırkları kullanılmaktadır. Bunların büyük bir kısmı et ve yumurta üretimi için yetiştirilirken, bir kısmı da yabancı ot mücadelesi, gösteri ve zevk amacı ile yapılmaktadır .

Tuluz Kazı : Adını Fransa'da yetiştirildiği Tuluz kentinden almıştır. Tüy rengi, sırtta koyu kurşini, göğüs üzeri dalgalı, açık gri ve karın kısmı beyazdır. Kazların en iri ırklarından biri olup, ergin erkekler ortalama 11.8 kg. dişiler ise 9.1 kg ağırlıktadır. Yumurta verimleri düşüktür. Bir yumurtlama döneminde ortalama 25-30 adet yumurta verirler. Çiftleşmede su bulunması esastır.

Emden Kazı : Alman kökenlidir. Tüy rengi beyazdır. Ergin erkekler ortalama 11.8 kg dişiler ise 9.1 kg ağırlıktadır. Ortalama 25-30 adet yumurta verir.

Çin Kazı : Beyaz ve kahverengi iki varyetesi vardır. Beyaz olanı daha yaygındır. Erkekler 5.4 kg dişiler 5.4 kg canlı ağırlıktadır. Bir yumurtlama döneminde 40-60 adet bazıları ise 100 adet yumurta verir. Yumurtlama dönemi genellikle sonbahar ayıdır (41).

Afrika Kazı : Tüy rengi bakımından Çin kazına benzer. Yılda ortalama 25-30 adet yumurta verir.

Roman Kazı: Kökeni İtalya'dır. Erkekleri 6.8 kg, dişileri 5.9 kg canlı ağırlığındadır ve hızlı büyümeleri ile tanınır. Bir yumurtlama döneminde 60'tan daha fazla yumurta verirler.

Pilgrim Kazı: Tüylerinin rengi ile cinsiyet ayrımı yapılabilen bir türdür. Erkekler beyaz ve dişiler kurşuni renktedir. Erkekler ortalama 6.3 kg, dişiler 5.9 kg. canlı ağırlıktadır.

Sbastopol Kazı: Süs hayvanı olarak ilgi görürler. Erkekler ortalama 6.3 kg dişileri 5.4 kg canlı ağırlıktadır.

Kanada Kazı: Yabani Amerikan kazı ve Çin kazı ile benzer canlı ağırlıkta olup, ekonomik önemi yoktur.

Mısır Kazı: Uzun bacaklı, gösterişli bir kaz olup, parlak tüylere sahiptir. Yetişkin erkekler ortalama 2.5 kg, dişiler 2.0 kg canlı ağırlığa sahiptir.

Buff Kazı: Mısır ve Kanada kazlarında olduğu gibi ekonomik önemi yoktur. Daha çok süs hayvanı olarak yetiştirilirler.

Türkiye’de genel olarak dört kaz varyetesinin yetiştiriciliği yapılmaktadır (41).

1. Beyaz Varyete: Bu varyete içerisinde sözü edilen kazlar tamamen (lekesiz) beyazdırlar. Yetiştiriciliği fazla olup erkek kazların ağırlığı, 4.5-6 kg, dişiler ise 4-5 kg arasında değişmektedir.
2. Alaca Varyete (siyah-beyaz): Bu kazlarda baş siyah, boyun ve göğüs beyaz, kanatların uç kısmı siyahtır. Bu kazlar beyaz varyetelere kıyasla daha kaba bir yapıya sahiptirler. Erkek damızlıklarda canlı ağırlık 5 – 5.5 kg, dişilerde 4.5 – 5 kg kadardır.
3. Gri Varyete (kül rengi): Sırt ve kanat uçları koyu kahve rengi tüylerle kaplı iken, vücudun diğer bölümleri gri tüylerle kaplıdır. Bu kazlar canlı ağırlık ve görünüm bakımından beyaz varyetelere benzerlik gösterirler.
4. Siyah Varyete: Sırt ve kanatlar göğüs kısmına nazaran daha koyu tüylerle kaplıdır. Anüs çevresinde tüyler beyazdır. Erkeklerde ortalama canlı ağırlık 4.5 kg, dişilerde 4 kg civarındadır (41, 29).

Trakya, İç Anadolu (Eskişehir, Konya), Doğu Anadolu (Kars, Doğubeyazıt, Erzurum ve Ardahan) kaz yetiştiriciliği bakımından yurdun ün yapmış bölgeleridir. Kars bölgesinde bu varyetelerin hepsi mevcuttur (41, 54).

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda dikkatleri üzerinde toplayan önemli bir konudur. Serbest radikaller dış orbitalinde 1, 3, 5, ... gibi tek sayıda elektron bulunduran atom ya da molekül olup, hem organik hem de inorganik halde bulunurlar. Diğer bir ifadeyle serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonlar ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir (50, 51, 60). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Biyokimyasal açıdan önemli olan serbest oksijen radikaller oksijen, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş maddelerinin iyonları ve hidroksil radikalleridir. Oksijen, aerobik canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olmasına karşın potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Serbest radikaller, moleküler oksijeni metabolize eden bütün canlılarda oluşur (148).

Oksijen elektronlarının dağılımları sırasında, iki elektron eşlenememiş durumda kalır. Bu yüzden bazen bir radikal olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girerler. Oksijen en son olarak suya indirgenir (2,148). Serbest oksijen radikallerin daha çok zararlarından söz edilmekteyse de sitokrom p-450 aracılığındaki oksidasyonlar, düz kas kontraksiyonunda düzenlenmesi ve mikroorganizmaların öldürülmesi gibi pek çok fizyolojik olayda gerekli olduğu göz ardı edilemez (40) .

Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondrial elektron transport zinciri ortaklanmamış elektron çiftinin artışına bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelir. Bunlar süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH), alkoksil radikali (RO \cdot), alkil peroksi radikali (RO $_2$), hidroperoksi radikali (HO $_2$), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) ve hipoklorid (ClO \cdot) gibi reaktif moleküllerdir. Bu tip maddeler hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de ilaç ve diğer kimyasal maddelerin etkisiyle oluşturulabilmektedir (2, 75, 151, 171, 174). Radyasyonla da hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar (79).

Serbest radikaller bir çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar. Myokardial enfarktüs, diyabet, kanser, katarakt, romatoidtrit, infertilite, solunum, sinir ve üriner sistem hastalıkları ile stres ve yaşlanma sürecinde antioksidan enzim Süper oksit dismutas (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) düzeylerinde önemli değişiklikler ve lipid peroksidasyonunda artışın olduğunu teyid eden araştırmalar mevcuttur (1, 144).

Yaşlanma sürecinde de serbest oksijen radikalleri hücrede oksidatif hasarlar oluşturmasıyla başlar. Bu radikaller özellikle eritrositlerde hemoglobinin sürekli oto-oksidasyon yolu ile oksidatif stres oluşturmaktadır (144). Bu bozuklukları önlemek için savunma mekanizmalarının veya antioksidanların devreye girdiği bildirilmektedir (50).

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı zaman (CCl_4 ve etil alkolün verilmesi durumunda) membranındaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu, organizmada bir serbest radikal etkisi sonucunda membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur (13, 43,173).

Biyolojik sistemlerde elektron transferi sonucu oluşan serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral özelliindedir. Bunlar organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilir. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektrona sahip olduklarından serbest radikallerin oluşumunda etkin rol oynarlar (2, 42).

1.2.1. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Temel olarak serbest radikallerin kaynakları aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (7, 44, 56, 123).

I. Normal biyolojik işlemler

- Oksijenli solunum
- Katabolik ve anabolik işlemler

II. Oksidatif stres yapan etmenler

1. İskemi-hemoraji-travma radyoaktivite, intoksikasyon
2. Ksenobiyotik maddelerin etkisi
 - a. Alışkanlık yapan maddeler
 - b. İlaçlar
3. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
4. Fagositik enflamasyon hücrelerinden salgılanma
5. Uzun süreli metabolik hastalıklar
6. Diğer nedenler (sıcak, soğuk, güneş ışınları)

III. Yaşlanma süreci

Bir diğ er sınıflandırmada da doğ ada serbest radikallerin biyolojik ve intrasellüler olmak üzere iki temel kaynağı oldu ğ u belirtilmektedir (2, 151, 171).

Biyolojik kaynaklar; aktive olmuş fagositler antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine), radyasyon, uyuşturucular (alkol, morfin vs), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal ajanlar, sigara dumanı, solventler, aromatik hidrokarbonlar) ve stres.

İntrasellüler kaynaklar; küçük maddelerin otooksidasyonu (tioller, hidrokinonlar, katekolaminler flavinler, tetrahidroproteinler ve antibiyotikler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofandioksijenaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b₅), peroksizomlar (oksidazlar ve flavoproteinler), plazma membranı (lipoksijenaz, prostoglandin sentezi, fagositlerde NADPH oksidaz ve lipid peroksidasyonu) ve oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma ve intoksikasyon) şeklinde sıralanabilir (171, 173, 175).

Aktive olmuş fagositler antreoplastik ajanlar, radyasyon, alkol, pestisid, sigara dumanı, hiperoksit, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar serbest radikallerdendir. Eğer hücreye bu maddeler girecek olursa hücrenin homeostazisi bozular. Böylece hücrede üretimi artan oksidan radikaller özellikle membran lipidlerinde hasara neden olur (25). Oksijen molekülünün lipidlere karşı yüksek affinitesi vardır. Oksijen molekülü, hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoprotein ile eritrosit zarındaki lipidlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu arada zarda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanmasıyla lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Bu olay hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına neden olurken oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi üç farklı yol ile hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir (50,136). Lipid peroksidasyonunun artması, serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir göstergesidir (2, 43).

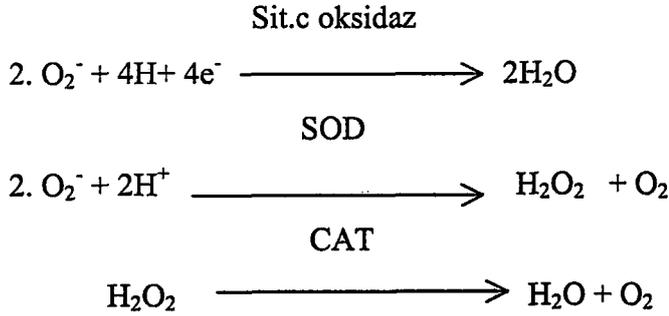
Çeşitli faktörlerle hücrede meydana gelen oksijenin toksik etkilerine karşı organizmayı koruyabilecek yapıdaki enzimler ve enzimatik yapılardan oluşan

savunma sistemleri gelişmiştir (104). Bu sistemler antioksidan etkilerini; antioksidan toplama (Scovenging), baskılama (quencer), onarma (repairing) ve zincir kırma (chain breaking) reaksiyonlarıyla gösterir (60).

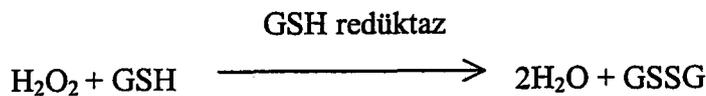
Normal şartlarda iç ve dış kaynaklı birçok stres faktörü hücresel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stresörlere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden ve antioksidanlar olarak tanımlanan bazı bileşikler rol oynamaktadır. Antioksidanlar, belirli düzeyi aşmış oksidanlara direk olarak etki edip onları inaktif hale getiren moleküllerdir (15).

Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının derecesi, hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. Savunma sistemlerini çeşitli serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır. Primer savunma olarak belirtilen gruptaki antioksidanlar süperoksit SOD, (GSH-Px), (CAT) enzimleri, GSH, ürik asit ve vitaminler (E,C,A) ile gerçekleştirilir. Primer savunma sistemi süper oksidin H_2O_2 'ye dönüşümünü engeller. Sekonder savunma olarak bilinen sistemde ise lipolitik ve proteolitik enzimlerin salınımı rol oynar (15, 25, 61).

Organizmada sürekli bir oksidan molekülü yapımı söz konusudur ve bu moleküller doğal endojen enzimlerle ilk basamakta etkisiz hale getirilmektedirler.



Veya



Normal koşullarda mitokondirilerde bulunan stokrom sistem, hücre içi stoplazmik yapıları sürekli olarak oksidazların zararlı etkilerinden korumakta, bunun yetersiz kaldığı durumlarda SOD ve diğer doğal enzimler devreye girerek yardım etmektedirler. Hidrojen peroksit (HP) ise CAT veya GSH aracılığıyla glutatyon molekülü ile etkileşime girer ve su molekülüne dönüştür. Glutatyon ise okside olmuş hale (GSSG) gelir (104). Bu sırada doku hasarının olduğu bölgede doğal enzimlerden kaçabilmiş olan oksidan moleküller hücre veya kapiler membrandaki lipitleri etkileyerek Lipit peroksidasyonunu başlatacaktır. Azda olsa başlamış olan bu reaksiyonun artamaması için engelleyici mekanizmalar devreye girecektir (2, 77).



Akut dönemde başlamış olan lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan LOO^{\bullet} , lipofilik özelliğinden dolayı mebranlarda erimiş halde bulunan vitamin E'yi zayıf radikal etkinlikli radikal vitamin E'ye dönüştürür. Ortamda yeterli bulunan Glutatyon, lipid hidroperoksit (LOOH) ile reaksiyona girer ve onu etkisizleştirirken, yine ortamda bulunan vitamin C, zayıf oksidan molekül olan vitamin E'yi radikal vitamin C'ye dönüştürür. Radikal vitamin C ise 2H^+ ile reaksiyona girerek tekrar aktifleşir. Radikal vitamin E ortamda vitamin C bulunmazsa GSH ile reaksiyona girerek aktif vitamin E'ye dönüştür. Bu reaksiyonda GSH harcandığından vitamin C'nin ortamda bulunması tercih edilir. Çünkü GSH hem akut dönemde oluşan LOOH için hem de daha sonraki aşamada oluşan H_2O_2 ve $.\text{OH}$ 'nin etkisizleşmesi için gerekecek olan önemli bir moleküldür (2, 145).

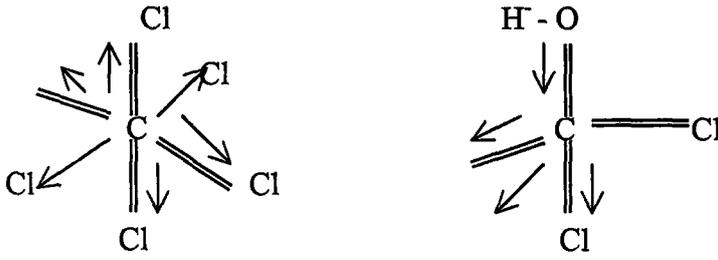
1.2.2. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar

Serbest radikallerin etkilediği en önemli yapı hücre membranıdır. Çünkü membran lipid ve proteinlerden oluşmuş bir yapı teşkil eder. Membrana ait kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Organizmada en çok görülen radikal hasarı lipid peroksidasyonu şeklinde olup, membranda doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çıkmasıyla yağ (L[•]) radikali oluşur ve zincir şeklindeki reaksiyonların sonunda sitotoksik ürünler olan aldehitler ayrıca pentan gibi hidrokarbon gazları meydana gelir. Bu toksik ürünlerden aldehitlerin en son basamağında yer alan malondialdehit (MDA) ise lipid peroksidasyonunun saptanmasında kullanılmaktadır. Meydana gelen membran hasarları geriye dönüşümsüzdür (36, 58, 160, 170).

Proteinlere etkisi ise doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere olan ilgisindedir. Triptofan, fenilalanin, histidin, metionin, ve sistin gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Örneğin aminoasit içeren paparin ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimleri serbest radikallere karşı karşıya kaldıklarında inhibe olurlar (11, 160).

1.3. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

Karbon tetraklorür genellikle organik çözücü olarak kullanılan apolar bir moleküldür. Bir karbon molekülüne bağlı dört Cl atomu tetrahedral bir şekilde bağlı olup, H ile Cl⁻ iyon değişmesiyle (CHCl₃) molekül durumuna geçer (35, 46).



Şekil 1.3.1. CCl_4 'ün moleküler yapısı(33)

CCl_4 başta domuz olmak üzere tüm evcil memeliler için zehirlidir. Buzağılarda 0.05 ml/kg dozda karaciğer hasarına ve keçilerde 0.1 ml/ kg zehirlenmeye yol açar. Evcil hayvanlardan ilaca en duyarlı olan koyundur (35).

CCl_4 sindirim kanalında az miktarda emilmiş olsa bile karaciğer dejenerasyonuna yol açar. Karaciğerdeki hasara paralel olarak plazmadaki (AST, ALT, GSH, GSH-Px) enzimlerde artış oluşur. Nitekim pestisidlere uzun süre maruz kalan insanların kan serumlarında yapılan biyokimyasal analizlerde bu enzimlerde artış gözlenirken, kontrol gruplarında da protein düzeylerinde anlamlı bir azalış gözlenmiştir (30).

1.3.1. CCl_4 'ün Etki Mekanizması ve Karaciğere Etkisi

CCl_4 'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan serbest radikaller organizmalar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulum'una (ER) yerleşmiş olan monooksijenazlar tarafından CCl_4 'den bir klor atomu ayrılarak dayanıksız bir radikal oluşur. Bu serbest radikal doymamış yağ asitlerinde çok sayıda bulunan metil gruplarından bir hidrojen atomu koparır ve onunla birleşir. Bu reaksiyon sonucu bir taraftan kloroform oluşurken, diğer taraftan da yağ asidi esterlerinin bir serbest radikali ortaya çıkar (47, 101).

Akut karaciğer dejenerasyonu çok miktarda kimyasal maddelerden birinin oksidasyonu suretiyle vücuda alınmasıyla oluşur. Absorbsiyon, barsak kanalı, akciğer ve deri yolu ile olabilir.

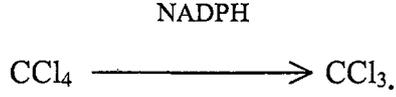
Tablo 1.3.1.1. Potansiyel hepatotoksik maddeler (9)

Karaciğer hücrelerine Doğrudan toksik etki yapan maddeler	Karaciğerde dolaylı olarak dejenerasyon yapan hemolitik maddeler	Yalnız hassas bireylerde karaciğer harabiyati yapan maddeler
Kloroform Iodoform Dinitrofenol	Sülfonamidler Inkompatibil kan Distile su	Çinkofen Neocinkofen Arsfenamin ve yakın bileşikler
Fosfor CCl ₄	Anilin türevleri Yılan zehirleri	Sulfonamidler Bizmut bileşikleri ⁷ (tedavi dozlarında)
Sintalin Nitrobenzen Fava fasulye toksini Eterler Ağır metaller	Trinitrofenol	Kalomel Klorpromazin

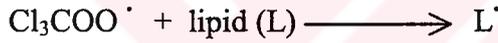
Bunların yanında yapıları bilinmeyen bitkisel, hayvansal veya bakteriyel menşeyli bir çok toksinler de mevcuttur. Kimyasal hepatotoksik maddeler, vücudun diğer yerlerinde de hasara neden olurlar.

CCl₄'in metabolizması ile ortaya çıkan serbest radikaller, hücrelerin koruyucu mekanizmaları ile bertaraf edilir. Yağ asidi zincirinde peroksit oluşumunun ortaya çıkması glutatyon ve diğer redüksiyon ekvalantların yardımıyla normal olarak azaltılır. Ancak belli bir dozun üzerindeki CCl₄ lipidlerin deentegrasyonu, ER, mitokondrilerde ve diğer membran yapılarında bozukluklara neden olur. Bundan dolayı hücrelerin ve hücre organellerinin enzimleri serbest kalır ve kana geçer. Hücrelerin elektrolit yapısında bozukluklar meydana gelir. Trigliseridlerin hücre içinden kana geçmeleri bozulur ve hücre içinde toplanır. Bütün bu olaylar geriye dönüşümsüz olup hücre nekrozuna sebep olur. CCl₄'ün toksik dozlarda oral ya da inhalasyonla alınması kısa süre içerisinde karaciğer bozukluklarına neden olur. Bu maddelere bağlı zehirlenmelerin ilk belirtileri plazmada karaciğer enzim

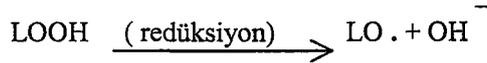
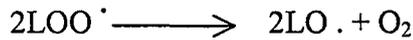
CCl_4 toksisitesinin ER'un membranında yer alan lipidlerin yıkımına bağımlı olarak hepatositlerde toksik etki oluşturduğu öne sürülmektedir. CCl_4 hepatosit içine girer ve ER'e diffüze olur ve protein varlığında NADPH'a bağımlı sitokrom p-450 sistemi tarafından redüktif CCl_3 radikalini oluşturur.



CCl_3 radikallerinin doymamış fosfolipidlere yakın yerlerde olduğu sanılmaktadır ve oluşan radikaller çift bağlara eklenirler. Ayrıca CCl_4 oksijen ile reaksiyona girerek $\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$ oluşturur. Lipidlerin peroksidatif yıkılımı CCl_3 ve Cl_3COO ile başlatılmış olur.



Lipid radikalleri daha sonra oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikallerini oluştururlar. Bunlar da diğer lipidlerin oksi-radikal yoluyla peroksidasyonunu başlatırlar (140).



CCl_4 metabolizmasının başlangıcında görülen bu olaylar daha sonra trigliserid birikimi, poliribozomal disagregasyon, protein sentezinde depresyon, hücre membran yıkımı, ve sonuçta hücre ölümüne sebep olacaktır (101, 107, 129). Plazma membranları birkaç nedenden dolayı serbest radikal reaksiyonlarının yer aldığı hücrenin önemli bir bölümüdür. Oluşan serbest radikaller çevre dokulardaki subsellüler komponentlerle reaksiyona girebilmek için önce hücre

membranlarını geçebilmek durumundadır. Membrandaki doymamış yağ asitleri, okside olabilecek amino asitleri içeren transmembran proteinler serbest radikal hasarına hassastır (112). Lipid peroksidasyonu nedeniyle ve önemli yapısal proteinlerin oksidasyonu ile trans membran iyon gradientinde yıkım, sekretuar fonksiyonlarda kayıp ve sellüler metabolik olaylarda inhibisyon sözkonusudur. Karaciğer hücrelerinden protein ve lipoproteinlerin sekresyonunda yer alan mikrotübüler sistemde de inhibisyon olurken mitotik indekste azalma gerçekleşir (50, 125).

Bunun dışında glukoz-6-fosfataz, aminopurin dimetilaz gibi enzimlerde ve mitokondride respirasyonda inhibisyon olur. İntrasellüler taşıyıcı olan ligandin (protein Y) lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan aldehidler tarafından inaktifleşmektedir.

CCl_4 'ün bütün bu etkilerinin yanında, ER ve mitokondrinin Ca^{+2} tutma kapasitesini etkilediği bildirilmiştir. İzole hepatositlerde yapılan invivo ve invitro çalışmada CCl_4 verilmesini izleyerek ER'ün Ca depolama kapasitesi azalmış ve sitozolik kalsiyumda artış saptanmıştır (3, 155). Sitozolik kalsiyumda kabul edilemez sınırlardaki değişiklikler de sonuçta hücre ölümüne sebep olmaktadır.

CCl_4 'ün salgı mekanizmasının kendisini veya lipidin apolipoprotein ile konjugasyonunu da etkilemesi büyük olasılıktır. Etkisi doğrudan değildir; ancak molekülün daha fazla şekil değiştirmesine bağlıdır. Bu olasılıkla lipid peroksidasyonunun oluşumuyla birlikte ER'deki lipid membranlarını parçalayabilen serbest radikallerin oluşumunu kapsar (3, 168).

CCl_4 tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonuna karşı bir miktar korunma, E vitamini katkılı diyetlerle sağlanabilmektedir. Etionin etkisinin, ATP'nin sağlanabilmesinde bir azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu, etionin S-adenozil metionin içinde bulunan adenini yakalayıp tuttuğu ve ATP sentezini engellediğinde olur. Selenyum ve E vitamini katkılı beslenmede lipid peroksidasyonunun engellendiği ifade edilmektedir (95).

1.4. Etil Alkol ve Metabolizması

Etil alkol mono ve disakkaridlerin (şarap) ya da polisakkaridlerin (arıpandan bira, pirinçten sake ve mısırdan sika) mayalanmasından meydana gelir. Mayalanma oluşan alkol konsantrasyonu ile ilişkilidir. Distilasyona tabi tutulması ile alkol ortamından uzaklaştırılarak saf olarak elde edilebilir.

Bir doymamış C atomuna bağlı bir hidroksil (-OH) grubu içeren ve genel formülleri R-OH olan bileşiklere alkol denir. Etanol (etil alkol) C_2H_5OH ağırlıkça % 95.57 alkol ve % 4.43 sudan oluşan bir karışımdır. Gerek fermentasyon yolu ile ve gerekse herhangi bir sentez yöntemiyle elde edilen etanol, normal ya da fraksiyonlu distilasyon ile ancak %95.57 alkol içeren sulu bir karışım haline dönüştürülebilir ve distilasyon ile de derişik bir hale getirilemez (53, 111). % 100 ya da %99.99 etanol 'mutlak etanol' ya da mutlak alkol olarak isimlendirilir. Adi alkol CaO , CaC_2 veya metalik Ca ile muamele edilip bir süre bekletildikten sonra destillenirse mutlak alkol elde edilir. Mutlak alkol açık havada bırakılırsa havadan nem çekerek bir süre sonra % 95.57'lik alkole dönüşür.

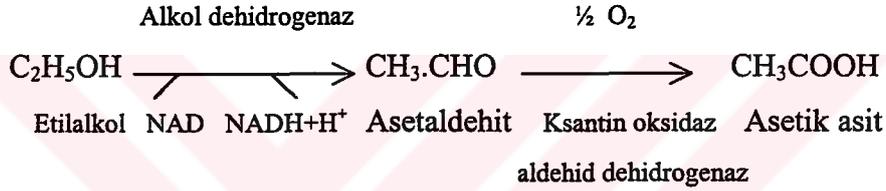
Etanol bilinen bir çok kullanım alanı yanında, gerek endüstride ve gerekse organik kimyada önemli bir çözügen olarak da bol miktarda kullanılır. Mutlak alkolünde organik kimyada önemli bir yeri vardır. Endüstride etanol elde edilmesinde fermentasyona uğratılan madde glukozdur ve genellikle nişastadan amilaz denilen özel bir enzim yardımıyla oluşturulur. Etanol elde edilmesinde ayrıca doğrudan doğruya glukoz ya da sakkaroz içeren melas, incir ve üzüm gibi maddelerde kullanılır (55). Etanolün yağ/su dağılım katsayısı 0.04 olarak tespit edilmiştir. Bundan anlaşılacağı üzere emilme hızı oldukça yavaştır. Buna rağmen vücutta iyi dağılım gösterir (105).

Alkol ağız yoluyla alındığında emilim hem mide hem de barsakta gerçekleşmektedir. Etil alkolün sindirim sisteminde yaklaşık bir saat sonra tamamına yakını emilir. Mide boş olduğunda sindirim hızlı, dolu olduğundan daha yavaş gerçekleşir. 1-2 saat içerisinde maksimum kan konsantrasyona ulaşan alkol vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılır. Alkol plasenta ve süte de geçer. Alkolün

vücut sıvılarına dağılımı kg vücut ağırlığı x kan konsantrasyonu (mg/100 g). V (V: dağılım volüm oranı) erkeklerde 0.68, dişilerde 0.55'dir (53, 91, 111).

Alkolün önemsiz bir bölümü akciğerlerden (% 2-3) ve böbreklerde (%1-2) değişmeden atılırken önemli bir kısmı vücutta metabolize olur. Etanolün eliminasyon periyodu erkeklerde 0.1 g/kg/saat, dişilerde ise 0.085 g/kg/saattir. Bu durum etanolün erkeklerde daha hızlı metabolize olduğunu göstermektedir. Alkolün etki yeri, merkezi sinir sistemidir (111).

Etil alkol metabolizması başlıca karaciğerde meydana gelir ve 2.yol ile ilişkilidir. I. ve temel yol alkol dehidrogenaz ve asetaldehit dehidrogenaz kullanılarak, etanol aset aldehit üzerinden asetata, bu da sonra asetil Co-A'ya dönüşür (55).



Bu reaksiyonların herikisinde redüklenmiş $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ üretilir. Böylece inrasellüler NADH/NAD oranı büyük miktarlarda olan etanol alınımı ile göze çarpacak derecede değiştirilebilir. Bu değişimden sonra bu iki kofaktörü kullanan birkaç önemli metabolik reaksiyonun K_{eq} 'sünü etkileyebilir. Yüksek NADH düzeyleri laktik asidozdan sorumlu olan laktatın pirivattan oluşması lehine bir durum yaratırlar. Bu durum piruvat konsantrasyonunu azaltır (Piruvat reaksiyonu için gerekli olan) ve böylece glikoneogenezi kısıtlar. Ağır durumlarda, karaciğer glikojeninin tükenmesi, artık glikojenoliz için sağlanabiliyor olmayışı hipoglisemi durumu ile sonuçlanır. İkinci yol asetaldehit oluşturan bir mikrozomal stokrom P-450 (mikrozomal etanol okside edici sistem) kapsar. Asetaldehit yüksek derecede reaktif bir moleküldür ve protein, nükleik asit ve diğer moleküllerle kompleks oluşturabilir. Aset aldehitin muhtelif moleküller ile reaksiyona girme kabiliyeti, etanolün toksik etkilerinin açığa çıkışı ile bağlantılıdır. Etanol aynı zamanda biyolojik membranların içine dolarak bunları genişletir ve akışkanlıklarını arttırabilir. Etkilenen membranlar uyarılabilir durumda oldukları zaman bu aksiyon potansiyelinin değişikliğe uğraması ile sonuçlanır. Transport zedelenir ve

nörotransmittör açığına çıkışı da etkilenir. Bunların tümü serabral işlevi bastırır ve yeterli ağırlıkta gelişirse solunum felcine bağlı koma ve ölüme neden olabilirler (76, 81, 122).

Ayrıca etanolün metabolizması sırasında oluşan NADH, solunum zinciri için diğer substratlardan gelen indirgeyici ekivalanlarla yarışarak bunların oksidasyonunu engeller. Artmış olan NADH/NAD⁺ oranı malat-okzalasetat dengesinde sola kaymaya neden olarak sitrik asit döngüsünün aktivitesini azaltabilir (111). Yağ asidi oksidasyonu inhibisyonun net etkisi, triaçilgliserol de yağ asidinin esterleşmesindeki artmadır. Bu da karaciğerin yağlanmasına neden gösterilmektedir. Oluşan asetik asit ise intermediyer metabolizmada Co-enzimA aktivasyonu üzerinden önemli derecede trikarboksilik asit (TCA) siklusuna girerek karbondioksit (CO₂) ve suya (H₂O) parçalanır. 1 gram etanol 7.1 kcal (jul) enerji oluşturur. İnsanlarda alkolün %90-96'sı bu şekilde metabolize olur. Bu temel yolun yanında %3-8 oranında da p-450'ye bağımlı monooksijenaz enzim sistemi tarafından okside edilir ve aynı şekilde asetik aside dönüştürülür. % 0.5 oranında direkt glukronide edilir. Az miktarda da sülfirik asit ile birleşir ve idrarla atılır (16, 105, 111, 122).

Alkolizmde karaciğerde yağ toplanmasına hiperlipidemi denir ve ilerlemesiyle siroz şekillenir. Alkolün etkilerinin görülebilmesi için kanda en az %1.4 düzeyinde alkol konsantrasyonunun bulunması gerekir. Bu durumda öncelikle kaslarda koordinasyon bozukluğu ortaya çıkar. Alkol bütün dozlarında diüretik etki gösterir. Ayrıca hipoglisemik etki de görülür. Fazla ve sık alınan alkol ağır karaciğer bozukluklarına neden olur. Başlangıçta alkole bağlı karaciğer yağlanması vardır. Ancak devamlı ilerleyen alkol alınımında bu durum ilerler ve karaciğer hücrelerinde yağ damlacıkları toplanır (76, 111).

Etanol oksidasyonu NAD'a ihtiyaç duyar. Bu nedenle zamanla NAD, NADH oranında kuvvetli derecede azalmalar ortaya çıkar. Bundan dolayı ara metabolizmada NAD'ya bağlı enzimatik reaksiyonlar dizisi engellenir. Betahidroksi yağlar beta ketoyağ asitlerine dönüşür. Trigliseridlerin plazmadaki konsantrasyonu açık bir şekilde artar ancak serbest yağ asitlerinin düzeyi düşer. Bu durum hem akut hem de kronik alkol alınımında görülür.

Karaciğerde lipid oranının çoğu türlerde %5 kadar olduğu çeşitli etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Serbest yağ asitlerini plazmadan alarak daha çok trigliserid ve fosfolipid sentezinde kullanan karaciğer, dolaşımdaki trigliseridlerin %30-40'ını alarak önce kısmen hidroliz eder, sonra yeniden esterleştirir. Şilomikronların kandan alınması, karaciğer dokusunda fosfolipidlerin artmasına neden olur (122).



Şekil 1.4.1. Etanol tarafından meydana getirilen toksisiteye katılan mekanizmaların özet (111).

Karaciğerde yağ depolanması uzun zaman alkol alınmasıyla gerçekleşir ve olay reversibldir. Birey uzun süre alkol almazsa karaciğer tekrar eski haline döner. Ancak alkol alınımı devam ederse kronik karaciğer yağlanması görülür. Uzun süreli alkol alınmasıyla karaciğer yağlanmasının yanında hepatitis de görülür. Karaciğerin kalıcı yağlanmasını takiben yangısal durum bağ dokuya da yayılarak kötü huylu karaciğer sirozuna neden olur.

Ancak uzun süre etanol alımı karaciğerde yağ asidi birikimine yol açar. Buradaki yağ asitleri adipoz dokudan çok, endojen sentezden türerler. Etanol alınımından sonra, karaciğerde protein sentezinde bozukluklar olmaz. Hepatik sitozolde, aşırı NADH üretiminin neden olduğu hepatik triaçilgliserol sentezinde artış ile ilgili sağlam kaynaklar vardır (111, 122).

1.4.1. Karaciğer Yağlanması ve Etil Alkol

Karaciğer vücudun birçok metabolik olaylarının meydana geldiği bir organdır. Protein, lipid, karbonhidrat metabolizması, safra, keton bileşikleri ve üre sentes bazı hormonların inaktivasyonu karaciğerde yapılmaktadır. Karaciğer gerek eksojen gerekse endojen toksik maddeleri safra ve idrarla dışarı atılabilir veya toksisitesi daha az olan maddelere çevirir (9).

Genellikle toksikasyon veya zararlı maddelerin uzun süre emilmesi sonucu karaciğer hücrelerinde dejenerasyon ve yağ birikimleri oluşur. Bu bozukluk, kümes hayvanlarının yumurtlama dönemlerinde görülen fizyolojik karaciğer yağlanmasından çok farklıdır. Lipidler normal olarak karaciğer bileşenleri içerisinde %5 gibi küçük bir paya sahiptir. Bir çok nedene bağlı olarak şekillenen karaciğer yağlanmasında ise bu oran genellikle %30'un üzerine çıkabilir. Hepatik hücreler, diğer doku hücrelerine kıyasla çok fazla metabolik yönde faaliyete sahip hücrelerdir. Bu nedenle, özellikle trigliserid sentezini takiben hücresel ortamları işgal edecek düzeyde depo fonksiyonları göstermezler. Hepatik hücrelerde trigliserid sentezini (lipogenezis) takiben bunlar, lipoprotein yapısına alınarak dolaşım yoluyla ekstrahepatik dokulara, özellikle adipositlere gönderirler. Yeteri oranda gıdasal enerji buldukları, ihtiyacın üzerinde yakıt moleküllerinin gıdasal olarak alındığı durumlarda hepatik hücrelerdeki bu faaliyetler insülin hormon stimülasyonu altında oluşur (2, 9). Bunun aksi durumlarda yani enerji ihtiyacının yükseldiği durumlarda ise, glukagon stimülasyonlarını takiben başlıca adipositlerden salınan yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları artar ve karaciğere yoğun olarak alınırlar. Birbirine zıt gelişen bu iki metabolik yoldan birincisinde yani hiperglisemik şartlarda, lipoprotein sentezindeki aksamaya bağlı olarak karaciğer yağlanması gerçekleşir ve hepatositlerde depolanmaya başlayan lipidler

yeni sentezlenen lipidlerdir. Klinik olarak doğum döneminde de şekillenen, doğumu takiben iyice belirginleşen yağlı karaciğer sendromu (fatty liver syndrome) denilen ikinci metabolik yolda ise hipoglisemi, glukagon ve plazma yağ asitleri düzeylerinde artış ile ilgili olarak yağlanma şekillenir (76).

Kısaca karaciğer yağlanmasını nedenlerini şu şekilde sıralamak mümkündür:

1. Hepatik lipogeneziste artışa neden olan pozitif enerji balansında (karbonhidrat yağ oranı yüksek olan rasyon ile) karbonhidrat ve lipid metabolizmasında koenzim rolü olan B-kompleks vitaminlerinin yüksek oranda alınması
2. Lipoprotein sentezinde kilit role sahip kolin ve metionin gibi, lipotropik faktörlerin noksanlığı durumunda ,
3. Uzun süreli açlık ve stres, hipoglisemi ve glukagon salınımında artış, insülin noksanlığı ve nöyro-adrenal sistemde hiperaktiviteye bağlı olarak çevreden merkeze yağ göçü yükselmesine bağlı olarak,
4. Hepatik bazı fonksiyonlarda azalmaya neden olan, hepatitis, siroz, vitamin E noksanlığına bağlı hepatik nekrozlar, CCl₄ ve kloroform zehirlenmesi .

Hepatik hücrelerde yağ birikimine bağlı olarak bir çok fonksiyon aksar. Özellikle çoğu transport proteinlerin sentezindeki noksanlığa bağlı olarak mineral metabolizma bozuklukları şekillenir.

Plazma serbest yağ asidi konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak lökositlerin hareket kabiliyeti azalır, immun tepki yavaşlar ve sonuçta hepatik yağlanmada enfeksiyon şekillenme oranı yükselir (111).

1.5. Selenyum (Se)

İlk defa 1818 yılında İsveç'li kimyacı Berzelius tarafından sülfirik asit (H₂SO₄) artıklarından keşfedilen (120), 1930'lu yıllarda toksik bir element olarak kabul ediliyordu. 1957 yılında karaciğer nekrozuna karşı bir etkisi olduğu belirtilmiştir (11, 24, 70, 102). 1956'da da hayvanlarda antitümör tedavide kullanılmıştır.

Doğada özellikle alkali topraklarda bulunur. Bitkilerin Se Emilimi alkali topraklarda en fazla, asitli topraklarda ise az olmaktadır (24, 175). Biyolojik bir siklus göstererek topraktan bitkilere dolayısıyla insanlara geçen (120) asıl kaynağı toprak ve bitkiler olan bir elementtir (109, 126, 157, 158).

Bileşiklerinin fizyolojik ve antiproliferatif etki mekanizması büyük ölçüde bilinmemekle beraber en önemli antiproliferatif mekanizması glutatyon ile etkileşmesidir. Bir amino asit olan selenosistein GSH-Px enziminin prostetik grubunu oluşturmaktadır (17). GSH-Px'in karaciğer, iskelet, ve kalp kasları, eritrositler, böbrekler, damar endoteli ve selluler membran metabolizmasında önemli fraksiyonları vardır.

Oksidatif harabiyetinin önlenmesi ve bütünlüğünün devamı için E vitamini ve Se birbirini tamamlayıcı rol oynarken immun sistem üzerine etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Se in vivo olarak oluşan peroksitlerin GSH-Px aracılığı ile parçalanmasını sağlar (100, 175).

Se fazla alınması hayvanlarda toksik etki oluşturmakta, kılların dökülmesi, tırnak düşmesi, körlük ve tembellik gibi belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (67, 68).

Beyaz ırkta siyah ırka göre daha yüksek olan Se düzeyinin alkolik kişilerde azaldığı da ileri sürülmüştür. Diyetle yeterli miktarda E vitamini bulunduğu durumlarda selenyumun büyüme etkilerinin olduğu bildirilmektedir (137).

Se'un insanda en çok bulunduğu dokuların böbrek korteksi, karaciğer, pankreas ve hipofiz bezi olduğu ileri sürülmektedir (22, 82, 86, 92). Se'un asıl fonksiyonunu Schwarz (28) civcivleri '*exudatit diatez'e*', ratları karaciğer nekrozuna karşı korudu. Se yetersizliği genç hayvanların çeşitli doku ve organlarında, özellikle karaciğer, kalp, iskelet kasları, beyin ve sinir sisteminde değişik bozukluklara, eritrositlerde hemolizin artmasına, büyüme ve gelişmede yavaşlamaya, ergin ruminantlarda infertilite, abort ve retentio secundinaruma; gebe olan rat ve ruminantlarda embriyonik ölümlere yol açması sebebiyle

reproduktif performansın azalmasına neden olmaktadır (28, 100, 128, 139, 161, 175).

Selenyum eksikliğinde kuzularda Nutrisyonel muskuler distrofi (NMD) görülür. Vitamin C ve selenyum yetersizliği ergin ruminantlarda infertilite abort, plasentanın atılması gibi üreme bozukluklarına; kuzu, oğlak ve buzağılarda beyaz kas hastalığı (WMD)'na neden olurken (18, 161), tayların kalp ve iskelet kaslarında, yetişkin atların iskelet kaslarında dejenerasyon, ergin atların yarış performansında azalma gözlenmektedir (139). Ratlarda karaciğer nekrozu, testislerde dejenerasyon, musküler distrofi, aspermatogenez ve gebe olanlarda fetal rezepsiyon da görülen yetersizlikler arasındadır (27, 88, 139).

Selenyum ile kanser arasındaki ilişkiler incelendiğinde, insanlarda fizyolojik düzeylerdeki Se'un kanserojen olmadığı ve hatta antikanserojen etki gösterdiği kanser olgusu ve selenyum konsantrasyonları arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Se düzeyi düşük olan bölgelerde mide, özafagus ve rektum kanserlerinin oluşum risklerinin arttığı bildirilmektedir (120).

Son zamanlarda Se preparatları genel olarak pratikte çiftlik hayvanlarının çeşitli hastalıklarının önlenmesinde veya tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda Se'un çevredeki yüksek konsantrasyonu, hayvan veya bitkilerin üreme ve gelişmesinde, yaşam sürelerinin uzamasında etkilidir (71, 107).

Civcivlerde deri altı ve karın boşluğunda sıvı toplanıp şişkinliklerin oluştuğu, bacak kaslarının etkilendiği muskuler distrofi, beyinde oluşan dejenerasyon nedeniyle ayakta durma ve yürümede zorluklar olduğu bildirilirken, başlarının arkaya doğru kasıldığı ensefalomalasi ve alyuvarlarda hemoliz görülmüş, ergin kanatlılarda ise et ve yumurta veriminde azalma olduğu belirtilmiştir (117, 128, 139, 141, 149, 156).

Se tavuk ve hindiler için temel iz elementlerden birisidir. Kanatlı hayvanların beslenmesinde selenyumun önemi son yıllarda ortaya konmuştur. Tavuk ve broylerlerin Se gereksinimi 0,1 ppm hindilerin ise 0.2 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu miktar, yumurta veriminin normal düzeyde devam edebilmesi ve kuluçka

oranının yeterli düzeyde kalabilmesi için gerekli bulunmaktadır. Sodyum selenit veya sodyum selenat halinde yeme katılmaktadır ve hayvanlar 16 haftalık oluncaya kadar verilmektedir. Bu yaş döneminde yemlere selenyum katılması önemlidir (17, 120).

Genellikle hayvanların Se yetersizliği sendromundan korunabilmesi için rasyonlarda 0.05- 0.10 µg/gr selenyum bulunmasının yeterli olduğu (14, 22) 0.05 µg/gr 'dan daha az olan değerlerin yetersiz kabul edildiği, 0.02 µg/gr ve daha az miktarda ise hastalıkların meydana geldiği ve dokularda optimal GSH-Px aktivitesinin meydana gelebilmesi için diyetel Se konsantrasyonunun 0.10-0.20 µg/gr değerleri arasında olması gerektiği kaydedilmiştir (24).

1.5.1. Selenyumun Metabolizması

Element halindeki Se'un Emilimi sınırlıyken (63, 169) selenomethionin ve selenosistein formlarında ya da selenit formunda alındığında monogastrik hayvanların midelerinde ve ruminantların rumeninde absorbe olmadıkları (158) ancak ince barsak ve duodenumdan aktif taşınma ile emildikleri (27), kısmen de sekum ve kolondan emildikleri bildirilmiştir (24).

Monogastrik türlerin, ruminantlara göre selenyumdan daha fazla yararlandığı ve oral olarak verilen selenyumu domuzların % 77, koyunların ise % 29 oranında değerlendirdiği bildirilmiştir. İnorganik selenyum rumen mikroflorası tarafından sentezlenen aminoasitlerin yapısına girer ve muhtemelen selenomethionin veya selenosistein olarak absorbe olur. Diyetle organik formda alınan veya organizma tarafından organik forma dönüştürülen Se'un Emiliminin daha kolay olduğu bildirilmiştir (24, 27).

Özellikle duodenum, sekum ve bir miktar da kolondan absorbe edilerek kana transfer edilen selenyum, plazma proteinlerine bağlanarak (albumin, α-1 ve α-2 globulinlere ve β-lipoproteinler) kemikler, saç ve eritrositleri de içine alan tüm vücut dokularına, özellikle böbrekler, karaciğer, kalp ve pankreas dokularına

ayrıca hemoglobinin globulinine, süt proteinlerine eritrosit ve lökositlere taşınmaktadır (102, 158).

Se GSH-Px enziminin yapısına girerek, lipidlerin oksidasyonu sonucu meydana gelen peroksitlerin katabolizmasında önemli rol oynar. Böylece hücre membranının bütünlüğünün sağlanması ve korunmasında etkin bir fizyolojik fonksiyon üstlenir. GSH-Px karaciğer ve eritrositlerde en yüksek kalp, böbrek, akciğer, mide, adrenal bezler, pankreas ve adipoz dokuda orta derecede; beyin, iskelet kasları, göz lensleri ve testislerde ise az olmak üzere tüm dokularda aktivite gösterir (102, 158).

Se'un endokrin aktivitesine katıldığı, bakteriyel RNA'nın yapısına girdiği (120), plazma proteinlerinde taşıma görevi yaptığı ve testis proteinlerinde mitokondriyal yapıya katıldığı kaydedilmektedir (14). Değişik düzeylerde radyoaktif Se (^{75}Se) içeren rasyonlarla beslenen kuzularda 48-336 saat arasında, tüm organizmanın Se kaybı ile alınan rasyonun Se konsantrasyonu arasında ters ve önemli bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca 96-144 günler arasında plazma, karaciğer ve kalp dokusunda hızla, iskelet kasları ve kemiklerde ise daha yavaş bir hızda azalmakta olduğu kaydedilmiştir (120).

İnsanlarda oral olarak alınan Se intestinal absorpsiyonu bireylere göre % 44-70 arasında değişmekte ve ilk bir hafta emilen miktarların % 20-24'ü idrarla, çok az bir miktarı da deri ve solunum yolu ile atılmaktadır. Buna karşılık % 33-58 arasında bireylere göre değişen oranlarda feçesle atılmaktadır.

^{75}Se verilen köpeklerin değişik kan proteinlerinde 310.güne kadar farklı değerlerde Se belirlenmesi, bu arada 100-120. günler arasında eritrositlerde oldukça yüksek miktarlarda Se saptanması, eritrositlerin yapısına giren Se'un ömür boyu alyuvarların bünyesinde kaldığını göstermektedir (158).

Kısa sürede fazla miktarda selenyum alındığında, solunum yoluyla atılımı önemli derecede artar. Ayrıca arsenik, talyum, bakır ve kadmiyum enjeksiyonları da solunum yoluyla selenyum atılımını arttırmakta, ancak kurşun ve çinkonun

selenyumun bu yolla atılımı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (83, 158).

1.5.2. Selenyum Tayin Yöntemleri

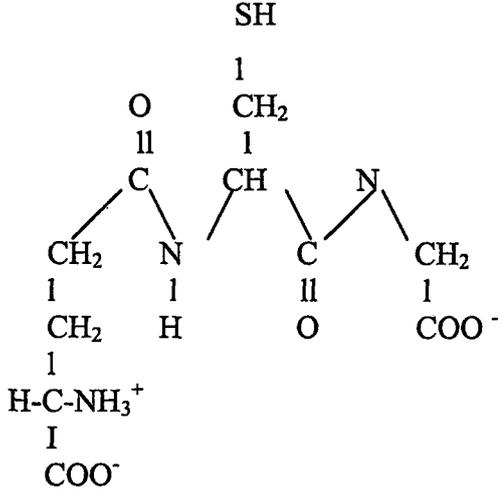
Se miktar tayininde kullanılan yöntemler arasında nötron-aktivasyon analizi, flurometri ve atomik absorpsiyon spektroskopisi sayılabilir (94, 103). Nötron-aktivasyon analizi klinik laboratuvarlarda uygulanabilirliği olmayan bir yöntemdir.

Se'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 duyarlılığında ölçüm yapılabilir ve Dr Massman tarafından geliştirilen grafit fırın tekniği ile daha güçlenen atomik absorpsiyon fotometresinde tayinler daha iyi sonuç vermektedir.

Se'un flurometrik tayininde ise örneğin asit ile dijestiyonunu takiben selenatın selinite indirgenmesi sağlanmakta ve piyazselenol kompleksi oluşturularak meydana gelen flurosansın şiddeti ölçülmektedir (86).

1.6. Glutatyon (GSH)

GSH ilk kez 1890 yılında Rey-Pailhade tarafından philothion olarak adlandırılmış ve RH_2 formülü ile gösterilmiştir. 1907 yılında Heffter, R'nin sistein olabileceğini ve tiyol taşıyan bu bileşiğin hücrede oksidasyon olayları için önemli bir fenomen olduğunu ifade etmiştir. İnsan hücresindeki mevcut GSH oranı 0.1-10mM olarak belirtilmiştir (80). Hopkins tarafından glutatyon olarak isimlendirilmiş glutamat ve sistein'den oluşmuş bir dipeptid olduğu ileri sürülmüştür (153). 1929 yılında ise Kendall ve arkadaşları tarafından bugünkü gamma-glutamil-sisteinil glisin adıyla bilinen bir tripeptid olduğu bildirilmiştir. 1935'de ilk kez Hatigton ve Mead tarafından laboratuvarında glutatyonun sentezlenmesi başarılmıştır (90).



γ glutamil, sisteinil glisin

Şekil 1.6.1. Glutatyonun yapısı (80, 118)

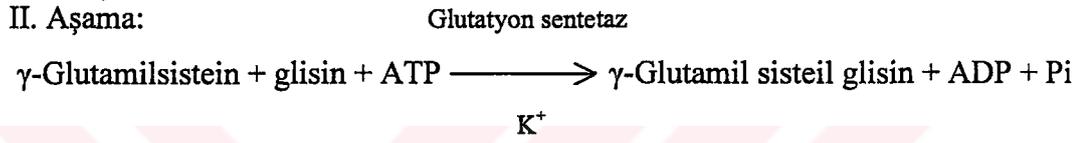
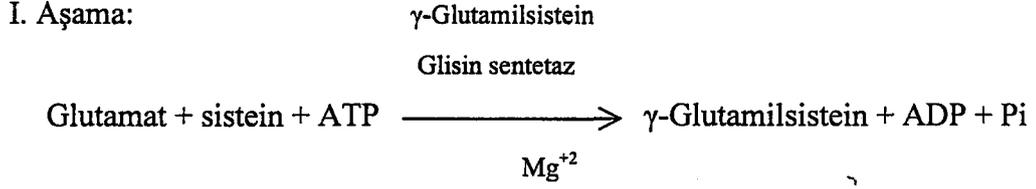
Bu bileşik hemen hemen tüm aerobik canlılarda en yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı intraselüler tiyol bileşiği olup, protein ve DNA sentezi, transport, enzim aktivitesi, metabolizma, hücre savunması gibi çok önemli biyolojik fonksiyonları olan bir tripeptittir. Çok yönlü fonksiyonlarının olmasından dolayı GSH enzim mekanizmaları, makromolekül biyosentezi, ara metabolizma, ilaç metabolizması, radyasyon, kanser toksitesisi, transport mekanizmaları, immunoloji, endokrinoloji ve yaşlanma gibi değişik konularda yapılan araştırmalar için ideal bir yer tutmaktadır (38, 80, 136).

Glutatyon canlı organizmalarda hemen hemen bütün organlarda bulunmaktadır. Glutatyonun en fazla bulunduğu yer gözdeki lens dokusudur. 100 gram dokunun 600 mg kadarı glutatyondur. Göz dokusunda GSH oftalmik ve noroftalmik asit gibi bazı analogları az miktarda da olsa bulunur. GSH oksidasyonun katarakt patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmektedir (34).

GSH bir çok reaksiyonda koenzim olarak görev yaparken ilaçlar ve diğer yabancı maddeler, metabolik aktivite sırasında oluşan östrojen, prostoglandin ve lökositler gibi bileşiklerle, konjugatlar oluşturarak onları metabolizma olaylarına katılmaktadırlar. Hücre dışına taşınabilen GSH membranda bulunan γ - glutamil trans peptidaz (GGT) enziminin etkisiyle amino asitlerle birleşip, bunların

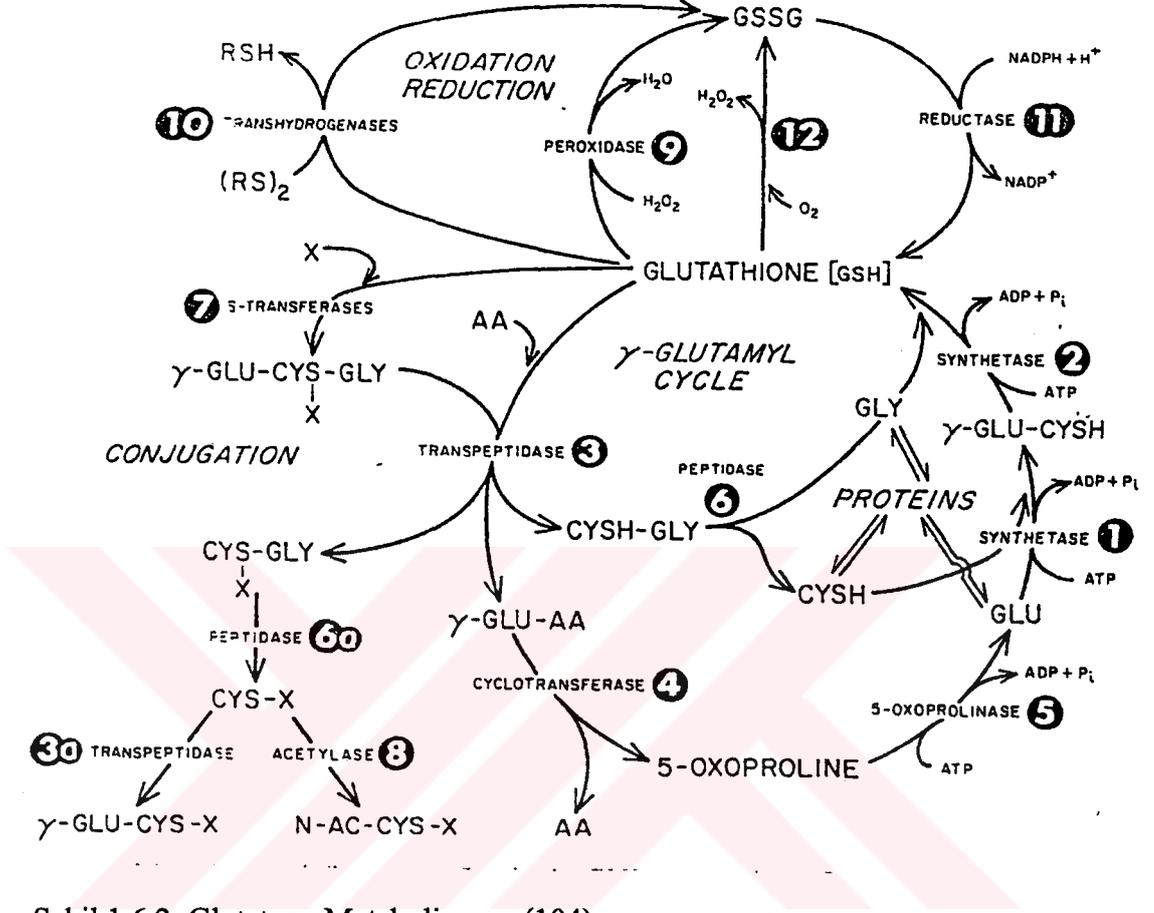
transportunda rol oynamaktadır. Taşınan GSH hücre membran ve yakın çevrelerinde oluşan indirgenme tepkimelerine katılır, plazmaya ve diğer hücrelere geçebilir. Bu bakımdan glutatyonun, sisteinin depo ve transport formu olduğu düşünülmektedir (104).

Glutatyonun sitozolde iki aşamada biyosentezi yapılmaktadır.



GSH, hücre içi düzeylerinin düzenlenmesi amacıyla, γ -Glutamil sistein sentetazı, non-allosterik feed-back inhibisyon yoluyla, kontrol etmektedir (143).

1.6.1. Glutasyon Metabolizması



Şekil 1.6.2. Glutasyon Metabolizması (104).

Glutasyon hücre içinde γ -glutamil-sistein sentetaz (Şekil. 4 Reaksiyon 1) ve glutasyon sentetazın (Reaksiyon 2) katalizi ile oluşmaktadır. Reaksiyon 1'i GSH feedback mekanizması ile inhibe edilebilmektedir. GSH ve GSSG'nin yıkılığını sağlayan Gama glutamil transferaz (GGT), γ -glutamil-sistein, glutamin, methionin gibi amino asitlere, bazı dipeptidlere, suya veya glutasyonun kendisine verilir (Reaksiyon 3).

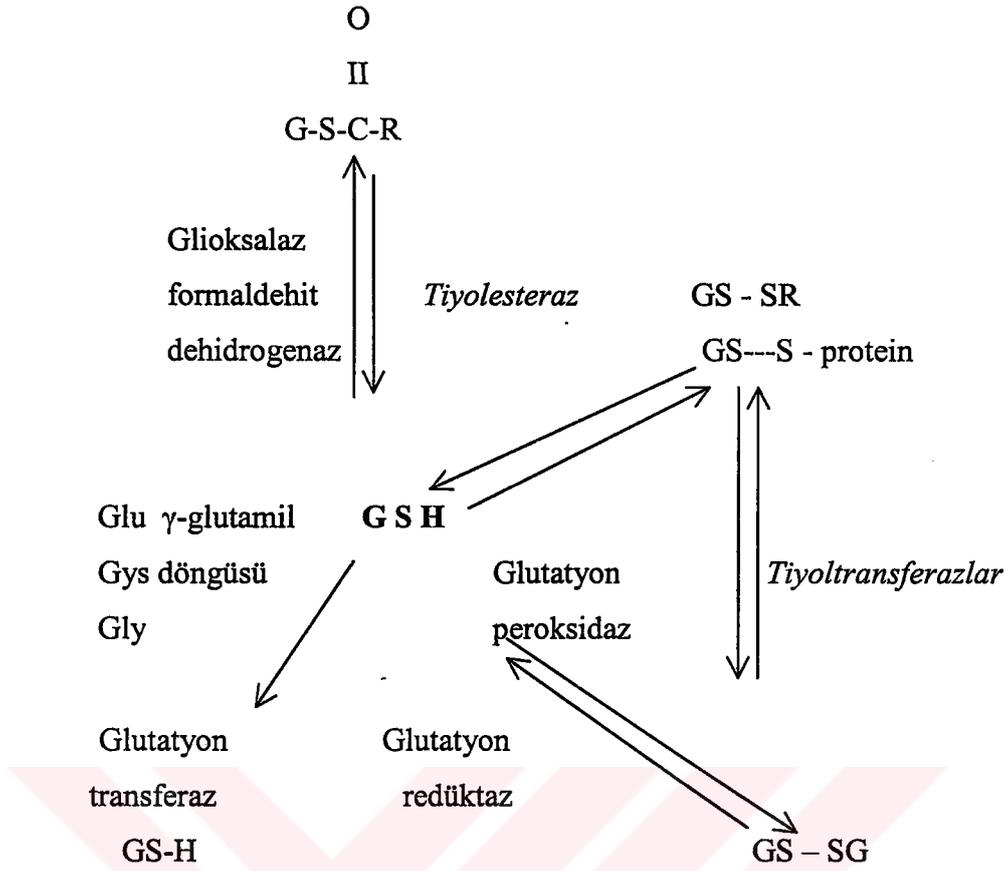
GSH'un hücre içinde yer almasına karşılık transpeptidaz hücre membranının dış yüzeyinde lokalizedir. Bu nedenle hücre membranlarından taşınan GSH, GGT ile reaksiyona girer. Oluşan γ -glutamil siklo transferazların etkisiyle kendilerini oluşturan aminoasitlere ve 5-okso-L-proline dönüşmektedirler (Reaksiyon 4). 5-okso-L-prolinaz ATP'nin varlığında 5-okso-L-prolini L- glutamata çevirir

(Reaksiyon 5). Dipeptidaz, transpeptidaz etkisiyle oluşan sisteinil glisini tekrar sistein ve glisin componentlerine ayırırlar (Reaksiyon 6). Bu reaksiyonlar GSH'un sentez ve yıkılımını sağlayan γ -glutamil siklusunu oluşturmaktadır. Bu siklusun enzimlerinden ikisi kükürtlü GSH türevlerinin metabolizmasında da yer almaktadır (Reaksiyon 7). GGT ve türevlerinden γ -glutamil ayrılır (Reaksiyon 3), oluşan kükürtlü sisteinil glisin türevleri dipeptitazın etkisiyle kükürtlü sistein türevlerine dönüşüp (Reaksiyon 6) N- açilasyona uğrayabilmekte veya diğer bir transpeptidasyon reaksiyonu ile γ -glutamil türevlerine dönüşebilmektedir (Reaksiyon 3a).

Hücre içindeki GSH, Se içeren bir enzim olan GSH-Px ile GSSG'ye çevrilir. Bu enzim H_2O_2 ve diğer peroksitleri indirgeyerek peroksitleri korumaktadır (Reaksiyon 9). GSH, transhidrojenasyon ile de GSSG'ye dönüşebilir. (Reaksiyon 10). GSSG ise NADPH'a bağımlı GSSG- redüktazın katalizi ile GSH'a dönüşmektedir (Reaksiyon 11). Hücre dışı GSH'un GSSG'ye dönüşümü ise oksijenin varlığında gerçekleşmekte ve H_2O_2 açığa çıkmaktadır (Reaksiyon 12). GSH'un serbest radikallerle etkileşmesiyle de GSSG oluşabilmektedir (36, 104).

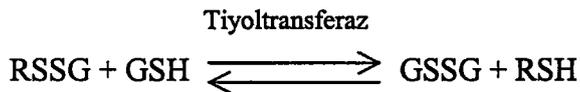
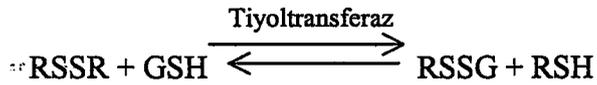
1.6.2. Glutatyona Bağlı Enzim Sistemleri

GSH, biyolojik materyallerde indirgenmiş sülfür kaynağı olarak bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle oksijen metabolizması sırasında meydana gelen toksik ve reaktif bileşiklerin detoksifikasyonunda GSH ve GSH' a bağımlı enzimlerin rolü büyük olup Şekil 1.6.2.1'de olduğu gibi özetlenebilir. GSH'un canlı organizmada çok önemli ve kilit rolleri vardır.



Şekil 1.6.2.1. Glutatyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri (104, 111).

Tiyol grupları hücre içerisinde daima indirgenmiş durumda tutulurlar. Sistein aminoasidi ve Co A'nın protein sentezi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda olmaları gerekir.



Formaldehid dehidrogenaz ve glukozilaz'a gelince bu enzimler reaktif aldehitlerin inaktivasyonunu katalizlerler. Reaksiyon sırasında glutatyon tiyol grubu ile aldehit arasında bir tiyohemiasetal türevi meydana gelir. Glutatyon türevi, enzimatik reaksiyon ile bir tiyol estere dönüştürülür. Bu dönüşümde aldehit

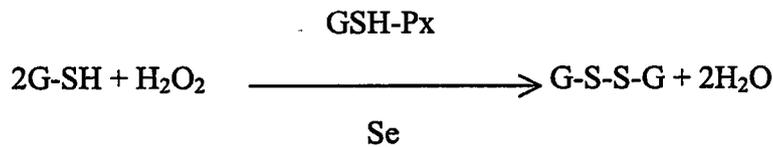
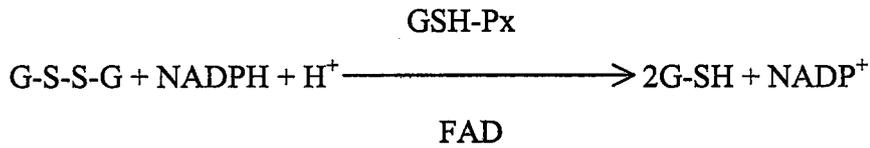
grubunun yükseltgenmesi karboksilik asit yükseltgenme düzeyine eşdeğerdir (81). Kinetik çalışmalarına göre glutatyon formaldehit dehidrogenaz enziminin katalitik mekanizmasında esas aktivatör olarak görülmektedir.

1.6.3. Glutatyonun Rol Aldığı Metabolik Reaksiyonlar

1.6.3.1. Endojen Peroksitler ve Radikallerin Yıkımı

Glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda toksik potansiyelli olan H_2O_2 dekompozisyonu gerçekleşir.

Eritrositlerdeki pentoz fosfat yolu, okside olmuş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyonuna (2G-SH) dönüştürülmesi için gerekli olan NADPH'ı sağlar. Bu indirgenme olayı, FAD içeren (Flavinadeninükleotid) bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz tarafından katalize olunur. Bundan sonra, indirgenmiş glutatyonunda iz elementlerden selenyumu içeren bir enzim olan GSH-Px ile katalize edilen bir reaksiyonda eritrosit içindeki H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırır (18, 81).



Glutatyon redüktazın katalitik aktivitesi iki reaksiyon ile açıklanabilir. NADPH tarafından enzimin indirgenmesi ve G-S-S-G tarafından indirgenen enzimin yeniden oksitlenmesi glutatyonun indirgenmiş olarak tutulmasının dışında glutatyon redüktazın H_2O_2 ve süper oksit anyonu gibi yükseltgen bileşikleri oluşturan redoks döngülerinde görevi vardır. GSH-Px ise, H_2O_2 'in ve yağ asit

hidroperoksitleri (R-COOH) karşısında indirgemiş glutatyonu yeniden G-S-S-G'ye yükseltir (17). Bu reaksiyonlar önemlidir. Çünkü H₂O₂'nin birikimi, hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını arttırmak suretiyle, eritrositin yaşam süresini kısaltabilir. Aynı zamanda GSH-Px, bir çok dokuda bulunan, doğal bir antioksidandır. Tavuk embriyosunun çeşitli dokularında (beyin, karaciğer, membran, deri) antioksidan enzimlerine bakıldığında (51) deride glutasyon konsantrasyonu büyümeye bağlı olarak azalmıştır. Diabetli hastalarda antioksidan enzim aktivitelerini inceleyen araştırmacılar (77), GSH-Px aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bazı kanserli kişilerde kan selenyum ve GSH-Px aktivitesinin düşük olması nedeniyle kanser ve antioksidan enzim düzeyleri arasında bir ilişkinin olduğunu kaydedilmiştir (33, 129).

1.6.3.2. Proteinlerdeki (-SH) Gruplarının Korunması

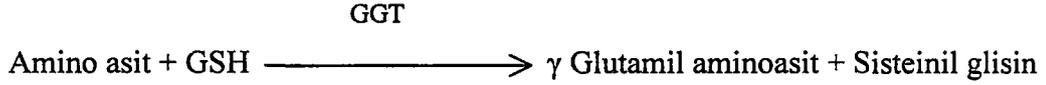
Glutasyon, SH gruplarına redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan SH okside olur ve glutasyonun diğer bir molekülü ile bir disülfid köprüsü oluşturur.



Gerektiğinde G-S-S-G'de NADPH kullanan bir reaksiyon ile glutasyon redüktaz tarafından GSH'a redüklenebilir.

Bu reaksiyon kırmızı kan hücrelerinde Glukoz-6-fosfat (G-6-P)'da hidrogenaz aktivitesi düşüklüğünde olduğu gibi NADPH düzeyi düşük ise redüklenmiş GSH yeterli miktarda rejenere olmaz. GSH'ın indirgenmiş düzeyleri peroksitlerin eritrositlerde birikmesine yol açarak membran lipidleri üzerine olan oksidatif etkinliklerinden dolayı hemoliz meydana gelebilir (26, 81, 101, 104).

1.6.3.3. Aminoasitlerin Membran Transportundaki Rolü



Bu reaksiyon bazı amino asitlerin plazma membranından transferine yardım eder. Sonra amino asit GSH ile yeniden sisteinil glisinden sentezlenebilmektedir (26, 101).

1.6.3.4. Bazı Elektrofilik Ksenobiyotiklerin Glutasyon ile Konjugasyonu

Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikler nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.



Burada R elektrofilik ksenobiyotiktir. Bu reaksiyonları katalize eden GST'ler karaciğer sitozolinde yüksek, diğer dokularda daha düşük miktarlarda bulunur (147, 150).

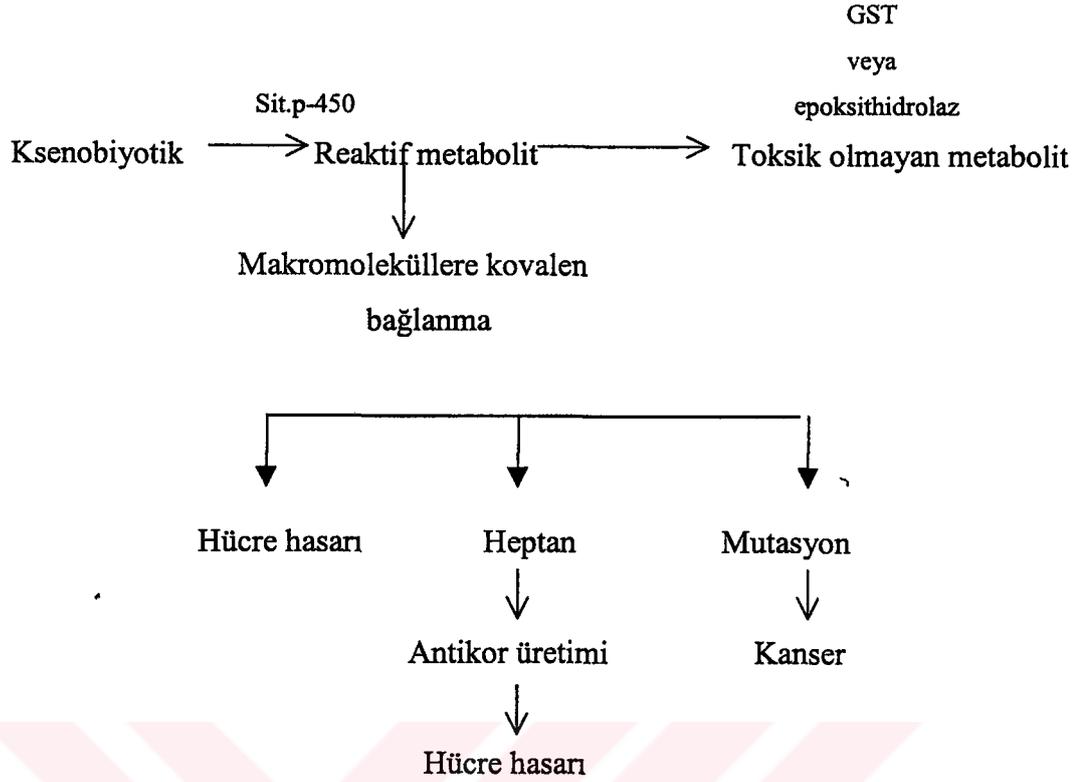
İnsan dokusunda GST'in bir çok çeşitleri olup, farklı substrat özgünlükleri gösterirler (2, 111, 171). Bir çok gelişmiş organizmada toksik maddelerin vücuttan uzaklaştırılması işlemi detoksifikasyon enzimleri adı verilen bir seri enzim ile gerçekleşmektedir. Bu işlem normalde uzaklaştırılması istenen toksik maddelerin enzimatik reaksiyon sonucu suda çözünürlüğü artırarak boşaltım yoluyla atılmasını kapsamaktadır (81).

Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalar; DNA, RNA veya hücre proteini ile kovalant olarak birleşerek, sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi (111). Bundan dolayı GST bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (2, 50, 75).

Karaciğer gibi dokularda GST düzeyi düşürülürse normalde GST ile konjuge olması gereken muhtelif kimyasal maddelerin yol açacağı hasara dokuların daha yatkın olduğunu gösteren bir çok çalışma vardır (2, 50, 52, 75, 151). Bitkilerde de GST bulunur. Bitkiler metabolizmaları sırasında çok fazla sayıda metabolit içerirler. Üretilen sekonder metabolitler aynı ekosferdeki diğer organizmaları etkileyebilir. Bazı durumlarda ksenobiyotiklerin mutajenik aktivasyonu ve fiziksel etkileri bitki sekonder metabolizması üzerinde meydana gelebilir. Ksenobiyotikler genelde bitkiler tarafından tamamen metabolize edilmezler. Fakat çözünür ve çözünmez konjugatlar formunda depolanırlar (133).

Bitkilerde GST'lar, pestisidleri de kapsayan elektrofilik substratların GSH ile konjugasyonunu katalizlerler. Bitki GST'ları pestisid substratları çeşitli kloro- s- etil dipropil-tiyokarbomat'ın sülfoksidi ve klorimuronu içine alır (114).

Glutasyon konjugeleri eksekresyon öncesi daha ileri metabolizasyona uğrarlar. Glutasyona ait glutamil ve glisin grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna bir asetil grubu (asetil Co-A'dan sağlanan) eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik, idrarla atılan L- asetilsisteinin konjugesi olan merkapturik asittir. İnsan hücrelerinde GSH'un ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü yanında diğer bazı önemli fonksiyonları da vardır. Bu ksenobiyotiğin metabolizmasının hücre hasarı, immunolojik hasar veya kanser ile nasıl sonuçlanabileceği Şekil 6 'daki gibi şematize edilmiştir.



Şekil 1 6. 3. 4. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu (111)

Bu durumda bir ksenobiyotiğin bir reaktif metabolite dönüşümü bir seri sitokrom p-450 tarafından ve reaktif metabolitin (örneğin bir epoksit) toksik olmayan bir metabolite dönüşümü ise ya GST veya epoksit hidrolat tarafından katalize edilir (111, 142).

Ksenobiyotik bir ilaç olunca Faz I reaksiyonları bunun aktif formlarını örtebilir veya farmokolojik olarak aktif ise önceden metabolize olmaksızın etkisini azaltabilir veya sonlandırabilir (142).

Bazı ksenobiyotikler (siyanür) düşük dozlarda bile çok toksiktirler. Diğer taraftan yeterli miktarda uygulanırsa bazı toksik etkiler göstermeyen, ilaçlar dahil az sayıda ksenobiyotikte mevcuttur. Ksenobiyotiklerin toksik etkileri son derece geniş bir spektrumu kapsamaktadır.

1.6.4. Glutasyonun Tayin Yöntemleri

1.6.4.1. Spektrofotometrik Yöntem

Dokularda geniş bir dağılım gösteren ve bazı önemli biyolojik fonksiyonlara sahip GSH ve türevlerinin miktar tayini çalışmaları GSH'un ilk keşfedildiği yıllara dayanır. GSH indirgenmiş halde sülfidril ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) olarakta disülfid gruplarına sahip iki şekilde bulunur (111). GSSG'nun miktar tayini GSH'a göre daha güçtür 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 üzerinde saptanması esasına dayanır. Enzimatik indirgenme NADH veya NADPH tarafından maya glutasyon 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 saptanması mümkündür (47).

1.6.4. 2. HPLC Yöntemi

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 floresans özellikli GSH konjugatları ters faz oktadesilsilan kolonundan elde edilir. İzokratik koşullar asetonitril/amonyum fosfat tamponu-tetrabutylamonyum hidroksit ile sağlanır (87, 104).

1.6.4. 3. Fluorometrik Yöntem

GSH ve GSSG'nin fluorometrik tayinini o-ftalaldehit (OPT) gibi bir floresans bileşik kullanarak Hissin ve Hilf (87) geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, glutasyon OPT ile pH: 8 ve GSSG OPT ile pH:12 de reaksiyona girer, GSH N- etilmaleimit

ile kompleks meydana getirir, bu durumda GSSG ölçümünde GSH'un girişimi engellenmiş olur. Bu yöntemde GSH ve GSSG için verim %91-100 oranındadır.

1.7. Glutasyon S- Transferaz (GST)

1879 yılında (153) ve ayrıca Jaffe tarafından brombenzil merkaptürik asit'in köpek idrarından izole edilmesiyle dolaylı da olsa GST enzimlerinin varlığı fark edilmiştir. Çünkü glutasyonun bazı konjugasyon ürünlerinin en son aşaması olan merkaptürik asit oluşumunda, GST enzimleri görevlidir. GSH konjugatlarının GST'lar tarafından gerçekleştirilen kataliz reaksiyonlarının esasını 1959 yılında Barnes ve ark ile Bray'in tanımladığı bildirilmiştir (142). GST'lar 1974 yılında ilk kez Habiğ ve ark. (59) tarafından saflaştırılmıştır. İlk adı glutasyon S- transferaz B (glutasyon 1-1 ve 1-2) olan GST'ları ligandin adı ile 1985 yılında ifade etmişlerdir (137). GST enzimleri hemen hemen bütün bitkilerde, omurgalılarda, böceklerde, memelilerde, maya ve bakterilerde bulunmuştur (62).

Bir multi enzim olan Glutasyon S-transferaz (GSH-transferaz, GST, GST(s), (EC.2.5.1.18) ve izo enzimleri, lipofilik yapıli elektrofilik merkeze sahip çeşitli bileşiklerin GSH ile nükleofilik reaksiyonları katalizleyen hücre içinde lokalize olmuş bir enzim grubudur (95, 164). Bu enzimler izoelektrik noktaları 4,8-8,9 arasında değişen ve alt birimlerinin moleküler ağırlıkları 23-27 kD arasında, homodimer veya heterodimer olarak bulunabilirler (142). GST enzimlerinin her dimeri birbirinden bağımsız iki aktif bölgeye sahiptir. Bu aktif bölgeler indirgenmiş glutasyon için bağlanma bölgesi ve elektrofilik ve çoğunlukla hidrofilik kosubstrat için bağlanma bölgesi içerir (31).

Ayrıca bu enzimler yapısal olarak farklı alkil ve aril halojenler, laktonlar, epoksitler, guinonlar, esterler ve aktive edilmiş alkenler gibi bir çok substrata karşı reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahiptirler (95).

İnsan organizması ve tarımsal alanlarda bu denli önem taşıyan bu enzim grubunun mekanizmasının çok iyi bir şekilde anlaşılaraq fonksiyonel verimliliğinin maksimum düzeye ulaştırılması gerekmektedir.

1.7.1. GST'lerin Yapısal Özellikleri ve İzomerleri

Memeli sitozolik enzimleri, yapısal, katalitik, immunolojik özellikleri ve izoelektrik noktalarına göre farklılıklar gösterirler (45).

GST'lar canlılarda iki şekilde bulunurlar:

- Suda çözülmüş halde
- Membrana bağlı

GST'lerin suda çözünebilir (sitzozolik) türünü fizikokimyasal, immünolojik, enzimatik ve yapısal özellikleri esas alındığında izomerleri üç grupta toplanırlar. Bu izoenzimler izoelektrik noktalarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmışlardır (164).

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

Memelilerde en az yedi izoenzimi tanımlanan GST'lerin 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 alt birimden meydana gelirler. GST (s)'ların farklı kromozomlar üzerinde yerleşimini en az üç multigen ailesi oluşturmaktadır (140). GST'da homo veya heterodimer oluşturmak üzere yapıya katılan altbirimler; Y_a , Y_c , Y_{b1} , Y_{b2} , Y_n , Y_p , ve Y_k dir (96, 142).

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

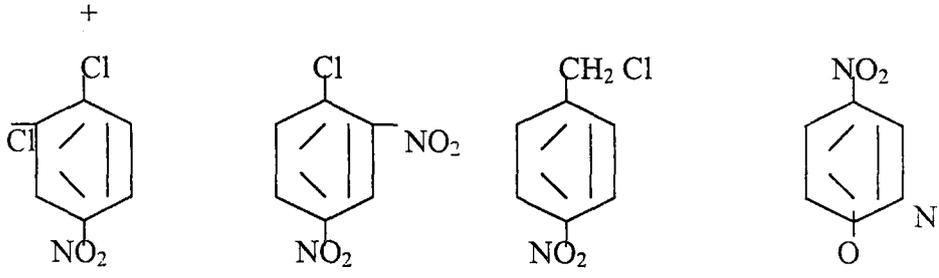
Tablo 1.7.1. İnsan ve sıçan karaciğerlerinde GST enzimlerinin bazı yapısal özellikleri (142).

Enzim	PI	MW(D)	Substrat	Referans
İnsan karaciğer Sitosol enzimi Alfa (α) Mu (μ) Pi (π)	7.8 6.6 4.6	51.000 53.000 53.000	CDNB trans-4-fenil-3-büten-2-on, sitiren-7,8-oksit Kumen hidroperoksit.	Warholm at al. 1981
Sıçan karaciğeri A B C D	8.5 7.4 7.8 7.4	45 homodimer	CDNB, DCNBP- Nitrobenzilklorid, 1.2-epoksi-3(pnitrofenoksi) propan. Bromosülfofitalerin Alilalkol, iyodo metan. Etakrinik asit	Habig 1974

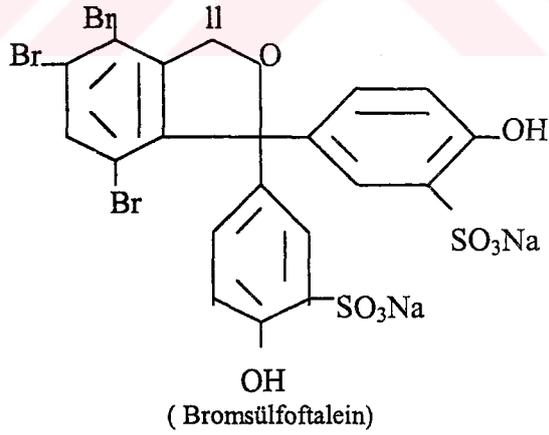
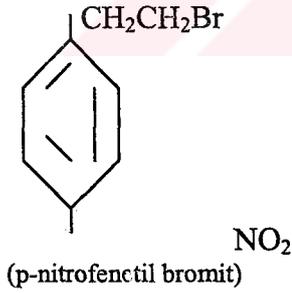
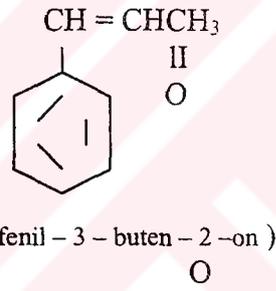
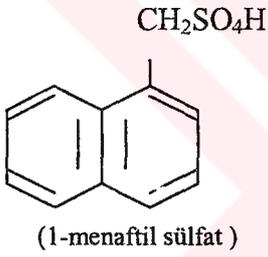
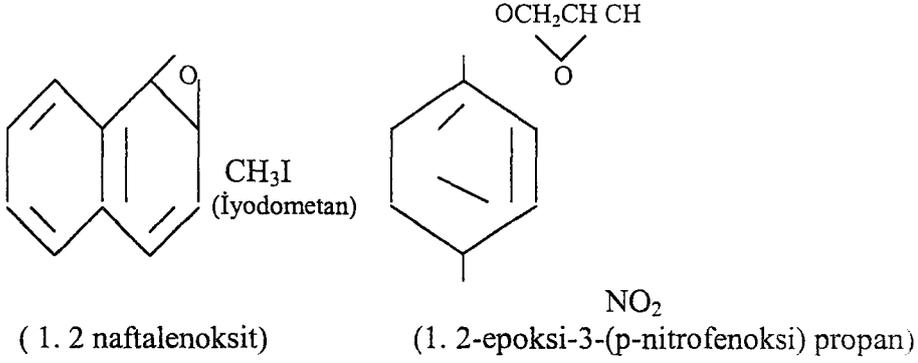
GST izoenzimlerine hemen hemen bütün memeli ve omurgalı türlerinde rastlanmıştır. Bitkilerde de GSH transferaz enzim aktivitesi bulunmaktadır. İnsanda GST aktivitesi böbrek, karaciğer, adrenal bez, kas, pankreas, testis ve beyinde yüksek iken deri ve eritrositlerde oldukça düşüktür. Ratlarda ise GST aktivitelerinin en yoğun olduğu dokuların karaciğer ve daha sonra testis, böbrek ve beyin olduğu belirtilmiştir (142,164).

1.7.2. GST'in Detoksifikasyon Mekanizmasındaki Önemi

GST (s)'lar temel olarak, ksenobiyotik bileşiklerin, ilaçların, karsinojenlerin, pestisid herbisit gibi çevre kirleticilerinin yer aldığı grupların detoksifikasyonunda rol oynarlar. Hücrelerde pestisidler, canlı bitkilerde fotosentetik transportu (atrazin) veya esansiyel amino asitlerin biyosentezi (klorosilfuron) gibi spesifik proseslere engel olurlar. Herbisit detoksifikasyonu glutatyonla konjugasyonu kapsar. Oluşan konjugatlar daha hidrofilik ve bitkilerde daha az değişken olup ilave proseslere hassas ve ilk hedef bölgeye karşı genellikle inaktiftir (114). GST (s)'lar ilaçlar, steroid hormonlar, safra asitleri ve bilirubin gibi lipofilik bileşikleri bağlayarak hücre içinde taşıyıcı ve bağlayıcı proteinler olarak da görev yapar. GST (s)'ların reaksiyona girdiği substratlar aşağıda gösterilmiştir



(1,2- dikloro-4-nitro benzen)(1-kloro-2,4-di-nitribenzen) (p-nitrobenzil klorür) (4-nitropiridin-N-oksit)



Şekil 1.7.2. GST (s)'ların reaksiyona girdiği substratlar (59).

Not: Daire içine alınan gruplar bileşiklerden ayrılan grubu, oklar ise GSH'un alken ve epoksitlere katıldığı bölgeleri ifade etmektedir.

GST'ların katalizlediği temel reaksiyonlar arasında nükleofilik yer değiştirme, oksiran halkasının nükleofilik açılımı, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonlar yer almaktadır (59, 131).

Reaksiyonları katalizleme açısından GST izoenzimleri farklılıklar gösterirler. GST (α) grubu yüksek peroksidaz aktivitesine sahip olduğu için organik hidroperoksitler ile reaksiyona girerler. GST (π) izoenzimleri ise çeşitli epoksidasyon reaksiyonlarına ilgi duyarlar. GST (π) türü için ise henüz reaksiyona girmeyi tercih ettikleri özgün bir gruptan söz edilmemektedir (136).

Tablo 1.7.2. GST'ların katalizlediği nükleofilik yer değiştirme, oksiran halkasının nükleofilik açılımı, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonlar (59)

Reaksiyon tipi	Substrat
1. Michael katımı	N-asetilbenzokinonmin 4-hidroksinon – enol
2. Oksiran halkasına atak	1-nitropiren-4,5 oksit
3. Nükleofilik yer değiştirme	Brom izovalerilüre iyodometan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
4. Organik hidroperoksitin indirgenmesi	Linoleik asit hidroperoksit 5-hidroperoksimetil-urasil
5. Organik nitratın indirgenmesi	Nitrogliserin ve türleri

GST'lar ile reaksiyona giren bileşikler arasında N-asetil, p-benzokinonimin, aflatoksin B₁-8,9-oksit (AFB₁), benzopren-4,5-oksit, α -bromizovalerilüre de yer almaktadır. Bu bileşikler, karsinojen ve ilaçlar tarafından oluşturulmuş elektrofilik bileşiklerdir ve GST'lar yardımı ile zehirsizleştirilirler (142).

Bazı endojen elektrofiller sitotoksik veya genotoksik etki göstermektedirler. Örneğin mutajenik bir bileşik olan kolesterol oksit GST (σ) tarafından zararsız

hale getirilirler. Polidoymuş yağ açıl hidroperoksitlerin ayrışmasından oluşan hidroalkenler de GST (s) için güçlü substratlardır (31).

Ayrıca prostaglandin H₂, Lökotrien C₄ (LTC₄), trinitrogliserin gibi bazı kimyasal mediatörlerin biyosentezlerinde GST (s)'lar görev yapmaktadır. LTA₄'ün GSH konjugasyonu s- transferaz katalizler ve LTC₄ meydana gelir (93).

GSH ile konjugasyona girerek GST'lar için substrat olarak ortaya çıkan ksenobiyotik elektrofilik bileşikler kısaca özetlemek gerekirse;

1. Kimyasal sanayi ürünleri,

Plastik sanayi ürünleri: vinil klorür ve stiren oksit

Pestisid ve herbisitler : alaklor, diazinon, atrazin

Boya endüstrisinde kullanılan aromatik aminler

2. Farmasotik ürünler, parasetamol, melfalan, karmustin, misanidazol.

3. Petrokimyasal ve diğer organik madde kaynaklı çevre kirleticileri, Benzo (a) piren, 2-naftilamin.

4. Doğal ürünler, Keteşoller, aflatoksin, aminoasit piroliz ürünleri, lipid oksidasyon ürünleri.

GST'lar karaciğerde bilirubin ile bağlı halde bulunurlar (153) LTA₄'ün LTC₄ 'e değişimi GST enzimi ile sağlanır. Bu reaksiyon bazofil, mast, lökosit ve duyarlı akciğer hücrelerinde gösterilmiştir. LTC₄ anafilaksinin yavaş ilerleyen bileşigidir ve bir eikozatetraenoik asit-glutasyon konjugatıdır (143).

GST'lar, bazı bileşiklerin glutasyon (-SH) grubu ile reaksiyonunu katalizleyerek elektrofilleri nötralize ederler. Suda çok çözünen konjugatlarını meydana getirirler. Glutasyon konjugatları, glutamat ve glisin kalıntılarının parçalanması ile metabolize olurken sisteil 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, 59, 104).

Detoksifikasyon reaksiyonlarında, GST'in substratı olan bileşikler, p-450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin etkisiyle oluşan metabolitlerdir. Alkileyici kemoterapik bileşiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzim GST dir. GST'lar peroksidazlar gibi fonksiyon göstererek mitomisin C, adriamisin-blemosin CCl₄ ve X, α radyasyonuna karşı hücre membranını korurlar. Membran peroksidasyonuna neden olan reaktif alken ve aldehitlerin detoksifikasyonundan da GST'lar sorumludur (142). Ayrıca bir DNA hidroperoksidi olan indirgen timin hidroperoksitin DNA'ya peroksidatif zararını engelleyici bir rol üstlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında GST'lar DNA tamir edici enzimlerdir (152). Bütün bu fonksiyonlarının yanında metal ve antibiyotiklerin detoksifikasyonunda da GST'lar sorumludur (84).

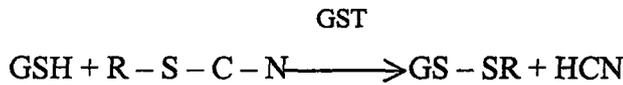
1.7.3. GST'ların GSH Konjugasyonun Reaksiyonları

GST'ların GSH konjugasyonunu katalizlediği reaksiyona çeşitli gruplar katılmaktadır. Bunlar;

Disülfid değişim reaksiyonu



Tiyosiyanatlar ile reaksiyonu



Azot (nitro) grubu reaksiyonu



Organik hidroperoksitlerle reaksiyonu



İlaçların detoksifikasyonunda GST'ların, hücre içindeki düzeylerini düzenleyen en önemli faktör baskı-yanıt mekanizmalarıdır. GST düzenleme çalışmaları genellikle karaciğer üzerinde yoğunlaşmıştır. Hepatik GSH düzeylerini etkileyen faktörleri, dış kaynaklı indirgen ajanlar, hormonlar, interferon ve lenfokinler olarak sıralamak mümkündür (26). GST substratları, kimyasal karsinojenler, sentetik fenolik oksidanlar ve iz elementler de bulunabilir. Bu konuda, iyi bilinen indükleyiciler ise 3-metil kolantren, 2-asetilaminofloren, fenobarbital dietilnitrozamin ve trans-stilben oksittir (26, 59)

1.7.4. GST Enzimlerinin Klinik Önemi

GSH izoenzimlerinin genetik yoksunluğunun, bazı önemli riskleri beraberinde getirdiği çalışmalarla (90) kanıtlanmıştır. Örneğin Kafkas toplumunda %50 gibi bir oranda GST - π izoenziminin yokluğu saptanmıştır. Bu izoenzim gerçekte güçlü bir mutajen epoksit olan trans-stilben oksidin detoksifikasyonunda etklidir. Genetik olarak GST - π izoenzimi yetersiz olan kişilerin sigara kaynaklı akciğer kanseri riski altında bulunduğu ileri sürülmektedir (165). Dokulardaki malignansi ile GST- π arasında da bir ilişkinin varlığı belirlenmiştir. Rat GST - π veya diğer adıyla Yp rat hepatomları veya hiperplazik nodüllerinde yüksek düzeyde bulunurken, normal karaciğerde böyle bir durum söz konusu değildir. Benzer şekilde insanda GST - π serisinin hepatomlar, barsak ve mide tmörlerinde yüksek düzeyde olduğu tespit edilirken GST- π türünün serumda analizi henüz rutin olarak çalışılmamakla beraber bu izoenzimin ovarium tümörleri için iyi bir göstergesi olabileceği ifade edilmektedir (73, 90, 115, 153).

1.7.5. GST Aktivitesinin Ölçüm Yöntemleri

1.7.5.1. Spektrofotometrik Yöntem

GST aktivitesi Habig ve arkadaşları (59) ve Hawwi ve arkadaşları (73)nin geliştirmiş olduğu GST'a özgül substratın, GSH ile konjugasyonu sonucunda

oluşan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesi temeline dayanan spektrofotometrik yöntem ile saptanabilmektedir.

GST enzimlerinin fiziksel özellikleri ve substrat özgünlükleri farklıdır. GST aktivite tayininde temel olarak, 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) kullanılmakla birlikte, 1,2 – dikloronitrobenzen, 4-nitropridin-oksit, p-nitrobenzil klorür, 1.2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan etakrinik asit gibi substratlarda kullanılabilir (59).

1.7.5.2. İmmünoradiyometrik Yöntem

Serum doku örneklerinde GST aktiviteleri radyoimmünassay ile tayin etmek mümkün olmuştur. Bu yöntemde önce serum GST- π enzimleri immünabsorbasyon ile saflaştırılarak anti- GST - π antikorları elde edilir ve kloroamin T metodu ile iyotla işaretlenip, jel filtrasyon ile saflaştırmayı takiben gamma sayacı ile de ölçümler yapılır. Radyoimmün ölçüme geçmeden önce saflaştırmaları anyon değiştirici kromatografi ile de yapılabilmektedir (74).

1.8. Serbest Radikal, Se, Vitamin E ve Glutasyon Arasındaki İlişki

Serbest radikaller (oksidan moleküller), dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü, reaktif atom veya moleküllerdir (2, 75).

Stres oluşturan faktörler arasında sayılan hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, sigara dumanı ve iyonize edici radyasyon gibi çevresel ve kimyasal etkilerle karşı karşıya kalma sonucunda hücrelerde radikallerin çoğaldığı (50, 57) hipoksi, inflamasyon, ısı, yoğun egzersiz, iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumların, radikal oluşumunu etkileyen faktörler olduğu ileri sürülmektedir (77). Serbest radikaller başlıca, moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır (50). Ayrıca, organik maddelerin çürümesi, boyaların kuruması ve plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde, oksijenin kısmi redüksiyonu ile oluşabilmektedir (2).

Canlı organizma gerek dış ve gerekse iç etkenlerin uyarılması ile her an zorlanmakta ve travmatize edilmektedir. İşte bu zorlanmalar sırasında veya kirli havanın içindeki moleküllerin etkisi ile normal yaşam süreci içinde zaman zaman oksidan moleküller artmaktadır. Bunların belli bir miktarı yine vücutta belirli bir düzeyde bulunan doğal endojen antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedirler (144).

Yaşamın sürekliliği için hücresel bazda homeostasise gerek vardır. Normal şartlarda iç ve dış kaynaklı bir çok stres faktörü hücresel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stresörlere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği, serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden ve antioksidanlar denilen bazı bileşikler rol almaktadır (36). Bu bileşikler radikallerle hızla reaksiyona girerek oksidasyonun ilerlemesini önlerler. İşlemler, antioksidan toplayıcı enzimlerin ve antioksidan diğer faktörlerin harekete geçirilmesi ile spesifik savunma komponentlerinin fonksiyonel entegrasyonunu içermektedir. Bu komponentler, hücresel karışıklıkları azaltıp, stresörlerin etkilerini yok ederek hücrenin en uygun koşullarda kalması için uğraşırlar (2).

Reaktif türler ve serbest radikallerin dengeli bir konsantrasyonda tutulması amacıyla oluşturulan hücresel savunmaya, enzimatik olmayan bazı komponentler de katılır. Antioksidanlar, belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif bir hale getiren moleküllerdir. Bu moleküller serbest radikalleri temizleyerek hücrenin zarar görmesini engellerler, dokuları serbest radikallerin etkilerinden korurlar (58).

GSH-Px, yapısında selenyum bulunan, H_2O_2 'i, GSH kullanarak katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyona giren GSH, disülfit bağları ile bağlanıp GSSH formuna geçer. GSH-Px fonksiyonunun sürekliliği, GSH'a gereksinim duyduğu için, GSSG, NADPH'a bağlı GSH- redüktaz (GR) tarafından sürekli olarak indirgenir. GSH-Px'in diğer bir fonksiyonu da, membranların korunmasında selenyum ve vitamin E ile koordine çalışmasıdır (1, 57, 75).

GSH-Px ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (1, 6).

GSH-Px enzimi yalnız lipid peroksidasyonun başlamasını önleyici etki yapmamakta, aynı zamanda lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin metabolizmasını da sağlayarak, oksidatif hücre hasarına karşı hücre membran bütünlüğünü korumaktadır (57, 75).

Oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hücresel hasar için en büyük hedef membran lipidleridir (54). Oksijen molekülünün lipidlere karşı yüksek affinitesi vardır. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada zarlarda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijenin bağlanması lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan kimyasal reaksiyona neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonunun, zar yapısı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi üç farklı yolla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir (159). Lipid peroksidasyonunun artması serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir göstergesidir (167).

Membranların doymamış yağ asitlerinin non enzimatik peroksidatif yıkımı, küçük fragmentlerin membrandaki lipoprotein fonksiyonlarını bozar, yapısal ve fonksiyonel bütünlüklerini ciddi şekilde hasara uğratar (121). Plazma lipoproteinleri de oksidasyona uğrayarak fonksiyonlarını bozabilirler (146).

Lipid peroksidasyonun meydana geldiği koşullara ve lipid kaynağına bağlı olarak önemli sayıda kimyasal açıdan farklı oksidan ürünler oluşmaktadır (2). Doku hasarının olduğu bölgede bu gibi doğal enzimlerden kaçabilen oksidan moleküller hücre veya kapillar membranındaki lipitleri etkileyerek "Lipid Peroksidasyonu" başlatırlar (38).

Canlı organizmada fizyolojik fonksiyonların sürdürülebilmesi için diğer besin maddelerinin yanısıra vitaminlere de gereksinim duyulur. Genellikle diyetle bağlı veya ilave olarak alınan vitaminler, metabolik fonksiyonların fizyolojik sınırlar içinde seyretmesinde oldukça önemli rol oynarlar. Avitaminoz veya hipovitaminoz durumlarında organizmada çeşitli bozuklukların ortaya çıktığı uzun zamandan beri araştırmacıların dikkatini çekmiştir (136).

Vitamin E ve Se organizmanın birçok fizyolojik fonksiyonlarında rol oynamaktadır. Vitamin E'nin bilinen en önemli fonksiyonlarından birisi antioksidan özelliği nedeniyle, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemesidir (77, 124).

Doymamış yağ asitleri çift bağa sahip oldukları için oksijen ile hızlı bir reaksiyona girerek mitokondri, mikrozom ve diğer intrasellular membranların yapısını ve metabolizmasını bozan, serbest radikallerden peroksit ve hidroperoksitleri oluşturur. Vitamin E hidrojen protonları ile peroksit ve hidroperoksitleri doyurarak peroksit radikallerinin aktivitelerini azaltır. Biyolojik otooksidasyon için başlatıcı olan bu reaksiyon, anılan indirgeme nedeniyle hemen inhibe edilir. Bu şekilde peroksit oluşumu indirgenmiş olur (48, 89).

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksit radikallerini (LOO.) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (168).

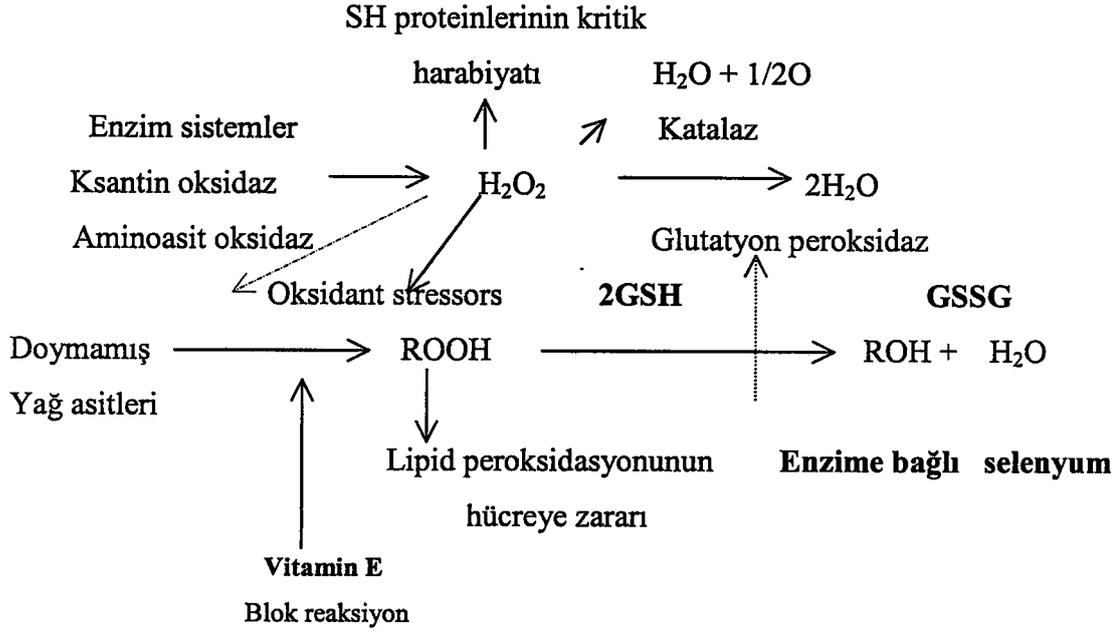
Se, GSH-Px enziminin temel bir unsurudur, hücre membranında lipid peroksidasyonun önlenmesinde vitamin E ve GSH-Px arasındaki ilişkiyi gösteren bir teori ileri sürmüştür. GSH-Px, aktif peroksitleri engelleyen siklik sistemin bir elemanı olarak çoğu aktif hücrelerde bulunmaktadır. Özellikle, yağ asitleri gibi çeşitli bileşiklerin hidroperoksitlerinin alkollere dönüşümünü katalize eder. GSH-Px'in bu aktivitesi hücresel ve subsellular membranların oksidatif etkiden korunmasında oldukça önemlidir (172).

Hoeksta (70)'nın teorisine göre; hem vitamin E hemde Se böylesi oksidatif hasarının önlenmesinde temel ve birbirini tamamlayıcı rollere sahiptirler. α -

tokoferol molekülleri (subsellular membranların içine testere dişi gibi yerleşerek) doymamış yağ asidi moleküllerine bağlanır ve hücre solunumu süresince onların metabolize olmalarına kadar onlarla zayıf kimyasal bileşikler oluştururlar. Aynı zamanda, GSH-Px, hücreye giren ya da hücrede oluşan tüm aktif peroksitleri engeller. Şayet α -tokoferol doymamış yağ asidi moleküllerinin hepsine bağlanacak kadar yeterli değilse, ya da GSH-Px miktarı tüm peroksitleri engelleyemeyecek düzeyde ise o zaman doku harabiyeti meydana gelir (77). Bu nedenle gerek vitamin E gerekse Se'un eksikliğinin klinik etkileri birbirine benzer (82, 103, 117). Ancak şunu önemle belirtmek gerekir ki, vit. E ve Se birbirinin yerini kesinlikle alamazlar.

Se eksikliğinin fertilité ve döl verimi üzerine de etkileri bildirilmiştir (12) GSH-Px'in 4 atomgram Se içerdiğini (157) ve enzimin esansiyel ko-faktörünün selenyum olduğu belirtilirken; daha sonra Floch ve ark. (49) ise GSH-Px'in % 0.37'sinin Se olduğunu belirtmişlerdir.

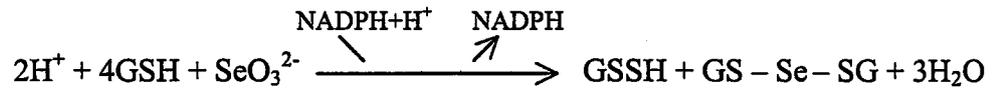
GSH-Px'in haraplayıcı yapıda olan yağ asitleri peroksitlerinin alkollere dönüşümünü katalize ettiği, bu etkisiyle hücresel ve sellular membranların oksidatif etkiden korunmasını sağladığı kaydedilmektedir (120). Oksidatif hasara karşı Se ve vitamin E birbirlerini tamamlayıcı rol oynarlar. E vitamini doymamış yağ asidi moleküllerine bağlanır ve hücre solunumu esnasında yağ asitleri metabolize oluncaya kadar onlarla zayıf kimyasal bileşikler oluşturur (128).



Şekil 1.8 Se vitamin E ve glutatyon arasındaki ilişki (175).

Bunun mekanizması şöyledir. Doymamış yağ asitleri çift bağa sahip olduklarından oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve membranların yapısını, metabolizmasını bozan peroksit ve hidroperoksitleri oluşturur. İşte vitamin E, hidrojen protonları ile peroksit ve hidroperoksitleri doyurarak peroksit radikallerinin aktivitelerini azaltıp, otooksidasyonun başlatıcısı olan bu reaksiyonu daha işin başından inhibe eder (175). Se ise in vivo olarak oluşan peroksitleri GSH-Px vasıtası ile parçalar (32).

Selenyum ilk kez 1956'da hayvanlarda antitümör tedavide kullanılmıştır. Selenyum bileşiklerinin fizyolojik ve antiproliferatif etki mekanizması büyük ölçüde bilinmemekle beraber en önemli antiproliferatif mekanizması GSH ile etkileşmesidir.



Bu etkileşimde meydana gelen selenodiglutatyon (GS-Se-SG) neoplastik hücrelerin gelişmesini inhibe eden en etkin selenyum bileşiği olarak tanımlanmıştır. GSSeSG memeli dokularında inorganik Se oluşturduğu temel

metabolit olarak kabul edilir ve GR 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 etkileşimlerin memeli hücrelerinde fizyolojik bir düzenleyici mekanizma olabileceği bildirilmiştir. Meme kanserlerinde kan düzeyi düşük bulunan Se akciğer ve hepatopoetik sistem kanserleri ile ilişkisi olduğu da düşünülmektedir (2, 32, 120).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmada yetiştiricilerden takip edilerek alınan 3 haftalık, ağırlıkları 160-200 g arasında değişen 40 adet kaz palazı kullanıldı. Kaz palazları çalışmaya başlamadan önce Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğine getirilerek özel bir odada 10 günlük bir süre bekletilip ortama adapte olmaları sağlandı.

Daha sonra herbiri 10 palazdan oluşan 4 ayrı gruba ayrıldı.

I. Grup (Kontrol Grubu): 10 hayvandan oluşmuştur. Bu hayvanların beslenmelerinde herhangi bir değişiklik uygulanmayıp standart koşullar sağlandı

II. Grup: Bu gruba 1 ml/kg. canlı ağırlık hesabıyla CCl₄ üç gün arayla besleme sondası kullanılarak oral olarak verildi.

III. Grup: Bu gruba da yine üçer gün arayla her kg canlı ağırlığına 1.5 ml CCl₄ verildi.

IV. Grup Sadece karaciğer yağlanması oluşumuna yönelik olarak 3 gün arayla haftada iki kez % 50'lik etil alkolden 5 ml /kg. canlı ağırlık olacak şekilde besleme sondası ile oral olarak verildi.

Kaz palazlarında uygulamalara 1 aylıkken başlandı ve 12 hafta boyunca (toplam 16 haftalık) gruplar izlendi, sürenin sonunda eter anestezisi altında kesimler yapılarak karaciğer dokuları porsiyonlara ayrılıp ayrı ayrı koyu renk şişelere gruplandırılarak analize alınmaya kadar -70 °C'de saklandı.

2.1.2. Yem Materyali

Kars yem fabrikasından temin edilen ve bileşimleri aşağıda verilen kaz yemi kullanıldı. (I. dönem yem, kaz plazlarına 4. hafta ile 8. hafta arasında verilirken II. dönem yem ise 8. hafta ile 16. hafta arasında verildi)

Tablo 2.1.2.1 Kazlara I. dönemde verilen yemin bileşimi (200 kg) (118).

Mısır	%61,2		
Soya Fasulyesi Küspesi	%26,2		
Ayçiçek Küspesi	%10	HP	%20
Mermer	%1,2	Kcal	%2910
Tuz	%0,25		
DOP	%0,8		
Vit. Min	%0,35		

Tablo 2.1.2.2 Kazlara II. dönemde verilen yemin bileşimi (400 kg)

Mısır	%60		
Buğday	%15,4		
Soyafasulyesi Küspesi	%16		
Mermer	%1,2	HP	%20
Tuz	%0,25	Kcal	%2910
DOP	%0,8		
Vit. Min	%0,35		
Kepek	%6		

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

CCl₄- (Merck, AG- Darmstadt)

Bovine serum albumine (Sigma Chem. U.S.A)

Folin-ciocalteu (Sigma Chem. U.S.A)

Glutamil, sisteinil glisin (Sigma U.S.A)

GST (glutathione S-transferase) (Sigma U.S.A)

Selenium standart (Sigma Chem. U.S.A)

DTNB (5, 5'- Dithio-bis (2- nitrobenzoic acit)

CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzoic acit) Sigma

Deneyde kullanılan diğer kimyasal maddeler amaca uygun saflıktadır.

2.1.4. Kullanılan Aletler

Homojenizatör (Braun-Potter S)

PH metre

Hassas terazi

Magnetik karıştırıcı

Santrifüj

Ultrasantrifüj

Spektrofotometre

Fluorometre

Su banyosu

Etüv

Derin dondurucu

Otomotik pipetler

Cam pipetler

Ultrasantrifüj tüpleri

Kuars tüpler

2.1.5. Kullanılan Çözeltiler

2.1.5.1. 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 çözüldürüldü. Çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile magnetik karıştırıcıda pH: 7.4'e ayarlandı ve 0.15 M KCl çözeltisi ile litreye tamamlandı.

2.1.5.2. Protein Miktarını Ölçmek İçin Kullanılan Çözeltiler

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 tamamlandı

B. % 1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisi:

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

C. % 2 Na-K tartarat çözeltisi:

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

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 hazırlandı.

E. Folin-Ciocalteu çözeltisi:

Kullanılacağı zaman 1:1 oranında sulandırılarak hazırlandı.

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

0.05 g sığır serum albumini 100 ml distile suda çözünerek hazırlandı ve 0 °C' de saklandı.

2.1.5.3. GSH Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **0.1 M Fosfat tamponu:** Doku homojenizasyonundaki gibi hazırlandı. 5 mM EDTA çözeltisi ilave edilerek, pH'sı 1 N NaOH ile 8'e ayarlandı

- **5 µM DTNB çözeltisi (Ditiyobisnitrobenzen):** 99 mg DTNB 500ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

GSH standartları : 20, 50, 75 ve 100 mg/dl GSH olacak şekilde distile suda çözünerek deney gününde hazırlandı.

5 mM EDTA çözeltisi

% 5'lik TCA çözeltisi (Trikloroasetik asit): 5 ml TCA alındı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.5.4. GST Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

30 mM CDNB (Klorodinitrobenzen) Çözeltisi: 1.550 g CDNB 250 ml etanolde çözünerek hazırlandı.

GSH çözeltisi: 800 mg GSH 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

100 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH: 6.5): 1.741 g K_2HPO_4 ve 1.360 g KH_2PO_4 bir miktardistile su içerisinde çözüldü ve 1N NaOH ile pH 6.5'e ayarlandıktan sonra distile su ile litreye tamamlandı.

2.1.5.5. Selenyum Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. Diaminonaftalin 2. HCl (DAN) Çözeltisi: 1 L. 0.1 N HCl çözeltisi içinde 4 g. çözülerek deney gününde taze hazırlandı.

2. **Buffer Çözeltisi** : 1 l mlde 7.44 g EDTA, 10 mg brom krezol moru ve 114 ml. NH_4OH içerir.
3. **5 M HCl çözeltisi**
4. **Derişik HNO_3**
5. **Siklohekzan**
6. **HClO_4**

2.2. METOT

2.2.1. Doku Homejenizasyonu

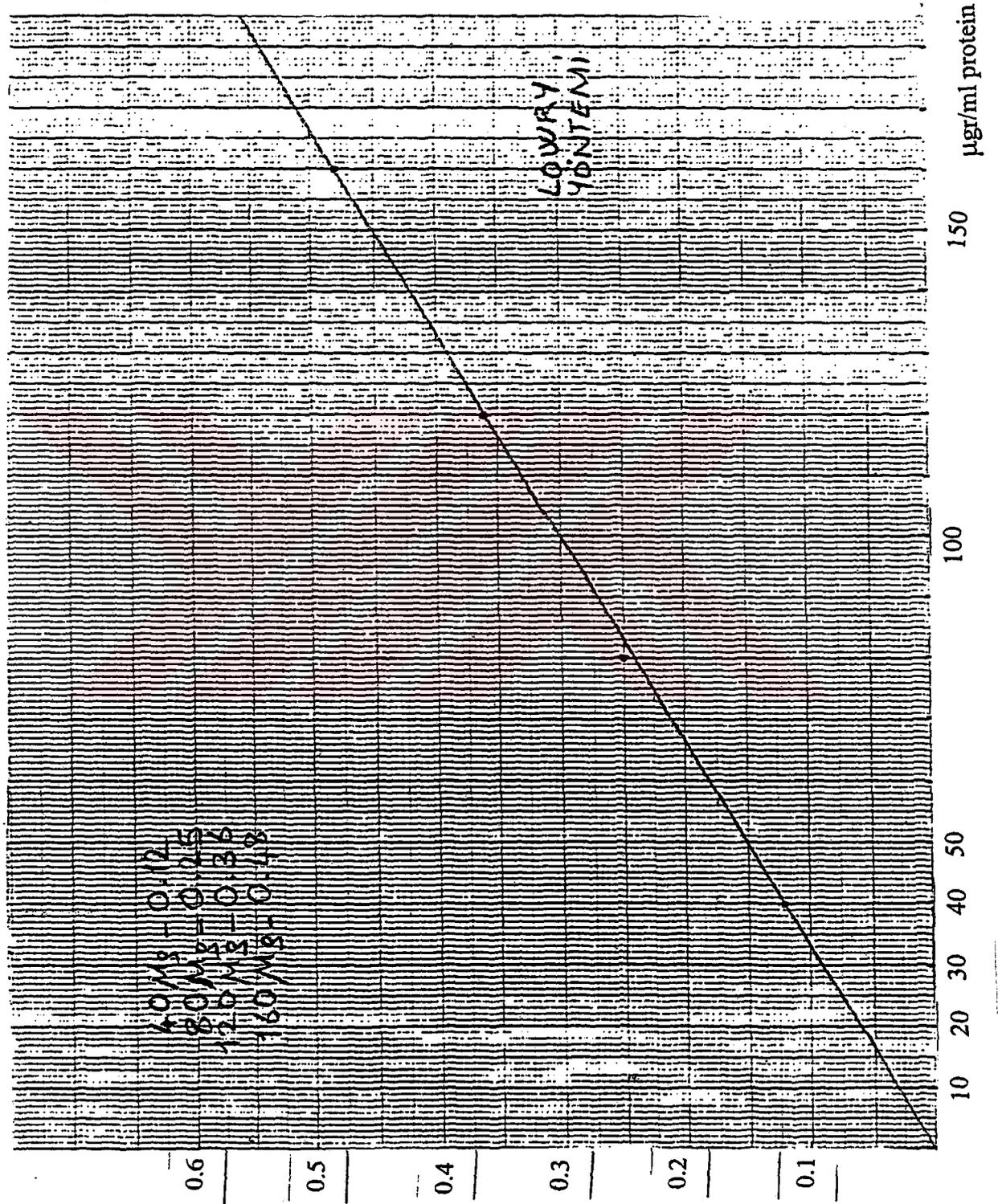
Doku parçacıklarının yaş ağırlıkları saptandı, bistüri ile daha küçük parçalara ayrılıp bir miktar distile su ile yıkandı. Homojenizasyon tüpünde işgal ettikleri miktarın dört katı 0.1 M fosfat tamponu ile yüksek devirde 10 dakika $+4^\circ\text{C}$ de homojenize edildi. Homojenizatlar bekletilmeden 16.500 x g'de 30 dakika ultrasantrifüje tabi tutularak, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra analiz gününe kadar -70°C de saklandı (49, 147).

2.2.2. Protein Miktarının Ölçümü

Proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüret tepkimesi vermesi esasına dayanır. Peptid bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluşturur. Aynı zamanda protein yapısındaki trozin ve triptofan amino asitleri fosfo molibdat-fosfotungustat çözeltisi (folin-Cocalteu) ile indirgenir.

Standart olarak % 0.05 gram sığır serum albumini içeren çözeltiden 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050 ml ve numune olarak doku homojenizatından 0.005 ml ayrı ayrı tüplere mikropipetlendi. Hacimleri 0.075 ml'ye distile su ile tamamlandı. Her bir tüpe 1.5 ml protein renk reaktifi eklendi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Karışımlara 1:1 oranında seyreltilmiş folin-ciocalteu çözeltisinden 0.15 ml ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Köre tüplere su konularak hazırlandı ve numunelerle aynı işlemlere tabi tutuldu. Sonuçlar mg protein/ml doku homojenat olarak değerlendirildi (154).



Grafik 2.2.2.1 Protein standart eğrisi

2.2.3. GSH Miktar Tayini

Santrifüj tüplerine doku homojenat süpernatantından 1ml alındı ve 4 ml %5'lık TCA ilave edildi 5 dakika beklendi. 1000 x g'de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldı.

	Kör tüp	Deney tüpü
Süpernatant (µm)	-	200
Fosfat tamponu pH=8 (ml)	2	2
DTNB çözeltisi (ml)	0.25	0.25
Distile su (µl)	200	-

Şeklindeki karışımlar 3-4 dakika içerisinde 412 nm'de spektrofotometrede okundu. GSH standartları da aynı deney protokolü izlenerek çalışıldı ve standart eğri çizilerek, miktar tayini gerçekleştirildi (47).

2.2.4. GST Aktivasyon Ölçümü

	Kör tüp	Deney tüpü
GSH çözeltisi (µl)	0.1	0.1
CDNB çözeltisi (µl)	0.1	0.1
Potasyum -fosfat tamponu (µl)	2.2	2.2
Süpernatant (µl)	-	0.6

Şeklinde hazırlanan karışımların 340 nm'de absorbanları saptandı. (A₁) Beş dakika sonra yeniden okuma yapıldı (A₂) absorban farkı alınarak aşağıdaki formül ile spesifik aktivite hesaplandı (52, 59).

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Absorbans değişimi (A}_2\text{-A}_1\text{)} / 5}{\text{Glutasyon Ekstraksiyon sabiti} \times \text{Küvetteki protein konsantrasyonu}}$$

(mM⁻¹ cm⁻¹) (mg ml⁻¹)

Spesifik aktivite= $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ protein

Glutasyon ekstraksiyon sabiti = $9.6 \text{ mM}^{-1} / \text{cm}^{-1}$

2.2.5. Se Miktar Tayini

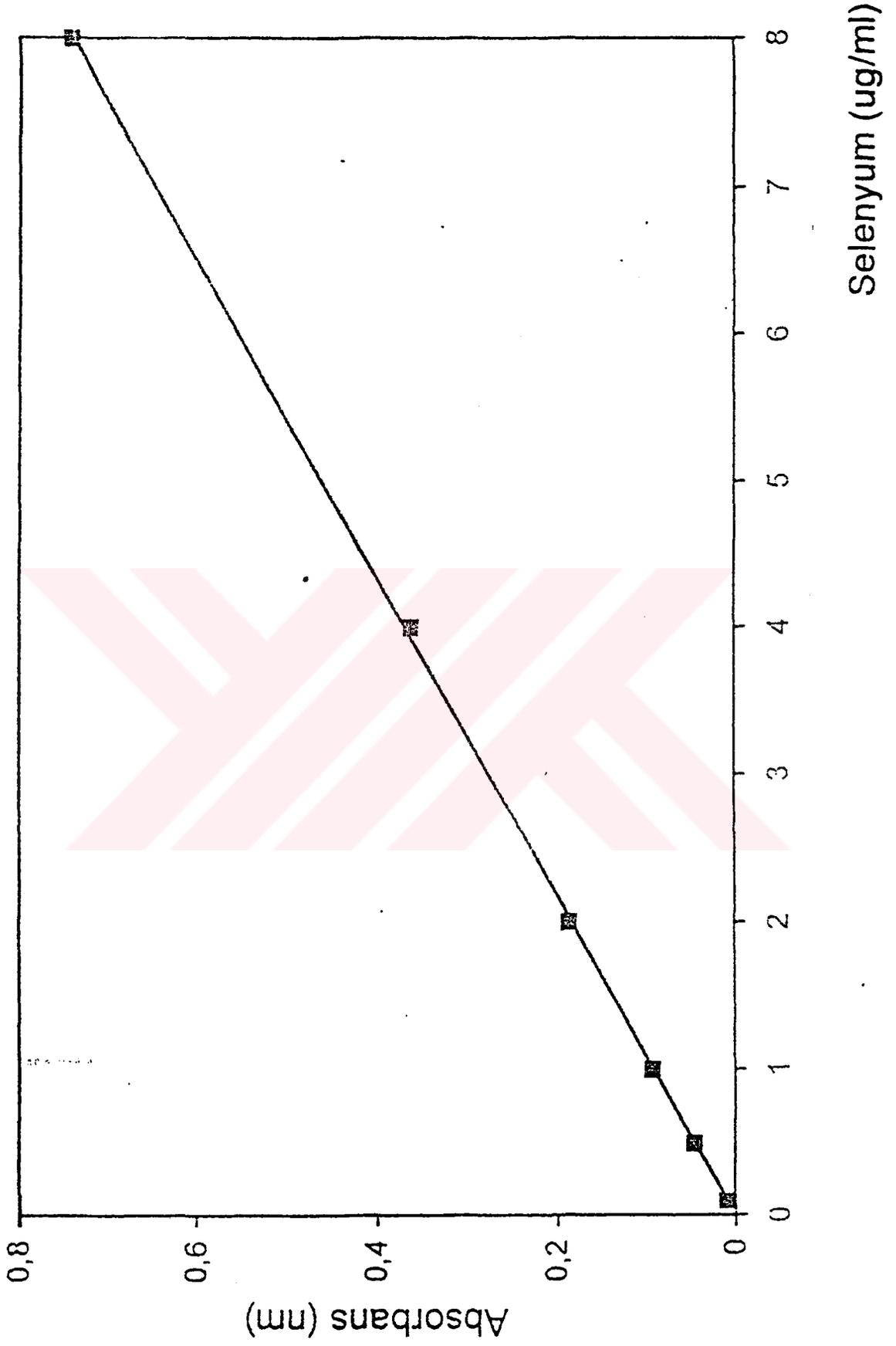
Selenyum miktar tayininde, fluorometrik yöntem kullanıldı. Homojenizatın asit ile dijestiyonunu takiben selenatın selenite indirgenmesi sağlanarak ve plazselenol kompleksi oluşturularak meydana gelen flurosansın şiddeti ölçüldü.

Fluorometrik olarak Se miktar tayinin yapıldığı bu yöntemde, 0.4 ml doku homojenat süpernatantı üzerine derişik 0.2 ml HNO_3 ve HClO_4 ilave edildi.

Karışım aliminyum blok üzerinde 150°C 'de 30 dakika, daha sonra sıcaklık 190°C 'ye getirilerek iki saat süreyle ısıtıldı. Tüpler soğutuldu ve 6 M HCl çözeltisi'nden 0.2 ml ilave edildi. 150°C 'de 5 dakika yeniden ısıtılarak dijestiyon işlemine geçildi.

Tayinin ikinci aşamasında, selenat'ın selenite indirgenmesi sağlandı. Tüpler üzerine 2 ml buffer çözeltisi ilave edilerek, 140°C 'de sarı renk gözlene kadar bekletildi daha sonra tüpler soğutuldu ve 0.1 M HCl'den 5 ml ilave edilerek, karışım hacmi distile su ile 10 ml'ye getirildi. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 24 saat bekletildi.

Tayinin üçüncü aşamasında, plazselenol kompleksinin oluşturulması gerçekleştirildi. Örnekler 0.5 ml DAN çözeltisi ilave edilerek yarım saat karanlıkta bekletildi. Daha sonra 40°C 'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. 5 ml siklohegzan ilave edilerek ekstraksiyon yapıldı. Ekstrakte edilen kısım 3 ml'lik küvetlere alındı ve eksitasyon dalga boyu 360 nm 'e emisyon dalga boyu ise 520 nm 'e ayarlanarak okuma yapıldı. Sonuçlar standart grafiklerde hesaplandı (86).



Grafik 2.2.5.1 Se standart eğrisi

2.2.6. İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen bulguların gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Kruskal-wallis 1-Way Anova testi kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası farkın belirlenmesinde student t testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama (\pm) standart hata olarak verildi. $P < 0.05$ ve 0.01 anlamlılık düzeyi kabul edildi.



3. BULGULAR

Deneyel olarak 4 gruba ayrılan 40 adet kaz palazı üzerinde yapılan bu çalışmada, CCl_4 ve etil alkol ile oluşturulan karaciğer doku hasarlarında GSH, GST ve Se düzeyleri araştırılmıştır.

Deney süresince ayrıca klinik bulgular gözlenmiş ve histopatolojik incelemeler de yapılmıştır. CCl_4 ve etil alkolün uygulama dönemlerinde hayvanlarda toksisiteye bağlı meydana gelen klinik bulgular zaman aralıkları ile birlikte resim 3. (1 - 6) da karaciğerde karbon tetraklorür ve etil alkole bağlı olarak meydana gelen hücresel değişimler de resim 3. (7- 10) da verilmiştir.

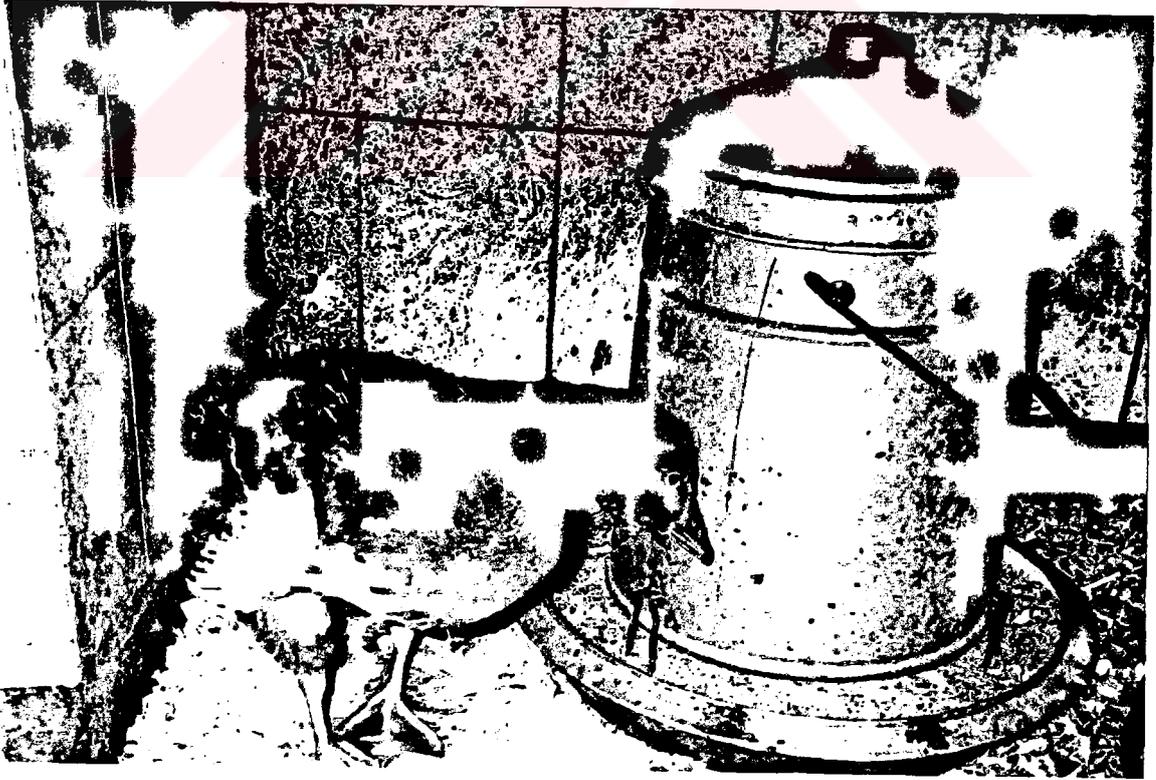
Kontrol, CCl_4 ve etil alkol gruplarına ait kaz karaciğer homojenatlarındaki enzim aktivitelerinin her bir kazdaki ortalama ve standart sapmaları sırasıyla Tablo 3.(1-4) te görülmektedir.



Resim 3.1 1 ml/kg CCl_4 uygulanan II. grupta 6. hafta sonunda görülen klinik belirtiler



Resim 3.4 1 ml/7kg CCl₄ uygulanan II. grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler



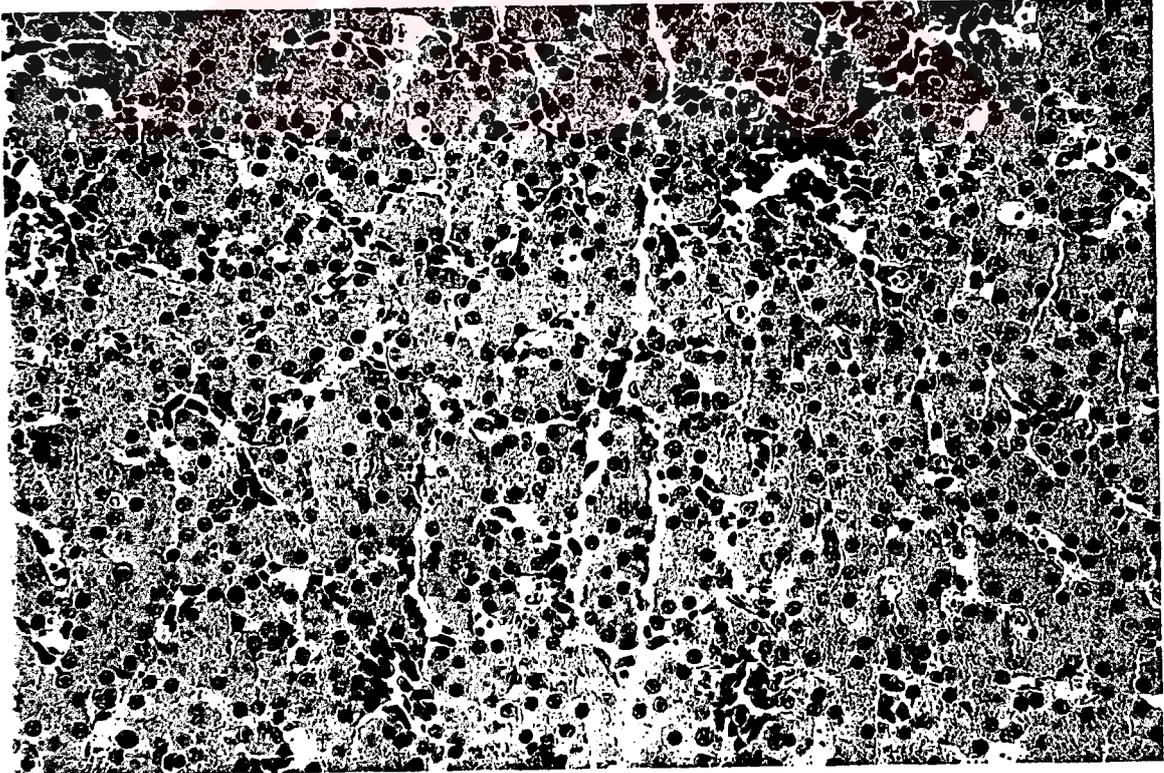
Resim 3.5 1.5 ml/kg CCl₄ uygulanan III. grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler



Resim 3.6 Etil alkol uygulanan IV. grupta 12. hafta sonunda görülen klinik belirtiler

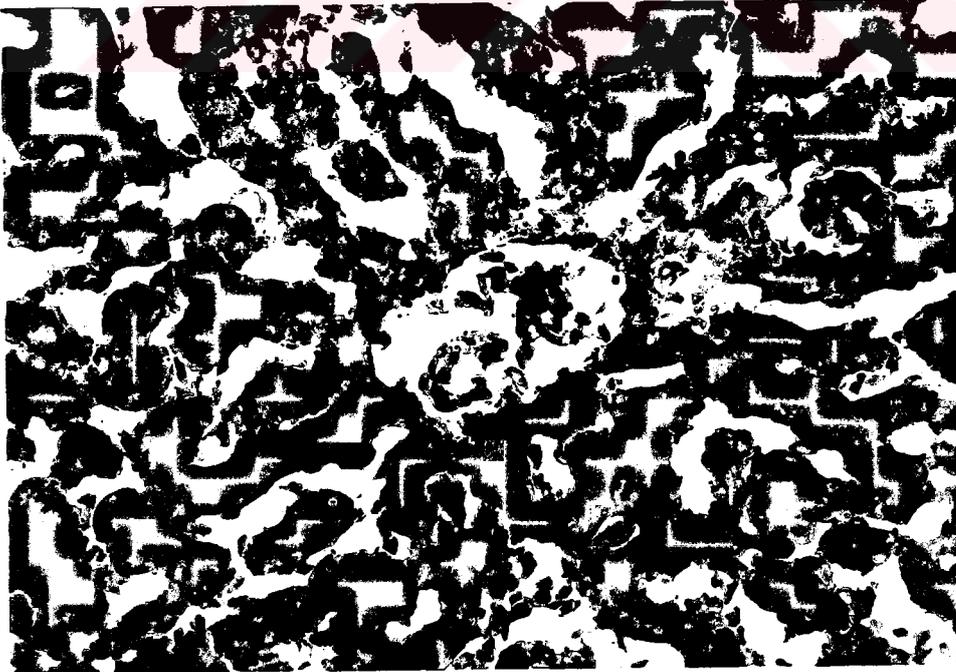
Tablo 3.1 Kontrol grubuna ait GSH, GST ve Se Düzeyleri

Örnek No	GSH (µmol/g doku)	GST (nmol /min mg protein)	Se (ng/g doku)
1	5.786	980.310	260.10
2	5.868	1100.140	218.20
3	5.630	1100.560	180.60
4	4.520	985.300	190.20
5	5.420	987.400	210.00
6	5.260	820.310	190.60
7	5.866	760.910	220.85
8	5.450	910.230	195.20
9	5.100	935.200	210.30
10	4.820	987.300	200.20
Ort. ± S.H	5.372 ± 0.14	956.696 ± 33.97	210.525 ± 6.98

Resim 3.7 CCl₄ (1ml/kg canlı ağırlık) Uygulanan II. Grubun Karaciğer Hücrelerindeki Görünüm.

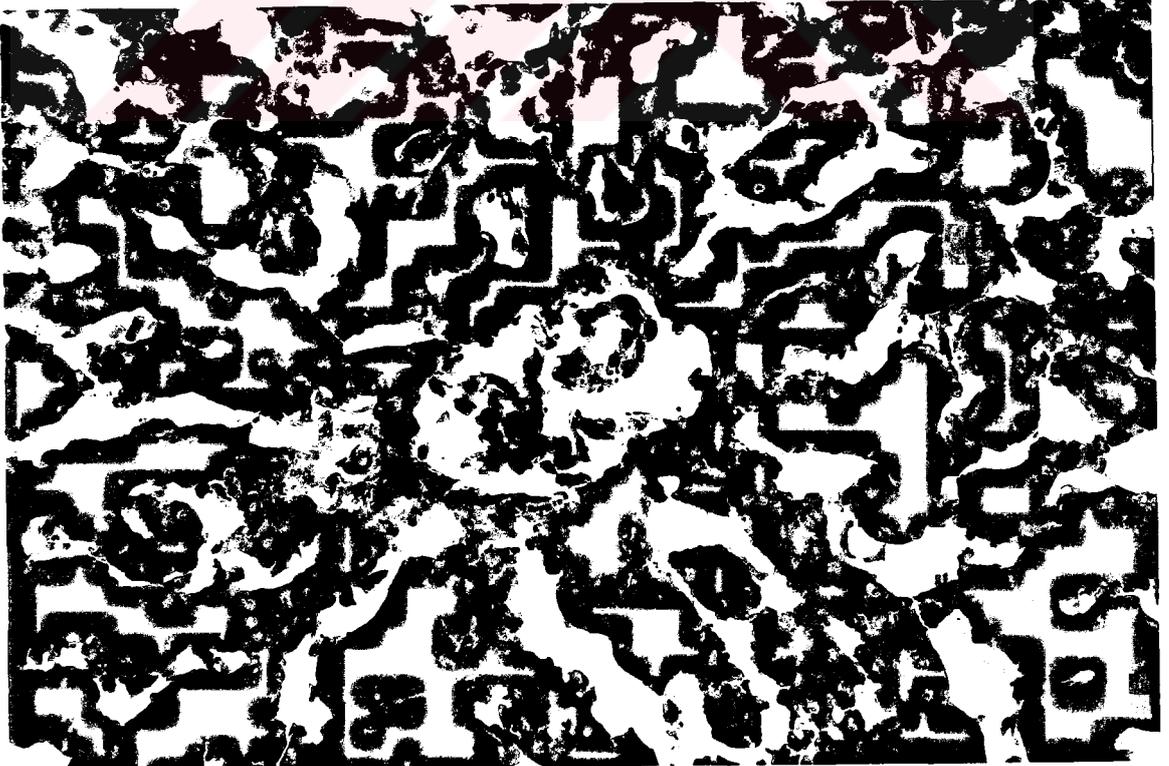
Tablo 3. 2 1ml CCl₄ Uygulanan II. Grupta GSH, GST ve Se Düzeyleri

Örnek No	GSH (μmol/g doku)	GST (nmol/ min mg protein)	Se (ng/g doku)
1	6.120	910.200	190.00
2	6.230	874.200	170.00
3	7.440	880.300	198.00
4	7.260	860.270	200.00
5	6.950	800.300	178.00
6	6.860	892.300	195.20
7	6.720	746.200	178.60
8	6.700	772.720	165.20
9	7.230	780.240	190.20
10	7.320	800.340	170.20
Ort. ± SH	6.883 ± 0.14	831.107 ± 18.32	183.54 ± 4.02

Resim 3.8 CCl₄ (1,5 ml/kg canlı ağırlık) uygulanan III. grubun karaciğer hücrelerindeki görünüm

Tablo 3. 3 1,5ml CCl₄ uygulanan III. grupta GSH, GST ve Se düzeyleri

Örnek No	GSH (μmol/g doku)	GST (nmol/min mg protein)	Se (ng/g doku)
1	8.000	880.200	186.20
2	7.720	875.310	185.10
3	7.080	862.318	193.20
4	6.720	790.20	195.80
5	7.730	760.300	180.10
6	7.420	790.900	170.80
7	7.480	810.240	168.30
8	7.620	810.340	198.10
9	7.620	880.240	196.20
10	7.740	794.816	168.90
Ort. ± SH	7.513 ± 0.11	825.4864 ± 14.11	184.27 ± 3.71



Resim 3.9 :%50'lik etil alkol (5ml/kg canlı ağırlık) uygulanan III. grubun karaciğer hücrelerindeki görünüm

Tablo 3.4 5ml etil alkol uygulanan IV. grupta GSH, GST ve Se düzeyleri

Örnek No	GSH (µmol/g doku)	GST (nmol/min mg protein)	Se (ng/g doku)
1	7.615	885.240	210.20
2	6.880	840.910	190.15
3	6.800	800.100	186,20
4	7.400	816.210	200.00
5	6.800	780.910	195.200
6	7.180	785.775	185.400
7	6.800	860.120	185.40
8	7.120	746,900	210.10
9	7.120	746.900	200.10
10	6.835	780.700	198.56
Ort.± SH	7.055 ± 0.09	804.3765 ± 14.60	196.131 ± 2.87

Tablo 3.5. Tüm grupların GSH, GST ve Se düzeyleri

GRUPLAR No	GSH (µmol/g doku)	GST (nmol/min mg protein)	Se (ng/g doku)
Kontrol (Grup I)	Ort. ± S.H 5.372 ± 0.14	Ort. ± S.H 956.696 ± 33.97	Ort. ± S.H 210.525 ± 6.98
1 ml/kg CCl ₄ (Grup II)	6.883 ± 0.14**	831.107 ± 18.32**	183.54 ± 4.02**
1.5 ml/kg CCl ₄ (Grup III)	7.513 ± 0.11**	825.4864 ± 14.11**	184.27 ± 3.71**
% 50'lik Etil alkol (Grup IV)	7.055 ± 0.09**	804.3765 ± 14.60**	196.131 ± 2.87*

**P<0.01, *P<0.05



Resim 3.10 1.5 ml CCl_4 verilen IV. grupta omurgadaki değişimler

4. TARTIŞMA

Çalışmalarını kazlar üzerinde yoğunlaştıran bazı araştırmacılar (23, 65) kaz ırkları arasında metabolik parametrelerin değişkenlik gösterdiğini belirtirken, parametrelerdeki değişimlerin genellikle yapıyla ilintili olduğu ileri sürmektedirler (20, 37, 65, 66). Aynı zamanda çevre faktörlerinin etkisi, cinsiyet faktörü, yaş ve ırka bağlı olarak bir çok metabolik ve fizyolojik farklılıkların olduğu bilinmektedir. Kars yöresinde yapılan çalışmalarda, söz konusu etkenlerin metabolik parametreler üzerindeki değişikliğini görmek mümkündür (98, 99).

Kazları konu alan sınırlı sayıdaki biyokimyasal çalışmalar (37,163), bu hayvanların belirli fizyolojik işlevleri ve çeşitli hastalıkları üzerine odaklanırken, kimi araştırmacılar da bazı besi yöntemlerinin biyokimyasal etkileri konusunda yoğunlaşmışlardır (23, 29, 65, 98, 99). Yapılan literatür taramalarında karaciğer hasarı oluşturulan çeşitli maddelerin kazlarda r GSH, ve Se düzeyleri ile GST enzim aktiviteleri arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Genelde kimyasal (CCl₄, NO gibi) ve kimyasal olmayan (aflatoksin gibi) maddeler doku hasarlarına yol açarak hücresel enzimlerin salınımına ve bunun sonucunda da serum enzim konsantrasyonunda artışa neden olurlar. Toksik maddeler büyük oranda karaciğerde detoksifiye edilir, toksitite arttıkça protein sentezi inhibe olur ve karaciğer hücrelerindeki dejenerasyon sonucu antioksidan görevi yapan enzimlerde artış gözlenir (78).

Bazal koşullarda tüm aerobik hücreler, solunum, fagositoz, araşidonik asit metabolizması ve diğer normal fonksiyonları sırasında ve bazı kimyasal maddelerin alınmasına bağlı olarak oksijeni metabolize ederken reaktif oksijen radikalleri oluştururlar. Bu radikaller normal bir organizmada antioksidan savunma sistemleri tarafından hızla temizlenirler. Ancak serbest radikallerin oluşumu, hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa metabolik ve fonksiyonel bir çok bozukluklar ortaya çıkar (119, 138). Bu fonksiyonel

bozukluklardan biri kronik karaciğer hastalıkları olup hepatosellüler hasar ile karakterize edilir ve bu da genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır (10). Oksijen serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonu hepatik yangısal hastalıkların patogenezinde rol oynarlar (108).

Organizmalarda serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı endojen koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahip enzimler vardır. Bu enzimlerden birini de glutatyon konjugatlar oluşturmaktadır. Glutatyon redoks tamponu olarak proteinlerdeki sülfidril gruplarının indirgenmiş halde kalmasını sağlar (95). Bu reaksiyon GSH-Px tarafından katalize edilmektedir. GSH'ın içerdiği sisteinden dolayı tiyol grubu organik maddelere dahildir. Sistein SH grubu, molekülün aktif grubu olup, elektron aktarma rolüne sahiptir (2, 85). GSH, protein ve DNA sentezi, hidroperoksitlerin transportu, proteinlerin sülfidril gruplarının devamının temini, hücrenin ve eritrositlerin radyasyon ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunması, enzim aktivitesinin modülasyonu, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi çok önemli biyolojik olaylarda rol oynar (8, 19, 97, 108). Dokularda ve eritrositlerde bulunan GSH-Px indirgenmiş glutatyon tarafından H_2O_2 ve lipid peroksitlerin parçalanmasını katalize eder. Böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksitlerin oksidasyonuna karşı korur (15, 64, 79, 81).

Bölge ve yöre halkı için çok önemli bir protein kaynağı olan tüyleri dahil hemen hemen tamamı değerlendirilen kazların, metabolizmasındaki biyokimyasal değerlerin belirlenmesi, GSH ve GST enziminin katıldıkları metabolizasyon olaylarında Se elementinin etkisi; bu elementin eksikliğinde Se GSH-Px enzim kaybına bağlı olarak oksidatif doku hasarı ve hepatik siroza yatkınlığının araştırılması incelenmeye değer önemli bir konudur.

Bu çalışmada; bu güne kadar kazlarda belirlenmeyen serbest radikal oluşturan kaynaklar (karbon tetraklorür ve etil alkol), bu radikallerin rol oynadıkları tepkimeler ve hücresel savunma mekanizmaları ile bu mekanizmalarla iç içe bulunan Se kantitatif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

CCl₄ ' ün I. ve II. Gruba Etkileri

Glutasyon konjugasyon reaksiyonları, organizmada toksik ve elektrofilik metabolitler için önemli bir koruyucu mekanizma olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle bu enzim gurubunun savunma metabolizmasında önemli bir yerinin olduğu bilinmektedir. GSH ile ilgili bileşiklerin metabolizması organ içi ve organlar arası döngülerle süreklilik kazanırken, etkili olan organlar arasında karaciğer, böbrek ve ince barsak yer almaktadır. İntraselüler GSH, böbrek hücreleri tarafından membrana bağlı γ -GGT enzimi vasıtasıyla dışarı atılır (49).

Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ve GST ile konjugasyona uğramasalar; DNA, RNA veya hücre proteini ile kovalent olarak birleşmekte serbest olacaklar ve sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi (111). Bundan dolayı GST, bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (2, 50). Aynı zamanda glutasyon; eritrosit zarını hidrojen peroksitten, lokositleri fogositoz da kullanılan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasarlardan korumaktadır (2, 104).

GST bir çok endojen ve eksojen bileşiğin detoksifikasyonunda görev alır. Bu enzim glutasyonun tiyol grubunun ikinci bir substrata kovalent bağlanması ile daha az toksik olan GSH-konjugat oluşum reaksiyonunu katalizlerler. Glutasyon konjugasyon reaksiyonları; organizmada toksik ve elektrolitik metabolitler için önemli bir koruyucu mekanizma olarak görev yapmaktadırlar (2, 111, 171).

Bugüne kadar diğer canlılar üzerinde çeşitli ilaç ve toksinler veya diyet değişikliği ile yapılan bir çok çalışmada karaciğer enzimleri, karaciğer fonksiyonel ve yapısal farklılaşmaları incelenmiş ve farklı görüşler ileri sürülmüştür (107, 173). CCl₄, hepatik granülsüz ER'de, NADH, sitokrom P-450 elektron transport zincirini kullanan karışık fonksiyonlu oksidaz kompleksi tarafından haloalkan serbest radikallerine (CCl₃ ve CCl₃O₂') metabolize edilir (44). Oluşan bu maddeler membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatırlar (166). CCl₄ metabolizmasının başlangıcında görülen bu olaylardan daha sonra trigliserid birikimi, poliribozomal disagresyon, protein sentezinde depresyon, hücre membran yıkımı ve hücre ölümlerine neden olduğu sonucunu çıkarmak mümkündür. CCl₄ metabolitlerinin

kovalent bağlanması, membran fosfolipidlerinde oluşan peroksidasyon CCl_4 'ün toksik etkilerinin temelini oluşturur (173).

Çalışmamızda hepatotoksik etkisi bilinen CCl_4 'ün kazlara iki farklı dozda 3 gün arayla 12 hafta süre ile oral olarak verilmesinden sonra elde edilen karaciğer dokularının gerek biyokimyasal, gerek makroskobik ve gerekse histopatolojik incelemelerinde CCl_4 'ün karaciğerde dejenerasyon ve enzim farklılıkları oluşturması gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu çalışmayı diğerlerinden farklı kılan nokta kazlarda ilk kez yapılmasıdır. Çalışmanın oksidatif etki sonucunda karaciğer dejenerasyonu oluşmuş hayvan gruplarında muhtemel GSH, GST ve Se değerlerini ortaya konulması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada kontrol grubunda GSH değeri 5.374 ± 0.14 $\mu\text{mol/g}$ doku, GST 956.696 ± 33.97 nmol/min mg protein ve Se düzeyi ise $210,525 \pm 6.98$ ng/g doku olarak tespit edildi. 1 ml CCl_4 uygulanan gruplarda bu değerler sırasıyla 6.883 ± 0.14 $\mu\text{mol/g}$ doku, 831.107 ± 18.32 nmol/min mg protein, 184.27 ± 3.71 ng/g doku olarak bulunurken, 1.5 ml CCl_4 uygulanan grupta bu değerler sırasıyla 7.513 ± 0.11 $\mu\text{mol/g}$ doku, 825.4864 ± 14.11 nmol/min mg protein, 184.27 ± 3.7 ng/g doku, alkol uygulanan grupta ise 7.055 ± 0.09 $\mu\text{mol/g}$ doku, 804.3785 ± 1460 nmol/min mg protein, 196.131 ± 2.87 ng/g doku olarak bulundu.

Deneme grubuna göre kontrol grubundaki değerler oldukça düşük olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubundaki GST aktivitelerindeki bu düşük değerler Hoffman ve ark. (72) yaptığı incelemede ortaya çıkan 957 nmol/min mg protein değerine çok yakındır. Bir diğer çalışmada da (166) 3-methylchlanthrenenin farelere uygulanmasında GSH değerlerinin karaciğerde kontrol grubuna göre az da olsa bir farklılık gösterdiğinin tespit edilmesi çalışmamızla uyumluluk teşkil etmektedir. Yersan'ın (169) monensin ile kanatlılarda yaptığı çalışmada meydana gelen zehirlenmede klinik bulguların türden türe değişim gösterdiği belirtilirken, genel olarak iştahsızlık, ishal, zayıflama hareketlerde azalma, sürekli yatma isteği ve bacak ve kanatlarda halsizlik gibi bulgulara rastlandığı ifade edilmektedir. Görüldüğü gibi kanatlılarda zehirlenmelerin büyük çoğunluğunda öncelikle etkilenen iskelet sistemi olmak üzere kas ve karaciğerdir. Bu çalışmada da CCl_4

uygulanan her iki grupta ikinci haftadan itibaren sürekli yatma isteđi, bacak ve kaslarda halsizlik ve kanatlarda dūşüklük tespit edilmiştir.

Ratlarda , tavşanlarda, koyun ve sıçanlarda (17, 18, 19) yapılan çalışmalarda CCl₄ uygulamalarının karaciğer savunma sistemi enzimleri ve mineral maddeler üzerine inhibitör etki gösterdiği bildirilmektedir. Bu sonuçlar kazlar için de söz konusudur.

CCl₄ sindirim kanalında az miktarda emilmiş olsa bile karaciğer hasarına yol açarak çeşitli biyokimyasal parametreleri etkilemektedir. Örneğin vücut proteinlerinin ve lipidlerin yıkılma ve yeniden sentezlenme hızında değişimler olur. Aynı zamanda karaciğer yağlanması kaynaklanan ağırlık artışı ile serum albumin ve protein fraksiyonları arasında negatif bir korelasyonun olduğu bildirilmektedir (20).

Ayrıca CCl₄'e bağlı olarak membran geçirgenliğinde de artışın olduğu ifade edilmektedir (50, 116). Nitekim yapılan çalışmada enzim ve aktivite farklılıkları ve karaciğerde dejenerasyon görülmesi yukarıdaki bulguları destekler niteliktedir.

Dianzani (33), toksik olmayan diyetle bağlı yağlı karaciğer olgularında, örneğin kolin eksikliği, orotik asitten zengin diyetle beslenme veya etanol kullanımı ya da kwashiorkor hastalığında karaciğerde artmış lipid peroksidasyonu saptamışlardır. Bu tür peroksidatif değerdeki değişikliğın, peroksidasyona uğrayabilecek substratlardaki artış ile örneğin; poliansatüre yağ asitlerindeki artış gibi ya da doğal olarak oluşan antioksidanlardaki dūşüklük ile açıklanabileceği ifade edilmektedir .

Çalışmamızda kazlara CCl₄ verildikten sonra strese bağlı olarak oluşan serbest radikal üretimindeki artış plazmada antioksidan konsantrasyonunu azalttığı gibi vücudun direncini de azaltmıştır 6. ve 12. haftalarda çekilen fotoğraflarda (Resim 3 (1-6)). hayvanların gelişmelerinde duraklama, iştahsızlık ve ishalin de görülmesi CCl₄ ile yapılan çalışmalarda (134) olduğu gibi CCl₄'ün kazlarda da memelilere benzer etki gösterdiğini açıklamaktadır. Karbon tetraklorür uygulanan

gruplarda elde edilen enzim aktivitelerindeki düşük değerler (Tablo 7 ve 8) lipid peroksidasyon ürünlerinin artması ile de açıklanabilir (2).

Kontrol grubunda GSH'ın 4.520 -5.786 $\mu\text{mol/g}$ doku aralığında saptanması Mezes ve Salyı (107) ve Nejad ve Battje'in tavuklarda (113) 4.06 $\mu\text{mol/g}$ doku gibi daha düşük bir değer tespit etmeleri kazlarda antioksidan enzim oranlarının daha fazla olduğu fikrini verir. Sonuçlar Mezes ve Matkavles'in diğer bir çalışmasında (108) broiler tavuklara toksik Se uygulamasında elde ettikleri sonuçlarla uyumluluk teşkil etmektedir. Hücre organelleri içinde ER ve mitokondriler CCl_4 ile gelişen peroksidatif değişikliklerin ilk hedefleridir. Burada bulunan GSH, GSH-Px, CAT gibi enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır. Kontrol grubunda GST aktivitesi 956.696 nmol/min mg protein iken 1 ve 1.5 ml/kg CCl_4 verilen gruplarda sırasıyla 831.107, 825.4864 nmol/ min mg protein olması inhibisyonunun varlığının bir sonucu olarak gösterilebilir. Benzer şekilde tavşanlar üzerinde yapılan (21) çalışmada cisplatin uygulanan grupta GST değerini 4.147 $\mu\text{mol/g}$ protein/min bulurken, kontrol grubunda bu değeri 4.918 $\mu\text{mol/g}$ protein olarak tespit etmiştir ve elde edilen bulgular bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Ratlarda yapılan çalışmada (140) 0.5 ml/kg dozda enjekte edilen CCl_4 'ün GSH-Px ve GSH düzeylerinde önemli sayılabilecek farklılığa sebep olması CCl_4 'ün düşük dozlarda bile memeli ve kanatlı için mutlak bir toksik etki yarattığı söylenebilir.

Bir diğer çalışmada da Bompert ve ark (21) ratlara cisplatin uygulanmasında antioksidan sistemde değişmeler gözlemlendi. Kontrol grubundaki bireylerin karaciğerlerinde GSH ve GST değerleri sırasıyla 245, 3.918 $\mu\text{mol/ min g}$ protein olarak tespit edilirken, cisplatin uygulanan grupta ise bu değerler sırasıyla 264, 4.508 $\mu\text{mol/min g}$ protein olarak tespit edilmiştir. Çalışmada da kontrol ve toksisite oluşturan gruplar arasındaki farklar benzerdir. Sonuçların benzer olması, cisplatin ve CCl_4 'ün benzer bir etki mekanizması gösterdiğini ve bunun da karaciğer ve antioksidan enzimler üzerine etkili olduğunu düşündürülebilir.

1 ml/kg CCl_4 uygulanan farelerde GSH değerleri kontrol grubunda 5.6 $\mu\text{mol/g}$, uygulama grubunda ise 8.8 $\mu\text{mol/g}$ gibi yüksek bir düzeye ulaşmıştır (112). Kaz karaciğerinde ise aynı dozlardaki CCl_4 uygulanan grupta GSH'ın 6.883 $\mu\text{mol/g}$

olarak tespit edilmesi CCl_4 'ün memelilere etki eden toksik dozun kazlarda da aynı etkiyi gösterdiği fikrini doğrulamaktadır. Yine aynı çalışmada GST değerinin kontrol ve uygulama grubunda sırasıyla 22.7, 15.4 nmol//min g protein olarak tespit edilmesi çalışmamızdaki bulgularla paralellik içindedir. Farelerle yapılan bir diğer çalışmada da (97) vücut ağırlığına 200 mg/kg damar içi verilen CCl_4 'ün protein oranında artışa, antioksidan enzimlerde düşüşe neden olduğu ve bunun şekillenmiş olabilecek peroksidasyonla açıklanabilir.

Bildik ve ark (19), CCl_4 ile akut toksite oluşturulan tavşanlarda tüm kan GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük bulunmuşlardır. Kadmiyum ratlarda CCl_4 'e benzer etki göstererek GSH miktarında azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir (80) . Aynı şekilde ratlarda kadmiyumun farklı dozlarının GSH oranında da azalışa (112), Nejad ve ark.(113)'ün tavşan rat ve tavuk karaciğerlerinde DDT (dithiothteitol) uygulamalarında zamana ve madde miktarına bağlı olarak her üç hayvan grubunda karaciğer GSH düzeylerinde düşme gözlemleri de kanatlı ve memeli de toksik maddelerin ortak bir geleceklerinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.2 ve 3.3'e bakıldığında CCl_4 gruplarındaki GSH ve GST düzeylerindemeydana gelen anlamlı değişiklikler, CCl_4 'ün karaciğer ve antioksidan enzimler üzerine önemli etkilerinin açık bir diğer ifadesidir.

Oksidatif doku hasarını oluşturan farklı dozlardaki (1-1.5 ml/kg canlı ağırlık) CCl_4 'ün antioksidan enzimler üzerindeki etkileri farklı bulunmuştur. CCl_4 antioksidan enzim aktivitelerinde ister inhibisyon ve isterse indüksiyon yapsın, her iki halde de oksidatif doku hasarı artışına yol açtığını söylemek mümkündür.

III. Gruba Alkol'ün Etkisi

Bir mayalanma ürünü olan alkolün uzun süre belirli dozlarda alınmasıyla kronik karaciğer hastalıkları görülür. Bu hastalıklar hepatoselüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır. İlerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığı olan siroz, karaciğer hücrelerinin fibrozis ve nodülleşmesi ile tanımlanmaktadır (90, 168).

Alkol metabolizmasının gerçekte olduğu karaciğer, çeşitli fonksiyonel ve dönüşümsüz değişikliklere predispozedir (122). Lipid peroksidasyonu, organizmada bir serbest radikal etkisi sonucunda membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar ve bu durumda MDA düzeyinin artmasına sebep olurlar (13, 51). MDA, insan serumunda bulunan karsinojen nitelikte bir maddedir. Lipid peroksidasyonunun kanserin ilerlemesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (5).

Etanolün, trigliserid sentezini katalizleyen enzimleri aktive eden trigliserid sentezini arttırdığı, kronik etanol alınımından sonra kolesterol sentezinin yükseldiği ileri sürülmektedir (91). Ani ve yüksek dozda alkol alındığında karaciğer yağ asitlerinin sentezinin arttığı ve yıkımın azaldığı bildirilmektedir (111).

Alkol ilave edilen sıvı diyetle beslenen ratların karaciğerinde yağlanma olduğunu belirten bir çalışma da (91) yağlanmaya bağlı olarak enzim aktivitelerindeki artışın hücre harabiyatı ile ilişkili olduğu, lipid düzeylerindeki yükselmenin ise karaciğer yağlanmasında önemli bir faktör olduğu kaydedilmiştir. Benzer şekilde çalışmada da alkol verilen kazlarda karaciğer yağlanması tespit edildi.

Sağlıklı ve normal beslenen ratlarda 2 g/kg /gün veya daha aşağı dozlarda etanol verildiğinde sabit ve sınırlı bir hızda okside olduğu bildirilirken, 3 g/kg/gün ve daha yukarı dozda verilen etanolün ise kronik alkol etkisi oluşturduğu ifade edilmektedir (91). Bu çalışmada da kazlarda kronik alkolizm oluşturulmak amacıyla % 50'lik etil alkolden üç gün arayla 5 ml/kg canlı ağırlık olacak şekilde verildi. Bu dozun kazlarda kronik alkolizm oluşturduğu ancak kazların 12. haftada canlılık faaliyetlerinin azaldığı klinik bulgulardan ve karaciğerdeki histopatolojik bulgulardan belirlenmiştir. Ayrıca GSH daki artış, GST ve Se düzeylerinde de azalış saptanması hücre dejenerasyonunun olduğunu gösterirken aynı zamanda histopatolojik incelemelerde karaciğerlerinde yağlanma olması kronik alkolizme dair bulgular olduğu kanısını ortaya koyabilir.

Yapılan çalışmada elde edilen bulgular karaciğer dejenerasyonunda GSH düzeyindeki artış ve GST aktivitesindeki düşmeye bağlı olarak süperoksit

radikallerinin aşırı düzeylerde biriktiğini ve serbest radikallerin siroz gibi karaciğer hastalıklarının patogeneğinde rol oynayabileceği gösterilmektedir. Etil alkol verilen gruplarda karaciğer dokusu GST aktivitelerinin 804.376 ± 14.6 nmol /min mg protein olarak bulunması kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli bir azalma olduğu ve bu durumun alkol ve benzeri maddelerin karaciğerde lipid peroksidasyonuna sebep olduğu buna bağlı olarak ta savunma sistemi enzimlerinde dengesizliklerin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak kronik alkolizm ile karaciğer lipid peroksidasyonu arasında bir ilişki olduğu ve artan peroksidasyonla da GSH ve GST değişim görüldü. Kaz karaciğerlerinde peroksidasyona bağlı olarak yükselen GSH ve azalan GST düzeyleri alkolün karaciğerde meydana getirdiği fonksiyonel bozukluğun bir sonucudur.

CCl₄ ve Etil alkolün Karaciğer Se Düzeyleri Üzerine Etkileri

Se; GSH-Px enziminin yapısına girerek, lipidlerin oksidasyonu sonucu meydana gelen peroksitlerin katabolizmasında önemli rol oynar. Böylece hücre membranının bütünlüğünün sağlanması ve korunmasında etkin bir fizyolojik fonksiyon üstlenir.

Hayvanların kan Se değerleri, yemlerde bulunan Se miktarlarındaki değişikliklere karşı oldukça duyarlıdır (120). Sağlıklı insanlarda yaş karaciğer Se miktarlarının $0.005-1.01$ µg/gr arasında değiştiği (162), ileri gebe koyunlarda 0.140 µg/gr (104), kuru karaciğer selenyum değerleri incelenen gebe koyunlarda 0.28 µg/gr, kuzularda 0.16 µg/gr olarak bulunmuştur. Gebe ineklerde ise maternal kuru karaciğer ortalama selenyum konsantrasyonunun fötusların kuru karaciğer selenyum miktarında, önemli derecede düşük olduğu bildirilmiştir (162). Kanatlılarda yapılan çalışmalarda selenyum gereksinimi tavuklarda en az 0.1 ppm, hindilerde 0.2 ppm olarak belirlenirken kazlarla ilgili bir belgeye rastlanmamıştır. Çalışmada kontrol grubuna ait karaciğer Se düzeyleri 210.5 ± 6.98 ng/g doku olarak saptanmıştır. Deneme gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla önemli bir düşüş görülmüştür. Bu düşüş CCl₄ uygulanan gruplarda istatistiki olarak ($p < 0.01$) alkol grubunda ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Alkol uygulanan grupta Se değerlerini ortalama 196.131 ng/g doku gibi düşük bir rakama ulaşması alkoliklerde selenyum değerinin düştüğü (137) şeklindeki literatür bilgisi ile uyum içindedir. Alkol ve karbon tetraklorür gibi toksik maddelerin karaciğer selenyum düzeyleri üzerine doğrudan etkilerinin olduğu söylenebilir.

CCl₄ ve Alkol Uygulanan Kazların Karaciğerlerinde Histopatolojik İncelemeler

Yapılan literatür taramalarının ışığı altında CCl₄ zehirlenmelerinde hayvanlarda klinik olarak iştah kaybı, gastrointestinal sancı, kanla karışık ishal şekillendiği, mikroskopik olarak ta karaciğerde hidropik ve yağ dejenerasyonu (69) sellüler infiltrasyonla nekroz (4) şekillendiği bildirilmektedir. Kronik bulgularda ise siroz şekillenmektedir (134).

Kontrol grubuna ait kazların karaciğerlerinde makroskopik olarak normal yapı gözlenirken, deneme grubuna ait kazların karaciğerlerinde hafif büyüme ve sarımtırak bir renk aldığı gözlenmiştir. Mikroskopik olarak (Resim 3.8) kontrol grubuna ait kazların karaciğerlerinde normal hepatik yapı gözlenmiştir. Deneme grubunda yapılan mikroskopik incelemede ise karaciğerde diffuz bir yağlanmanın şekillendiği ve periportal bölgelerde lenfo-plazmositik infiltrasyon olduğu tespit edilmiştir (Resim 3.10).

1 ml CCl₄/kg uygulanan grubun histopatolojik değerlendirilmesinde dokunun kontrol grubuna göre farklı olduğu gözlenmiştir (Resim 3.9). Minimal hidropik dejenerasyon ve bağ dokusu artışı vardır. Resim 3.10 da karaciğerde kollops alanı ve köprüleşme nekrozu saptanmıştır.

Çalışmada 1.5 ml/kg CCl₄ uygulanan grupta yapılan histojik incelemelere göre karaciğerde nükleer vakualizasyon, fokal yağlanma ve centrilobuler konjestiyon meydana gelmiştir (Resim 3.9-11) Patolojik bulgulara bakıldığında ise tam bir nekroz tablosu elde edilmiştir. 1.5 ml/kg CCl₄ uygulanan gruptaki hayvanların karaciğerinde yapılan histopatolojik incelemelerde, Zhao ve O'Brien'in (176) bulgularına benzer olarak karaciğerde yağ dejenerasyonu tespit edilmiştir. Ancak

bu çalışmada, rat ve farelerde yürütülen çalışmaların aksine karaciğerde nekroz görülmezken, fibrosis tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kazların karaciğer dokularında yapılan biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler; bu hayvanların karbon tetraklorür ve etil alkolden memelilere benzer şekilde etkilendiklerini ve GSH, GST ve Se tayinlerinde kullanılan yöntemlerle ortaya konuldu. Ayrıca kazların oksidan maddelere karşı toleranslarının memelilere oranla daha zayıf olduğu görüldü. Yani oksidan etki yaptığı bilinen CCl_4 ve C_2H_5OH hayvanlarda gelişme bozukluğu, hareket kabiliyetinde zayıflama, iştahsızlık ve buna bağlı olarak ta canlı ağırlık kaybına neden olmuştur. Alkolün etkisinin bir diğer bulgusu da insanlarda olduğu gibi kazlarda da beyin ve kas sisteminde kontrol dışı hareketlere neden olmasıydı. Bu konuda fare, koyun, rat ve insanlar üzerinde bir çok çalışma mevcut olmasına rağmen kazlarda benzer çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle de kazlarda savunma sistemi elemanlarının tespit edilmesi kanatlı metabolizmasına bu yönden de açıklık getirilmesi açısından ilk olması, ilerde bu konuda yapılması düşünülen çalışmalara da referans olacağı kanısını güçlendirmektedir.

5. ÖZET

Bu çalışmada, karbon tetraklorürün (CCl₄) farklı iki dozu ile etil alkolün kaz karaciğerlerindeki GSH, GST ve selenyum düzeylerine etkileri ile patolojik değişimleri incelenerek karşılaştırılmıştır.

Çalışmada 40 adet 160-200 g klinik olarak sağlıklı 3 haftalık kaz palazı kullanıldı. Hayvanlar 4 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubunu oluşturdu, standart yem ve su ile ad libitum olarak beslendi. II. gruba canlı ağırlık başına 1 ml/kg CCl₄, III. gruba 1.5 ml/kg CCl₄ ve IV. Gruba da %50'lik etil alkolden canlı ağırlık başına 5 ml/kg haftada üç kez olmak üzere 12 hafta boyunca verildi.

Çalışmada kontrol grubunda GSH değeri 5.374 ± 0.14 $\mu\text{mol/g}$ doku, GST 956.696 ± 33.97 nmol/min mg protein ve Se düzeyi ise $210,525 \pm 6.98$ ng/g doku olarak tespit edildi. 1 ml CCl₄ uygulanan gruplarda bu değerler sırasıyla 6.883 ± 0.14 $\mu\text{mol/g}$ doku, 831.107 ± 18.32 nmol/min mg protein, 184.27 ± 3.71 ng/g doku olarak bulunurken, 1.5 ml CCl₄ uygulanan grupta bu değerler sırasıyla 7.513 ± 0.11 $\mu\text{mol/g}$ doku, 825.4864 ± 14.11 nmol/min mg protein, 184.27 ± 3.7 ng/g doku, alkol uygulanan grupta ise 7.055 ± 0.09 $\mu\text{mol/g}$ doku, 804.3785 ± 1460 nmol/min mg protein, 196.131 ± 2.87 ng/g doku olarak bulundu.

CCl₄ uygulanan gruplarda GST ve Se düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük $P < 0.01$, GSH aktivitesi ise yüksek bulundu ($P < 0.01$). Bu sonuçlar alkol grubunda daha az anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çalışmada CCl₄ ve etil alkol uygulanan gruplarda yapılan klinik incelemelerde iştah kaybı, ishal, koordinasyon bozukluğu, yürüme güçlüğü, kanatlarda düşme, tortikollis ve mikroskobik olarak ta karaciğerin hidropik ve yağ dejenerasyonu sellüler infiltrasyonla nekroz şekillendiği görüldü. Radyolojik olarak da iskelet sisteminin tamamen deforme olduğu ve yer yer kemiklerde eğilmeler görüldü.

Sonuçta; karaciğeri dejenerasyonu oluşturulmuş Anser anser ırkı kazlarda savunma sistemi olarak görev yapan GSH, GST ve bununla iç içe bir durum sergileyen Se karaciğer dokusundaki düzeyleri ve dejenerasyonla ilişkileri ilk kez ayrıntılı olarak ortaya kondu.



6. SUMMARY

In this study pathological the effects of different doses of CCl₄ and ethyl alcohol on GSH and selenium levels, and GST activities in the livers of geese were examined and compared.

The experiments were carried out on forty 3 week-old clinically healthy geese weighing 200-250 g, divided into control and experimental groups of 10 animals each. The first group was used as the control group. The second group was given 1 ml/kg bw. CCl₄ while the third group was given 1.5 ml/kg bw. CCl₄. The fourth group was given 50% ethanol (5 ml/kg bw). The treatment was given three times a week for a total of 12 weeks.

The mean GSH, GST and Se values in the control group were determined as 5.374±0.14 μmol/g tissue, GST 956.696±33.97 nmol/minmg protein and Se 210.525 ±6.98 ng/g tissue respectively. In the liver of CCl₄-treated (group II, III) mice GSH, GST and Se were measured as 6.883 ± 0.14, 7.513±0.11 μmol/g tissue GSH, 831.107 ±18.32, 825.486±14.11 nmol/minmg protein GST, 183.54±4.02, 184.27±3.71 ng/g tissue respectively. The mean GSH, GST and Se values in group IV were determined as 7.055±0.09 μmol/g tissue, 804.37±14.60 nmol/minmg prutein and 196.131±2.87 ng/g tissue repectively.

The levels of liver GST and Se in the treated groups were significantly lower than the control group (P<0.01). GSh activity was significantly higher in groups II. III. IV than in the control group (P<0.01).

In clinical examinations carried out on the groups dosed with CCl₄ and ethyl alcohol, loss of appetite, diarrhea, coordination deFfect, difficulty in walking, collapsing of the wings, and torticulis were observed. Under microscopic examination hydropic and fat degeneration of the liver were observed and the skeleton system was seen to be completely deformed with the bones twisted, in part.

In conclusion in *Anser anser* geese with induced liver degeneration, the levels in liver tissue of the antioxidant defence system constituents GSH, GST and the closely interlinked Se, and detail for the first time.



7. KAYNAKLAR

1. Ak, G., Dingiloğlu, T., Habif, N., Kltrsoy, S., Bayındır, O., Onat, T.: Plasma lipid peroxidation, vit. E superoxide dismutase and glutathione peroxidase alternations in coronary atherosclerosis. *Tr. J. Med. Sci.*, 26, 11-15, 1994.
2. Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya. 1995.
3. Albano, E., Carini, R., Parola, M., Bellomo, G., Poli, G., Dianzani, A.U.: Increase in cytosolic free calcium and its role in the pathogenesis of hepatocyte injury induced by Carbon tetrachloride. *Adv. Biosciences* 76, 45-53, 1989.
4. Al-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM.: Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci.* 66(3): 265-70, 2000.
5. Aleynik, I.S., Leo, A.M., Man, Y., Aleynik, K.M., Lieber, S.C.: Polyenylphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. *J. Hepatol.* 27: 554-561, 1997.
6. Allison, R.D., Laven, R. A.: Effect of vitamine E supplementation on the health and fertility of dairy cows: Review. *Veterinary Record*, 147, 703-708, 2000.
7. Altıntaş, Y., Güven, M., İnce, E., Açıbay, Ö., Caner, M, Sultubek, G., Hatem, H.: The invitro effects of captopril on the levels of lipid peroxidation and glutathione of erythrocytes in Type II Diabetics, *Tr. J. Med. Sci.*, 26:139-42, 1996.
8. Anderson, D.: Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.* 350(1): 103-108, 1996.
9. Aras, K., Erşen, G.: Tıbbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Ankara niv. Basımevi, Ankara . 198-203, 1988.
10. Armbrust T, Batusic, D., Ringe B and Ramadari G.: Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis, indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 26: 1042-1054, 1997.
11. Arthur, J.R., Boyne, R.: superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci*, Vol. 36, 1569-1575, 1985.
12. Avcı, M., Karakılçık, Z., Kanat, R.: Vitamin E, A ve selenyumun koyunlarda dl verimi ve bazı biyokimyasal parametre düzeyleri ile kuzularda yaşama gücü ve canlı ağrılık üzerine etkileri. *Türk J. Vet Anim Sci.* 24, 45-50, 2000.

13. Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A.S., Toker, N.K., Sivas, A., Öz, H.: The effect of chronic ethanol in gestation on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, (36):71-76.36, 1985.
14. Aytuğ, C.N., Alaçam, E., Özkaç, Ü., Yalçın, C., Türker, H., Gökçen, H.: Koyun Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Tüm Veteriner Hayvancılık Yayını. No. 2 İst. 1990.
15. Bast, A., haenen, G., Doelman, J.. Oxidants and antioxidants. State of the art. *Am. J. Med. Vol 91(Suppl. 3C)*, 2-13, 1991.
16. Bayşu, N., Çamaş, H.: *Biyokimya, Kafkas Üniv. Fen-Edb. Fak. Yayınları 1.* 1995.
17. Behne, D. and Wolters, W, W.: Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 113, 456-461, 1983.
18. Beytut, E., Erişir, M., Aksakal, M.: Beyaz kas hastalıklı kuzuların kalp, iskelet kası ve karaciğerlerinde redükte glutatyon, malondialdehit düzeyleri ile katalaz enzim aktivitesi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 7(1): 1-5, 2001.
19. Bildik, A., Ertekin, A., Yur, F., Dede, S.: Karbon tetraklorür toksikasyonunun lipid peroksidasyonu, glutatyon ve vit C üzerine etkileri. *Serbest Radikaller ve Antioksidantlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongresi.* 1999.
20. Bogin, E., Avidar, J., Merom, M.,Israeli, B.A., Malkinson, M., Soback, S., Kduler, Y.: Biochemical changes associated with fatty liver in geese. *Avian Pathol.* 13:683-701, 1984.
21. Bompert G.J. Prevat D.S., Baccands, J.L., Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S- transferase activity. application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem.*, Vol. 23: 501-504, 1990.
22. Braun, U., Forrer, R., Furer, W., Lutz, H.: Selenium and vitamin E in blood sera of cows from farms with increased incidence of disease., *Veterinary Record.* 128, 543-547, 1991.
23. Bulla, J., Kotalaj, A., Granat, J., Zelnik, J., Grom, A., Dobalova, M.: Blood enzyme activities in different breeds of geese. *Br Poultry Sci.* 20;(3): 255-257, 1979.
24. Cambs, G.F., and Chung S.B.: The nutritional biochemistry of selenium, *Ann. Rev. Nutr.*, 4, 257-280, 1984.
25. Cheesman, K.H., Slater, T.F., Free radicals in medicine, *British Medical Bulletin*, 49(3) 630-641, 1993.

26. Chung, P, M., Cappel, R, E., Gilbert, H, F.: Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione, Arch. Biochem. Biophys., 288, 48-53, 1991.
27. Church, D.F., Pryor, W.A., Free radical chemistry of cigarette health perspectives 64: 111-126, 1982.
28. Church, D.C., Pond, W.G.: Basic animal nutrition and feeding., Second ed. John. Wiley and Sons Inc. Canada. 174-177, 1982.
29. Çelikler, D., Maraşlı, N. Kars'ta yetiştirilen kazların kan serumlarında total lipid, total protein, glukoz, sodyum, potasyum, kalsiyum ve inorganik fosfat değerleri. Kafkas Üniv. Fen Bilimler Derg. Cilt 1, sayı (1-2), 38-47, 1996.
30. Çömlekoğlu, Ü., Arpacı, A., Mazmancı, B.: İçel il tarım alanlarında kullanılan pestisidlerin yöre halkının karaciğer fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırılması. II. Uluslar arası Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, 20-22 Mayıs 26-33, 1998.
31. Danielson, U.H., Esterbauer, H., Mannervik, B., Structure activity relationships of 4- hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mamalian glutathione S-transferase. Biochem. J. 247, 707-713, 1987.
32. Desai, I.D., Scott, M.L.: Mode of action of selenium in relation to biological activity of tocopherols. Arc. Biochem Biophys. 110, 309-315, 1965.
33. Dianzani, M.U.: Biological activity of methylglyoxal and related aldehydes. Submoleccular Biology and Cancer. Ciba Foundation Series 67, 245-269, 1979.
34. Dikici, K., Kaleağasıoğlu, F., Hekim, N.: Kataraktlı hastalarda ön kamara sıvısındaki glutatyon peroksidaz düzeyleri. Biyokimya Derg. Cilt 19 (1), 31-33, 1994.
35. Doğan, A.: Farmakoloji, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Ders Kitapları, 2000.
36. Dudley, R.H., Klaassen, C.D.: Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. Toxicology and Applied Pharmacology 72: 530-538, 1984.
37. Emonovic, D., Timet, D., Mazdak, I., Kijucec, M., Madaras, F., Herak, M., Kraljevic, P. and Gradinski-Virbanc, B.: Changes of plasma protein concentration in geese blood plasma during natural and stress induced laying cycle, Veterinarski Arch., 49; 5-7, 1979.
38. Enkvetchakul, B., Bottje, W., Anthony, N., Moore, R: Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers. Poul. Sci. 72: 2272-2280, 1993.

39. Ensminger, M. E., Breeds and breeding geese. Animal Sci. 841 Interstat publishers, Inc., Danvill, unions USA, 1991.
40. Erden, M.: Serbest Radikaller. T. Klin. Tıp Bilimleri 12: 201-207. 1992.
41. Erençin, Z.: Türkiye'de Su Kanatlıları Yetiştiriciliğinin Önemi. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg, 9 (2). 117-127. 1983.
42. Ergin, D., Baysal, V.: Serbest Radikaller ve Deri. Selçuk Üniv. Tıp Fak. Derg., 13 (3): 213-219, 1997.
43. Esterbauer, H., Cheeseman, K.M., Dianzani, M.U., Poli, G., Slater, T.F.: Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidations stimulated in rat liver microsomes. Biochem. J., 208, 129-140, 1982.
44. Evan, C.R., Halliwell, B., Cunt, G.G.: Free radicals and oxidative stress: enviroment, drugs and food additives. Protland Press. London, 120-129, 1995.
45. Faulder, C.G., Hirrell, P.A., Hume, R., Strange R.C.; Studies of the development of basic, neutral and acidic izoenzymes of in human liver, adrenal, kidney and spleen. Biochem J., 241; 221-228, 1987.
46. Fairley, P.: Flexibility drives dupont CCl₄ reductions. Chemical Week, vol 158, Issu 40. 1996.
47. Ferreyra, E. C., Bernacchi, A. S., Castro, J. A.: Increased glutathione (gsh) content in livers of control and carbontetrachloride poisoned rats treated with the anticalmodulin drug trifluoperazine (TFP). Res. Commun Chem. Path Pharmacol., 53-3, 399-402, 1986.
48. Flohe, L., Günzler, N.A., ve Shock, H.H.: Glutathione peroxidose. A selenoenzyme. Biochem. Soc. Letters. 32, 132, 1973.
49. Foye, W.O., Principles of Medicinal Chemistry, Third Ed, Lea-Ffbiger, 102, 1989.
50. Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease, free radicals and tissues injury Lab. Invest. 47(5), 412-425, 1982.
51. Gaal T., Mezes M., Nobel R.C., Dixon, J., and Speake, B.K.: Development of antioxidant capacity in tissues of the chick embryo. Comp. Biochem. Physiol. 112B (4): 711-716, 1995.
52. Gibson, G. G., Skett, P.: Introduction to drug metabolism, Chapman and Hall, 262-263. 1986.
53. Glinsukon, T., Taycharpipranai, S, and Toskulkao, C.: Aflatoxin β , hepatotoxicity in rats pretreated with ethanol. Experientia 34/7, 869-870, 1977.

54. Gönül, T., Yücelyiğit, E., Aksu, M., Kapucu, A.: Kars kazcılık üretme istasyonu inceleme raporu. Türkiye Kalkınma Vakfı, Ankara. 1995.
55. Gözükara, E. M. : Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri LTD. ŞTL., Ankara. 1989.
56. Graves, W.: Rasing poultry succesfully. Pp. 145, Williamson Publishing, charlotte Vermont, 1985.
57. Gupta, M.P., Khanduya, K.L., Sharma, R.R.: Effects of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. Toxicology letters. 41, 107-114, 1998.
58. Habig, W. H., Pabst, M.J and Jakaby, W.B.: Glutathione S- transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, The Journal of Biological Chem, 249 (2): 7137139, 1974.
59. Hermier, D., Salichon, M.R., Guy, G., Peresson, R.: Metabolism and nutrition. differential channelling of liver lipids in relation to susceptiblity to hepatic steatosis in the goose. Poult Sci. 1999, 78: 1398-1406.
60. Halliwell, B.: Reactive oxygen species in living systems. Source Biochemistry and Role in Hmuman Disease. Am. J. Med., 91, (3), 14-21, 1991.
61. Hamada, T.: The role of vitamin E preventing the hemolysis of kid and chick erthrocytes with tween-20., Experientia, 36, 979, 1980.
62. Hatton, P., Dixon, D., Cole, D. And Edwards, R.: Glutathione transferase and activities herbicide selectivity in maize and associated weed species, Pestic. Sci., 46: 267-275, 1996.
63. Hegazy, SM., Adachi, Y, (2000): Comparison of the effects of dietary selenium, zinc and selenium and zinc supplementation on growth and immun response between chick groups that were inoculated with salmonella and aflatoxin or salmonella. Poult Sci. 79:3, 331-335.
64. Henderson, C. W.: GST activity is better marker than alanine aminotransferase activity. Blood Weekly. Conference News Reports. 2000.
65. Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M.R., Sallier, N., Rousselot, D., Chapman M.J.: Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptiblty to hepatic steatosis; Changes induced by devalopment and force feeding geese. Lipids. 26(5): 331-339, 1991.
66. Hermier, D., Fugez, P., Laplaud, P.M., Chapman, M.J.: Density distribution and physiochemical properties of plasma lipoproteinal model of liver steatosis. J. Lipid Res., 29: 893-907, 1988.

67. Hidiroğlu, M., Hoffmann, I., Jenkins, K.J.: Selenium distribution and radiotocopherol metabolism in the pregnant ewe and fetal lamb. *Can.J. Physiol. Pharmacol*, 47, 953-962, 1969.
68. Hidiroğlu, M., Jenkins, K.J., Carson, R.B., MacKay, R.R.: Some aspects of selenium metabolism in normal and dystrophic sheep. *Can. J. Animal Sci*, Vol. 48, 335-346, 1968.
69. Hocher B. Zart R, Diekmann F. Slowinski T, Thone-Reineke C, Lutz J, Baver C.: Selenium, *Evr, J. Pharmacol*, Dec 7; 293 (4): 361-8, 1995.
70. Hoekstra, W.G.: Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed. Proc.*, 34, 2083.
71. Hoffman, D.J., Eastin, W.C., Gay, M.L.: Embryotoxic, and biochemical effects of waste crankcase oil on birds' eggs. *Toxicol, Appl. Pharmacol.*, 63:230-241. 1982.
72. Hoffman, D.J., Heinez, G.H. Sileo, L., Audet, D.J., Campbell, J.K., at al.: Developmental toxicity of lead-contaminated sediment in Canada geese (*Branta canadensis*) *J.Toxico, environment. Health. Part A* 59: 235-252, 2000.
73. Howie, A. F., Douglas J.G., Fergosson, R.J., Beckett, G. J.: Measurement of glutathione S-transferase Pi isoenzyme in plasma, a possible marker for adenocarcinom of the lung. *Clin. Chem.*, 36;3, 453-56, 1990.
74. Howie, A.F., Hoyes, J.d., Beckett, G.J., Purification of acidic glutathione S-transferase from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their mesaurment, *Clin. Chem. Acta.*, 177, 65-76, 1988.
75. Huges, H.M., George, I.M., Evans, J.C., Rowlands, C.C.: Free radicals, *Life Sci.*, 41: 2469-2475, 1991.
76. İkizler, A.: *Organik Kimyaya Giriş*, KTÜ. Fen Edb. Fak. Genel Yayın No 4, 167-170,1998.
77. İnal, E.M., Kanbak, C., Alataş, Ö.: Antioxidant enzyme activities in diabetes mellitus. *Tr. J. Med. Sci.* 21 , 155-157, 1994.
78. Kamal AM., Elgary, M.T., Maklady, F., Mustafa, M.A., Massaud, A.: Serum Ach Colinesterase and liver function among a group of organophosphorus pesticides sprayers in Egypt. *J. Toxicol. Clin. Experiment*, 10: (7-8) 427-435, 1990.

79. Kavas, G.Ö.: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri, 9(1): 1-6, 1989.
80. Kang, Y.J.: Exogenous glutathione decreases cellular cadmium uptake and toxicity. Drug metabolism and disposition. Vol.20, No. 5 714-718, 1997.
81. Kaya, N.: Biyokimya, Atatürk Üniv. Yayınları, 743; 248-249, 1993.
82. Karakılçık, A. Z., Aksakal, M.: Selenyumun bazı fizyolojik işlevleri. Gaziantep Üniv. Tıp. Fak. Derg. 4, 283-291, 1993.
83. Karakılçık, A.Z., Aksakal, M., Özgüner, F., Çay, M., Nazıroğlu, M.: Maternal and foetal selenium concentrations and their interrelationship in Akkaraman sheep. Indian J. Anim. Sci. 67 (1): 19-22, 1997.
84. Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., Mechanism for the glutathione S-transferases, J.Biol. Chem., 251/20, 6183-88, 1976.
85. Kökçam, I., Nazıroğlu, M.: Psoriasisli hastalarda antioksidan ve lipid peroksidasyon düzeyleri. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongresi. 1999.
86. Lalonde, L., Jeon, Y., Roberts, K. D., Chapdelaine, A.: Fluorometry of selenium in serum or urine. Clin. Chem., 28/1. 172-74, 1982.
87. Lamphug, S.M., Apeageyi, F., Mwanmut, D., Hendrickse, R.G.: Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and serum of pregnant women, Br Med. J., 296: 968, 1988.
88. Lassiter, J.W., Hardy, M., Edwards, J.B.: Animal nutrition Reston Publishing Company Inc. Reston, Virginia. 203-205, 1982.
89. 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, 981-87, 1987.
90. Lee, J.W., Iwatssuru, M., Nihigori, H.: Alternation of activities of hepatic antioxidant defence enzymes in developing chick embryos, after glucocorticoid administration – a factor produce some adverse effects. J. Oharm. Pharmacol., 50 (6): 655-666. 1998.
91. Lieber, C.S.: Metabolism and metabolic effects of ethanol. Med. Clin. North America, vol 68, No 1 1984.
92. Lin, S.C., Chong, T.C., Ueng, T.H., Lin, Y.H., Hsu, S.H., Chiang, C.L., Lin, C.C. The hepatoprotective effects of selenium *lotum moench.* on oacetaminophen-

- induced hepatotoxicity in mice. *American J. of Chinese-Medicine*. 28 (1): 105-114, 2000.
93. Loscalzo, J., Freedman, J., Purification and characterization of human platelet glutathione-S- transferase, *Blood*, 67/6, 1595-1599, 1986.
94. Loyd, B., Holt, P., Delves, H.T., Determination of selenium in biological samples by hydride generation and atomic absorption spectroscopy. *Analyst*, 107, 927-933, 1982.
95. Manisha, K., Nisha, R.: The protective effect of vitamin E in pyrethroid induced. Oxidative stress in rat tissues, *J. Nutr. Envir. Med.*, 9 (4): 281-287, 1999.
96. Mannervik, B.: The isozymes of glutathione S- transferase, *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, Meister A., (Ed), Jhon Wiley and Sons, New York, 57: 357-417, 1985.
97. Manno, M., Bertazzon, A., Burlina, A., Galzigna, L.: Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. *Enzym*, 34: 107-112, 1985.
98. Maraşlı, N., Maraşlı, Ş., Özcan, A., Utlü, N., Acerer, N., Çelikler, D.: Arpa ve kaz büyüme yemi ile beslenen kazlarda biyokimyasal çalışmalar. I. Arpa ve Kaz büyüme yemi ile beslemenin canlı ağırlık artışı ile serum lipidleri arasındaki ilişki üzerine etkileri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2 (1): 65-68, 1996.
99. Maraşlı, Ş., Maraşlı, N.: Kars yöresinde halk elindeki sağlıklı kazlarda biyokimyasal çalışmalar. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2 (1): 96-102, 1996.
100. Maylin, G.A., Rubin, D.S., Lein, D.H.: Selenium and vitamin E'nin horses. *Cornell Vet.* 70: 272-289, 1980.
101. Mc Cay, P., Lai, E.K., Poyer, J.L., Dubose, C.M., Janzen, E.G.: Oxygen and carbon-centered free radical formation during Carbon tetrachloride metabolism., *J. Biol. Chem.* 259 (4), 2135-2143, 1984.
102. McDowel, L. R., Conrad, J.H., Ellis, G.L., et al.: Minerals for grazing ruminants in tropical region., *N Bulletin*. 40-44, 1983.
103. Mcpherson, A.: Selenium, vitamin E and biological oxidation. In *Recent Advances in Animal Nutrition*. Ed. D.J. Cole & P.C Garnsworthy, Oxford Butterworth & Heinemann. 3-30, 1994.
104. Meister, A., Anderson, M.E.: Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760, 1983.

105. Mengi, A.: Kronik stress faktörlerinin rat karaciğerlerindeki pirüvat kinaz fruktoz-6-fosfokinaz, furüktoz 1.6 difosfotaz ve furüktoz 1.6 difosfat aldolaz aktivitesine etkisi üzerine araştırmalar. Doçentlik tezi, İstanbul 24-27, 1978.
106. Mercia, L.S.: Raising Poultry the Modernway. Revised and up dated edition. gardenway publishing, storney communication. INC, Pownal, Vermont 1995.
107. Mezes, M., Salyı, G.: Effect of acute selenium toxicosis on the lipid peroxide status and the glutathione system of broiler chickens. Acta Vet. Hung. 42 :(4). 459-463, 1994.
108. Mezes, M., Matkovies, B.: Molecular mechanism of lipid peroxidation and its qantitative measurement (in Hungarian) In: Csaba, G.(ed) A Biologia Aktualis Problem. Vol. 34, 61-104. Medician Budapest. 1986.
109. Mills, C.F.: Trace elements metabolism in animals. Proceeding of WWP/IBP International Symposium. Pp.339-343, 1970.
110. Moore J.A., Novia R Wells I.C.: Selenium concentration in plasma of patients with arteriographically defiend coronary atherosclerosis. Clin Chem; 30:1171-1173, 1984.
111. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rotwell, V.W.: Harper'ın Biyokimyası. (Çeviri, Menteş, G. ve Ersöz, B) Barış Kitapevi. 46, 814, 1993.
112. Nakagawa, K.: Carbon tetrachlorid-induced alterations in hepatic glutathione and ascorbic acid contents in mice fed a diet containing ascorbate esters. Toxicol, 67, 686-690, 1993.
113. Nejad, H., Bottje, W.G: Glutathione oxidation occurs during homogenisation in perchloric acid of rabbit but not rat or chicken liver. Med Sci. Res., 19, 369-370, 1991.
114. Neufeind, T., Reinemer, P. And Bieseler, B.: Plant glutathione S- transferas and herbicide detoxification, Biol. Chem, 378: 199-205, 1997.
115. Niitsu, Y., Takahashi, Y., Saita, T., Hirata, Y.: Serum glutathione S-transferase – π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. Cancer 63/2, 317-323, 1989.
116. Niki, E., Yamamoto., Komuro, E., Sato, K.: Membran damage due to lipid oxidation. Am. J. Clin. Nutr. 53. 201-205, 1991.
117. Norton, S.A, and Mc Carthy, F.D.: Use of injectable vitamin E and selenium-vitamin E emulsionin ewes and suckling lambs to prevent nutritional muscullar dystrophy., J. Anim. Sci., 62, 497-508, 1986.

118. NRC.: Nutrient requirements of geese in nutrient requirements of poultry. 9 th. Revised Edition National Academic press. Washington D.C., 41, 1994.
119. Okada, M., Ho, Y., Inano, K., Miida, T., Matsuto, T.: Structural changes in oxidative modification of low-density lipoprotein: Investigation using lipid peroxidation products, surface charge, and spectrophotometric patterns. *Ann Clin Biochem*, (34): 173-178. 1997.
120. Oldfield, J.E.: The two faces of selenium. *J. Nutr.*, 117, (12), 2002-2008, 1987.
121. Ortenblad, N., Madsen, K., Djurhuus, L.. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am. J. Physiol.*, 272 (4 pt2) : R 1263, 1997.
122. Özcan, A., Özcan, K., Mengi, A.: Ratlara oral olarak verilen alkolün karaciğer üzerine etkisi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2(1):40-42, 1996.
123. Özdemir, G.: Reaktif oksijen patikülleri (ROP) Roche Bilimsel Eserleri Serisi. 1993.
124. Öztürk A., Ürek R., Bozkaya L.A., Tarhan L.: The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues cell. *Biochem Funct.*; 19;125-132, 2001.
125. Parola, M., Abano, E., Autelli, R., Barreara, G., Biocca, M., Paradisi, L., Dianzani, M.U.: Inhibition of the high affinity Ca^{2+} ATPase activity in rat liver plasma membrans following Carbon tetrachloride intoxication., *Chem. Biol. Interact*, 73, 103-119, 1990.
126. Pehrson, B., Johnson, S.: Selenium and Glutathione Peroxidase in Young bulls of different, dietary selenium levels. *Zbl. Vet. Med. A*, 32, 492-501, 1985.
127. Poli, G., Chiarpotto, E., Albano, E., Cottalasso, D., Nanni, G., Marinari, U.M., Bassi, A.M., Diazani, M.U.: Carbon tetrachloride induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of golgi apparatus in the early phases of such injury. *Life Sciences*, 36, 533-539, 1985.
128. Putnam, M.E., Comben, N.: Vitamine E *The Veterinary Record.*, 121, 141-145, 1987.
129. Recknagel, R.O.: A new drection in the studay of Carbon tetrachloride hepatotoxicity., *Life Scie.* 33, 401-408, 1983.
130. Robin, J.P., Cherel, Y., Girard, H., Geloën, A., Le Maho, Y.: Uric acid and urea in relation to protein catabolism in long term fasting geese. *J Comp Physiol*, 157: 491-499, 1987.

131. Salyı, G., Mezes, M., Banhidi, G.Y. Changes the lipid peroxide status of broiler chickens in acute monensin poisoning. *Acta veterinaria Hungarica* 38(4), 263-270, 1990.
132. Saghy, I. E.: Mission raport on geese production station. Veterinary Medical Research Institute, Hungarian Academy of Sciences, 1995.
133. Sandarman, H.: Plant metabolism of xenobiotics, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 82-84, 1992.
134. Seki, M, Kasama K. Imai K.: Effect of food restriction on hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *Toxicol Sci .*, 25(1): 33-40, 2000.
135. Selçuk, E., Aykut, İ., Geliyi, C.: Kaz Yetiştiriciliği. Tarım Orman Bakanlığı Ziraat işleri Genel Müdürlüğü, Merkez İkmal Müdürlüğü Basımevi, Ankara, 1983.
136. Seven, A., Seyman, O., Hatemi, S., Hatemi, S., Kültürsay, H., Bayındır, O., Onat, T.: Plasma lipid peroxides, vitamin E, superoxide dismutase and glutathione alternations in coronary atherosclerosis. *Tr. J. Med. Sci.* 26: 11-15, 1996.
137. 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, 850-52, 1966.
138. Shainkin, K.R., Carusa, C., Beryne, G.M.: Reduced superoxide dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients. *Nephron*, 55, 251-253, 1990.
139. Shamberger, R.J.: Selenium metabolism and function, *Clin. Physiol. Biochem.*, 4, 42-49, 1986.
140. Shimuzzu M, Morita S, Yamano Yamada A.: Relationship between hepatic glutathione content and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo. *Toxicology Letters*, 47, 95-102, 1989.
141. Siddons, R.C., Mills, C.F.: Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status., *Brit, J. Nutr.*, 46, 345-355, 1981.
142. Sies, H. and Ketterer, B.: Glutathione conjugation, mechanism and biological signifiante, Ketterer, B. (Ed)., Academic Press, London, 74, 1988.
143. Smyth, J.B.A., Wang, J.H., Barlow, R.M., Humphreys, D.J., Robins, M., Stodulski, J.B.: Experimental acute selenium intoxication in lambs, *J. Comp. Path.*, 102: 197-209.

144. Sözmen, E.Y., Onat, T., Tanyalçın, T., Erlaçın, S.: Eritrositlerin antioksidan enzimlerde yaşa bağlı değişiklikler. *Biyokimya Derg.* 18 (3): 83-89, 1993.
145. Smutna, M., Synek, O.: Lipid peroxidation in serum of the boar, *Acta Vet. Brno*, 48, 1979: 48, 35-43.
146. Spurlock, M.E., Savage J.E.: Antioxidant activity of japon ase quail liver cytosol in the absence and presence of reduced glutathione. *Poult., Sci.*, 71, 928-931, 1992.
147. Srivatave S. P., Singah, K. P., Saxhena, A. K., Sethe, P. K.: In vivo protection by protein a of hepatic microsomal mixed function oxidase system of CCl₄-administered rats. *Biochem. Pharmacol.*, 36 (23): 4055-4058, 1987.
148. Stolan, I., Oros, A., Moldaveanu, E.: Mineral view. apoptosis and free radicals. *Biochem. Mol. Med.* 59, 93-97, 1996.
149. Şenel, H.: Hayvan besleme. İstanbul Üniv. Vet. Fak. İstanbul Üniv. Yay. Fen Fakültesi Basımevi. I+ 380, 1986.
150. Şengil, A., Gürbilek, M.: Serbest radikaller, Selçuk Üniv. Tıp Fak. Derg., 13(4): 673-681, 1992.
151. Şengül, A., Gürbilek, M., Yalçın, A.S., Toker, N.K., Sivas, A., Öz, H. . The effects of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione , glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats, *Toxicology*, 36: 71-76.
152. Tan, K.H., Moyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., Tymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependet glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Lett.* 207 (2): 231-133, 1986.
153. Taniguchi, N.; Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A.: Glutathione centennial: molecular perspectives and clinical implications, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1989.
154. Tietz, N.W.: Textbook of Clinical chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA. 1986.
155. Tsokos-Kuhn, J.O., Smith, C.V., Mitchell, J.R., Tate, C.A., Entman, M.L.: Evidence for increased membrane permeability of plasmal vesicles from livers of phenobarbital induced CCl₄ – intoxicated rats., *Molec. Pharmacol.*, 444-451, 1986.
156. Türker, H.: Bilimsel Yönleriyle Tavuk Besleme , İstanbul, I+142, 1988.
157. Ullerey, D.E.: Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals, *J. Anim. Sci.* 65, 1712-1726, 1987.

158. Underwood, E.J.: Trace elements in human and animal nutrition, Fourth Ed. Acad. Press. New York. 303-346, 1977.
159. Urbanov, J., Joulova, M.: Lipid peroxidation invitro and tocopherol levels in the tissues of suckling and weaned piglets Acta. Vet. Brno., 44, 17-22, 1975.
160. Vajdovich , P., Szilagy, A., Gaal, T.: Evaluation of blood lipid peroxidation parameters in Carbon tetrachloride (CCl₄) toxicity in sheep. Acta Vet. Hung. 43 (4): 423-429, 1995.
161. Van Saun, R.J., Herdt, T.H., and Stowe, HD.: Maternal and fetal vitamin E concentrations and selenium vitamin E interrelationships in dairy cattle., J.Nutr. 119, 1028-1037, 1989.
162. Van Vleet, J.F.: Retention of selenium in tissues of calves, lambs and pigs after paranteral injection of a selenium-vitamin E preparation, Am, J. Vet. Res., 36(9): 1335-1339, 1975.
163. Vetesi, M., Mezes, M., Gaal, T., Baskay, G., Effect of bulk feeds on the metabolism and liver parameters of growing geese. Acta Vet. Hung. 40 (4): 231-237, 1992.
164. Waxman, D.J.: Glutathione S- transferase role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy, Cancer Res., 50: 6449-6454, 1990.
165. 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. Cancer. Res. 50, 1585-90, 1990.
166. Williams, M.K., Dalvi, S., Dalvi, R.: Influence of 3- methylcholanthrene pretreatment on sanguinarine toxicity in mice, Vet Human Toxicol 42,(4) 196-197, 2000.
167. Yaği K.: Free radicals in diagnostic medicine, Arm strong D (ed), Plenum Press: New York. 1-15, 1984.
168. Yałcın, A.: Fare Karaciđerlerinde çeřitli etkenler ile oluřturulan doku hasarlarında GSH, GST ve selenyum tayinleri.Ege Üniv. Sađlık Bil. Ens. Doktora Tezi. 38-40, 1993.
169. Yarsan, E.: Monensin ile vitamin E ve selenyum birlikte veya ayrı ayrı verilmesinin etlik piliğerlerde enzim etkinlikleri ve histopatolojik parametrelere etkileri, Tr. J. Vet. Anim. Sci., 22; 53-63, 1998.

170. Yeğen, A., Yeşilkaya, A., Özlem, S., Gümüştü, S., Aksu, T.A.: The activity of some of the antioxidant enzymes in valued lipid peroxidation in com one hydroperoxide-treated. Humon red blood cells Biyokimya Derg. 21 (4): 23-30 1996.
171. Yerer, M.B., Aydoğın, S.: Oksidatif stress ve antioksidantlar, Erciyes Üniv. Saç. Bil. Derg., 9 (1): 49-53, 2000.
172. Yılmaz, Ö., Çelik, S., Nazıroğlu, M., Çay, M.: The of dietary selenium and vitamin E and their combination on the fatty acids of erythrocytes. Bone Marrow and spleen tissue lipids of lambs. Cell Biochemistry and Function 15: 1-7, 1997.
173. Yılmaz, S., Bahçelioğlu, H.İ.: Karbontetraklorür ile siroz oluşturan ratlarda lipid peroksidasyonu. antioksidant enzim ile pirüvat kinaz aktiviteleri. Tr.J.Vet. Anim. Sci., 24:25-28, 2000.
174. Zabucchi, G., Bellavite, P., Berton, G.: Free radicals, Generation by the Inflammatory cells Agents, Actions. Suppl., 7: 159-166, 1980.
175. Zintzen, H.: Fat soluble vitamins in the nutrition of ruminants. Seminar for the feed in dustry. Animal nutrition of events, Roche. Tokyo I+38, 1975.
176. Zhao, Z.S, O'Brien PJ.: The prevention of CCl₄-induced liver necrosis in mice by naturullay occuring methylenedioxybenzenes. Toxicol Appl. Pharmacol., 140(2): 411-421, 1996.

8. ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Kayseri’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Osmaniye’nin Kadırlı ilçesinde tamamladıktan sonra Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1990 yılında buradan mezun oldum ve aynı üniversitenin Çevre Mühendisliği Bölümü’nün açmış olduğu Yüksek Lisans programını kazandım. Bu arada 1992- 1994 yılları arasında orta öğretimde öğretmenlik görevimi sürdürdüm. 1993 yılında mastırımı tamamladım. 1994 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne Öğretim Görevlisi olarak girdim. 1995 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Biyokimya programını kazandım. 2000 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandım ve halen aynı görevde olup evli ve iki çocuk annesiyim.

9. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda tecrube ve olumlu eleştirileri ile bana yön veren danışman hocam Prof.Dr. Necati KAYA'ya, büyük desteğini gördüğüm önceki danışmanım Prof.Dr. Nalan BAYŞU'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Kafkas Üniversitesi Patolojik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç.Dr. Serpil ERGİNSOY, radyolojik çalışmalar için Doç. Dr. Burhan ÖZBA'ya hayvanlara barınak temininde yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Turgut KIRMIZIBAYRAK'a, laboratuvar çalışmalarını yürüttüğüm Hayvancılık ve Uygulama Merkezi Müdürlüğüne, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanlarına ve çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

