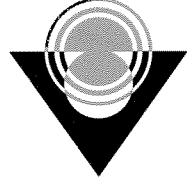


2007-204



**TÜBİTAK**

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU**  
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**Çevre, Atmosfer, Yer ve Deniz Bilimleri Araştırma Grubu**  
Environment, Atmospheric, Earth and Marine Sciences Research Grant Group

90418

**Proje No: 106Y244**

**Sülfid Oksidaz Yetersizliğinin Ksenobiyotik Metabolizması  
Üzerine Etkileri**

**Prof. Dr. Alaattin ŞEN  
Begüm TÜTÜNCÜ**

**HAZİRAN 2007  
ANKARA**

## ÖNSÖZ

Otozomal resesif olarak ortaya çıkan ve erken yaşta ölümle sonuçlanan sülfid oksidaz (SOX) yetersizliği bulunan bireylerde, bu hastalığın tedavi sürecinde veya bu hastalarda değişik hastalıklarda uygulanan tedavide kullanılan ilaçların metabolizmalarının bilinmesi, tedavi sürecine katkı sağlamak adına bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Vücudumuza dışarıdan alınan ilaçların metabolize edilmesinde, enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, önceden geçirilmiş hastalıklar patofizyolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi birçok faktör rol oynar. İlaç metabolizması ilaç etkileşimlerini de kapsayan farmakokinetik bir süreçtir. Bu süreçte, temel hedef sistem bağırsaklar, böbrekler, akciğer ve beyinde de bulunmakla birlikte; çoğunlukla karaciğerde hepatositlerin endoplazmik retikulumlarında bulunan CYP450 izoenzim sistemidir ve CYP450 izozimlerinin aktiviteleri, genetik yapı farklılığı nedeniyle türler arasında da değişmektedir. İlaç metabolizması, ilaç-ilaç etkileşimleri, ilaç-diyet etkileşimleri, ilaç kullanımının yaşa bağlı değişimi, ilaçların çeşitli hastalıklarla etkileşimi ve farklı türlerdeki etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (James vd 2005). Bu çalışmalarda temel amaç; insan fonksiyonlarını ve bu işlevlerdeki fonksiyon bozukluğunun nedenlerini oluşturan mekanizmalarını anlayarak, daha sağlıklı bir yaşam için uygun modeller geliştirilebilmesidir. Her ne kadar ilaçlar, çevresel kirlenmeler, diyetel bileşenler ile kimyasal etkileşimleri ve ilaçların CYP450 genlerinin ifadelerinin üzerine etkilerini araştıran birçok detaylı çalışmaları yapılmış olsa da, CYP450 enzimlerinin patofizyolojik koşullarda düzenlenmeleri üzerine yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Son dönemde bu çalışmalar araştırmacılar için ilgi odağı haline gelmiştir. Bizde benzer nedenler ile bu çalışmamızda; otozomal resesif olarak ortaya çıkan ve toksik olan sülfid detoksifiye edilmesinde rol oynayan SOX enzim yetersizliğinde, yine vücuda alınan ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol oynayan enzim sistemlerinin nasıl etkilendiği ve bu hastalarda, hastalık harici ilaç kullanımının etkilerinin nasıl olabileceği araştırıldı.

Bu amaçla oksidaz yetersizliğinde ilaç metabolize eden enzimlerin aktivitesi araştırıldı. Bu amaçla 7 hafta boyunca AIN-76 yemi ve 200 ppm W içeren suyla beslenen sıçanlardan elde edilen karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak dokularında ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteleri araştırıldı. Çalışmamızda anilin 4-hidroksilaz (A4H), N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND), eritromisin N-demetilaz (ERND), kafein N-demetilaz (C3ND) ve aminopiren antipiren N-demetilaz (APND) etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), metoksirezorufin O-demetilaz (MROD), pentiloksirezorufin O-depentilaz (PROD), benziloksirezorufin O-debenzilaz (BROD), glutatyon S-transferaz (GST), aktiviteleri sülfid oksidaz yetersizliği sağlanmış olan sıçanlarda ölçülerek, elde edilen veriler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı.

TÜBİTAK AR-GE Eşgüdüm Daire Başkanlığına Hızlı Destek Programı (1002-B) kapsamında sunduğumuz bu çalışma ÇEVRE, ATMOSFER, YER ve DENİZ BİLİMLERİ ARAŞTIRMA GRUBU (ÇAYDAG) tarafından 106Y244 kodu ile desteklenmiştir. TÜBİTAK Çevre, Atmosfer, Yer ve Deniz Bilimleri Araştırma Grubuna destekleri için teşekkürlerimizi sunarız.

Prof.Dr. Alaattin ŞEN  
Begüm TÜTÜNCÜ

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Sülfid Metabolizması, Sülfid Oksidaz (SOX) ve Sülfid Oksidaz Yetersizliği	1
1.1.1. Sülfidler	1
1.1.2. $SO_3^-$ Toksisitesi	3
1.1.3. $SO_3^-$ Metabolizması	4
1.1.3.1. Oksidatif Olmayan $SO_3^-$ Metabolizması	4
1.1.3.2. Oksidatif $SO_3^-$ Metabolizması	4
1.1.4. İnsanlarda Gözlenen SOX Yetersizliği	5
1.1.4.1. SOX genindeki bir mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği	6
1.1.4.2. Molibdopterin sentezinde görev alan birden çok enzimin genlerindeki mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği	6
1.2. İlaçları Metabolize Eden Enzimler	6
1.2.1. Sitokrom P450 Bağımlı Monooksijenazlar	7
1.2.1.1. Sitokrom P450 Döngüsü	9
1.2.1.2. Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	10
1.2.1.3. İlaç Metabolizmasında Önemli Olan CYP450 Enzimleri	10
1.2.1.3.1. CYP1 Ailesi	10
1.2.1.3.1.1. CYP1A Alt Ailesi	11
1.2.1.3.1.2. CYP1B Alt Ailesi	12
1.2.1.3.2. CYP2 Ailesi	12
1.2.1.3.2.1. CYP2A Alt Ailesi	12
1.2.1.3.2.2. CYP2B Alt Ailesi	12
1.2.1.3.2.3. CYP2C Alt Ailesi	13
1.2.1.3.2.4. CYP2D Alt Ailesi	13
1.2.1.3.2.5. CYP2E Alt Ailesi	14
1.2.1.3.3. CYP3 Ailesi	15
1.2.1.3.4. CYP4 Ailesi	16
1.2.1.3.5. CYP19 (Aromataz)	16
1.2.2. Glutatyon S-Transferaz Enzimleri	17
1.3. İlaç Metabolizmasında Etkin Rol Alan Dokular	18
1.3.1. Karaciğer	18
1.3.2. Böbrek	18
1.4. Deney Hayvanı	18
2. MATERYAL VE METOD	20
2.1. Materyaller	20
2.1.1. Kimyasallar	20
2.2. Metotlar	20
2.2.1. Dokular	20
2.2.2. Dokulardan Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması	20
2.2.3. Analitik İşlemler	21
2.2.3.1. Protein Miktarı Tayini	21
2.2.3.2. Sülfid Oksidaz (SOX) Aktivitesinin Tayini	21
2.2.3.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Aktivitesinin Tayini	21
2.2.3.4. Mikrozomal N-demetilaz Aktivite Tayinleri	22
2.2.3.4.1. N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz Aktivite Tayini	22
2.2.3.4.2. Kafein N-demetilaz Aktivite Tayini	23
2.2.3.4.3. Eritromisin N-demetilaz Aktivite Tayini	24
2.2.3.4.4. Aminopiren N-demetilaz Aktivite Tayini	25
2.2.3.5. Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri Tayini	26
2.2.3.5.1. 7-Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini	26
2.2.3.5.2. Pentiloksirezorufin O-Dealkilaz (PROD) Aktivite Tayini	27
2.2.3.5.3. Metoksirezorufin O-Dealkilaz (MROD) Aktivite Tayini	27
2.2.3.5.4. 7-Benziloksirezorufin O-Dealkilaz (BROD) Aktivite Tayini	28
2.2.3.6. Dibenzofloresein O-Debenzilaz (DBFOD) Aktivite Tayini	29
2.2.3.7. Sitozolik Glutatyon S-Transferaz Aktivite Tayini	29
2.2.3.7.1. 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesinin Tayini	29
2.2.3.8. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	30
2.2.3.8.1. Stok çözeltiler	30

2.2.3.8.1.1.	10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30)	30
2.2.3.8.1.2.	Stok ayrıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80)	30
2.2.3.8.1.3.	Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80)	31
2.2.3.8.1.4.	Stok jel çözeltisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C)	31
2.2.3.8.1.5.	%10 SDS	31
2.2.3.8.1.6.	%10 Amonyum persülfat (APS)	31
2.2.3.8.1.7.	4X Numune seyreltme tamponu	31
2.2.3.8.1.8.	Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri	31
2.2.3.8.1.9.	Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması	31
2.2.3.8.2.	Jelin hazırlanması	32
2.2.3.8.3.	Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması	32
2.2.3.8.4.	Örneklerin yüklenmesi	32
2.2.3.8.5.	Elektroforetik ayrıştırma	33
2.2.3.8.6.	Jelin boyanması ve bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması	33
2.2.3.9.	Western blot analizleri	33
2.2.3.9.1.	Proteinlerin elektroforezi	33
2.2.3.9.2.	Transfer sandiviçinin hazırlanması	33
2.2.3.9.3.	Elektroforetik transfer	34
2.2.3.9.4.	Proteinlerin immünokimyasal tespiti	34
2.3.	İstatiksel Analizler	34
3.	BULGULAR	35
3.1.	Dokuların Protein Miktarları	35
3.2.	Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve İnce Bağırsak Mikrozomal MO Aktiviteleri	35
3.2.1.	Anilin 4-Hidroksilaz Aktivite Tayini	35
3.2.2.	N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz Aktivite Tayini	35
3.2.3.	Eritromisin N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini	36
3.2.4.	Kafein N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini	37
3.2.5.	Amino piren N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini	37
3.2.6.	Etoksirezorufin O-Deetilaz (EROD) Aktivitesinin Tayini	38
3.2.7.	Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) Aktivitesinin Tayini	39
3.2.8.	DBFOD Aktivite Tayini	40
3.2.9.	GST-CDNB Aktivite Tayini	41
4.	TARTIŞMA	42
5.	SONUÇ	49
6.	KAYNAKLAR	50

## TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1 Sülfid içeren ilaçların listesi (Simon 1986) .....	2
Tablo 1.2 Türk gıda kodeksince tanımlanmış bazı yiyecek ve içeceklerin içerdikleri maksimum $SO_3^-$ miktarları .....	3
Tablo 1.3 SOX eksikliği olan hastanın idrar biyokimyası ve fibroblast SOX aktivitesi .....	5
Tablo 1.4 Bazı Sitokrom P450 Substratları .....	8
Tablo 1.5 Örnek Substratlarla Sitokrom P450'lerce Katalize Edilen Genel Reaksiyonlar .....	9
Tablo 1.6 Wistar albino sıçanın sistematığı .....	18
Tablo 2.1 Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatındaki SOX aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımının bileşenleri .....	21
Tablo 2.2 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri .....	22
Tablo 2.3 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA-ND) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri .....	23
Tablo 2.4 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Kafein N-Demetilaz (CN3D) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri .....	24
Tablo 2.5 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Eritromisin N-demetilaz (END) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri .....	25
Tablo 2.6 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki 4-dimetilamino antipiren N-demetilaz (Aminopiren N-demetilaz APND) aktivite tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri .....	26
Tablo 2.7 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	27
Tablo 2.8 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki PROD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	27
Tablo 2.9 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki MROD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	28
Tablo 2.10 Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki BROD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	28
Tablo 2.11 Tipik karaciğer aromataz aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	29
Tablo 2.12 Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	30
Tablo 2.13 4X numune sulandırma tamponunun içeriği .....	31
Tablo 2.14 SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları .....	31
Tablo 2.15 Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama .....	34

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1 Sistein ve Metiyonin Katabolizması .....	2
Şekil 1.2 Sülfid oksidaz enziminin 3-boyutlu yapısı .....	4
Şekil 1.3 Sülfid oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi (Garret vd 1998) .....	5
Şekil 1.4 Sitokrom P450 Reaksiyon Döngüsü .....	10
Şekil 2.1 Anilin 4-hidroksilasyonu .....	22
Şekil 2.2 N-nitrosodimetilamin N-demetilasyon .....	23
Şekil 2.3 Kafein N-demetilasyonu .....	24
Şekil 2.4 Eritromisin N-demetilasyonu .....	25
Şekil 2.5 Aminopiren N-demetilasyon .....	26
Şekil 2.6 Alkoksirezorufin dealkilasyon .....	26
Şekil 2.7 DBFOD aktivitesinin tayini .....	29
Şekil 2.8 GST-CDNB enzimatik reaksiyonu .....	30
Şekil 3.1 Anilin 4-Hidroksilaz enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	35
Şekil 3.2 NDMA-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	36
Şekil 3.3 Eritromisin-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	37
Şekil 3.4 Kafein-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	38
Şekil 3.5 Aminopiren-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	38
Şekil 3.6 EROD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	39
Şekil 3.7 EROD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	40
Şekil 3.8 DBFOD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	40
Şekil 3.9 GSTenzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi .....	41
Şekil 4.1 Kontrol grubuna göre SOX yetersiz grubun enzim aktivitesinin değişimleri .....	47
Şekil 4.2 CYP450 ile metabolize olan ilaçlar .....	48

## ÖZET

Sülfite oksidaz (SOX) vücudu sülfite içeren eksojen ve endojen bileşiklerin toksisitesinden koruyan temel enzimdir. Sitokrom P450'ler endojen ve eksojen bileşiklerin metabolizmasında rol alan Faz I enzimlerinin önemli bir ailesini teşkil eden, Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar [E.C.1.14.14.1] veya karışık fonksiyonlu oksidazların terminal enzimleridir. İlaçların vücuttaki en önemli metabolizma yollarından biri sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemi oksidatif, peroksidatif ve çok çeşitli endojen ve eksojen bileşimin redaktif metabolizmasını katalize eden mikrozomal hemoproteinlerden oluşur. Sitokrom P450 enzimleri; retinoidler, biyogenik aminler, prostaglandinler, yağ asitleri, vitamin D<sub>3</sub>, safra asitleri, endojen bileşikler içeren steroidler, gıda katkı maddeleri, çevre kirleticileri, boyalar, anestezi ajanları, organik çözücüler, pestisitler ve ilaçlar gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyon ve aktivasyonunda önemli rol oynayan hemoprotein süper ailesidir. Sitokrom P450 ailesi (CYP450), karaciğerdeki faz I metabolik enzim sisteminin önemli bir enzim grubunu oluşturur. Toksik olan sülfite detoksifiye edilmesinde rol oynayan sülfite oksidaz enziminin yetersizliği otozomal resesif olarak ortaya çıkmakta ve erken yaşta ölüme sonuçlanmaktadır. Bu çalışmada sülfite oksidaz yetersizliğinde ilaç metabolize eden enzimlerin aktivitesi araştırıldı. Bu amaçla 7 hafta boyunca AIN-76 yemi ve 200 ppm W içeren suyla beslenen sıçanlardan elde edilen karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak dokularında ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteleri araştırıldı. Çalışmamızda anilin 4-hidroksilaz (A-4H), N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA-ND), eritromisin N-Demetilaz (E-ND), kafein N-Demetilaz (C3-ND) ve aminopiren antipiren N-Demetilaz (AP-ND) etoksirezorufin O-Deetilaz (EROD), metoksirezorufin O-Demetilaz (MROD), pentiloksirezorufin O-Depentilaz (PROD), benziloksirezorufin O-Debenzilaz (BROD), glutatyon S-transferaz (GST), aktiviteleri sülfite oksidaz yetersizliği sağlanmış olan sıçanlarda ölçülerek, elde edilen veriler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. Yapılan ölçümler sonucunda; Wistar albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarında; anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz, eritromisin N-Demetilaz ve kafein N-Demetilaz aktivitelerinde karaciğerde kontrol grubuna göre sülfite oksidaz yetersiz grupta artış gözlemlendi. Eritromisin N-Demetilaz aktivitelerinde ince bağırsaktaki artış tespit edildi. Aminopiren N-Demetilaz, EROD, PROD aktivitelerinde, yaklaşık olarak bir değişkenlik gözlenmezken, yapılan ölçümlerde MROD ve BROD aktiviteleri ise tayin edilemedi. GST-CDNB aktivitesinde de karaciğerde de sülfite oksidaz yetersiz grupta kontrol grubuna göre azalış gözlenirken çok büyük bir değişkenlik tespit edilemedi.

Anahtar Kelimeler: Sülfite oksidaz, Sitokrom P450 enzimleri, ilaçları metabolize eden enzimler



## ABSTRACT

Sulfite oxidase (SOX) is an essential enzyme in the pathway of the oxidative degradation of sulfur containing amino acids. It protects cells from toxicity of sulfite which has both endogenous and exogenous provenances. SOX deficiency is an inborn error of the metabolism of sulfated amino acids. Individuals affected with SOX deficiency most commonly present in the neonatal period with intractable seizures, characteristic dysmorphic features, and profound mental retardation. Xenobiotic metabolism is carried out by large groups of xenobiotic metabolizing enzymes (XME) that include the phase I cytochrome P450s and phase II enzymes including various transferases. XME play a dual role in xenobiotics metabolism. On one hand, they transform compounds to more water soluble metabolites and thus enhance their excretion. On the other hand, some of the intermediates arising during this process become more toxic. Some factors like species, sex, age, diet and genetic polymorphism alter XME levels and causes considerable differences in biotransformation ability of individuals, which is a problem faced by drug researchers interpreting toxicological results to humans. The present project investigates the role of SOX deficiency on xenobiotic metabolism, which is the first report on changes of XME in SOX deficiency. In this study, male Wistar albino rats, aged 3 months, were used. Three experimental groups, each consisting of 30 rats, were formed; control group, SOX deficient group, and the SOX deficient group treated with sulfite. Animals were housed in groups of four to five rats in stainless steel cages at standard conditions ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5\%$  humidity) with a 12 h light-dark cycle and fed ad libitum with standard rat chow and tap water. SOX deficiency was produced in rats by the administration of a low molybdenum diets (AIN 76a, Research Diets Inc, USA) with concurrent addition of 200 ppm tungsten to their drinking water. At the end of the experimental period (7 weeks), livers, kidney, lung and small intestine were taken and cytosolic and microsomal fractions were prepared. First, hepatic SOX activity in deficient groups was measured to confirm SOX deficiency. Then, N-nitrosodimethylamine N-demethylase (NDMA-ND), aniline 4-hydroxylase (A4H), erythromycin N-demethylase (ERND), aminopyrene N-demethylase (APND), caffeine 3- N-demethylase (C3-ND), ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), penthoxyresorufin O-depenthylase (PROD), benzyloxyresorufin O-debenzylase (BROD), methoxyresorufin O-demethylase (MROD) and glutathione S-transferase (GST) activities were determined to monitor XME activity changes in SOX deficiency. Our results clearly demonstrated that SOX deficiency significantly elevated A4H, ERND and NDMA-ND activities while decreasing EROD and GST activities. No significant changes were observed with CN3D, MROD and PROD activities. These alterations in XME can contribute to the varying susceptibility and response of these individuals to different drugs and/or therapeutics used for treatments.

Key: Words: SOX, Cytochrome P450 enzymes, Drugs metabolizing enzymes,

## 1. GİRİŞ

Endüstri devriminin öncesine kadar insanoğlu sadece basit hayvansal ya da bitkisel kaynaklı zehirlere maruz kalırken, günümüzde her geçen gün çeşitlenerek artan endüstriyel üretim, hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için geliştirilen ilaçlar ve dünyanın her yerinde yaygın olarak kullanılan tarım ilaçları gibi kimyasallar günümüz insanının yaşantısının kaçınılmaz bir parçası haline gelmişlerdir. Her yıl ticari pazarlara 1000 adet yeni kimyasal girerken, global ölçekte yaklaşık 100.000 kimyasalın kullanıldığı bilinen bir gerçektir. İlaçlar dahil tüm bu kimyasalların bilinçsiz kullanımları değişik zararlara yol açarak, insan ve çevre sağlığı açısından tehdit edici boyutlara ulaşmıştır.

Değişen bu koşullarla birlikte çeşitli hastalıklarda artışlar olmuş, teşhis ve tedavi sürecinde ilaçların ve ksenobiyotiklerin farmakolojik ve toksikolojik etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Bir ilacın metabolizması terapötik veya toksik etkiler ortaya çıkartabilir. Bu nedenle metabolik yolun detaylı keşfi, ilaca verilen bireyler arası tepki farklılıklarını ve metabolizmadan kaynaklanan eliminasyonu öngörebilme konusunda yardımcı olur. Yapılan in vitro deneylere dayanarak ilacın seçimi konusunda rasyonel kararlar verilmesi, geliştirilmesi ve ilacın insandaki etkilerinin öngörülebilmesini mümkün kılmaktadır.

İlaç yapısıyla ilgili pek çok çalışma ilaçların içerikleri ve ilaç metabolize eden enzimlerin özellikleri nedeniyle ilaçlara verilen tepkilerde farklılıklar olduğu konusunda birleşiyor. Bu tepkiler; ekzojen ve çevresel faktörlerin yanında psikolojik ve patolojik endojen faktörlerin ve ilaç metabolize eden enzimlerin her birinin genetik yapısına göre değişiklik gösteriyor. Bu nedenle verilmiş bir ilacın izlediği metabolik süreci anlamak, ilacın zararsız veya klinik olarak önemsiz olup olmadığını öngörmek veya ağır ve ölümcül olabilecek bir yan etkisinin olup olmadığını anlamak açısından son derece önemlidir. Neyse ki, bu faktörler hakkındaki bilgimiz son on yılda artış göstermiştir. Bu sayede artık ilaç geliştirilmenin erken bir safhasında, muhtemel olumsuz bir etki olmadan bu bileşimleri elimine edebilmek için başvurabileceğimiz büyük bir bilgi kaynağına sahibiz (Gasser R 1997).

Otozomal resesif olarak ortaya çıkan ve erken yaşta ölümle sonuçlanan sülfite oksidaz (SOX) yetersizliği bulunan bireylerde, bu hastalığın tedavi sürecinde veya bu hastalarda değişik hastalıklarda uygulanan tedavide kullanılan ilaçların metabolizmalarının bilinmesi, tedavi sürecine katkı sağlamak adına önemlidir.

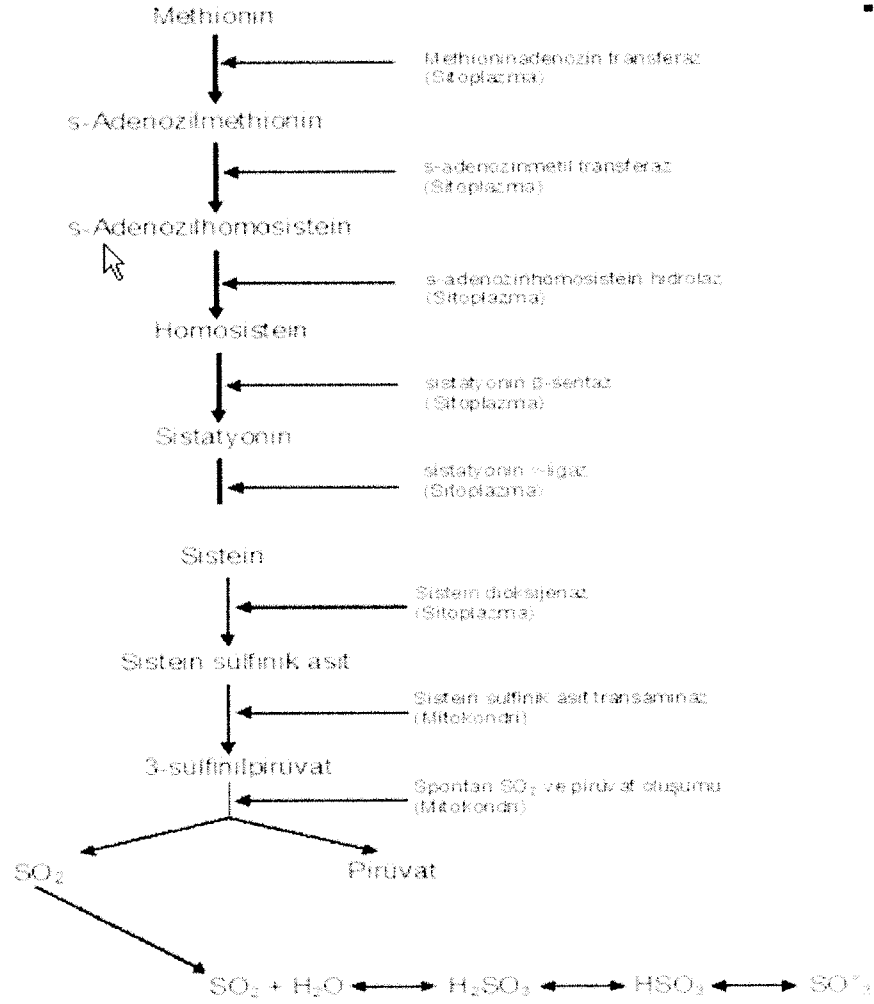
### 1.1. Sülfite Metabolizması, Sülfite Oksidaz (SOX) ve Sülfite Oksidaz Yetersizliği

#### 1.1.1. Sülfite

Sülfite oksidaz enzimi (SOX), hava kirliliği ve gıdalarla alınanın dışında, vücutta kükürt içeren amino asitlerin ve diğer sülfite ( $SO_3^-$ ) içeren bileşiklerin katabolizması sırasında oluşan  $SO_3^-$  detoksifikasyonunda önemli bir enzimdir. Ağız ve mide gibi asidik ortamlarda besinler ile alınan  $SO_3^-$  tuzları kolay ve hızlı bir şekilde sülfüroz asite ( $H_2SO_3$ ) dönüşmekte bu asit de fizyolojik pH'da  $SO_3^-$ 'e dönüşmektedir (Gunnison ve Jacobsen 1987). Endojen  $SO_3^-$  üretiminde en önemli yolak sistein ve metiyonin amino asitlerinin katabolizmasıdır (Cooper 1983, Yamaguchi vd 1973; Şekil 1.1)

Bunların yanısıra hipotaurin katabolizması ve hidrojen kükürt ( $H_2S$ ) oksidasyonu da daha az önemli oldukları düşünülen diğer endojen  $SO_3^-$  oluşum mekanizmalarıdır (Gunnison ve Jacobsen 1987). Sistein ve methionin gibi endojen mekanizmaların dışında, ekzojen kaynaklı sülfite de maruz kalınmaktadır. Bunların başlıcaları; hava kirliliği, ilaçlar, yiyecek ve içeceklerdir.

Hava kirliliğinin önemli bileşenlerinden olan ve özellikle fosil yakıtların kullanılmasına bağlı olarak atmosfere katılan kükürt dioksit ( $SO_2$ ) ekzojen  $SO_3^-$  oluşumunun önemli kaynaklarından (Amdur 1969). Atmosferdeki  $SO_2$  miktarına bağlı olarak birçok hastalık (solunum sistemi rahatsızlıkları, beyin tümörlerinin görülme sıklığında artış, eritrosit antioksidan savunma sistemi ve lipid peroksidasyonunda değişiklikler) ve hatta ölümler gerçekleşebilmektedir (Atkinson vd 1993, Andersson vd 1998, Samet vd 2000, Agar vd 2000, Kucukatay vd 2003).



**Şekil 1.1** Sistein ve Metiyonin Katabolizması

İlaç endüstrisinde SO<sub>3</sub><sup>-</sup> çeşitli dozlarda ilaç etkinliğinin azalmasına neden olan oksidasyonu önlemek amacı ile kullanıldığı gibi, çeşitli ilaçlara ilave edilerek suda eriyebilirlik kazandırmak için de kullanılmaktadır. SO<sub>3</sub><sup>-</sup> içeren bazı farmakolojik ajanların belirtildiği Tablo 1.1'de de görüldüğü gibi birçok ilaç grubu SO<sub>3</sub><sup>-</sup> içermektedir (Koepeke 1983, Golembiewski 2002).

**Tablo 1.1** Sülfite içeren ilaçların listesi (Simon 1986).

<i>İlaç grubu</i>	<i>Etken madde</i>
Bronkodilatatörler	Salbutamol, metaproterenol
Epinefrin	Adrenalin
Lokal anestezipler	Lidokain, novokain, ksilokain, prokain
Kortikosteroidler	Deksametazon, hidrokortizon
Antibiotikler	Aminoglikozid grubu antibiyotikler
Anajezikler	Meperidin
Göz damlaları	Sulfasetamid, prednizolon, deksametazon solüsyonları

Bunların yanı sıra gıda endüstrisinde de  $SO_3^-$  yiyecek ve içeceklerin korunması ve dayanıklılığının artırılması amacı ile geniş kullanım alanları bulmaktadır. Kararmayı önleyici etkisi, anti-mikrobiyal, renk ve kıvam koruyucu ve renk ağartıcı olarak pek çok değişik amaçla yoğun bir şekilde bu endüstride kullanım alanı bulan  $SO_2$  ve çeşitli  $SO_3^-$  tuzları şunlardır; Kükürt dioksit (E220), Sodyum sülfid (E221), Sodyum hidrojen sülfid (E222), Sodyum metabisülfid (E223), Potasyum metabisülfid (E224), Kalsiyum sülfid (E226), Kalsiyum hidrojen sülfid (E227), Potasyum hidrojen sülfid (E228) (Fazio ve Warner 1990). Tablo 1.2'de Türk gıda kodeksince tanımlanmış bazı yiyecek ve içeceklerin içerdikleri maksimum  $SO_3^-$  miktarları  $SO_2$  cinsinden mg/kg veya mg/l olarak verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi günlük hayatta alınan pek çok besin değişik düzeylerde  $SO_3^-$  içermektedir.

**Tablo 1.2** Türk gıda kodeksince tanımlanmış bazı yiyecek ve içeceklerin içerdikleri maksimum  $SO_3^-$  miktarları (Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı maddeleri Tebliği (25.08.2002). Tebliğ No2002/57, 24857 sayılı Resmi Gazete.)

<i>Yiyecek ve içecekler</i>	<i>İçerdikleri <math>SO_3^-</math> miktarı (mg/kg veya mg/l)</i>
Kahvaltılık sosis, salam ve sucuklar	450
Kurutulmuş, tuzlanmış balık	200
Kuru bisküvi	50
Nişasta	50
Kurutulmuş granüle patates	400
Hububat veya patates bazlı çerezler	50
İşlenmiş patates (Dondurulmuş)	100
Salamura içindeki sebze ve meyveler	100
Kurutulmuş meyveler	2000
$SO_3^-$ 'le muamele edilmiş meyvelerden yapılan reçel, jöle ve marmelatlar	100
Glikoz şurubu bazlı şekerlemeler	50
Bira (Alkolsüz ve düşük alkollü dahil)	20
Alkollü alkolsüz şarap	200

### **1.1.2. $SO_3^-$ Toksisitesi**

Günlük  $SO_3^-$  tüketiminin; yiyecek ve içeceklerle alınan miktarına, hava kirliliği ve ilaç endüstrisi yoluyla alınımının da katılması ile oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Daha çok alerjik ve astımlı bireylerde olmak üzere normal bireylerde de oldukça yoğun olarak  $SO_3^-$  hipersensitivitesi rapor edilmiştir. Bu hipersensitivite hastalarda başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere ürtiker, laringeal ödem ve/veya anjiödem olarak ortaya çıkmaktadır. Daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalar ile bu maddenin alerjik yan etkilerine ilaveten özellikle yüksek dozlarda, pek çok hücre yapılı etkileşebildiği gösterilmiş ve toksik özellikleri daha iyi tanımlanmaya başlanmıştır. Genetik materyalde sitozen ve urasil bazları ile reaksiyona girerek hasar ve mutasyonlara neden olduğu, lipid ve proteinler ile reaksiyona girdiği bildirilmiştir (Shi ve Mao 1994, Rencuzogullari 2001). Sayılan bütün bu etkilerin yanında elastaz gibi serin proteinazların inhibitörü olan  $\alpha$ 1-antiproteinaz ( $\alpha$ 1-AP) aktivitesini engelleyerek, akciğer hasarı da oluşturduğu bildirilmiştir (Reist vd 1998). Yapılan çalışmalar sonucunda günlük kabul edilebilir  $SO_3^-$  alımının 163 mg/gün olduğu belirlenmiştir. Yiyecek ve içeceklerle birlikte, hava kirliliği ve  $SO_3^-$  içeren çeşitli ilaçlar birlikte düşünüldüğünde, günlük alınması gereken düzeyin üzerine çıktığı ve  $SO_3^-$  toksisitesinin ortaya çıkma riskinin arttığı bildirilmiştir. Bu sayılan etkilerde direkt veya dolaylı olarak oksijen ( $O_2$ ) ve kükürt merkezli radikal oluşumları en önemli mekanizmadır (Inouye 1980, Shi ve Mao 1994, Abedinzadeh 2001, Chamulitrat 1999). Serbest radikallerin hücre hasarındaki rolleri de çok iyi bilinen bir konudur.  $SO_3^-$  'in toksik etkilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli mekanizmanın kükürt ve  $O_2$  merkezli radikaller olduğu düşünülürse bu maddenin metabolize edilerek detoksifiye edilmesinin ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

### 1.1.3. $SO_3^-$ Metabolizması

Gerek endojen oluşan gerekse de eksojen maruz kalınan  $SO_3^-$ 'in detoksifiye edilmesi gerekir. Bunun için 2 temel yolak vardır. Bunlar; oksidatif olmayan  $SO_3^-$ metabolizması ve oksidatif  $SO_3^-$  metabolizması'dır.

#### 1.1.3.1. Oksidatif Olmayan $SO_3^-$ Metabolizması:

$SO_3^-$ detoksifikasyonunda oksidatif metabolizmaya göre daha az öneme sahiptir.  $SO_3^-$ 'in bu şekildeki detoksifikasyonunda sülfitolizis reaksiyonu önemli yer tutar.  $SO_3^-$  bu reaksiyon ile sistin, okside glutasyon (GSSG) gibi küçük veya daha büyük molekül ağırlıklı proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile birleşir ve s-sulfonat adı verilen bileşiği oluşturur. Bu bileşiğin idrarda bulunmaması,  $SO_3^-$ 'in bu yolla metabolizmasının oldukça az bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir (Gunnison ve Jacobsen 1987).

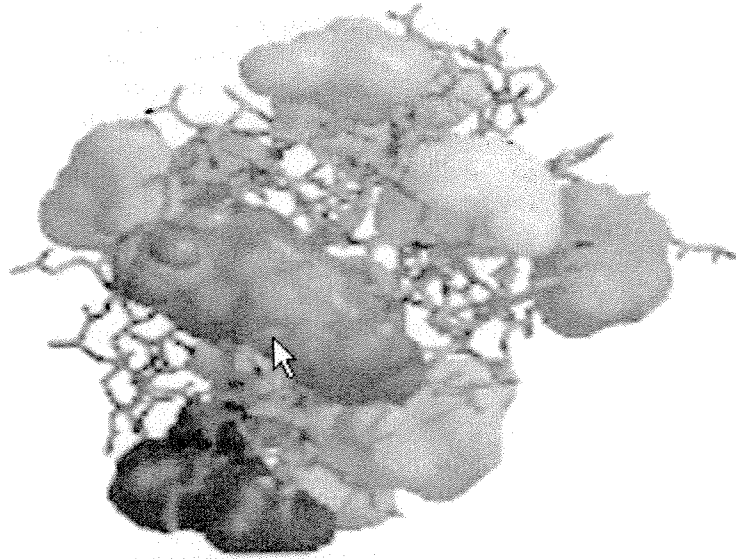


Oksidatif olmayan bir diğer  $SO_3^-$ metabolizması yolu tiyosülfattır. Tiyosülfat  $SO_3^-$  ve 3-merkaptoprüvatın reaksiyona girmesi ile oluşan bir bileşiktir ve  $SO_3^-$  bu yolla idrarla atılmaktadır. Ayrıca  $SO_3^-$ 'in, tiyosistein ile reaksiyona girerek tiyosülfat oluşturduğu bildirilmiştir (Gunnison vd Jacobsen 1987).

#### 1.1.3.2. Oksidatif $SO_3^-$ Metabolizması:

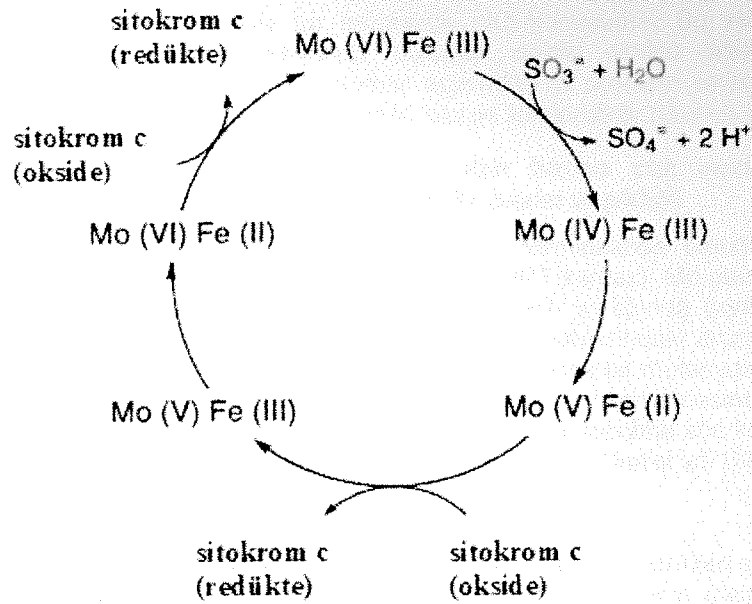
$SO_3^-$ 'in temel detoksifikasyon mekanizması oksidatif  $SO_3^-$ metabolizmasıdır. Bu işlem vücutta sülfat oksidaz (SOX) enzimi aracılığı ile yapılmaktadır. SOX, (EC 1.8.3.1) molekül ağırlığı 104 kilodalton (kDa) olan bir molibdohemoproteindir ve memelilerde kofaktör olarak Mo kullanan 3 enzimden birisidir (Cohen vd 1971).

Mitokondrinin iç membranında lokalize olmuş olan, SOX birbirine benzer her biri 52 kDa'luk 2 alt üniteden oluşmuş, dimerik bir yapıya sahiptir. 52 kDa'luk her bir alt ünite, hem içeren küçük bir N terminali ve Mo içeren büyük bir C terminali bulunur (Kisker vd 1997). Bu yapının SOX etkinliğini Mo içeren büyük C terminali gösterir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Sülfat oksidaz enziminin 3-boyutlu yapısı

SOX  $SO_3^-$ 'i okside ederek  $SO_4^{2-}$ 'a dönüştürür. İdrarla atılan inorganik  $SO_4^{2-}$ 'in yaklaşık % 90'ının SOX enzimi tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir.  $SO_3^-$ 'in, enzimin aktif bölgesine bağlanması Mo'un iki elektron kaybı ile sonuçlanırken  $SO_3^-$   $SO_4^{2-}$ 'a çevrilir. Enzimin yeniden görev yapması sitokrom c'nin molekül içi elektron transferi yapmasına bağlıdır (Garret vd 1998). Bu işlem de iki basamakta yapılarak enzimin işlevselliği tekrar kazandırılır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Sülfid oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi (Garret vd 1998).

#### 1.1.4. İnsanlarda Gözlenen SOX Yetersizliği

Toksik etkilerinden bahsedilen  $\text{SO}_3^{2-}$ 'in, detoksifiye edilmesinin önemi genetik olarak bu enzim eksikliğinin gözleendiği vakalar ile anlaşılmıştır. İlk SOX eksikliği vakası 1967 yılında Mudd ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş ve otozomal resesif olarak geçtiği gösterilmiştir. 2,5 yaşındaki bir erkek çocukta şiddetli beyin hasarı, mental gerilik, körlük, spastik kuadripleji ve serebral atrofi gibi çeşitli klinik bulguların tespit edilmesinin ardından yapılan, laboratuvar tetkikleri kükürt metabolizmasında bozulma olduğunu gösterdi. Bu bulgular, idrarla yoğun bir şekilde atılan S-sulfosistein,  $\text{SO}_3^{2-}$ , tiosülfat ve normalden daha az miktarda çıkarılan  $\text{SO}_4^{2-}$  idi. Araştırmacılar tanımladıkları klinik bulguların kükürt içeren amino asitlerin metabolizmasındaki bir sorundan kaynaklanabileceğini düşünüp, postmortem karaciğer böbrek ve beyin dokusunda SOX aktivitesi ölçtüler. Bulguları hipotezlerini tam anlamı ile destekliyordu; incelenen karaciğer, beyin ve böbrek gibi dokularda kükürt içeren amino asitlerin metabolizmasından sorumlu ana enzim olan SOX aktivitesinin olmadığını buldular (Mudd vd 1967). Aşağıdaki tabloda SOX enzim eksikliği tanısı konmuş bir hastanın kükürt metabolizmasının ileri derecede bozulmuş olduğunu gösteren idrar biyokimyası ve izole fibroblastlarından elde edilen SOX aktivitesi bulguları verilmiştir.

Tablo 1.3 SOX eksikliği olan hastanın idrar biyokimyası ve fibroblast SOX aktivitesi (Garret vd 1988).

Ölçüm		SOX eksikliği	Normal
İdrar	$\text{SO}_3^{2-}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	100-250	-----
	Tiosülfat (mM)	0,297-1,632	<0,100
	S-Sulfosistein (mM)	0,240	0,006-0,030
Fibroblast	SOX aktivitesi (U/g prot)	Belirlenemedi	6-23

SOX enzim eksikliği, hayatın erken dönemlerinde ölüme sonuçlanan ciddi bir kalıtsal hastalıktır. SOX enzim eksikliğinin iki şekilde ortaya çıktığı gösterilmiştir.

#### 1.1.4.1. SOX genindeki bir mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği

Eksikliğin bu formunda SOX geninde bir mutasyon söz konusudur. Bu mutasyonlardan biri, enzimin protein dizilimindeki 160. pozisyonda bulunan arjinin amino asidinin, glisinle yer değiştirmesidir. Bu mutasyon diğer Mo içeren enzimler açısından bir problem yaratmadığı için sadece SOX eksikliğinden söz edilebilir ve "İzole SOX eksikliği" olarak isimlendirilir (Garret vd 1988).

#### 1.1.4.2. Molibdopterin sentezinde görev alan birden çok enzimin genlerindeki mutasyondan dolayı ortaya çıkan SOX enzim eksikliği:

Molibdopterin, kofaktör olarak Mo içeren enzimlerin C terminalinde bulunan ve Mo iyonun bağlandığı integral bir yapıdır. Sentezi Molibdopterin sentaz (MPT sentaz), Mo şelataz gibi enzimlerin ve MogA, MoeA gibi Mo transportunda görevli çeşitli proteinlerin varlığında guanozinden başlayan kompleks bir biyokimyasal yolakla gerçekleşir. Bu sentez basamaklarındaki enzim ve proteinlerden birinin veya birden fazlasının sentezinden sorumlu gende oluşabilecek bir mutasyon, Mo'un bu integral yapıya bağlanamamasına veya molibdopterin sentezinin gerçekleşmemesine sebep olur. Bu durumda SOX da dahil olmak üzere Mo içeren diğer enzimlerde de bozulma söz konusu olacaktır. Bu yüzden SOX eksikliğinin bu tipine "Mo kofaktör eksikliği" denmektedir (Garret vd 1988).

### 1.2. İlaçları Metabolize Eden Enzimler

Hücre zarı; hücreyi suda çözünen ksenobiyotiklerin toksik etkisinden koruyan etkili bir bariyer olsa da, lipofilik bileşikler bu bariyeri kolayca aşarak hücre için toksik seviyeye ulaşabilir. Bu nedenle; bunların zararlı etkisinden hücreyi korumak amacıyla, bu bileşenlerin ortamda birikerek toksik etki göstermesini engellemek için; organizmalar çeşitli biyolojik sistemler geliştirdiler. Bu amaç için 2 mekanizma vardır, biyotransformasyon ve taşıma. Tek hücrelilerde bu bileşenlerin eliminasyonu taşıyıcı proteinlerle hücre dışına çıkarılması şeklinde basit bir sistemle sağlanırken, çok hücrelilerde ise lipofilik bileşenlerin yalnızca hücreden değil, organizmadan da uzaklaşmasını sağlayacak sistemler gelişmiştir. Böylece lipofilik maddeler suda çözünür metabolitlere dönüştürülerek vücuttan uzaklaştırılır (Handschin ve Meyer 2003). İlaçların enzimlerin etkisi ile kimyasal değişikliklere uğramasına biyotransformasyon denilir. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilir. Bu yüzden biyotransformasyona, biyoinaktivasyon veya detoksikasyon (zehirsizlenme) da denilir. Bazen ilaçlar biyotransformasyon sonucu daha etkili (kodein'in morfine, difenoksilatın difenoksin'e dönüşümü) ve/veya daha toksik (metil alkolün formaldehid ve formik aside, asetaminofen'in N-asetil-p-benzokininimin'e dönüşümü) bileşikler haline dönüştürülmektedirler. Biyotransformasyonda rol alan enzimlerin büyük kısmı spesifik olarak belirli organlarda lokalize olmuşlardır. Örneğin; karaciğerde parankimal hücrelerde (hepatositlerde), böbrek proksimal tübülüs hücrelerinde (S3 segmenti), akciğerde Clara hücreleri, tip II hücreler, ince bağırsakta mukozal hücreleri, testislerde, sertoli hücrelerinde bulunurlar. Bununla birlikte metabolizmada başrol oynayan organ ise karaciğerdir.

Biyotransformasyon 'ilaçları metabolize eden enzimler' adı verilen enzim grubunun aktiviteleri sonucunda gerçekleşir. Bu enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlar, genellikle Faz-I ve Faz-II olarak adlandırılan iki alt gruba ayrılırlar (Schenkman, 1999). Faz-I reaksiyonları, genellikle oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonlarını içerir. Bu reaksiyonlar -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH veya -COOH gibi, ksenobiyotiklerin polaritesini artıran bir fonksiyonel grubun ilavesi ile sonuçlanır (Schenkman, 1999). Oluşan bu gruplar, Faz-II reaksiyonları için gerekli merkezlerin oluşumunu sağlar. Faz-I reaksiyonları, genellikle monooksijenazlar (MO), flavin içeren monooksijenazlar (FMO) ve diğer okside redüktazlar tarafından katalizlenir (Cooper vd, 1965; Jakoby, 1990; Schenkman, 1999). Kenetlenme reaksiyonları olan Faz-II reaksiyonlarında ksenobiyotik ve onun herhangi metabolitleri, vücutta bulunan polar moleküller ile kenetlenir. Bu endojen moleküller arasında glutatyon (GSH), glukorinik asit, sülfirik asit, aminoasit (en fazla glisin, taurin ve glutamik asit), metil ve diğer alkol grupları bulunur. Faz-II reaksiyonları başlıca glutatyon S-transferazlar, asetil transferazlar, glukuronil transferazlar ve sülfotransferazlar tarafından katalize edilir. Faz-I reaksiyonları genellikle ksenobiyotiklerin hidrofilik özelliklerinde küçük bir artış sağlarken, Faz-II reaksiyonları hidrofilik özellikte çok daha fazla artış ile sonuçlanır. Bu reaksiyonlar sonucunda, ksenobiyotik daha polar, daha az yağda ve daha çok suda çözünür hale getirilir. Bu şekilde vücuttan kolayca atılır hale dönüştürülerek, boşaltım hızı artırılmış ve toksik etkileri bertaraf edilmiş olur.

İlaçları metabolize eden enzimlerin aktiviteleri, bireyler arasındaki genetik yapı farklılığı nedeniyle değişebilmektedir. Enzim aktivitesindeki farklılık ise ilacın farmakokinetiğinde, dolayısıyla eliminasyonunda değişikliklere yol açabilir (Spatzeneger ve Jaegger 1995; Belpaire ve Bogaert 1996,).

Bir ilacın eliminasyon hızının bireyler arasında farklılık göstermesi, enzimlerin genetik yapısında polimorfik değişikliklere bağlı olabilir. Metabolizmadan sorumlu enzimlerdeki genetik polimorfizm nedeniyle ilacın terapötik konsantrasyonundan daha düşük düzeyde olması, yani ilaç etkisinin azalması veya daha yüksek konsantrasyonda olması, yani toksik etkilerin ortaya çıkması söz konusu olabilir. Bu değişkenlik terapötik indeksi dar olan ilaçları kullanan bireyler için ciddi sonuçlar doğurabilir. Ayrıca, enzim polimorfizmi kanser gibi çevresel etkenlerle doğrudan bağlantılı olduğu bilinen hastalıklara duyarlılığı artırdığı için de önemlidir (Marzo ve Balant 1996).

İlaçların vücuttaki en önemli metabolizma yollarından biri sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemidir. CYP450 süper ailesi oksidatif, peroksidatif ve çok çeşitli endojen ve eksojen bileşimin redaktif metabolizmasını katalize eden mikrozomal hemoproteinlerden oluşur. Bu süper aile nükleik asit sekanslarındaki homolojilere göre ailelere ve alt ailelere ayrılır (Nelson vd 1996). Çoğu ksenobiyotik biotransformasyonu CYP1, CYP2 ve CYP3 ailesindeki enzimlerce yapılmıştır. Diğer aileler çoğunlukla yağ asidi, safra asidi ve hormonlar gibi endojen yapılarına karışırlar (Gonzales 1989). CYP2 ailesi üzerinde; sıçan, fare ve tavşan kullanılarak yoğun çalışmalar yapılmaktadır. CYP2 ailesi memelilerde 7 alt aileyi içerir. İnsan için en önemli CYP'ler ilaç metabolizması itibarıyla CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 VE CYP2E1'dir. CYP2B6'nın ilaç metabolizmasındaki rolü henüz tam olarak netleşmemiştir. İnsan karaciğerindeki toplam P450 içeriğinin sadece %1'ini teşkil etse de, bazı ilaç metabolizmalarındaki CYP2B6'da önemli bir payının olduğunu ispat eden bazı bulgular vardır. İnsan karaciğerindeki CYP enziminin %70 kadarını ilaç metabolizmasına kararlı immunokimyasallar olarak katılan ailelere mensuptular. Bunlardan CYP2C toplam CYP enziminin %20'sini ve CYP3A4 %30 kadarını teşkil eder. Bu enzimler insan karaciğer mikrozomlarındaki P450'nin temel biçimleridir (Shimada vd 1994). CYP2 enzimlerinden CYP2F1'in insan karaciğerinde bulunduğu henüz belirtilmemekle birlikte, sadece akciğerlerde görüldüğü belirtilmektedir (Raunio vd 1995).

CYP enzimlerinin ekspresyonu; genetik-çevresel faktörlerle, bazı hastalıklardan kaynaklanmalarına göre ikiye ayrılıyor. Bu faktörler bireyler arasında ksenobiyotiklerin metabolik yollarında farklılıklara neden olur. Genetik faktörlerin etkisine örnek olarak; populasyon içinde en az CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP2D6 enzimlerinin bireyler arası çeşitliliğe etkisinin polimorfik ekspresyonu verilebilir. Zayıf metabolize edicilerin sıklığı soy ve etnik olarak ikiye ayrılır. Sigara içmek, alkol ve/veya uyuşturucu kullanmak gibi birtakım alışkanlıklarda bazı CYP'lerin ekspresyonuna veya indüksiyonuna neden olabilir (Pelkonen ve Briemer 1994, Pelkonen vd 1998). Birden fazla ilaç aynı anda verildiğinde farmakokinetik bir durumun ortaya çıkması her zaman mümkündür. Eğer aynı enzim tarafından metabolize edilmişse, bir ilaç bir diğer ilacın CYP-aracılı metabolizmasını düzenleyebilir. Diğer yandan, bir ilaç başka bir ilacın metabolizmasını, kendini metabolize etmeksizin, aynı enzimin salgılanmasını dondurarak engelleyebilir. Bu işlemler suni hepatositler veya insan karaciğerinden elde edilmiş organeller kullanılarak in vitro olarak gerçekleştirilebilir (Boobis 1995; Pelkonen vd 1998). CYP4503A4 ilaçların metabolizmasında rol alan en önemli sitokrom P450 izoenzimi görünümündedir. CYP3A4, karaciğerdeki sitokrom enzimlerinin %60'ını bağırsaklarda ise %70'ini oluşturur ve en geniş ilaç spektrumunun metabolizmasından sorumludur. İlaçların çoğu vücutta inaktif ya da daha az aktif metabolitlere metabolize oldukları için bu sürecin diğer tedavilerle engellenmesi bu ilaçların birinin ya da her ikisinin farmakodinamik etkilerini artırabilir. Bu klinik açıdan önemli ilaç etkileşimlerinin en sık ortaya çıkma biçimlerinden biridir (Hansten 1998, Michalets vd 1998).

### **1.2.1. Sitokrom P450 Bağımlı Monooksijenazlar**

Sitokrom P450'ler endojen ve eksojen bileşiklerin metabolizmasında rol alan Faz I enzimlerinin önemli bir ailesini teşkil eden, Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar [E.C.1.14.14.1] veya karışık fonksiyonlu oksidazların terminal enzimleridir (Cooper vd 1965) ve bakterilerden memelilere kadar çalışılmış tüm türlerde bulunan, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer hemoproteinler içeren bir gen süper ailesinin üyesidirler (Nebert vd 1991, Nelson vd 1996). Prokaryotik enzim çözünür bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda membrana bağlıdır. Memelilerde, mitokondriyal iç membranda ve endoplazmik retikulum membranların da yerleşmiştir.

Bu grup protein, ilk kez Alman araştırmacı M. Klingenberg tarafından 1958 yılında bulundu. Araştırmacı, karaciğere ait mikrozomal preparatın sodyum ditiyonat gibi bir indirgeme ajanı ile tepkimeye sokulmasını takiben, karbonmonoksit (CO) gazı ile muamelesi neticesinde 450 nm'de ışığı absorbe eden bir pigmentin varlığını gözlemledi. Daha sonra Omura ve Sato tarafından 1964 yılında bir hem protein olarak tanımlanan bu pigment, sitokrom P450 olarak adlandırıldı. Kısa bir süre sonra sitokrom P450'nin katalitik fonksiyonu, steroidlerin oksidatif metabolizmasına katılımı ve ilaçların

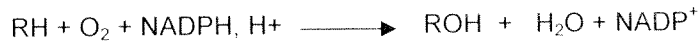


oksidatif metabolizmasındaki rolü gösterildi (Cooper vd 1965). Sitokrom P450'ler, böbrek, akciğer, deri, bağırsak, adrenal korteks, plasenta ve diğer farklı dokularda bulunmasına rağmen yoğun ve etkin olarak karaciğerde lokalize olmuşlardır; sadece düz kasta ve eritrositlerde bulunmazlar (Payne 1976, Ryan vd 1979, Spies vd 1982, Collodi vd 1984, Ueng ve Alvares, 1985, Gilewicz vd 1987, Adalı ve Arıncı, 1990). Sitokrom P450 enzim sistemi; steroidler, hormonlar, prostoglandinler, lipidler ve yağ asitleri gibi birçok endojen maddenin metabolizmasında ve dışarıdan alınan ilaçlar, insektisidler, çeşitli petrokimya ürünleri, prokanserojenler, anestezi malzemeleri, organik çözücüler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında bulunurlar (Goepfert vd 1995, Magnusson ve Sandström 2004, Szotakova vd 2004). Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar endojen (steroid hormonların biyosentezi, doymamış yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonu gibi) ve ekzojen (antibiyotikler, kanserojenler, organik çözücüler, boyalar, pestisitler, alkoller, çevresel kimyasallar gibi) kaynaklı çok çeşitli lipofilik bileşikler metabolize ederler (Lu ve Levin 1974, Arıncı ve Philpot 1976, Nebert ve Gonzales 1987, Gonzales 1989, Porter ve Coon 1991, Hasler vd 1999, Orellana ve Guajardo 2001, Oleksiak vd 2002, Nebbia vd 2003). Sitokrom P450 enzimlerinin bazı substratları Tablo 1.4'de verilmiştir.

**Tablo 1.4** Bazı Sitokrom P450 Substratları (Porter ve Coon 1991).

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

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıda verilmiştir:



Reaksiyonda substrat (R) alkan, alken, aromatik halka ya da heterosiklik sübstituentler gibi oksijenasyon için olanak veren bir bölgeye sahiptir. Reaksiyon bir monooksijenasyon ve enzim bir monooksijenaz olarak adlandırılır. Moleküler oksijenin yalnızca bir atomu substrata bağlanmış, diğeri ise suya indirgenmiştir. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi çok bileşenli elektron transport sistemi olarak fonksiyon görür. Mikrozomal sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin üç bileşeni vardır: Sitokrom P450, NADPH bağımlı Sitokrom P450 redüktaz ve lipid (Lu ve Coon 1968). Mikrozomal sistemde FAD ve FMN içeren NADPH bağımlı Sitokrom P450 redüktaz NADPH' dan sitokrom P450'ye elektron transferini katalizler. Bu enzim sistemi, hidrofobik ve hidrofilik peptid içeren membrana bağlı bir amfipatik proteindir (Gum ve Strobel 1981, Black ve Coon 1986).

Bu enzimler, bir metil grubunun karbon atomunun hidroksilasyonu, bir alkanın metilen karbonuna hidroksil grubu sokulması, fenol oluşturmak için aromatik halkanın hidroksilasyonu ya da epoksit oluşturmak için çift bağa oksijen atomu katılması gibi çok kompleks ve değişken reaksiyonları katalizler. Dealkilasyon reaksiyonlarında, oksijen, karbon-hidrojen bağına girmektedir. Ancak son ürün stabil değildir ve primer alkol, amit ya da sülfidril bileşiğine dönüşür. Azot, kükürt ve fosfor atomlarının oksidasyon ve dehalojenasyon reaksiyonları da sitokrom P450 tarafından katalizlenir. Sitokrom P450'ler tarafından katalizlenen bazı reaksiyonlar Tablo 1.5'te gösterilmiştir.

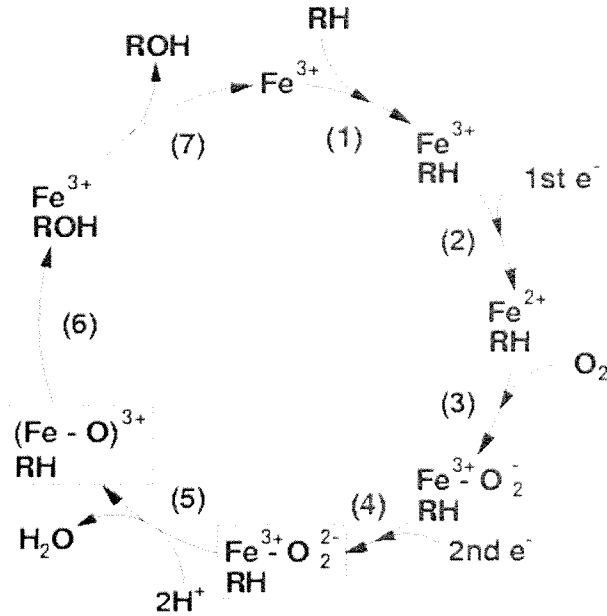
### 1.2.1.1. Sitokrom P450 Döngüsü

Sitokrom P450 proteinlerinin aktif bölgesi hidrofobik etkileşimlerle bağlanmış tek bir demir protoporfirin IX içerir. Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'nin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand su molekülü tarafından bağlanmış olan substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda  $O_2$ 'ne bağlanmaktadır.

**Tablo 1.5** Örnek Substratlarla Sitokrom P450'lerce Katalize Edilen Genel Reaksiyonlar (Schenkman, 1991; Guengerich 1993)

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

Genel olarak, P450'ler Şekil 1.4'te gösterilen reaksiyon döngüsüne girerler. Çeşitli bileşiklerin hidroksilasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH Sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Substrat RH öncelikle  $Fe^{3+}$  formu ile kombine olur. Daha sonra oksijenlenir ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürür. Bir iç oksidoredüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın ve suyun oluşumu gerçekleşir. Serbest sitokrom P450  $Fe^{3+}$  formunda rejenere olur. NADPH-Sitokrom P450 redüktazdan sitokrom P450'ye elektron transferine lipidlerin yardımcı olduğu gösterilmiştir (Lu ve Levin 1974). Sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin tüm üç bileşenide (NADPH-Sitokrom P450 redüktaz, Sitokrom P450 ve lipid) hidroksilasyon aktivitesinin oluşturulmasını sağlar (Lu ve Coon, 1968, Arınç ve Philpot 1976, Black ve Coon 1986, Adalı ve Arınç 1990, Oleksiak vd 2002).



**Şekil 1.4** Sitokrom P450 Reaksiyon Döngüsü: Döngü, 1) Substrat ile sitokrom P450 arasında bir kompleksin oluşması, 2) Oluşan kompleksin NADPH'a bağımlı sitokrom P450 redüktazdan bir enzim olarak indirgenmesi, 3) Bir oksijen molekülünün indirgenmiş sitokrom P450-substrat kompleksine bağlanmasının ardından, 4) İkinci bir indirgenmeyle peroksit dianyon-sitokrom P450 kompleksinin oluşması, 5) Bir oksijenin koparak su halinde ayrılmasıyla, 6) Elektron eksikliği olan oksijenin substratı okside ederek ürün oluşturması ve 7) Oluşan ürünün enzimin aktif bölgesinden ayrılarak serbest hale geçmesi aşamalarından oluşur.

### 1.2.1.2. Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Son on yılda, sitokrom P450'nin baz dizilimi ve yapısı tespit edilmiş, sitokrom P450 regülasyon ve evrimini anlamamızı sağlayan bilgiler çığ gibi artmıştır. Son 5–50 milyon yıl içinde meydana gelen gen dublikasyonlarına bağlı olarak birçok CYP450 formları ortaya çıkmış ve çeşitli türlere dağılmıştır. Günümüzde çeşitli hayvanlarda tanımlanan farklı CYP450 formları; diyet alışkanlıkları veya çevresel etkenlere maruz kalma gibi çevresel etkenlerin selektif baskısı sonucu ortaya çıkmaktadır. Primordiyal genlerin endojen substratları metabolize eden CYP450 enzimlerini üretmesi mümkündür. (Frey M vd 1995). Filogenetik incelemeler, oluşan aminoasit dizileri ve evrimsel değişim oranlarının sabit olduğu farzedilerek ilk CYP450'nin ortaya çıkması ile ilgili bir tahmin yapılırsa karşımıza metabolize yağ asitleri çıkmaktadır. Bu nedenle, CYP450'nin ilk ökaryotlarda membran bütünlüğünde rol oynadığı söylenebilir.

Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlenmelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir (Nebert vd 1987). Bu sistemde her bir sitokrom P450 için belirli aileyi tanımlamak için rakamlar verilir. Bunu, alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler ve bir diğer rakam özgün P450 formunu göstermek için kullanılır. Örnek olarak 1A2 ve 2E1 verilebilir. CYP terimi ise sitokromun "cytochrome" ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Bu adlandırma sisteminde sitokrom P450 1A2 ve 2E1 CYP1A2 ve CYP2E1 olarak gösterilir. Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog amino asit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır (Nebert vd 1991, Nelson vd 1996).

### 1.2.1.3. İlaç Metabolizmasında Önemli Olan CYP450 Enzimleri

#### 1.2.1.3.1. CYP1 Ailesi

Sitokrom P4501 ailesi enzimleri (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1), poliaromatik hidrokarbonları (PAH), poliklorlu bifenilleri (PCB) ve arilaminleri içeren çevresel kontaminantların hidrolize edilmesinde önemli role sahiptirler. Bu nedenle tanımlanan ve daha sonra saflaştırılan ilk P450 ailelerinden birisidir,

indirgenmiş sitokrom P450 proteinlerinin CO ile oluşturulan komplekslerinin 448 nm'deki maksimum absorpsiyonu nedeniyle P448 olarak adlandırılan CYP1 üzerinde en çok çalışma yapılan ailedir. CYP1 ailesi 1A ve 1B adlı iki alt aileyi kapsayan küçük bir ailedir. İlk bahsedilen alt aile iki protein içerirken sonraki bir protein içerir. CYP1A2 esasen karaciğerde eksprese edilir ancak CYP1A1 ve CYP1B1'in hepatik seviyesi düşüktür (Bhattacharyya vd 1995). Bir başka deyişle CYP1A2'nin tersine sonraki iki protein ekstra hepatik dokularda hissedilir oranda bulunmaktadır. Ancak yine de CYP1A2 ve aktivitesi insan akciğeri ve diğer ekstra hepatik dokularda bulunduğu bildirilmiştir (Mace vd 1998).

İnsanların ve kemirgenlerin her ikisinin de karaciğerindeki büyük CYP450 ailesi içeriği CYP1 değildir. Sıçan karaciğerindeki CYP450 içeriğinin %5'inden azını, insan karaciğerindeki ise %10 kadarını oluşturmaktadır. Ancak sığır karaciğerinde, geyikte ve bazı maymun ırklarında sıçan ile karşılaştırıldığında, CYP1 aktivitesi için en sık kullanılan marker olan etoksiresorufin ile ölçüldüğü gibi, daha yüksek ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir (Stevens vd 1993, Sivapathasaram vd 2003). Yeniden oluşturulmuş sistemlerde saflaştırılmış sitokrom P450 proteini kullanılarak yapılan çalışmalarda CYP1A2'nin uroporfirinojenin uroporfirine oksidasyonunu katalize ettiği ve bu isoformun ve uroporfirinün üriner boşaltımında rol aldığı bildirilmiştir (Kawajiri ve Hayashi 1996, Lambrecht vd 1992, Sinclair vd 1998). Benzer bulgular vahşi hayvan türlerinde uroporfirini indükleyen bireylerle birlikte, CYP1A2 " knockout " farelerde, saptanmıştır (Nichols vd 2003, De Matteis vd 1991, Zaccaro vd 2001).

#### 1.2.1.3.1.1. CYP1A Alt Ailesi

Sitokrom P450'ler arasında sitokrom P4501A kanserojenlerin biyoaktivasyonunda önemli bir rol oynar. En fazla sitokrom P450 çalışması sitokrom P4501A üzerinedir. İnsandaki CYP1A alt ailesi 3 üyeden oluşur: CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1'dir. CYP1A1 genellikle ekstrahepatik dokularda görülürken, CYP1A2 genelde karaciğerde görülür. CYP1A1'in indüklenmesine; akciğer ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda sigara kullanımı ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyeti neden olur. Karaciğerde CYP1A1 çok düşük seviyede görülür (Guengerich 1991, McKinnon vd 1991, Pasanen ve Pelkonen 1994, Raunio vd 1995, Pelkonen vd 1998).

P4501A1, çeşitli organik kimyasalların oksidasyonunu katalizleyerek onları daha hidrofilik veya Faz II enzimleri tarafından ileri konjugasyonlara uğratılabilecek formlara dönüştürüp vücuttan atılımını sağlayan sitokrom P450 bağımlı monooksijenazların alt ailesidir. Sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar ayrıca yabancı kimyasalların reaktif ara ürünlere aktivasyonundan da sorumludur. Özellikle P4501A1 izozimi, PCB, PAH ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini katalize eder. PAH'ların bir üyesi olan, sigarada, petrol ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda bulunan benzo(a)piren (B(a)P), mutajenik ve karsinojenik forma CYP1A1 tarafından katalize edilerek dönüştürülür (Conney ve Burns 1972, Heidelberger 1973). Sitokrom P4501A proteini karsinojenlerin aktivasyonu ve metabolizmasındaki rolleri (Gelboin 1980, Conney 1982, Parkinson 1995, Stegeman 1995), çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyelleri nedeni ile oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır (Payne vd 1987, Goksoyr ve Förlin 1992, Bucheli ve Pent 1995, Arınc vd 2000). B(a)P hidroksilasyonu ve 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) reaksiyonları için en temel katalizördür. 3-MC, B(a)P, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), poliklorlubifenil (PCB) ve diğer halojenli bileşikler sitokrom P4501A1'in güçlü indükleyicileri olarak bilinirler (Teles vd 2004). Bununla birlikte muamele olmamış canlılarda çok zor tespit edilirler.

CYP1A2 insan karaciğerinde PCB, PAH, sigara içimi, sebzelere turpgiller grubu, çok pişmiş et ve çevresel kirlenmelere maruziyet sonucu indüklenir (Adams vd 1997). 4-aminobifenil, 2-aminoantrasen ve 2-naftilamin gibi bazı arilaminlerin metabolizmaları CYP1A2 tarafından gerçekleştirilir (Guengerich 1991). İnsan karaciğerindeki toplam CYP enzimlerinin %5'i CYP1A2'dir (Pelkonen ve Bremier 1994, Shimada vd 1994). İnsan karaciğerinde CYP1A2 enzim düzeyinde bireylerarası bazı farklılıklar vardır (Shimada vd 1994). Bu farklılıkların çok olması nedeniyle, in vivo testlerle CYP1A2 aktivitesinin tayini oldukça zordur (Kunze ve Trager 1993) ve bu nedenle propranolol, fenasetin, parasetamol, ondansentron, olanzapin, kafein ve teofillin gibi çok değişik substratlar CYP1A2 için kullanılmaktadır. Kafein ve teofillin in vivo çalışmalarda kullanılırken in vitro çalışmalarda daha çok CYP1A2'nin spesifik katalizörü olarak bilinen etoksiresorufin kullanılmaktadır (Burke vd 1985).

### 1.2.1.3.1.2. CYP1B Alt Ailesi

CYP1B1 çok çeşitli PAH'ı ve heterosiklik amini aktive eder (Shimada vd 1996). Ayrıca CYP1B1'in; aflatoksin B1'in mutajenik metabolitlere dönüştürülmesini ve o-hidroksillenmiş östradiolün 4-hidroksiöstradiole dönüştürülmesini sağlamak gibi özel bir aktivitesi vardır (Crespi vd 1997, Spink vd 1994, Hayes vd 1996). İnsan CYP1B1'i B(a)P'nin, kanserojenik metabolit "diol epoksit 2" ye dönüştürülmesini katalize eder. Bu işi nispi oran olarak CYP2A1'den yüksek seviyede CYP1A1'den düşük seviyede yaptığı bildirilmiştir (Kim vd 1998). Çin hamsteri V79'un hücre hatları insan CYP1B1'inin ve CYP1A1'inin stabil ekspresyonu için geliştirilmiş ve bugüne kadar bilinen en güçlü kanserojenik PAH olan dibenzo[a]piren'in, DNA üzerindeki etkilerinin araştırılması için kullanılmıştır (Kim vd 1998). İnsan CYP1B1 ve CYP1A1'inin DB[a]P aktivasyonunda stereokimyasal seçiciliklerine göre ayrıldıkları saptanmıştır (Luch vd 1998).

Polimorfik insan CYP1B1'inin katalitik özellikleri üzerinde Shimada (1999) çalışmıştır. 4 allelik CYP1B1 değişkeni insan NADPH-P450 reduktazı ile birlikte *Escherichia coli*'de ekspres edilmiştir. Rekombinant proteinler, prokanserojen ve steroidleri de içeren türlü P450 substratına karşı katalitik aktivitelerini tayin etmek için kullanılmıştır. Aynı eğilim; östrojen 4-hidroksilasyonun CYP1B1 değişkeni tarafından katalize edilen östrojen 2-hidroksilasyona olan oranında da görülmüştür. Sonuçlar; insandaki CYP1B1 geninin polimorfizminin, prokanserojenlere ve meme kanseri ile solunum yolları kanserlerine karşı bireysel hassasiyetlere katkıda bulunan steroid hormonunun, katalitik fonksiyonlarında değişkenliğe neden olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte CYP1B1'in allelik değişkenlerinin PAH metabolizmasındaki etkisi henüz yeterli derecede anlaşılamamıştır. Tütün kullanımı ve insan baş ve boyun kanserleri (SCCHN) arasındaki bağlantı Ko ve ekibi tarafından yapılan çalışmalar araştırılmıştır. Ko ve ekibi 312 SCCHN vakası ve 300 kanser olmayan kişi üzerinde de CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genetik değişkenlerinin SCCHN oluşumlarına sigara içmenin oluşturduğu etkileri araştırıldı. Ulaşılan sonuç CYP1A1, GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 genlerinin tek başlarına genel bir etkileri olmadığı yönünde olmasına rağmen CYP1B1 kodon 432 polimorfizmi içiciler arasında hassas bir faktör olarak tanımlandı. (Ko vd 2001).

### 1.2.1.3.2. CYP2 Ailesi

CYP1 ailesinden farklı substratlarla katalize edilen, farklı bir alt aile takımı içeren ve farklı düzenleyici kontrolü olan en geniş CYP450 ailesidir.

#### 1.2.1.3.2.1. CYP2A Alt Ailesi

İnsanlarda CYP2A alt ailesinde üç gen vardır; 2A7, 2A13 ve 2A6. CYP2A7 enzimi aktif değildir ve CYP2A13 enzimi karaciğerde görülmez; CYP2A6 kodlu enzimse kumarin 7-hidroksilazı katalize eder (Pelkonen vd 2000). Mukozanın koku alma duyusuyla ilgili olarak CYP2A13 oldukça aktif bir protein olarak belirtilmiştir. Son zamanlarda CYP2A6 enziminin insan karaciğerinde polimorfik olarak işlev gördüğü belirtilirken CYP2A6 için hiçbir endojen substrat bulunamamıştır. Bununla birlikte CYP2A6 enziminin nikotin metabolizmasına ve onun metaboliti olan kodeinine katıldığı görülmüştür (Nakajima vd 1996a). Ayrıca bu enzim aflatoksin gibi pek çok promutajen ve prokanserojenin ve pek çok nitrosaminin metabolik aktivasyonunu katalize eder (Yamazaki vd 1992, Tiano vd 1994). Halathon ve kumarininde dahil olduğu bazı ilaç ve kimyasallar bu enzim tarafından katabolize edildikleri için aktivitesi hem in vivo hem de in vitro deneylerde, yaygın olarak araştırma maddesi olarak kullanılırlar (Rendic ve Di Carlo 1997, Pelkonen vd 1998).

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar CYP2A6'nın katalize ettiği kumarin7-hidroksilazın, üzerine etkileri hakkında yaygın olarak kullanılan P450 substrat ve inhibitörler hakkında geniş çalışmalar yapılırken, yine sıkça kullanılan bazı çözücülerin aynı reaksiyondaki etkilerini de gözlemlediler. Çalışılan pek çok kimyasalın CYP2A6'nın inhibitörleri olduğunu buldular. Örneğin; ketokonazol CYP3A4'ün özel inhibitörüken, hayli güçlü bir şekilde CYP2A6'yı da inhibe ettiği keşfedildi. Ayrıca yaygın olarak kullanılan pek çok organik çözücünün de kumarin 7-hidroksilaz'ı inhibe ettiği belirtilmiştir. Pek çok substrat ve inhibitörün in vivo ve in vitro deneylerde CYP2A6 tarafından metabolize edildiği veya bu enzimle birbirini etkilediği bilinmektedir (Pelkonen vd 2000).

#### 1.2.1.3.2.2. CYP2B Alt Ailesi

CYP2B6; bir genomda CYP2B7 geni bulunmuş olmasına rağmen, tek aktif CYP2B alt ailesi üyesidir (Czerwinski vd 1994). Uzun bir zaman boyunca CYP2B6'nın her insan karaciğerinde bulunmadığı düşünülüyordu. Örneğin Mimura ve arkadaşlarının 50 karaciğer örneğinde "immunoblotting" analizi (anti-maymun P4502B antikoru kullanarak) ile karaciğerlerin sadece ¼'ünün

CYP2B6 proteini içerdiğini gösterdi. CYP2B6'nin en yüksek miktarı toplam P450'nin %2'si olarak bulundu. Bugün pek çok grup bu enzimin her insanın karaciğerinde görüldüğünü; ancak seviyesinin bireylerarası farklılık gösterdiğini anladı (Ekins vd 1997, Stresser ve Kupfer 1999). Bir insan karaciğerindeki CYP2B6 proteininin miktarı toplam P450'nin %1'inin altındadır ve önceki raporlarda bu proteinin bireylerde görülemeyişinin nedeni muhtemelen kullanılan antikörlerin yeteri kadar hassas olmaması ve araştırma metodlarının yetersizliği olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde ise nicel immunolojik çalışmalara imkan veren oldukça hassas ve özel antikörler mevcuttur (Stresser ve Kupfer 1999). Bu bize CYB2B6 enzimine dair diğer çalışmalara benzer şekilde, bu enzimin ekspresyonunun oldukça değişken olduğunu göstermektedir. CYP2B6'nin CYP3A4 ile yeniden düzenlendiği ya da en azından kültüre alınmış insan hepatositlerindeki fenobarbital yanında rifampisin ve deksametazon gibi aynı indükleyicilerle indüklenebildiği varsayılmıştır (Strom vd 1996). CYP2B6'nin aktivitesi son zamanlarda pek çok grup tarafından ciddi araştırmalarda incelenmiştir. Özellikle Ekins ve grubu pek çok kimyasal ve ilacı, bu enzimin özel substratları olarak değerlendirdiler. CYP2B6 katalize edildiği öne sürülen reaksiyonları arasında 7-etoksi-4-triflorometilkumarin (7-EFC)'nin O-deetilasyonu ve S-mefenitoin N-demetilasyonu vardır. Yakın zamanda Kobayashi, CYP2B6'nin S-mefobarbital N-demetilasyon'daki rolünü cDNA-ekspres edilmiş insan sitokromları kullanarak araştırılmıştır. Sadece CYP2B6'nin reaksiyonu katalize ettiği bulunmuştur. Ayrıca tayin edilen aktivite aynı örneklerden alınan mikrozomlarda immünolojik olarak ölçülen CYP2B6 seviyesi ile kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Eğer bu substrat (S-mefobarbital), R-enantiomer'ından kolayca ayrılabilirse, bu aktivite muhtemelen oldukça kullanışlı olacaktır. Fenobarbital metaboliti yaygın olarak P450'yi ortaya çıkarıcı etken olarak kullanılmaktadır (Pelkonen vd 1998). Orfenadrin; her ne kadar isoforma yönelik seçiciliği sorgulanabilir olsa da, CYP2B6'nin yaygın şekilde kullanılan inhibitörüdür (Murray ve Reidy 1990, Chang vd 1993, Ekins vd 1997, Gue vd 1997). Yoğun araştırmalara rağmen, henüz CYP2B6'nin seçici inhibitörü bulunamamıştır.

#### 1.2.1.3.2.3. CYP2C Alt Ailesi

CYP2C insan karaciğerinde en çok bulunan ikinci CYP proteindir, toplam P450'nin %20 kadarını teşkil eder (Shimada vd 1994). Bu alt aile CYP2C8, CYP2C9 ve CYP2C19 isimli üç üyeden oluşur. Bunlardan CYP2C9 ve CYP2C19 polimorfik olarak karakterize edilmişlerdir (Goldstein ve Morais 1994, Gill vd 1999). CYP2C8' in insan karaciğerinde düşük oranlarda bulunduğu belirtildiğinden beri, bu enzimin ilaç metabolizmasına çok önemli bir rol oynamadığı düşünülmektedir. Fakat taksol gibi güçlü kanser ilaçları, kısmen CYP2C8 tarafından metabolize edilmektedir (Haris vd 1994, Sonnichsen vd 1995). CYP2C8 ayrıca, retinol ve retinoik asit gibi endojen ajanların metabolizmalarına da katılır (Leo vd 1989). CYP2C9 insan karaciğerindeki temel CYP2C izoformudur ve aktif protein üreten en az 3 farklı alelli polimorfizm gözlenmektedir (Goldstein ve de Morais 1994). S-warfarin tolbutamid, fenitoin, sülfametoksazol gibi zayıf asidik ilaçlar ve pek çok non-steroidal anti-enflamatuar ilaçların metabolizmalarında CYP2C9'un önemli bir rolü olmasına karşın, bu polimorfizmlerin klinik sonuçları henüz net olarak ortaya konamamıştır (Pelkonen vd 1998). Zayıf metabolize edici (PM) fenotipleri CYP2C19'un en az iki temel ve pek çok küçük farklı alellerin sonucu oluşurlar ve bunun sonucunda ise CYP2C19 substratları beklenen kadar metabolize edilemezler (Pelkonen vd 1998). Bu durum ilaçların vücutta birikmesine ve in vivo konsantrasyonlarının tedavi edici seviyeyi aşmasına ve beklenmeyen toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. CYP2C19 seçici inhibitörü için yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, genel olarak kullanılan ve diğer CYP'leri de inhibe eden omeprazolden beri devam etmektedir (Funck-Brentano vd 1997). 2C19'da genetik mutasyon olma sıklığı çok fazladır. Kişilere göre ilaç etkilerinin farklılıkları bu şekilde ortaya çıktığı öne sürülmektedir.

#### 1.2.1.3.2.4. CYP2D Alt Ailesi

İnsan genomu CYP2D alt ailesinde, CYP2D6 olarak adlandırılan tek bir fonksiyonel geni içerir (Nelson vd 1996). Bu genomda ayrıca iki tane CYP2D7 psödo geni ve iki tane de CYP2D8 psödo geni mevcuttur (Heim ve Meyer 1992, Nelson vd 1996). CYP2D6 için 60'tan fazla allel olduğu belirtilmiştir (Streetman vd 2000). Bunlardan en etkili eksprese edilmiş proteinin aktivitesidir. CYP2D6, toplam P450'nin %1 ila %5'i kadarıdır ve Kafkasyalıların %7-8'i bu enzim için zayıf metabolize (PM) edicilerdir (Heim ve Meyer 1992). CYP2D6 için endojen substratların araştırılması yakın zaman da daha da ilgi çeken bir hale gelmiştir çünkü çalışmalar CYP2D6'nin Parkinson hastalığı (Barbeau vd 1985, Armstrong vd 1992, Ağünder vd 1995), akciğer ve karaciğer kanserlerinin gelişime yatkınlığıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Idle 1981, Ayeshe vd. 1984, Ağünder vd 1994, Caporaso vd 1995, Bouchardy vd 1996). CYP2D6'nin endojen substratı olarak bir nörotransmitter olan, triptamin önerilmiştir (Martinez vd 1997). Triptofolde ki triptaminin metabolizması spesifik bir CYP2D6 inhibitörü olan, kinidin tarafından inhibe edilmiştir. CYP2D6 çok yaygın eksojen substrat özgüllüğüne sahiptir.

CYP2D6 substratları için yaygın özelliklerden biri oksidasyon alanından 5 veya 7A° uzaklıkta en az bir temel nitrojen atomu içeriyor olmalarıdır. İkincisi oksidasyon bölgesinin yakınında bir düzlemsel hidrofobik alan vardır. Üçüncüsü substratlar molekülün düzlemsel parçasının üstünde negatif moleküler elektrostatik potansiyel sergilerler (Koymans vd 1992, Strobl vd 1993, de Groot vd 1997). Bu enzim için substrat olarak bilinen ilaçlar, antiaritmik ve diğer kardiyovasküler haplar,  $\beta$ -adrenerjik bloke edici ajanlar, trisiklik antidepresanlar, nöroleptikler ve yaygın olarak kullanılan pek çok terapötik ajanları içerir (Cholerton vd 1992). In vitro model reaksiyonlarda en çok kullanılanlar dekstrometorfan O-demetilasyon, debrisoquin 4-hidroksilasyon ve bufuralol 1'-hidroksilasyon'dur. Bu substratlardan debrisoquin, artık pazarlanmadığı için kullanımı zorlaşmış olsa da, in vivo çalışmalarda CYP2D6 modelinin etken maddesi olarak kullanılmaktadır (Pelkonen vd 1998).

CYP2D6 inhibitörü olarak kinidin, ilaç metabolizması çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Ki değeri 0,06  $\mu$ M olan kinidin CYP2D6 için özel ve güçlü bir inhibitördür (Broly vd 1989, Bourie vd 1996). Sitokrom P4502D6 (CYP2D6), birçok tipik ve atipik antipsikotiklerin ve antidepresanların metabolizmasında rol oynamaktadır. Sertindol CYP2D6 üzerinden, risperidon temel olarak CYP2D6 çok az olarak CYP3A4, olanzapin CYP1A2 ve CYP2D6 ve klozapin birincil olarak CYP1A2 ve CYP3A4 ikincil olarak CYP2C9 ve CYP2D6 üzerinden metabolize edilmektedir. CYP2D6 enzimi trisiklik antidepresanların çoğu, bazı selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSGI), bazı diğer antidepresanlar (venlafaksin ve nefazodonun metaboliti m-klorofenilpiperazin ve trazodon),  $\beta$ -blokörler, antiaritmikler ve opiatların metabolizmasından sorumludur (Bertz ve Granneman 1997, Aynacıoğlu 1999). Bu enzimin polimorfik olduğu ve buna bağlı olarak birçok ilacın metabolize edilme hızında bireyler ve toplumlar arası farklılıkların bulunduğu bilinmektedir (Aynacıoğlu vd 1999). Bu enzimin aktivitesi bakımından bireyler yavaş, orta, hızlı ve ultra hızlı metabolizörler olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar. Bu enzimin aktivitesi toplumdan topluma değişiklik gösterebildiği gibi psikiyatrik hasta grubunda bu farklılıkların normal popülasyondan farklı olabileceği belirtilmektedir. A.B.D. ve Avrupa'da yavaş metabolizör oranı yaklaşık %7 iken (Chen vd 1996, Sachse ve diğ. 1997), A.B.D.'de bir psikiyatri hastanesinde yatarak tedavi gören 100 hasta üzerinde yapılan çalışmada hastaların %14'ünün yavaş metabolizör oldukları bulunmuştur (De Leon ve diğ. 1998). Ultra hızlı hastalarda verilen ilacın etkili kan düzeyine çıkamaması nedeniyle psikotik semptomlar düzelmeyebilir. Antipsikotiklerin etkisiz denebilmesi için 4-6 hafta beklenildiği de göz önünde bulundurulursa hasta ve hekim için vakit ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bork ve arkadaşları (1999), özellikle birden fazla ilaçla tedavi edilmeye çalışılan hastaların CYP2D6 enzim aktivitesinin bilinmesinin yararlı olacağını belirtmektedirler. Diğer yandan yavaş metabolizörlerde bazı ilaçlar etkisiz de kalabilmektedir. Örneğin, ağızdan alınan kodeinin yaklaşık %10'u P450-2D6 aracılığı ile metabolize olur ve morfine dönüştürülür. Bu dönüşüm yavaş metabolizör hastalarda yapılamayacağı için, bu grup bireylerde kodeinin analjezik etkisi çok az olur veya hiç olmaz. Yine yavaş metabolizörlerde CYP2D6 aracılığı ile metabolize edilen ilaçların etki süreleri uzamakta veya kan düzeyleri toksik konsantrasyonlara yükselebilmektedir (Coutts ve Urchuk 1999, Bork vd 1999). Piyasada CYP2D6 tarafından metabolize edilen çok sayıda ilaç olması ve bu proteinin ekspresyonun polimorfik doğasından kaynaklanmaktadır. Bu enzimin varlığı veya yokluğu ile Parkinson hastalığı, bazı kanserler, Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara duyarlılığı değiştirebildiği bildirilmiştir.

#### 1.2.1.3.2.5. CYP2E Alt Ailesi

CYP2E1'in kodlama bölgesi farklı ırklar ve türler arasında büyük oranda korunmuştur. Polimorfizmde pek çok ırklar arası farklılıklar vardır ancak herhangi bir polimorfizmin değişmiş bir in vivo aktiviteyle ilgili olduğuna dair doğrudan kanıt yoktur. Polimorfizmlerin endojen biyotransformasyonunda önemli bir rolü olduğu ileri sürülerek, bildirilen bütün polimorfizmler genin kodlanamayan bölgesinde de bulunmuştur (Ronis vd 1996, Yin vd 1997). CYP2E1 ekspresyonu pek çok faktör tarafından düzenlenir. Örneğin izoniazid translasyon etkinliğini artırıp enzim stabilizasyonunu etanozol ve imidazol'e benzer şekilde etkilerken, perhiz; genin transkripsiyonunu artırarak protein ve mRNA seviyesini dengelediği bilinmektedir (Park vd 1993). Genel olarak; bu enzim geniş sayıda düşük moleküler ağırlıklı bileşiği metabolize eder (moleküler ağırlığı<100), bunlardan birçoğu endüstriyel çözücüler (karbon tetraklorür, kloroform, vinil klorür gibi) ve bileşenleri toksikolojik ve kanserojenik öneme sahip kimyasal katkı maddeleridir. Ayrıca birçok halojenli anesteziyikler (halotan, enflaron, izoflaron) ve ilaçlar (asetaminofen, kloraksazon) CYP2E1 tarafından katalize edilirler. Çeşitli CYP2E1 substratlarından biri olan, NDMA metilasyonu, p-nitrofenol hidroksilasyonu ve kloraksazonun 6-hidroksilasyonu bu enzim seviyesinin görüntülenmesinde en etkin olanlardır (Lieber 1999, Tanaka vd 2000). Birçok ekzojen substratın yanı sıra CYP2E1, aseton, asetat gibi birçok endojen bileşikler ve araşidonik asit, laurik asit, linoleik asit gibi uzun zincirli yağ asitlerini metabolize edebilir (Lieber

1999, Klotz ve Amman 1998). Aseton ve keton yapıları 2E1 tarafından glikoz sentezinde kullanılabilen asetal ve metilglioksola metabolize olur. Asetonun çoğunluğunun bu oksidatif yolla metabolize olduğu gösterilmiştir (Landau ve Brunengraber 1987). CYP2E1 substratları pek çok klinik ilacı da içerir. Aslında burada bahsetmeye değer olanlar sadece parasetamol, kafein, klorzoksazon ve enfluran'dır. Çoğu organik solvent ve anestezi, alkol ve çoğu nitrosamin ve azo kanserojenler de bu enzimin ksenobiyotik substratlarıdır (Hong ve Yang 1985, Yang vd 1985, Sohn vd 1991, Koop 1992). CYP2E1; lipid peroksidasyon ürünleri, ketonlar, yağ asitleri gibi pek çok endojen maddenin metabolizmasına katılır. Piridin özel bir CYP2E1 in vitro inhibitörüdür ve CYP2E1'i nispeten daha düşük konsantrasyonlarda inhibe eder (Hargreaves vd 1994). Disülfram metaboliti dietildiyokarbamat, in vitro inhibitör olarak kullanılmıştır ancak seçiciliği şüphelidir.

Diğer CYP2 alt ailerinden; CYP2G1 sadece hayvanların burun mukozalarında ekspres edilen bir proteindir. Bu protein herbisitlerden 2,6- diklorobenzonitrinin ve parasetamolün biyoaktivasyonunda rol oynar (Genter vd 1998, Gu vd 1998). Bir diğer CYP2 alt ailesi olan CYP2F karaciğerden düşük miktarda ekspres edilen ve tek bir gen içeren bu aile akciğerde mevcuttur. Akciğerde 3-metilindol toksinini metabolize eder (Thornton-Manning 1991). Fare akciğerinde "clara" hücrelerinde lokalize olmuşlardır ve pulmoner bir toksin olan naftalinin epoksidasyonuna ek olarak benzopiren oksidasyonunu 7,8- epoksite kataliz ettiği gösterilmiştir (Schultz vd 2001). Ekstra hepatik dokularda ekspres edilen ve indüklenebilen 2J alt ailesi ise kimyasal kanserojenlerin biyoaktivasyonunda rol almaz (Xie vd 2000, Hukkanen vd 2002, Danielson 2002).

### 1.2.1.3.3. CYP3 Ailesi

CYP3 karaciğerde en çok bulunan ailedir ve tek bir alt aileyi içerir. N-dealkilasyon reaksiyonlarını katalize eden CYP3A4 ilaç metabolizmasında rol alan CYP450 enzimleri içinde, en aktif olanıdır. Ayrıca bağırsakta yüksek yoğunlukta bulunur (Rendic vd 1997, Thummel ve Wilkinson 1998). CYP3A alt ailesi, protein seviyesi bireyler arasında 40 kat değişebilmesine rağmen, insan karaciğerindeki toplam P450'nin %30'unu oluşturur (Shimada vd 1994, Pelkonen ve Breimer 1994). Bu alt aile 3 üyeden oluşur (Nelson vd 1996). İnsan karaciğerinde en çok bulunan CYP enzimi CYP3A4'tür ve pek çok dokuda ekspres edilir. Ancak ilaçların ve diğer kimyasalların metabolizmasında, karaciğer kadar ince bağırsaktaki ekspresyonda çok önemlidir (Guengerich 1999). CYP3A5 ise akciğerde ve kalın bağırsağın alt kısmında ekspres edilen daha önemsiz, polimorfik bir CYP3A enzimidir (Kivistö vd 1996, Anttila vd 1997, Gervot vd 1996). Farklı erişkin bireylerin %20 kadarı karaciğerlerinde yüksek seviyede CYP3A5 ekspres ederlerken, CYP3A7 ise fetal dönemde karaciğerde ve erişkinlerde ise endometriyum ve plasentada ekspres edilirler (Guengerich 1999, Schuetz vd 1993, Hakkola vd 1994).

CYP3A alt ailesinin üyeleri çakışan katalitik özelliklerin yanında, bazı seçici özelliklere de sahiptir. CYP3A4 günümüzde kullanılan ilaçların yarısının metabolizmasına katılır (Bertz ve Granneman 1997). Örneğin; testosteron 6β-hidroksilasyonu, midazolam 1'- ve 4-hidroksilasyonları, nifedipin oksidasyonu ve eritromisin N-demetilasyonu bu enzim tarafından katalize edilir. CYP3A4'ün bilinen substratları, asetaminofen (Mr 151), siklosporin A (Mr 1201) gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Guengerich 1999). CYP3A piyasadaki çok sayıda ilacın metabolize edilmesinden sorumlu enzimdir. Bu çok sayıda, zengin ilaç çeşidine siklosporin ve HIV proteaz inhibitörlerine ek olarak sisaprid ve artık piyasada bulunmayan non-sedatif antihistaminler terfenadin ve astemizol de dâhildir (Thummel ve Wilkinson 1998). CYP3A rifamfis, deksametason, karbamazepin ve fenobarbital gibi indükleyiciler tarafından indüklenebilir. CYP3A indüksiyonunun bireylerarası çeşitlilik üzerin de ve ilaç-ilaç etkileşiminde etkisi çok önemlidir (Guengerich 1999). CYP3A inhibitörlerinin geniş bir kimyasal yapı çeşitliliği vardır. Örneğin; funguslar, ketokonazol ve itrakonazol güçlü inhibitörlerdir. Ketokonazol diğer CYP'leri CYP3A4'ten daha çok inhibe eder (Newton vd 1994, Baldwin vd 1995). Ama bir 1 µM konsantrasyonun da, CYP3A4 için nispeten seçicilik gösterir. Bir CYP3A4 substratı olan gestadon steroid yapısıyla birlikte bir progesteron analogtur ve CYP3A inhibitörüne dayanan bir mekanizma olarak bilinir (Pelkonen vd 1998).

Substrat özellikleri ve CYP3A4'ün katalitik özellikleri son dönemde aktif araştırmaların hedefi olmuştur. CYP3A4'ün özelliklerinin henüz tam olarak açıklanamadığını pek çok grup çalışması göstermiştir (Ueng vd 1997, Korzekwa vd 1998, Wang vd 2000). Örneğin sitokrom b5'in rolü ve katalizdeki divalent katyonların üzerinde hala çalışılmaktadır (Guengerich 1999). Wang'ın, yaygın olarak kullanılan dört CYP3A4 substratıyla in vitro olarak ilaç-ilaç etkileşim üzerine yaptığı çalışmalarda; CYP3A4'ün çok kompleks bir enzim olduğunu ve gerçekleşen etkileşimlerinde substrat bağımlı olduğunu tespit edildi (Wang vd 2000). CYP3A4'le yapılan çalışmalarda takip edilen enzimatik



aktivitelerin yarışmalı inhibisyon kinetiklerini takip etmeyen CYP3A4 tarafından katalize edildiği gösterilmiştir. Bir substrat, hem bir başka substratın in vitro metabolizmasını inhibe edebilir veya harekete geçirebilir hem de kendi metabolizmasını harekete geçirebilir (Shou vd 1994). Kinetikler hem işbirliği içinde hem de allosterik, yani 2 substratın/inhibitörün moleküllerinin veya 2 substratın her birinin moleküllerinin veya bir efektör ve bir substratın bir molekülünün bağlanma bölgesine bağlı olabilirler (Shou vd 1994, Ueng vd 1997, Korzekwa vd 1998, Guengerich vd 1999, Wang vd 2000).

CYP3A4 katalize edilmiş reaksiyonun mekanizmaları konusunda, uzun zamandır bilinen işbirliğine rağmen, hala büyük bir ilerleme olmamıştır. Çalışmaların büyük çoğunluğu substrat ve efektör için en az iki ayrı bağlanma bölgesi olduğunu göstermektedir. Efektör bağlanma bölgesinin konumu (aktif alanda mı yoksa ayrı allosterik alanda mı olduğu) henüz bilinmemektedir (Ueng vd 1997). Harlow ve Halpert (1998); substrat ve efektör moleküllerinin bitişik alanlarda bağlı olduğu ve her ikisinin de aynı geniş bağlanma boşluğunun parçası olduğu, işbirliği modelini ortaya koyar. Bu model Shou tarafından ortaya konan modelle aynı görüşleri yansıtır. Bir istisna hariç, Shou ve ekibi (1994) her iki katalitik alanın her ikisinin de reaktif oksijene ulaşmak için işlem yaptığı görüşündedir.

Bu sonuçlara bakarak, talebi geniş bir substrat seçeneğiyle karşılanmış CYP3A4 aktif bölgesinin çok geniş ve esnek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Shou ve ekibi aktivitörün; aktif bölgeye bağlanma yaparken su moleküllerini substrat boşluğunun dışında tuttuğunu ve hidrojen peroksit salınımını engellediğini öne sürmüştür. Bu modeller hep birlikte ele alınarak atipik CYP3A4 kinetikleri; aktivasyon, otoaktivasyon, mutual inhibisyon, kısmi inhibisyon, substrat inhibisyonu, bifazik doygunluk eğrisi ve bölgeye spesifik alterasyonunu da içerir şekilde açıklanabilir. CYP3A4 üzerinde yapılan araştırmalara çok fazla emek harcanmasına rağmen, hala bu enzimin üzerinde çalışılması gereken pek çok özelliği olabilir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli bir rol oynadığından, sadece bir inhibitöre veya substrata dayanarak varılmış sonuçlar, geçici deneysel sonuçlar olarak görülmelidir.

#### 1.2.1.3.4. CYP4 Ailesi

CYP4; 1,25 milyar yıl önce, steroid biosentetik genlerinin formasyonundan hemen sonra, evrim geçiren en eski P450 ailesi üyelerinden birisidir. Bu ailenin kolesterol metabolize eden enzimlerle akraba olduğu ve bu iki ailenin, ilk ökaryotlardaki membran bütünlüğünün sürdürülmesinde birlikte yer almış olabileceği konusunda görüşler vardır (Nebert and Gonzalez, 1987). CYP4 gen ailesi, hem yapıcı hem de indüklenebilir ekspresyon gösteren izozimleri kodlayan 22 alt aileyi içerir. CYP4 ailesi insanlarda ve sıçanlarda daha çok böbreklerde ekspres edilirken, özellikle CYP4A sığır ve geyiklerde karaciğerde ekspres edilir (Sivapathasundaram vd 2003). Bu aile ksenobiyotiklere göre, yağ asitlerin ve eikonosoidlerin metabolizmasında daha baskın rol alır.

#### 1.2.1.3.5. CYP19 (Aromataz)

Aromataz, testesteron ve androstenedione gibi androjenleri östradiol ve östron gibi östrojenlere dönüştüren ve östrojen biyosentezinden sorumlu olan sitokrom P450 süperailisinin üyesi olan bir enzim kompleksidir. Bu enzim kompleksi hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunur ve iki ana proteinden ibarettir. Birinci protein olan sitokrom P450 aromataz, C19 steroidlerini (androjenler) fenolik A halkası içeren C18 steroidlerine (östrojenler) dönüştüren bir hem proteindir. İkinci protein olan NADPH-sitokrom P450 redüktaz ise indirgen değerlikleri sitokrom P450 aromataza transfer eder. Sitokrom P450 aromataz ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz proteinleri enzimatik aktivite için gereklidir ve bu enzim kompleksi düz endoplazmik retikulumda yer almıştır. Birinci protein sitokrom P450 aromataz bir hemoprotein olup C19 steroidlerini (androjenler) fenolik A halkası içeren C18 steroidlerine (östrojenler) dönüştürür. İkinci protein NADPH-sitokrom P450 redüktaz, indirgeyici değerlikleri sitokrom P450 aromataza transfer eder. Aromataz geni CYP19 şeklinde kodlanmış olup sitokrom P450 aromatazı kodlar (Simpson vd 1994). Bu gösterim C19 açılal metil grubunun oksijen tarafından atak bölgesi olduğu gerçeğinden temel almıştır (Thompson ve Siiteri 1974). Bir mol substratın bir mol östrojene dönüşümünde 3 mol NADPH ve 3 mol oksijen kullanılır. İlk iki oksijen molekülü standart hidrosilasyon mekanizmaları ile C19 açılal metil grubunu okside etmek için kullanılmakta, üçüncü oksijen molekülü ise C19 açılal metil grubu üzerine peroksidatif atak yapmaktadır. Dolayısıyla bu 3 mol oksijen molekülünün hepsi östrojenlerin fenolik yapı karakteristiklerinin vermek için A halkasının aromatazasyonu ile aynı zamanda C19 açılal metil grubunun formik asite oksidasyonunda kullanılmış olur. Bu enzim ilk defa 1959'da K. J. Ryan tarafından insan plasenta dokularında rapor edilmiştir. İnsanlarda, aromataz menapoz öncesindeki kadınlarda yumurtalıklarda, hamile kadınlarda plasentada ve erkek ve kadınların periferel adipoz dokularında bulunur ve bu dokular kan damarında östrojen sirkülasyonu için ana kaynaklardır.

(Simpson vd 1999). Aromataz ayrıca östrojenin yerel doku üretimi için de önemlidir. Aromataz aktivitesi meme dokusunda in vitro gösterilmiştir. Ayrıca, aromatazın ekspresyonu meme dokusu içinde veya yanında, aromataz enzimini içeren erkek ve kadınların beyininin çeşitli bölgelerinde, erkek testisinde ve ekek ve kadınların kemiklerinde en yüksek düzeydedir (James vd 1987). Aromataz geninin büyüklüğü 70 kilo bazı aşmakta olup 10 ekzondan ibarettir. İnsan aromataz geni 15q21.1. kromozomu üzerinde yer almaktadır (Simpson vd 1994). 3.4 kilo bazlık tam uzunluktaki cDNA yaklaşık 55.000 dalton molekül ağırlığındaki 503 amino asitlik bir proteini kodlar. Aromatazın çeşitli dokularda regülasyonu komplekstir ve CYP19 genini upstream bölgesinde birkaç doku spesifik promotör bölgeleri tanımlanmıştır. Bu doku spesifik promotörler P1.1, P1.2, P1.3, P1.4 ve PII dir. PII promotörü yumurtalık ve meme kanseri dokularında kullanılmakta olup cAMP cevap elementini içerir. Promotör 1.3 ve P1.4 adipoz doku gibi ekstrasgladular bölgelerde kullanılan asıl promotörlerdir ve IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF $\alpha$  gibi sitokinler ve glukokortikoyitlere uyumludur. Promotör P1.1 plasental dokularda kullanılan promotör olup regülasyonu halen geniş bir şekilde araştırılmaktadır (Simpson vd 1997).

### 1.2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimleri

GST'ler aerobik bakterilerden omurgalılara kadar geniş bir dağılıma sahiptir (Stenersen vd 1987, Kalinina vd 1988, Hayes ve Pulford 1995). Bu enzimler temel olarak karaciğerin sitozolik fraksiyonlarında lokalize olmalarına rağmen bütün dokularda bulunurlar (Sijm ve Opperhuizen 1989). Bu enzimler yüksek organizmalarda, özellikle de memeli türlerinde oldukça geniş şekilde araştırılmıştır (Mannervik vd 1985). Glutasyon S-transferaz enzimleri (GST'ler) [E.C.2.5.1.18] faz II biyotransformasyon enzimlerinden çok fonksiyonlu ve dimerik yapısı olan bir ailedir, protein dizilerine, izoelektrik noktalarına, substrat spesifikliğine, inhibitörlere olan hassaslıklarına ve immünolojik özelliklerine dayanarak 8 sınıfta toplanmışlar ve aerobik organizmalarda oldukça geniş olarak tanımlanmışlardır (Habig vd 1974, Keen vd 1976, Clark 1989, Meyer vd 1991, Rouimi vd 1996, Armstrong 1997, Board vd 1997, Perez-Lopez vd 2000). Çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin glutasyon (GSH) ile konjugasyonunu katalize ederler. Kataliz reaksiyonlarında GST'ler, elektrofilik substratlar üzerine glutasyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler (Jakoby ve Habig 1980, Hayes ve Pulford 1995, Armstrong 1997). Böylece GST'ler, dışarıdan alınan toksik yabancı maddelerin veya oksidatif basamakta oluşan ürünlerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar (Mosialou vd 1993, Bulavin vd 1996). Bu anlamda GST'ler, vücut için hayati koruyuculuk fonksiyonu üstlenmiş olan enzim gruplarından biridir. Ancak bunun yanı sıra GST'ler toksik ve karsinogenik bileşikler içeren çeşitli kimyasalların aktivasyonunda da rol alırlar (Jacoby ve Habig 1980, Ketterer 1988, Eaton ve Bammler 1999).

Çok geniş bir substrat spektrumuna sahip olan GST'lerin belirli substratlara karşı, spesifik aktiviteleri yeni tespit edilen GST'lerin sınıflandırılmasına imkan sağlar. Örneğin,  $\alpha$ -sınıf GST'ler kumen hidroperoksidine karşı oldukça reaktiftir (Mannervik vd 1985, Meyer vd 1991), M-sınıf GST'ler epoksitler için önceliğe sahip iken, P-sınıf GST'ler de etakrinik asite karşı oldukça reaktiftirler (Meyer vd 1991). CDNB substratı sınıf spesifik değildir ve alfa, mu, pi, teta sınıfı GST'ler ile etkileşebilir (Takamatsu ve Inaba 1994, Meyer vd 1991). GST'ler, konjugasyon oluşumunu kataliz etmelerinin yanı sıra peroksidaz veya izomeraz aktiviteleri de gösterirler ve çok çeşitli kimyasallara kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanabilirler (Mannervik ve Danielson 1988). Bu şekilde bu metabolitlerin, makromoleküller ile olası etkileşimlerinin önlenmesi ile, ekzojen ve endojen olarak tanımlanan elektrofilik intermediyer bileşiklere karşı vücudun çok önemli savunma sistemlerinden birini oluştururlar (Jakoby ve Habig 1980). GST'lerin varlığı ilk kez sıçan dokularında gösterilmiş (Booth vd 1961) ve birkaç GST izozimleri sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır (Habig vd 1974a ve 1974b, Keen vd 1976). Örtüşen substrat spesifikliğine sahip olan çok fazla GST izozimlerinin keşfi (Habig vd 1974a) ve bu enzimlerin çeşitli toksik bileşiklerin metabolizmasındaki rollerinin gösterilmesi, GSH-peroksidaz aktiviteleri (Prohaska ve Ganther 1977), hidrofobik molekülün hücre içi transportundaki katalitik olmayan bağlanmaları sayesinde toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda rol almalarının gösterilmesi (Jakoby 1978, Listowsky vd 1988) bu enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Son zamanlarda çeşitli patolojik ve çevresel faktörlerin bu izozimlerin ekspresyonunu etkilediğinin gösterilmesi de bu ilgiyi daha da arttırmıştır. Buna bağlı olarak, tümör markörleri olarak GST'lerin kullanımının mümkün olduğu önerilmiştir (Satoh vd 1985, Tsuchida ve Sato 1992, Kato vd 1995, Nielsen vd 1996).

### 1.3. İlaç Metabolizmasında Etkin Rol Alan Dokular

#### 1.3.1. Karaciğer

Vücut dokularına girişin bir portalı olarak karaciğer, gastrointestinal sistemler yoluyla; diyetlerden, yiyecek katkı maddelerinden, kontaminantlardan ve ilaçlardan kaynaklanan pek çok toksik maddenin etkisine açıktır ve deney hayvanlarında çoğunlukla bir hedefdir. İnsanda karaciğer hasarı daha az yaygındır ve karşıt ilaç reaksiyonlarının sadece %9 kadarı karaciğere etki eder. Karaciğer konumundan, yapısından, fonksiyonundan ve biyokimyasından dolayı, toksik bileşimlerden gelen zarara karşı hassastır. Gastrointestinal sistemler yoluyla vücuda alınan maddeler, hepatik-portal dolaşıma alınır ve portal damar yoluyla karaciğere geçer. Böylece gastro-intestinal mukoza ve kandan sonra karaciğer; vücuda alınan maddelerin etkisine açık hale gelmiş bir doku olur ve sistemik dolaşımdaki metabolik yolda diğer dokularinkine kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkar. Vücuttaki en büyük bez olan karaciğer, insan ağırlığının ve sıçan gibi diğer memelilerin vücut ağırlıklarının %2-3'ü kadarıdır. Karaciğer, yaklaşık iki hücre kalınlığındaki bir tabaka olarak düzenlenmiş hepatositlerden meydana gelmiştir. Karaciğer toksik maddeler için 4 nedenden dolayı hedef organ konumundadır: Karaciğerin birçok metabolik yeteneği pek çok yabancı bileşimi metabolize etmeyi mümkün kılar, ama metabolizma her zaman detoksifikasyonla sonuçlanmayabilir. Karaciğer metabolizmada ve sentezlerde kapsamlı bir role sahiptir ve bu nedenle endojen metabolizmada toksik etkilerin bertaraf edilmesinde etkin görev alır. Karaciğer tarafından salgılanan safra salgısı da bir faktördür. Diğer bir ihtimal enterohepatik dolaşım karaciğerdeki uzayan yüksek konsantrasyonların artışı sağlar. Kan akışı ise; karaciğerin, mide ve bağırsak sistemleri tarafından emilmiş toksik maddelerin yüksek konsantrasyonlarına açık hale gelmesini sağlar.

#### 1.3.2. Böbrek

Böbreğin fonksiyonu; fazla ürünü kandan süzerken, glikoz, aminoasit ve iyonlar (sodyum gibi) gibi zaruri maddeleri muhafaza etmektir. Böbreğin fonksiyonel bölümü nefrondur. Böbrek çeşitli nedenlerden dolayı toksiklerin hedef organı konumundadır. Renal kan akışı: Böbreğin vücutta sadece % 1 oranında yer tutmasına karşın, kalpten gelen kanın %25 kadarı memelilerin böbreklerinden geçer. Bu nedenle böbrek dokularının kan dolaşımındaki yabancı bileşimlere açıklığı, özellikle medulladan daha fazla kan alan korteksin açıklığı, göreceli olarak daha fazladır. Böbreğin konsantre edebilme yeteneği: Glomerular filtrelemeden sonra, su ve sodyumun %98-99 kadarı yeniden emilir. Bundan ötürü yabancı maddelerin konsantrasyonları, kandakinden ve tübüler sıvıdakinden oldukça fazladır. Örneğin sulfonamidler yüksek dozda verildiklerinde, tübül lümeninde daha az çözülebilir, nekrozlara neden olabilirler. Tübüler hücreler aracılığıyla bileşimlerin aktif taşınması. Kandan tübüler sıvıya aktif olarak taşınan bileşimler proksimal tübüler hücrelerde yığılır, bu özellikle de taşıma sisteminin doygunluğunun olduğu konsantrasyonlarda görülür. Metabolik aktivasyon: Böbrek, karaciğer kadar sitokrom P450 içermese de, böbrekte de metabolik aktiviteden sorumlu olmaya yetecek kadar P450 vardır. Aynı şekilde prostaglandin sentetaz sistemi gibi oksidatif enzimler zaten mevcuttur. Böyle metabolik aktivasyonlar kloroform ve parasetamolun renal toksisitesinin temelini oluşturabilir.

### 1.4. Deney Hayvanı

Çalışmalarımızda kullanılan Wistar albino sıçanların sistematigi Tablo 1.6'da verilmiştir.

**Tablo 1.6** Wistar albino sıçanın sistematigi

Süperalem	: Eukaryota
Alem	: Animalia
Filum	: Chordata
Altfilum	: Vertabrata
Sınıf	: Mammalia
Takım	: Rodentia
Alttakım	: Myomorpha
Aile	: Muridae

Cins : *Rattus*  
 Tür : *Rattus norvegicus*

Gelişmiş uyum gücü ve dayanıklılıkları nedeniyle sıçanlar birçok deney için uygun hayvan modelidirler. Günümüzde hayvan deneylerinin 1/5'inde sıçanlar kullanılmaktadır. Fizyolojik olarak insana büyük benzerlik göstermektedirler. Bu nedenle endokrinoloji, biyokimya, farmakoloji, deneysel fizyoloji, nörofizyoloji, onkoloji alanlarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Son yıllarda özellikle mikrocerrahi ve transplantasyon çalışmalarında ve eğitim amaçlı kullanımları artmıştır. Sıçanların deney hayvanı olarak kullanılmasına ilk defa 19. yüzyılda, kahverengi vahşi sıçan (*Rattus norvegicus*) ile başlanmıştır. Günümüzde kullanılan laboratuvar sıçanlarının atası bu türdür. Sıçanlar sistematik olarak evcilleştirilmiş ilk memeli türüdür. Laboratuvar sıçanı olarak kullanılan 3 önemli sıçan soyu bulunmaktadır. Bunlardan Wistar albino Wistar enstitüsünde 1906 yılında geliştirilmiş bir soydur. Sprague-Dawley albino 1925 yılında Wisconsin'de R.W. Dawley tarafından ticari amaçla geliştirilmiş bir soydur. Long-Evans kukuletalısı 1910 yılından itibaren çeşitli Wistar albinolar ile yabancı erkek sıçanın melezlenmesi ile elde edilmiştir. Siyah, mavimsi siyah veya beyaz renktedirler. Bu soya "kukuletalı rat" da denir. Bu üç soy içinde en çok kullanılanları Wistar ve Sprague-Dawley albinolarıdır. Wistarlar diğerlerine göre daha geniş bir kafa yapısına sahip ve daha kısa kuyrukludurlar. Ayrıca kullanımı çok yaygın olmayan Osborne-Mendel, Sherman ve Holtzman albino gibi soylar da bulunmaktadır.

Wistar albino sıçanların kılları sert, kalın ve uzundur. Pullarla örtülü olan kuyruğu bedeninden kısa veya bedeni kadardır. Kuyruk hem denge hem de termoregülatör görev üstlenmiştir. Dişleri köksüzdür ve yaşam boyu büyür. Ön ayaklar beş arka ayaklar dört parmaklıdır. Dişlerde genellikle altı çift meme başı bulunur. Beden uzunluğu baştan kuyruk ucuna kadar 20-25 cm'dir. Ergin sıçanların beden ağırlığı genetik yapı ve beslenme durumu gibi faktörlerle değişmekle beraber erkeklerde 300-800 g, dişilerde 200-400 g civarındadır. Yaşam süresi soylar arasında çok farklılık göstermekle birlikte erkeklerde 2,5-3 yıl, dişilerde 3-3,5 yıl kadardır. Albino olanlar yaygındır. Birçok özellik bakımından farelere benzerler, başlıca cüsselerinin iriliği ile farelerden ayrılırlar. İç organ anatomisindeki tek farklılık safra keselerinin olmayışıdır. Omnivordurlar. Selülozun sindirimi çekumda olur ve oluşan B vitaminleri koprofaji yoluyla sıçan tarafından alınır.

Sıçanlar yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip, çok değişik iklimlerde ve çevre şartlarında yaşayabilen ve üreyebilen hayvanlardır. Sıçanların araştırma ve keşif içgüdüleri vardır, meraklı fakat çekingendirler. Koku ve işitme duyuları çok gelişmiştir, buna karşın görme duyuları çok zayıftır. Normalde obur değillerdir ve günlük yem tüketimlerini kontrol edebilirler. Ancak kafeslerinde egzersiz yapabilecekleri alan olmazsa oburlaşabilirler. Kemirme kabiliyetleri çok yüksektir; sınırlı yem ve dar alanlara maruz kaldıklarında her şeyi hatta birbirlerini (kanibalizm) dahi kemirebilirler. Amaç kendilerine daha geniş bir yaşam alanı bulmak veya karınlarını doyurmaktır. Sıçanlar vahşi hayatta çöplük veya lağımlarda yaşamalarına rağmen temiz hayvanlardır. Sıçanlar genellikle yumuşak başlıdırlar. Narin ve iyi muamele gördüklerinde evcil davranırlar ve kolaylıkla eğitilebilirler. Nokturnal hayvanlardır; yani geceleri aktiftirler, çoğu fizyolojik aktivitelerini (yeme, içme, gezinti, çiftleşme, doğum) gece gerçekleştirirler. Gündüzleri ise inaktiftirler, kafesin bir köşesinde yatıp dinlenirler.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyaller

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

#### 2.1.1. Kimyasallar

Siğir serum albumin (BSA; A-7906), bütilehidroksitoluen (BHT; B-1378), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; 06298), etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA; 4931), 7-etoksirezorufin (E-3763), Folin reaktifi (F-9252), glutatyon indirgenmiş formu (GSH; G-6013), p-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( $\beta$ -NADPH; N-7505), fenilmetan sülfonil florid (PMSF; P-7626), HEPES (H-3375), rezorufin pentil eter (P-2456), 7-benziloksi rezorufin (B-1532), N-Nitrosodimetilamin (N-7756), anilin (A-9880), 4-metilamino antipiren (D-8015), kafein (C-0750), Eritromisin (E-6376), glukoz 6-fosfat (49280), Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz (G-7877), rezorufin metil eter (M-1544), sodyum potasyum tartarat (S-2377), Polioksietilen-sarbiton-monolaurat (Tween 20; P-1379), N,N',N'-Tetrametil-etilen-diamin (TEMED; T-8133), Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA)'den elde edilmiştir. Bakır sülfat pentahidrat (61240), gliserol (15524), potasyum klorür (60129), sodyum karbonat (31432), asetil aseton (00909), p-aminofenol (1009), kolik asit (27029), magnezyum klorür penta hidrat (63072), sodyum klorür (13423), Tris (33742), Fluka Chemie (GmbH Industrie Strasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'den elde edilmiştir. Potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873), hidroklorik asit (00314) E. Merck (Darmstadt, Germany)'ten elde edilmiştir. Etanol (32221), formaldehit (15512) ve fenol (16017) Riedel firmasından elde edilmiştir. Bunların dışındaki bütün kimyasal ve çözeltiler eldeedilebilecek maksimum safsızlıkta elde edilmiştir.

### 2.2. Metotlar

#### 2.2.1. Dokular

Bu çalışmada kullanılan Wistar Albino sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden temin edildi. Yaklaşık 300-400 g ağırlığındaki sıçanlar kontrol ve sülfıt oksidaz yetersiz olarak iki gruba ayrıldı. Sülfıt oksidaz yetersiz olan gruba olan gruba Sigma'ya ait AIN-76 kodlu yem 7 hafta boyunca yedirildi. Ayrıca bu grubun suyuna her gün 200 ppm tungsten eklendi. 7 haftalık sürenin ardından her iki gruba ait Wistar Albino sıçanlar 30 cc alfazin (alphazyne) ve 50 cc alfamin (alphamine) karışımı 40 cc olarak anestezik amaçlı hayvanlara enjekte edildi ardından tartım yapıldı. Dokular (karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak) ve kan diseksiyon sırasında temin edildi. Dokular ilk olarak buz üstüne alındı ve önce soğuk distile su, daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırıldı. İnce bağırsak dokusu soğutulmuş fizyolojik ile steril şırıngalar kullanılarak temizlendi. Dokular önce steril buzdolabı poşetlerine kondu ve daha sonrada alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek sıvı azotta donduruldu. Ardından PAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Araştırma Laboratuvarı'na getirilen numuneler, dokular -80°C'ye kaldırıldı, kanlar ise 10.000 rpm 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek derin dondurucuya kaldırılarak muhafaza edildi.

#### 2.2.2. Dokulardan Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması

Laboratuvarında -80°C'den çıkartılan dokular temiz filtre kağıdı üzerinde hızla tartıldı. Bundan sonraki bütün işlemler 0-4°C arasında buz üzerinde gerçekleştirildi. Makas ile dokular buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Kesilen dokulara 2 mM EDTA, 0,25 mM PMSF, 0,15 mM BHT, %0,05 Kolat ve %10 gliserin içeren %1,15'lik KCl çözeltisi içinde, buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem teflon cam homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan dokunun 3 katı homojenizasyon çözeltisi eklendi. Teflon çubuk cam tüp içinde 10 defa aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Black Decker, V2600) kullanılarak yapıldı. Homojenat, daha sonra postmitokondriyal fraksiyon elde etmek için 12000 xg' de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (Sup) çift katlı steril sargı bezinden süzülerek çökelektten ayrıştırıldı. Çıkan sup miktarı ölçülerek ölçülen sup miktarının 0,5 katı hacminde 16 mM CaCl<sub>2</sub> supun üzerine eklendi ve 20000 xg' de 75 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu çıkan sup üzerine %10 gliserin olacak şekilde soğuk

gliserin eklendi, elle homojenize edilip eppendorf tüplere konup  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Mikrozom fraksiyonlarını elde etmek için kalan çökelek homojenizasyon solüsyonu ile yıkandı ve tekrar 20000 xg'de 75 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu çıkan çökelek üzerine doku ağırlığının 0,5 katı kadar süspansiyon çözeltisi (0,1 M EDTA içeren %10'luk gliserin çözeltisi) eklendi ve elle homojenize edilip eppendorf tüplere konup  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

### 2.2.3. Analitik İşlemler

#### 2.2.3.1. Protein Miktarı Tayini

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

#### 2.2.3.2. Sülfid Oksidaz (SOX) Aktivitesinin Tayini

Cohen ve Fridovich tarafından önerilen metoda göre Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatlarında sülfid oksidaz enzim aktivitesi tayin edildi. Bu yöntem; SOX aktivitesi ile  $\text{SO}_3^-$ 'e bir oksijen daha eklenerek  $\text{SO}_4^-$  oluşması ve bu esnada açığa çıkan bir elektronun, sitokrom c'de bulunan okside demirin  $\text{Fe}^{+3}$ 'e transfer edilerek redüksiyona uğramasıyla okside formdan redukte forma geçen demirin absorbans artışına neden olması prensibine dayanır. Homojenizasyon işlemi sırasında elde edilen homojenat Tablo 2.1'de verilen reaksiyon karışımı ile 550 nm dalga boyunda oda sıcaklığında SOX aktivitesi kaydedilmiş ve absorbanstaki 0.100 birimlik artış 1 ünite SOX aktivitesi olarak ifade edilmiştir.

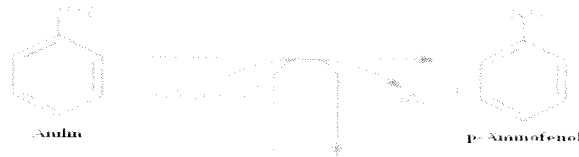
**Tablo 2.1** Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatındaki SOX aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımının bileşenleri.

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
Tris-HCl pH:8,50	50 mM	1,6	80 mM
Sitokrom c	0,2 mM	0,5	1 mM
KCN	10 mM	0,1	1 mM
$\text{Na}_2\text{SO}_3$	0,01 mM	0,1	0,001 mM
Homojenat		0,2	-
Ultra saf su		3 ml'ye tamamlama	-
Toplam hacim		3	

#### 2.2.3.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai vd (1966) tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Tablo 2.2'de verilen tipik reaksiyon karışımına göre tüplere 100 mM HEPES tamponu, pH 7,60 ve 10 mM anilin, karaciğer için 1 mg mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi kullanılarak son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. NADPH üretim sistemi; test tüpüne 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz, 2,5 mM glikoz 6-fosfat, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,80 ve 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  eklenmesiyle hazırlandı. Daha sonra üretim sistemi içeren test tüpü  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi. Reaksiyon 0,075 ml NADPH üretim sisteminin eklenmesiyle başlatıldı ve içinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen

tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,25 ml % 20 TCA eklendi. İnkübasyon 37°C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,25 ml % 20 TCA eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12500 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 0,5 ml süpernatant yeni tüplere transfer edilerek 0,25 ml % 20 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek nötrale edildi. Ardından 0,4 N NaOH içeren % 20 fenol eklenerek renk oluşumu sağlandı. Renk oluşumu için 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 630 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü.



**Şekil 2.1** Anilin 4-hidroksilasyonu

**Tablo 2.2** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklene Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
Hepes tamponu pH; 7,60	400 mM	0,125	100 mM
Anilin	100 mM	0,050	10 mM
Mikrozomal protein			1 mg/ml
<u>NADPH üretim sistem</u>		0,075	0,25 mM
<i>Glikoz 6-fosfat</i>	100 mM	0,025	2,5 mM
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	100 mM	0,025	2,5 mM
<i>Hepes tamponu pH 7,80</i>	200 mM	0,073	14,6 mM
<i>NADP<sup>+</sup></i>	20 mM	0,025	0,5 mM
<i>Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz</i>	500 u	0,001	0,5 u
Ultra saf su		0,5 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		0,5 ml	

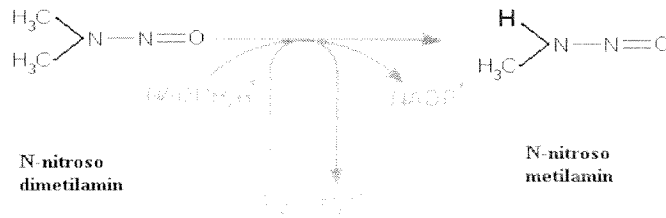
#### 2.2.3.4. Mikrozomal N-demetilaz Aktivite Tayinleri

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin, eritromisin, kafein ve aminopiren N-demetilaz aktiviteleri Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

##### 2.2.3.4.1. N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin aktiviteleri Tablo 2.3'de verilen tipik reaksiyon karışımına göre tüplere 400 mM HEPES tamponu, pH 7.70, substrat (25 mM N-Nitrosodimetilamin) belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. 0,075 ml NADPH üretim sisteminin (test tüpüne sırasıyla; 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,80, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM glikoz 6-fosfat ve son olarakta 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi) ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere

reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklendi. İlk inkübasyon 37°C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. İlk inkübasyon sonunda, inkübasyon ortamından alınan tüplere 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle reaksiyon sona erdirildi. Ardından karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12500 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant yeni tüplere transfer edildikten sonra, Nash reaktifinden (100 ml distile su da 30,5 gr amonyum asetat, 0,6 ml mutlak asetik asit ve 0,4 ml asetil aseton) 0,5 ml eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ikinci inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktivite hesaplandı. N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND) olarak adlandırılan enzim aktivitesinin katalizlediği reaksiyon Şekil 2.2'de belirtilmiştir.



**Şekil 2.2** N-nitrosodimetilamin N-demetilasyon

**Tablo 2.3** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA-ND) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
HEPES pH 7,70	400 mM	0,125	50 mM
NDMA	25 mM	0,100	2,5 mM
Mikrozomal protein			1 mg/ml
NADPH üretim sistemi		0,075	0,25 mM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

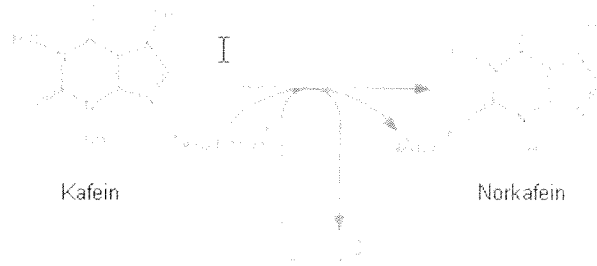
#### 2.2.3.4.2. Kafein N-demetilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki kafein N-demetilaz aktiviteyi Tablo 2.4'te verilen tipik reaksiyon karışımlarına göre tüplere 400 mM HEPES tamponu, pH 7,80, substrat (1 mM kafein) belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. NADPH üretim sisteminin (test tüpüne sırasıyla; 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,80, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM glikoz 6-fosfat ve son olarakta 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi) ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklendi. İlk inkübasyon 37°C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi.

İlk inkübasyon sonunda, inkübasyon ortamından alınan tüplere 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle reaksiyon sona erdirildi. Ardından karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12500 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant yeni tüplere transfer edildikten sonra, Nash reaktifinden (100 ml distile su da 30,5 gr amonyum asetat, 0,6 ml mutlak asetik asit ve 0,4 ml asetil aseton) 0,5 ml eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ikinci inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin



eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı. Kafein N-demetilaz (CN3D) olarak adlandırılan enzim aktivitesinin katalizlediği reaksiyon Şekil 2.3'te belirtilmiştir.



**Şekil 2.3** Kafein N-demetilasyonu

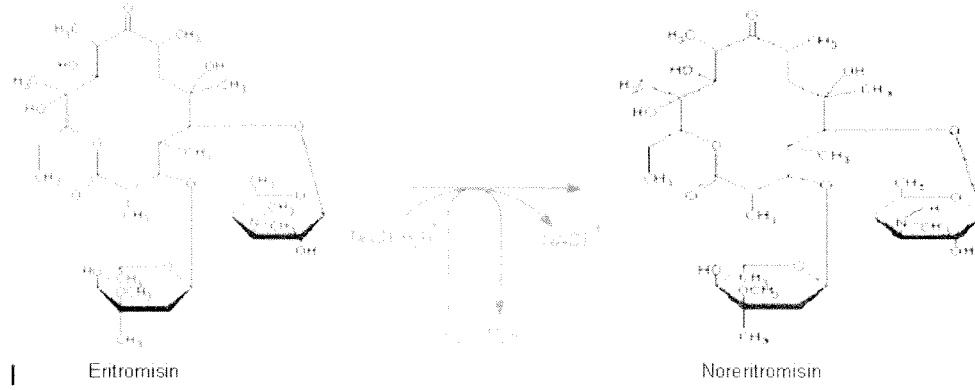
**Tablo 2.4** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Kafein N-Demetilaz (CN3D) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
HEPES pH 7,80	400 mM	0,125	50 mM
Kafein	1 mM	0,100	0,1 mM
Mikrozomal protein			1,5 mg/ml
NADPH üretim sistemi		0,075	0,25 mM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

#### 2.2.3.4.3. Eritromisin N-demetilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki kafein N-demetilaz aktiviteleri Tablo 2.5'te verilen tipik reaksiyon karışımlarına göre tüplere 400 mM HEPES tamponu, pH 7.80, substrat (50 mM eritromisin) belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. NADPH üretim sisteminin (test tüpüne sırasıyla; 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,80, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM glikoz 6-fosfat ve son olarakta 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi) ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklendi. İlk inkübasyon 37°C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi.

İlk inkübasyon sonunda, inkübasyon ortamından alınan tüplere 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle reaksiyon sona erdirildi. Ardından karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12500 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant yeni tüplere transfer edildikten sonra, Nash reaktifinden (100 ml distile suda 30,5 gr amonyum asetat, 0,6 ml mutlak asetik asit ve 0,4 ml asetil aseton) 0,5 ml eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ikinci inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı. Eritromisin N-demetilaz (END), olarak adlandırılan enzim aktivitesinin katalizlediği reaksiyon Şekil 2.4'te belirtilmiştir.



**Şekil 2.4** Eritromisin N-demetilasyonu

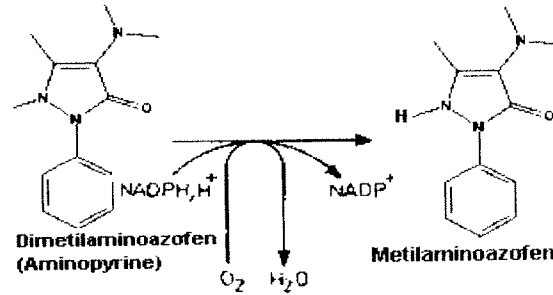
**Tablo 2.5** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Eritromisin N-demetilaz (END) Aktivite Tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri.

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklene Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
HEPES pH 7,80	400 mM	0,125	50 mM
Eritromisin	50 mM	0,100	5 mM
Mikrozomal protein			1 mg/ml
NADPH üretim sistemi		0,075	0,25 mM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

#### 2.2.3.4.4. Aminopiren N-demetilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki aminopiren N-demetilaz aktiviteleri Tablo 2.6'da verilen tipik reaksiyon karışımlarına göre tüplere 400 mM KPi; tamponu, pH 7,50, substrat (1 mM 4-dimetilamino antipiren (aminopiren)) belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH üretim sistemi ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. NADPH üretim sisteminin (test tüpüne sırasıyla; 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,80, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM glikoz 6-fosfat ve son olarakta 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde muhafaza edildi) ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH üretim sistemi eklemeyen önce 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklendi. İlk inkübasyon 37°C de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi.

İlk inkübasyon sonunda, inkübasyon ortamından alınan tüplere 0,5 ml 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle reaksiyon sona erdirildi. Ardından karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12500 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant yeni tüplere transfer edildikten sonra, Nash reaktifinden (100 ml distile su da 30,5 gr amonyum asetat, 0,6 ml mutlak asetik asit ve 0,4 ml asetil aseton) 0,5 ml eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ikinci inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı. 4-dimetilamino antipiren N-demetilaz (Aminopiren N-demetilaz APND), olarak adlandırılan enzim aktivitesinin katalizlediği reaksiyon Şekil 2.5'te belirtilmiştir.



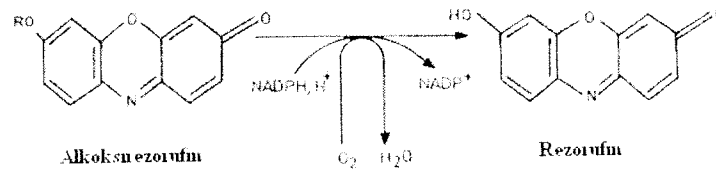
**Şekil 2.5** Aminopiren N-demetilasyon

**Tablo 2.6** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozoamlarındaki 4-dimetilamino antipiren N-demetilaz (Aminopiren N-demetilaz APND) aktivite tayini için inkübasyon karışımının bileşenleri

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,50	400 mM	0,250	100 mM
Aminopiren	1 mM	0,100	0,1 mM
Mikrozomal protein			1 mg/ml
NADPH üretim sistemi		0,075	0,25 mM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

### 2.2.3.5. Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozoamlarının AROD aktivitesi Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi. Bu aktivite tayininde substrat olarak 7-etoksirezorufin, 7-metoksirezorufin, 7-pentiloksirezorufin ve 7-benziloksirezorufin kullanılmıştır.



**Şekil 2.6** Alkoksirezorufin dealkilasyon

#### 2.2.3.5.1. 7-Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozoamlarında EROD aktivite tayininde kullanılan reaksiyon ortamı Tablo 2.7'de verilmiştir. Tipik reaksiyon ortamı sırasıyla; 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,80); 100 mM NaCl; 1,2 mg BSA; 100 µg mikrozomal protein; 1,5 µM substrat ve 0,1mM NADPH içermektedir.

Reaksiyon karışımının hazırlanmasında Tablo 2.7'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve Gary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

**Tablo 2.7** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklene Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,80	400 mM	0,250	100 mM
NaCl	1 M	0,100	0,1 mM
BSA	12 mg/ml	0,100	1,2 mg
Mikrozomal protein	1 mg/ml	0,05-0,100	50-100 µg
NADPH	10 mM	0,010	0,1 mM
7-Etoksirezorufin	10 µM	0.15	1,5 µM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

#### 2.2.3.5.2. Pentiloksirezorufin O-Dealkilaz (PROD) Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarında PROD aktivite tayininde kullanılan reaksiyon ortamı Tablo 2.6'da verilmiştir. Tipik reaksiyon ortamı sırasıyla; 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,80); 100 mM NaCl; 1,2 mg BSA; 100 µg mikrozomal protein; 0,225 µM substrat ve 0,1mM NADPH içermektedir.

Reaksiyon karışımının hazırlanmasında Tablo 2.8'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve Gary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

**Tablo 2.8** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki PROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklene Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,80	400 mM	0,250	100 mM
NaCl	1 M	0,100	0,1 mM
BSA	12 mg/ml	0,100	1,2 mg
Mikrozomal protein	1 mg/ml	0,100-0,200	100-200 µg
NADPH	10 mM	0,010	0,1 mM
7-Pentiloksirezorufin	1,5 mM	0.15	0,225 µM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

#### 2.2.3.5.3. Metoksirezorufin O-Dealkilaz (MROD) Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarında MROD aktivite tayininde kullanılan reaksiyon ortamı Tablo 2.7'de verilmiştir. Tipik reaksiyon ortamı sırasıyla; 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,80); 100 mM NaCl; 1,2 mg BSA; 100 µg mikrozomal protein; 0,225 µM substrat ve 0,1 mM NADPH içermektedir.

Reaksiyon karışımının hazırlanmasında Tablo 2.9'da belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave

edilerek başlatıldı ve Gary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

**Tablo 2.9** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki MROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,80	400 mM	0,250	100 mM
NaCl	1 M	0,100	0,1 mM
BSA	12 mg/ml	0,100	1,2 mg
Mikrozomal protein	1 mg/ml	0,100	100 µg
NADPH		0,010	
7-Metoksirezorufin	1,5 mM	0,15	0,225 µM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1 ml	

#### 2.2.3.5.4. 7-Benziloksirezorufin O-Dealkilaz (BROD) Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarında BROD aktivite tayininde kullanılan reaksiyon ortamı Tablo 2.10'da verilmiştir. Tipik reaksiyon ortamı sırasıyla; 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,80); 100 mM NaCl; 1,2 mg BSA; 100 µg mikrozomal protein; 0,225 µM substrat ve 0,1 mM NADPH içermektedir.

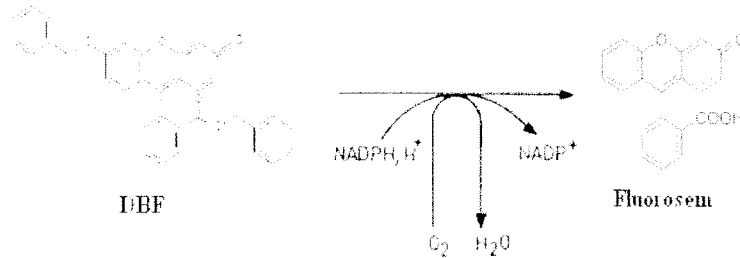
Reaksiyon karışımının hazırlanmasında Tablo 2.10'da belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve Gary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

**Tablo 2.10** Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki BROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,80	400 mM	0,250	100 mM
NaCl	1 M	0,100	0,1 mM
BSA	12 mg/ml	0,100	1,2 mg
Mikrozomal protein	1 mg/ml	0,100	100 µg
NADPH		0,010	
7-Benziloksirezorufin	1,5 mM	0,15	0,225 µM
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	
Toplam hacim		1	

### 2.2.3.6. Dibenzofloresein O-Debenzilaz (DBFOD) Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer mikrozomlarında aromataz aktiviteleri DBF substratı kullanılarak fluorometrik metotla tayin edildi. DBF ve NADPH her çalışmada taze olarak hazırlandı. Standart olarak fluoresein kullanıldı. Bu metod DBF'in aromataz tarafından NADPH varlığında fluoreseine yükseltgenmesi sonucu oluşan sarı rengin 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında florometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Bkz Şekil 2.2).



Şekil 2.7 DBFOD aktivitesinin tayini.

Tablo 2.11' de verildiği gibi tipik reaksiyon ortamı 0,5 ml hacimde belirtilen hacimlerde 400 mM KPi tamponu, 10 mM NADPH, mikrozomal protein ve 20 µM DBF kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.11 Tipik karaciğer aromataz aktivite ölçüm karışımının içeriği.

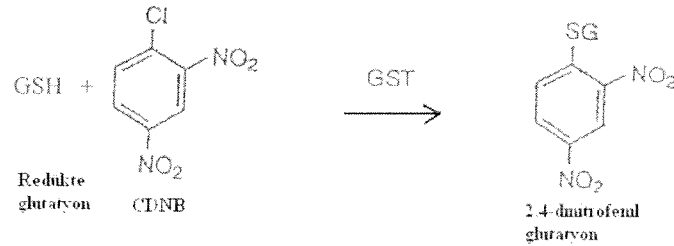
İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 8,25	400 mM	0,125	100 mM
Mikrozomal protein	1 mg/ml	0,040	100 µg
NADPH	10 mM	0,010	0,1 mM
DBF	20 µM	0,050	2 µM
Ultra saf su		0,275	
Toplam hacim		0,5 ml	

Tablo 2.11' de verilen tipik reaksiyon karışımına göre tüplere 400 mM Kpi tamponu, 10 mM NADPH, mikrozomal protein ve distile su eklenip vortekslendi ve tüpler 30°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından tüplere 20 µM DBF eklenerek 30°C de, 30 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,6 ml 1N NaOH eklenerek reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 xg de 25 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 0,1 ml süpernatant yeni tüplere transfer edilerek renk oluşumu için 2 saat 37°C sıcaklıkta inkübasyonun ardından Cary Eclipse Florometre'de 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında körlere karşı okundu.

### 2.2.3.7. Sitozolik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini

#### 2.2.3.7.1. 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak Habig vd, (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Şen ve Kırıkbakan'ın optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edildi. Habig metodu, GST tarafından CDNB ile GSH konjügasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutasyon kompleksinin ışığı 340 nm'de absorpsuyonuna dayanmaktadır.



**Şekil 2.8** GST-CDNB enzimatik reaksiyonu

Tablo 2.12'deki gibi tipik reaksiyon ortamı son 1 ml hacimde 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,50); 1 mM redükte glutatyon (GSH); 25 µg sitozolik protein ve 1 mM CDNB içermektedir.

**Tablo 2.12** Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği

İçerik	Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
KPi pH 7,50	400 mM	0,250	100 mM
GSH	50 mM	0,020	1 mM
CDNB	20 mM	0,050	1 mM
Sitozolik protein		0,050	50 µg
Ultra saf su		1 ml'ye tamamla	-
Toplam hacim		1 ml	-

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.11'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son CDNB ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn'lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Shimadzu UV-1600A Spektrofotometre de 340 nm'de 1 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

### 2.2.3.8. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. sitokrom c (Mr 11700), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (Mr 36000), yumurta albumini (Mr 45000), katalaz (Mr 60000), BSA (Mr 66000), moleküler ağırlık standartları olarak kullanılmıştır. SDS-PAGE'in detayları aşağıda verilmiştir.

#### 2.2.3.8.1. Stok çözeltiler

##### 2.2.3.8.1.1. 10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30)

30 g Tris ve 144 g glisin distile suda çözüldü ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Tamponun pH'sı asit veya bazla ayarlanmadı. Tampon kullanımdan önce 1 lt tampona 1 g SDS eklenerek 10 kez sulandırılarak kullanıldı.

##### 2.2.3.8.1.2. Stok ayrıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80)

18,15 g Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 8,80'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.3.8.1.3. Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80)

6 g Tris yaklaşık 40 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 6,80'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.3.8.1.4. Stok jel çözeltisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C)

29,2 g akrilamid bir miktar distile suda çözüldü; 0,8 g BIS (Bis-akrilamid) eklendi ve çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti kaba filtre kağıdından süzüldü. %T toplam akrilamid monomer konsantrasyonunun yüzdesini gösterir ve %C aşağıda gösterildiği gibi çapraz bağlanan monomer konsantrasyonunu tanımlar.

$$\%T = (\text{g Akrilamid} + \text{g BIS} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (\text{g BIS} / \text{g Akrilamid} + \text{g BIS}) \times 100$$

### 2.2.3.8.1.5. %10 SDS

10 g SDS ısıtılarak distile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.3.8.1.6. %10 Amonyum persülfat (APS)

0,1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözüldü. Her seferinde taze olarak hazırlandı.

### 2.2.3.8.1.7. 4X Numune seyreltme tamponu

%8 SDS, %40 gliserin, %20 β-merkaptotanol ve %0,01 bromfenol mavisi içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 6,80) Tablo 2.12'de verilen çözeltilerin belirtilen hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. Tamponun pH'sı son hacme tamamlanmadan önce 1 M HCl ile 6,80'e titre edildi.

**Tablo 2.13** 4X numune sulandırma tamponunun içeriği

Stok çözeltiler	Eklene Hacim (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,80)	2,5
Gliserin	4,0
B-merkaptotanol	2,0
SDS	0,8 g
Bromfenol mavisi	1,0 mg
Toplam Hacim	10

### 2.2.3.8.1.8. Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri

Moleküler ağırlık standart proteinleri, sitokrom c, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, yumurta albumini, katalaz ve BSA 1 ml'lik volumetrik şişe içinde 1 mg çözümlenerek 2 mg/ml stok çözeltisi şeklinde hazırlandı. Stok standartlar derin dondurucuda saklandı.

### 2.2.3.8.1.9. Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması

Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.13'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

**Tablo 2.14** SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

İçerik	Ayrıştırıcı Jel (%8,5) (0,375 M Tris, pH 8,80)	Sıkıştırıcı Jel (%4) (0,125 M Tris, pH 6,80)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5



Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012
Toplam Hacim	30	10

#### 2.2.3.8.2. Jelin hazırlanması

Poliakrilamid slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm'lik teflon ayırıcılar ile sabitleyici plastik levhanın ve son olarak kısa camın (12,5 x 16 cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki kuyucuğa %2'lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.13'de belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8-9 cm) ulaşmaya kadar 10 ml'lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazikçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1 cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15-20 dak süreyle polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten sonra 15 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak'da tamamlandı.

#### 2.2.3.8.3. Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması

Analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı.

Moleküler ağırlık standartları da şu şekilde hazırlandı: 16 µl sitokrom c, 14 µl gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz, 16 µl yumurta albumini, 12 µl katalaz, 12 µl BSA, 20 µl distile su ve 30 µl 4X numune seyreltme tamponu (standartların miktarı çok sayıda denemenin sonucunda tespit edilmiştir). Seyreltilmiş karışım daha sonra 2 dak süreyle sıcak su banyosunda kaynatıldı.

#### 2.2.3.8.4. Örneklerin yüklenmesi

Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi.

Uygun iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak 30 µl protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

### 2.2.3.8.5. Elektroforetik ayırıştırma

Sistem Thermo EC 1000-90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741-4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Sisteme aynı anda iki jel sandviçi hazırlanarak aynı anda iki elektroforetik ayırıştırma yapıldı. Elektroforetik ayırıştırmanın yapılacağı iki jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 20 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayırıştırıcı jelle ulaştırıldığında akım 30 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 40 mA'e çıkarıldı (Eğer tek jel kullanılarak elektroforetik ayırıştırma yapılacaksa mA değerleri yarılandı). Elektroforetik ayırıştırma süresince ısınmayı engellemek için sisteme 5°C'ye ayarlanmış Nüve (Nüve Cooling Bath Type BS 302 (S) Esenboğa Yolu 22 km Akyurt 06287 Ankara-Türkiye) Soğutmalı Su Banyosu bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayırıştırma sağlamak için toplam 5-5,5 saat yürütme yapıldı.

### 2.2.3.8.6. Jelin boyanması ve bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Jel uzun cam tabakadan dikkatlice alındı ve oda sıcaklığında 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavisi R 250, %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı hem de sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jellerden bazıları fotoğraflandı ve boyası çıkarılmış jeller %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

### 2.2.3.9. Western blot analizleri

Western blot prosedürü Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi uygulanmıştır. Ancak bizim laboratuvar koşullarımıza göre optimize edilmiştir.

#### 2.2.3.9.1. Proteinlerin elektroforezi

Seçilen mikrozomlar yukarıdaki bölümlerde tanımlandığı gibi denatüre koşullar altında %4'lük sıkıştırıcı ve %8,5'lük ayırıştırıcı jeller içinde elektroforez edildi. Elektroforezi takiben, jeller transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Jelin ön dengelenmesi SDS ve elektroforez tampon tuzlarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırır ve elektroforetik transferlerden önceki jelin son şeklinin ayarlanmasına yardımcı olur. Aksi takdirde transfer süresince jeller metanol içerisinde ebat değişikliğine uğrayabilir.

#### 2.2.3.9.2. Transfer sandviçinin hazırlanması

Nitroselüloz membran jel boyutlarından 0,2 mm daha geniş olmak üzere kesildi ve 5 dak süreyle transfer tamponu ile inkübe edilerek ıslatıldı. Membranın bütün yüzeyinin ıslatılması proteinlerin membrana bağlanması için son derece önemlidir. Eğer membran 5 dak içinde ıslanmazsa, bu membran proteinlerin transferi için kullanılamaz, çünkü bu durum depolama sırasında membranın dehidrasyona uğradığını ve proteinleri bağlama yeteneğini kaybettiğini gösterir. Bu işlem sırasında membranların taşınması, tutulması için yumuşak uçlu forsep kullanıldı ve kontaminasyonlardan kaçınmak için eldiven giyildi. Daha sonra dört adet Whatman #1 jel boyutlarından 0,1 mm daha büyük ölçülerde kesildi ve transfer tamponu ile ıslatıldı, ancak içlerinde saklı kalan hava kabarcıklarının tamamen ayrılmasını sağlamak için ilk olarak saf suyla ve daha sonra transfer tamponu ile ıslatıldı.

Elektroforetik transfer The Panther Semidry Electrobloetter Model HEP-3 221663 (55 Heritage Avenue Portsmouth, NH 03801 USA) kullanılarak Yarı-kuru Western blot yöntemi uygulanarak yapıldı. The Panther Semidry Electrobloetter Model HEP-3 221663 (55 Heritage Avenue Portsmouth, NH 03801 USA)'in platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman #1 yerleştirildi ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlandı. Whatman #1 üzerine 1 nolu kuyucuğu gösteren çentik sağda kalacak şekilde dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine membran da dikkatlice yerleştirildi. Proteinlerin transferini bloke edecek olan jel ile membran arasında hava kabarcıkları kalmasının engellenmesi bakımından bu kritik basamaklardan biridir. Bu nedenle membran birbirine zıt uçlardan tutularak öncelikle jelin ortasına degecek şekilde iki tarafa doğru yayarak yerleştirildi. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman #1 konarak sandviç tamamlandı. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlandı ve sandviç etrafına taşan

fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulandı. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkallice yerleştirildi ve sistemin vidaları sıkıldı.

#### 2.2.3.9.3. Elektroforetik transfer

Sistem Thermo EC 1000-90 model güç kaynağına bağlandı. Voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 400 mA'e ayarlandı ve 1 sa süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı, hücrenin bağlantısı kesildi ve sistemin vidaları açıldı. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edildi.

#### 2.2.3.9.4. Proteinlerin immünokimyasal tespiti

Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pirlanta Mavis R 250, %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak boyandı ve sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jelden membrana transfer olamayan protein miktarı tespit edilmeye çalışıldı.

Aynı zamanda membran, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve membran 1 sa süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcı da inkübe edildi.

Süre sonunda 40 ml bloke çözeltisi içinde 100 µl çözülerek hazırlanan primer antikorlar (anti-Rat CYP1A1-IgG ve anti-Rat CYP4A-IgG), membranın üzerine boşaltıldı ve 2 sa inkübe edildi. Daha sonra membran TBST solüsyonunda her biri 5 dak olmak üzere 3 defa yıkandı. Yıkama çözeltisi, membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için yapılan her yıkama basamağı arasında plastik tepside tamamen uzaklaştırıldı. Membran daha sonra 1 saat süreyle işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağı olan ikinci antikorlarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi yıkandı. Sonuç olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından Tablo 2.14'de verilen substrat çözeltisi ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutuldu, stretch film ile kaplandı ve karanlıkta saklandı. Substrat çözeltisi her seferinde taze olarak hazırlandı ve kullanımdan sonra atıldı.

**Tablo 2.15** Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama

<u>Çözelti A:</u>	<u>Çözelti B:</u>	<u>Çözelti C:</u>
2,97 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,80	2 mg fenazin	5,44 mg BCIP 0,136
4,0 ml 1 M NaCl 4,0 ml	metasülfat 1 ml saf	ml N, N-dimetil
0,82 ml 100 mM MgCl <sub>2</sub>	suda çözüldü	formamid içinde
0,04 ml 100 mM ZnCl <sub>2</sub>		çözüldü
0,096 ml Dietanolamin		
12,2 mg NBT		
Son hacim 40 ml		
NBT/BCIP substrat çözeltisi A çözeltisi ile C çözeltisi ve 0,268 ml B çözeltisinin karışımından hazırlandı.		

\* A çözeltisinin pH'sı, son hacmine tamamlanmadan önce satüre Tris ile 9,55'e ayarlandı.

### 2.3. İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her biri veri noktası için Ortalama ± Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için t-testi uygulandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Dokuların Protein Miktarları

Postmitokondriyal, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı.

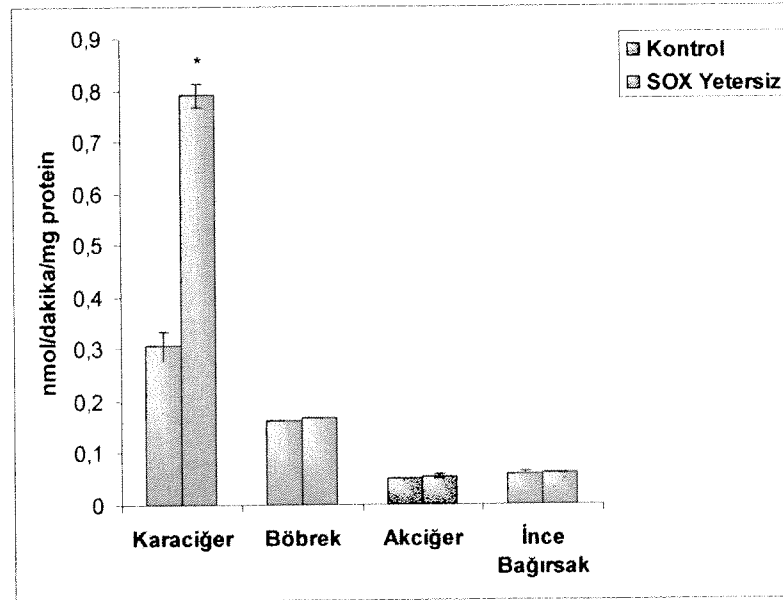
#### 3.2. Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve İnce Bağırsak Mikrozomal MO Aktiviteleri

##### 3.2.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark., (1966) tarafından önerilen metoda göre 630 nm'de spektrofotometrik olarak, p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Yaptığımız ölçümler sonucunda karaciğerde anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi sülfid oksidaz yetersiz olan gruplarda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat artış gösterdi. Kontrol grubuna ait ortalama aktivite değeri  $0,306 \pm 0,028$  nmol/dakika/mg protein olarak tespit edilirken, sülfid oksidaz yetersiz olan grupta ise  $0,79 \pm 0,023$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi.

Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü böbrek, akciğer ve ince bağırsakta kontrol ve sülfid oksidaz yetersiz gruplarda önemli bir farklılık gözlenmedi. Buna göre; böbrekte kontrol grubu  $0,163 \pm 0,003$  nmol/dakika/mg protein, sülfid oksidaz yetersiz olan grupta  $0,168 \pm 0,003$  nmol/dakika/mg protein, akciğerde kontrol grubu  $0,051 \pm 0,006$  nmol/dakika/mg protein, sülfid oksidaz yetersiz olan grupta  $0,054 \pm 0,004$  nmol/dakika/mg protein ve ince bağırsakta ise; kontrol grubunda  $0,058 \pm 0,0004$  nmol/dakika/mg protein, sülfid oksidaz yetersiz olan grupta  $0,061 \pm 0,0003$  nmol/dakika/mg protein olarak tespit edildi.

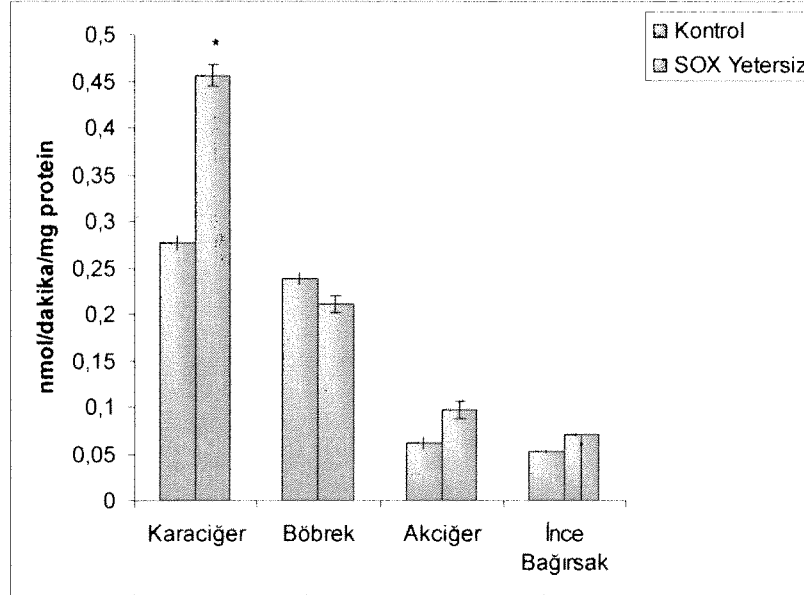


**Şekil 3.1** Anilin 4-Hidroksilaz enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir. \* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

##### 3.2.2. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm'de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

NDMA aktivitesi ölçülen dokulardan karaciğerde sülfite oksidaz yetersiz grupta, kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artış gözlenirken, böbrek, akciğer ve ince bağırsakta belirgin bir artış gözlenmedi. Buna göre karaciğer NDMA aktivitesi kontrol grubunda  $0,277 \pm 0,007$  nmol/dakika/mg protein, sülfite oksidaz yetersiz olan grupta ise  $0,456 \pm 0,011$  nmol/dakika/mg protein olarak tespit edildi. Böbrek kontrol grubunda  $0,239 \pm 0,006$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlenen NDMA aktivitesi, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $0,211 \pm 0,009$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Akciğer kontrol grubunda  $0,061 \pm 0,006$  nmol/dakika/mg protein, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $0,097 \pm 0,009$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlenen enzim aktivitesi, ince bağırsakta kontrol grubunda  $0,052 \pm 0,001$  nmol/dakika/mg protein, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $0,06 \pm 0,001$  nmol/dakika/mg protein olarak

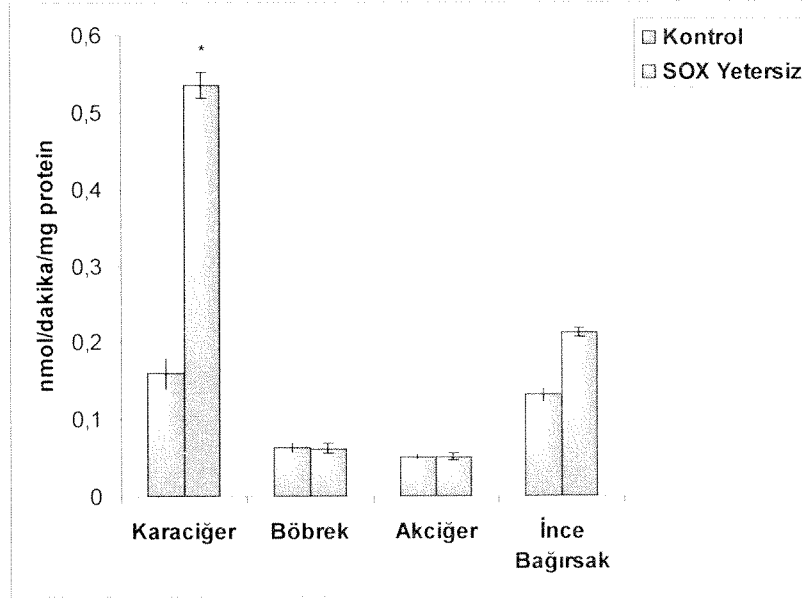


**Şekil 3.2** NDMA-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

### 3.2.3. Eritromisin N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Eritromisin N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm'de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

Yapılan ölçümler sonucunda Eritromisin N-Demetilaz aktivitesi karaciğer kontrol grubunda;  $0,159 \pm 0,02$  nmol/dakika/mg protein, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $0,535 \pm 0,016$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. İnce bağırsakta kontrol grubunda;  $0,131 \pm 0,008$  nmol/dakika/mg protein, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $0,212 \pm 0,005$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Böbrek ve akciğerde ise iki grubun aktiviteleri arasında fark gözlenmemiştir.



**Şekil 3.3** Eritromisin-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

#### 3.2.4. Kafein N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Kafein N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre formaldehit miktarının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

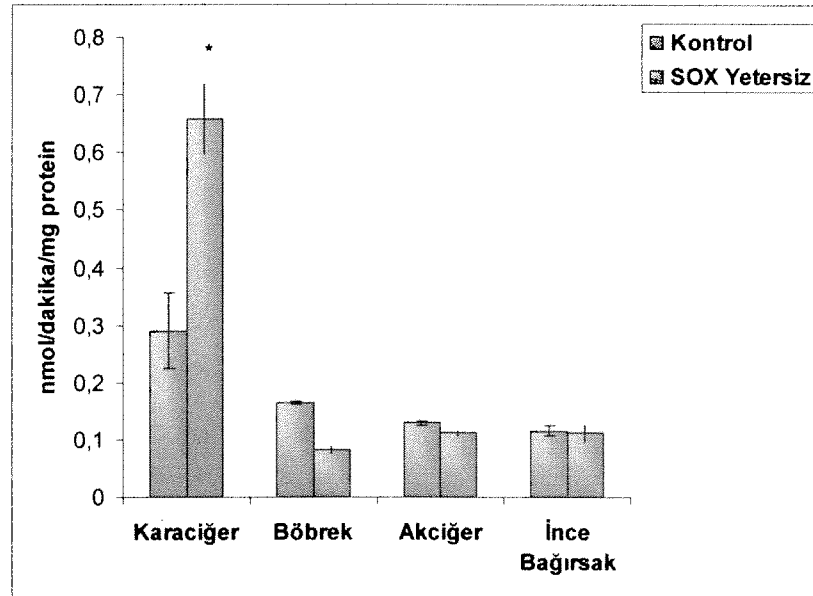
Kafein N-Demetilaz aktivitesi sülfid oksidaz yetersiz grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artış gösterdi. Karaciğer kontrol grubunda;  $0,29 \pm 0,066$  nmol/dakika/mg protein olarak ölçülen Kafein N-Demetilaz aktivitesi, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $0,657 \pm 0,06$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Böbrekte ise; kontrol grubunda;  $0,165 \pm 0,003$  nmol/dakika/mg protein olarak ölçülen aktivite,

Sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $0,081 \pm 0,006$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi ve aktivitede azalma gözlemlendi. Akciğer ve ince bağırsak Kafein N-Demetilaz aktivitelerinde ise iki grup arasında farklılık gözlenmedi.

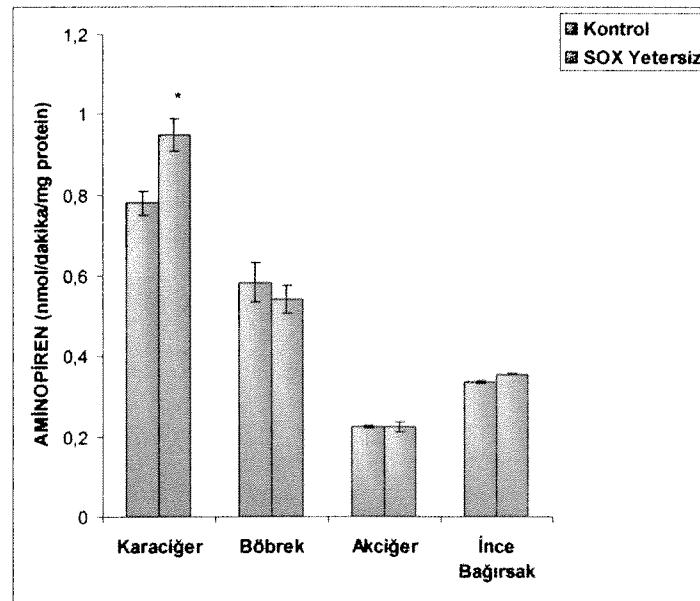
#### 3.2.5. Amino piren N-Demetilaz Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki 4-Dimetilamino antipiren N-Demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen Nash metoduna göre 412 nm'de spektrofotometrik olarak formaldehit miktarının ölçülmesiyle tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Yapılan ölçümlerde 4-Dimetilamino antipiren N-Demetilaz aktivitesi karaciğer kontrol grubunda;  $0,779 \pm 0,03$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlenirken, sülfid oksidaz yetersiz grubunda ise  $0,948 \pm 0,041$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Böbrek 4-Dimetilamino antipiren N-Demetilaz aktivitesi ise kontrol grubunda;  $0,582 \pm 0,048$  nmol/dakika/mg protein, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $0,54 \pm 0,034$  nmol/dakika/mg protein olarak ölçüldü. Akciğerde iki grup arasında fark gözlenmedi. İnce bağırsakta kontrol grubunda;  $0,336 \pm 0,003$  nmol/dakika/mg protein olarak ölçülen 4-Dimetilamino antipiren N-Demetilaz aktivitesi, sülfid oksidaz yetersiz grubunda ise  $0,355 \pm 0,001$  nmol/dakika/mg protein olarak belirlendi.



**Şekil 3.4** Kafein-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)



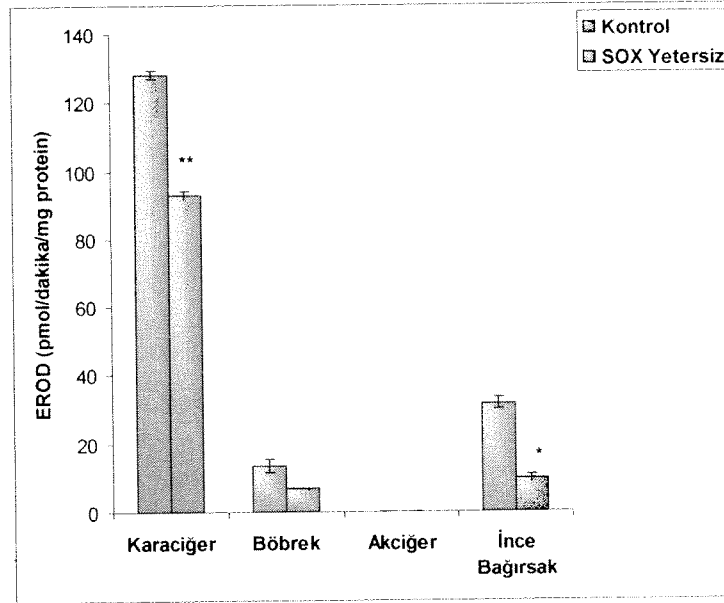
**Şekil 3.5** Aminopiren-ND enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

### 3.2.6. Etoksirezorufin O-Deetilaz (EROD) Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Etoksirezorufin O-Deetilaz aktivitesi florometrik olarak Burke ve Mayer (1974) metodu kullanılarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

EROD aktivitesi karaciğer kontrol grubunda;  $128,1274 \pm 3,5$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlenirken, sülfid oksidaz yetersiz grubunda ise  $92,8337 \pm 1,8$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Böbrekte; kontrol grubunda;  $13,3413 \pm 1,3$  pmol/dakika/mg protein olarak ölçülen EROD

aktivitesi, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $6,9251 \pm 2,1$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. İnce bağırsakta kontrol grubunda;  $31,5570 \pm 2,5$  pmol/dakika/mg protein, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $9,4730 \pm 0,9$  pmol/dakika/mg proteindir. Akciğerde ise aktivite gözlenmedi.



**Şekil 3.6** EROD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

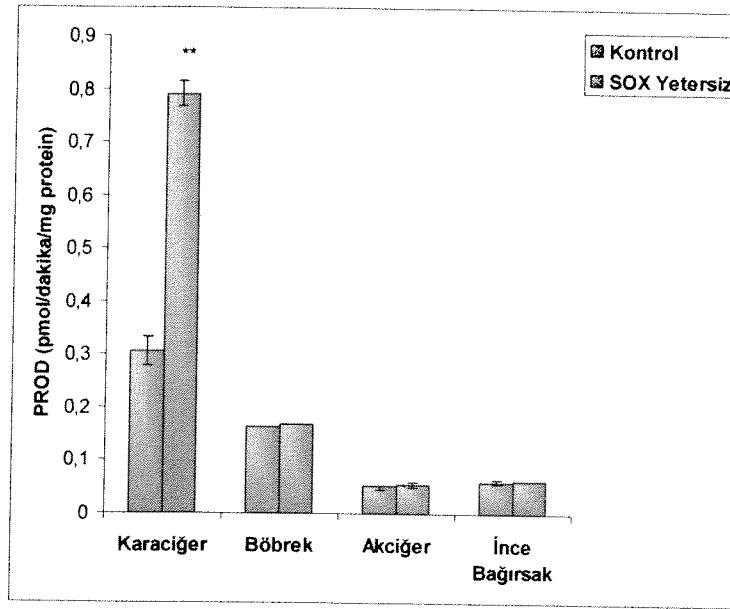
### 3.2.7. Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) Aktivitesinin Tayini

Wistar Albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, ince bağırsak mikrozomlarındaki Pentoksirezorufin O-Depentilaz (PROD) aktivitesi florometrik olarak Burke ve Mayer (1974) metodu kullanılarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

PROD aktivitesi sülfid oksidaz yetersiz grubunda kontrol grubuna göre azalış gözlemlendi. Karaciğer kontrol grubunda;  $20,998 \pm 1,66$  pmol/dakika/mg protein olarak ölçülen PROD aktivitesi, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $13,4549 \pm 0,6$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi. Böbrek ve akciğerde; iki grup arasında fark gözlenmedi. İnce bağırsak PROD aktivitesinde ise kontrol grubunda;  $39,8865 \pm 2,86$  pmol/dakika/mg protein olarak ölçülen PROD aktivitesi, sülfid oksidaz yetersiz grubunda  $45,2914 \pm 1,6$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi.

Benziloksiresorufin O-debenzilaz (BROD) ve metoksiresorufin O-demetilaz (MROD) aktiviteleri de ölçüldü fakat örneklerde bu enzimlerin aktiviteleri gözlenemedi.



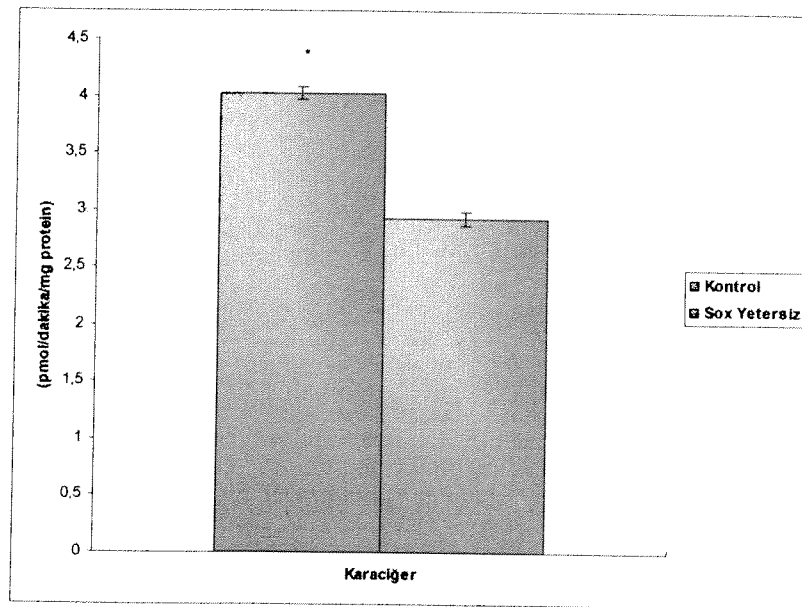


**Şekil 3.7** EROD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

### 3.2.8. DBFOD Aktivite Tayini

Wistar Albino sıçanlara ait karaciğer mikrozomlarında DBFOD aktiviteleri DBF substratı kullanılarak fluorometrik metotla tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

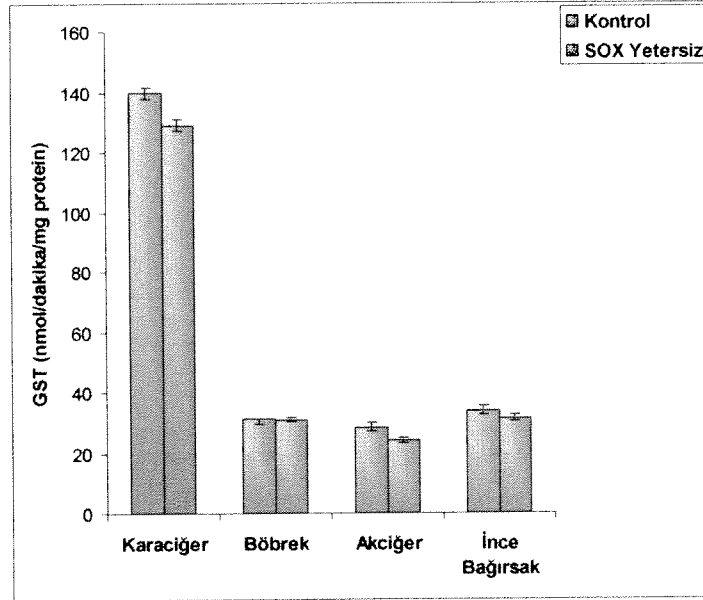
Sülfite oksidaz yetersiz grubunda kontrol grubuna göre azalış gözlemlendi. Karaciğer kontrol grubunda;  $4,022 \pm 0,058$  pmol/dakika/mg protein olarak ölçülen Aromataz aktivitesi, sülfite oksidaz yetersiz grubunda  $2,926 \pm 0,061$  pmol/dakika/mg protein olarak belirlendi.



**Şekil 3.8** DBFOD enzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

### 3.2.9. GST-CDNB Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferazlar dokulara ait sitozollerde 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivite optimum şartlar tespit edildi. GST aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de Habig ve ark., (1974a) tarafından önerilen metoda göre CDNB substratı kullanılarak tayin edildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9** GSTenzim aktivitesinin Wistar albino sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsaktaki değişimi her bir nokta iki set deney ve her bir deney üç ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.\* $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$  (kontrol grubu için  $n=8$ , SOX yetersiz grup için  $n=30$  olarak belirlenmiştir)

#### 4. TARTIŞMA

Vücutumuza dışarıdan alınan ilaçların metabolize edilmesinde, enzimlerin aktiviteleri ve ekspresyonunda; beslenme, tür, genetik polimorfizm, yaş, önceden geçirilmiş hastalıklar patofizyolojik şartlar, mikrobiyolojik ya da parazitolojik ajanlar gibi birçok faktör rol oynar. İlaç metabolizması ilaç etkileşimlerini de kapsayan farmakokinetik bir süreçtir. Bu süreçte, temel hedef sistem bağırsaklar, böbrekler, akciğer ve beyinde de bulunmakla birlikte; çoğunlukla karaciğerde hepatositlerin endoplazmik retikulumlarında bulunan CYP450 izoenzim sistemidir (Ament PW vd 2000). CYP450 izozimlerinin aktiviteleri, genetik yapı farklılığı nedeniyle türler arasında da değişmektedir. Enzim aktivitesindeki farklılık ise ilacın farmakokinetiğinde, dolayısıyla eliminasyonunda değişikliklere yol açabilir (Belpaire ve Bogaert 1996, Spatzenege ve Jaegger 1995). Sitokrom P450 bağımlı ilaç metabolizması ve enzim aktiviteleri ve ekspresyonları hastalık durumlarında önemli değişiklikler göstermektedir. Hastalıklar tarafından baskılanan ya da indüklenen sitokrom P450 enzimlerinin seviyeleri ilaç atılımı ve potansiyel ilaç toksisitesinin değişmesine neden olabilirler. Sitokrom P450 enzimleri değişmiş olan hastaların çevresel kirlenmeler, kanserojenler ve diğer ksenobiyotikler içeren kimyasalların yan etkilerine hassasiyeti de aynı zamanda çok önemli sorundur. Ek olarak, hastalardaki sitokrom P450 izozimlerin analizleri, steroid hormonları ve yağ asitleri gibi, sitokrom P450 tarafından katalize edilen bazı endojen substratların metabolizmasını açıklamada da yardımcı olur.

İlaç metabolizması, ilaç-ilaç etkileşimleri, ilaç-diyet etkileşimleri, ilaç kullanımının yaşa bağlı değişimi, ilaçların çeşitli hastalıklarla etkileşimi ve farklı türlerdeki etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (James vd 2005). Bu çalışmalarda temel amaç; insan fonksiyonlarını ve bu işlevlerdeki fonksiyon bozukluğunun nedenlerini oluşturan mekanizmalarını anlayarak, daha sağlıklı bir yaşam için uygun modeller geliştirilebilmesidir. Farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarda sıçanlar gerek insanlara benzer metabolik yollara sahip olmaları, gerekse birtakım benzer anatomik ve fizyolojik karakteristikleri nedeniyle tercih edilirler. Bu karakteristikler emilim, dağılım ve atılım özellikleridir. Sıçanlar uygun büyüklükleri, kısa yaşam ve gebelik süreleri, bulunma kolaylığı, ekonomik oluşu, daha uysal olmaları ve özellikleri hakkında geniş veri tabanının olması nedeniyle bilimsel araştırmalar için oldukça uygundur (Kacew S 2003). Bu nedenlerle bizde çalışmamızda Wistar albino sıçanlarla çalıştık.

Her ne kadar ilaçlar, çevresel kirlenmeler, diyetel bileşenler ile kimyasal etkileşimleri ve ilaçların CYP450 genlerinin ifadelerinin üzerine etkilerini araştıran birçok detaylı çalışmalar yapılmasına rağmen, CYP450 enzimlerinin patofizyolojik koşullarda düzenlenmeleri üzerine yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Son dönemde bu çalışmalar araştırmacılar için ilgi odağı haline gelmiştir. Bizde benzer nedenler ile bu çalışmamızda; otozomal resesif olarak ortaya çıkan ve toksik olan sülfitin detoksifiye edilmesinde rol oynayan SOX enzim yetersizliğinde, yine vücuda alınan ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol oynayan enzim sistemlerinin nasıl etkilendiği ve bu hastalarda, hastalık harici ilaç kullanımının etkilerinin nasıl olabileceği araştırıldı.

Sıçanlarda SOX yetersizliği ilk olarak Gunnison ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş ve sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılmıştır (Johnson ve Rajagopolon 1976). Bu deneysel modelin insanlara uyarlanabilecek sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılmasının ana sebepleri, sıçanların sülfid metabolize etme kapasitelerinin insana göre 20 kat fazla olması ve başta sıçanlar olmak üzere deneysel sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılan pek çok türün farklı düzeyde sülfid metabolize etme yeteneklerinin olmasıdır (Gunnison vd 1981). Bu model, hayvanların diyetinden molibdenin çıkarılması ve içme sularına tungsten (W) ilave edilmesi sureti ile oluşturulmaktadır. W verilmesinin veya molibdensiz diyetin toksisitesi ile ilgili literatürde oldukça az sayıda çalışma yapılmıştır. Toksisitesi hakkında bilinenlerin oldukça az olmasına rağmen, W'in en düşük toksisiteye sahip metal olduğu ileri sürülmektedir (Abedinzadeh 2001, Meng 2003). Bu çalışmada SOX yetersizliği oluşturma metodunda kullanılan ve 7 hafta boyunca hayvanların içme suyuna ilave edilen 200 ppm'lik veya daha yüksek tungsten dozu ile yapılmış bir toksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Tungsten verilmeksizin diyetten molibden çıkarılmasının ise herhangi bir toksisiteye neden olmadığı bildirilmiştir (Jakus V 2000). Tungsten verilmesi ve diyetten molibdenin çıkarılması ile organizmada bulunan 3 enzimin aktivitesinde eksiklik ortaya çıkmaktadır. Bunlar sülfid oksidaz (SOX), ksantin oksidaz (XO) ve aldehit oksidaz (AOX) enzimleridir (Cohen vd 1971, Johnson vd 1974). Daha önce de bahsedildiği gibi SOX enzim eksikliği ile ortaya çıkan patolojik tablo çok iyi bilinmekle birlikte, XO ve AOX enzim aktivitelerinin genetik olarak yokluğunda dahi yaşamı tehdit eden bir sorunun ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Johnson ve Rajagopolon 1976).

SOX yetersizliği oluşturulan grupların daha az yem tükettikleri halde ağırlık artışlarının SOX enzimi açısından normal gruplardan farklı olmadığı saptanmıştır. Bu, AIN-76 yeminin enerji değerinin (3902 kcal) normal sıçan yeminin enerji değerine göre (2300 kcal) daha fazla olmasına bağlanabilir. İlgili gruplarda SOX enzim aktivite yetersizliğinin oluşturulduğunu teyit etmek amacıyla karaciğer SOX enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları etkin bir yetersizliğin geliştiğini göstermektedir. Literatürde bu protokol uygulanarak karaciğer SOX enzim aktivitesinin yaklaşık %90-95 oranında azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ölçülen karaciğer SOX enzim düzeyinin de yaklaşık bu oranda baskılandığı bulunmuştur (Johnson ve Rajagopolon 1976, Hui vd 1989). Bu çalışmada kontrol ve sülfite oksidaz grupta bulunan deneklerin ortalama vücut ağırlıkları yaklaşık olarak değişkenlik göstermemiştir (kontrol grup;  $291 \pm 32$  ve sülfite oksidaz yetersiz grup;  $283 \pm 42$ ).

Bu çalışmada sülfite oksidaz yetersizliğinde ilaç metabolize eden enzimlerin aktivitesi araştırıldı. Bu amaçla 7 hafta boyunca AIN-76 yemi ve 200 ppm W içeren suyla beslenen sıçanlardan elde edilen karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak dokularında ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteyi araştırıldı. Çalışmamızda anilin 4-hidroksilaz (A4H), N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND), eritromisin N-demetilaz (ERND), kafein N-demetilaz (C3ND) ve aminopiren antipiren N-demetilaz (APND) etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), metoksirezorufin O-demetilaz (MROD), pentiloksirezorufin O-depentilaz (PROD), benzioksirezorufin O-debenzilaz (BROD), glutatyon S-transferaz (GST), aktiviteyi sülfite oksidaz yetersizliği sağlanmış olan sıçanlarda ölçülerek, elde edilen veriler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı.

Çalışmamızda karaciğerde A4H enzim aktivitesi sülfite oksidaz yetersiz olan gruplarda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat artış gösterdi. A4H enzim aktivitesinin ölçüldüğü böbrek, akciğer ve ince bağırsakta kontrol ve sülfite oksidaz yetersiz gruplarda önemli bir farklılık gözlenmedi. Aktivitedeki artışın en çok karaciğerde olduğu görüldü. A4H aktivitesini katalizleyen CYP izoziminin CYP2E bir diğer aktivitesi olan NDMA N-demetilaz aktivitesinin incelendiği gruplarda ise karaciğerde sülfite oksidaz yetersiz olan gruplarda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artış gözlemlenmiştir. Dışarıdan besin ve diğer yollarla alınan, nitrosoamin bileşikleri, CYP2E geninin indüksiyonunu artırmaktadır. Bu nedenle nitrosoamin ve diğer kanserojen maddelerin biyotransformasyonunda rol almalarından dolayı önem kazanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, karaciğerde NDMA N-demetilaz aktivitesi artış göstermekle birlikte, ölçüm yapılan diğer dokularda belirgin bir artış gözlenmemiştir. A4H ve NDMA-ND aktiviteyi kontrol ve SOX yetersiz denek gruplarına ait dokularda paralellik gözlemlendi.

CYP2E aktivitesi en çok karaciğerde artış gösterirken diğer dokularda belirgin bir artış gözlenmedi. Bu da karaciğerin gastrointestinal sistemdeki konumu nedeniyle birçok yabancı maddenin metabolizmasından sorumlu, ilaç toksisitesi için hedef organ olmasından kaynaklandığı gerçeği ile örtüşmektedir. CYP2E1 kanserojen bir madde olan N-nitrozaminle aktive olmaktadır. Vücuda alınan azotlu gıda maddelerinin metabolize edilmesi sırasında muhtemelen CYP2E geninin indüksiyonu artmaktadır. Bu genin indüksiyonunun artması, vücuda alınan çeşitli besin maddelerinin hidroksile edilerek polaritelerinin artırılmasını içermektedir. Sülfite oksidaz yetersizliğinde CYP2E aktivitesinin karaciğerde artış göstermiş olması çeşitli ilaçlar, kanserojenler, antioksidanlar, anestetikler gibi eksojen ksenobiyotiklerin ve steroidler, yağ asitleri, aseton gibi endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan CYP2E ile sülfite oksidaz bağımlı metabolizma arasında ilişki olduğu ileri sürülebilir.

Sıçanlarda obezitenin CYP2E1'nin üzerindeki etkisi, 1990 yılında Raucy ve arkadaşları tarafından test edilmiştir. Hepatik CYP2E1 seviyelerinin bu hastalıkta yükseldiğini bulmuşlardır. Yoğun enerji diyeti ile obez hale getirilmiş sıçan karaciğer mikrozomlarında ve toplam P450 içeriğinde %28 yükselme gözlenmiştir. CYP2E1 ile ilişkili katalitik aktiviteyi NDMA N-demetilasyon %66, anilin hidroksilasyon %52, p-nitrofenol hidroksilasyonu %28 kuvvetlenmiştir. Tersine obezite sıçanlarda P450C11 ve P450A1 ile bağımlı benzofetamin N-demetilasyonu ve eritromisin N-demetilasyonunu değiştirmemiştir. Obezitenin patofizyolojik durumu ile CYP2E1'in indüksiyonu gizli karaciğer hastalığı insidansının artması ve obezitedeki belirli kanserler için biyokimyasal bir temel oluşturabileceği ileri sürülmüştür (Raucy vd 1990). Buna göre; böyle bireyler CYP2E1-aracılı toksisiteler ve çevresel ajanların CYP2E1-aracılı metabolitlerinin oluşumunun neden olduğu yan etkiler açısından artmış risk taşırlar. Aynı çıkarımın bizim çalışmamızın teması olan SOX yetersizliği bulunan bireyler içinde ileri sürülmesi mümkündür.

CYP2E'nin ekspresyonu arttığında bu enzimle metabolize edilen ksenobiyotiklerin metabolizması da hızlanır. Bu da hepatotoksik metabolitlerin çok miktarda üretilerek metabolitleri toksik olan hepatotoksikite oluşmasına neden olur. Bu tür ksenobiyotiklerin ve CYP2E'nin substratlarından birisi olan parasetamol, kireçlenme önleyici ve ağrı kesici olarak kullanılan bir ilaçtır.

CYP2E1, CYP4A ile birlikte yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu başlatabilen uyarılabilir karaciğer sitokrom P450'lerden bir tanesidir. Artmış CYP2E1 ekspresyonunun, hücre hasarı ile sonuçlanan hücre membranlarını peroksidederek hepatit patogeneğinde rol oynamaktadır. Weltman, deneysel bir nonalkolik steatohepatit modelinde CYP2E1 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. İmmünohistokimyasal yöntemlerle, sıçan karaciğerindeki immünohistokimyasal olarak boyanan CYP2E1 deseninin karaciğer yağlanmasıyla çok benzediği ve CYP2E1 ekspresyonunun insanlarda da arttığı saptanmıştır. Ayrıca CYP2E1'in dağılım deseni alkolik hepatit ile oldukça benzerlik göstermektedir (Weltman vd 1998). Araştırmacılar, nonalkolik steatohepatit de artmış CYP2E1 ekspresyonunun hepatosit membranında lipid peroksidasyonunu indükleyen serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabileceğini düşünmektedirler (Leclercq vd 2000). Bu nedenle artan CYP2E1 aktivitesinin eksojen metabolizmanın yanı sıra endojen metabolizmada da hepatotoksisiteye neden olması SOX yetersiz bireyler için dahada önemli olabileceği, parasetamol ve benzeri ilaçların kullanımı SOX yetersiz hastalarda aşırı hepatotoksik reaksiyonların oluşmasına neden olur. Bu tür hastalarda bu ilaçların kullanılmasında dikkatli olması önerilir.

Karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktiviteleri ölçüldü. Karaciğer ve ince bağırsak mikrozomlarındaki eritromisin N-demetilaz aktivitesi sülfid oksidaz yetersiz olan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğerde yaklaşık 3 kat, ince bağırsakta ise 2 kat artış gösterdi. Sülfid oksidaz yetersizliği olan hastalarda kullanılan aritmik, antihistaminik ilaçların etken maddeleri CYP3A geninin indüksiyonunu artırmakta bununla bağlantılı olarak, Eritromisin N-demetilaz aktivitesinde de artış gözlemlenmektedir. Aktivite düzeyindeki değişimler tabii ki sadece alınan ilaçlarla değil birçok faktörün etkisiyle de değişebilmektedir. CYP3A vücuda giren ksenobiyotiklerin çoğunun ilk karşılaştığı ksenobiyotik metabolize eden sitokrom P450 enzimidir ve bağırsak duvarı boyunca karaciğere kadar enterohepatik siklusa çok miktarda bulunur. Bağırsak duvarlarında başlayan CYP3A'nın metabolik faaliyetleri karaciğerde de devam eder. Bu durumda, herhangi bir yolla alınan terapötik bir ajan karaciğere geldiğinde, artmış CYP3A aktivitesiyle karşılaşınca, ilacın yıkımı normalde olması gerektiğinden daha hızlı gerçekleşecektir. Bu da ilacın beklenen plazma konsantrasyonlarında bir düşüşe neden olur ve dozun artırılmasını gerektirebilecektir. Bu da beklenmedik hepatotoksisiteye sebebiyet verebilir. Bu durumun SOX yetersiz hastalarda kullanılması önerilir.

CYP3A ile metabolize edilen ilaçlardan ilk akla geleni siklosporin'dir. Siklosporin, organ transplantasyonlarında, immün sistemin bireye nakledilen organı reddetmemesi için bir immunosuppressant olarak klinikte kullanılmaktadır. Siklosporin, hidrosilasyon ve N-demetilasyon yoluyla farmakolojik olarak inaktif birçok ürüne metabolize edilir ve sonuç olarak yarılma ömrü seyirinde immün baskılayıcı aktivitesini kaybeder. Bu ilacın kanda dar bir konsantrasyon aralığında kalması şarttır ve eğer etkin konsantrasyonun altına düşerse hepato ve böbrek toksisitesiyle doku reddi gerçekleşebilir.

Sitokrom P450 enzimleri arasında, CYP3A4'ün hem kesesi, böyle büyük moleküler ağırlıklı bileşiklere yer verebilen geniş ve açık bir substrat bağlama yerine sahiptir (Lewis 1996). Bu nedenle çok değişik yapıda, geniş spektrumda birçok ilacın metabolizmasından sorumludur. Bu kadar fazla ilacın metabolizmasından sorumlu olmasından dolayı SOX yetersiz bireylerde artış göstermesi de göz önüne alınarak bu bireylerin diğer patofizyolojik tedavilerinde kullanılan ilaçların saptanmasında oldukça önem arz eden bir durum olarak değerlendirilmelidir.

Bunlar arasında HIV-1 enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan indinavir de CYP3A'nın çok önemli bir substratıdır. CYP3A4 nevirapin metabolizmasının esas katalizörlerinden birisidir (Erickson 1999). CYP3A ile metabolize edilen bir diğer ilaç, antikoagülant aktiviteye sahip olan ve damar içi pıhtı oluşumu ve gelişimini engellemek için kronik olarak kullanılan varfarin'dir. Varfarin'in insan metabolizması, CYP3A4'ü içeren birçok sitokrom P450 proteinini kapsar (Kaminsky ve Zhang 1997). CYP3A'nın akciğer ve böbrekte artan aktivitesinin yol açacağı varfarin biyoyeteneği kaybına, karaciğerde ise doz birikiminden dolayı hepatotoksisiteye yol açabileceği olasıdır.

Antidepresan ilaç olan amitriptilin ve nortriptilin CYP2C ve CYP3A ile katalizlenir. Bu sitokrom P450'lerin karaciğerde inhibisyonu, bu ilaçların plazma konsantrasyonlarının artmasına yol açarak doz düşürülmesini gerektirebilir. Hiperkolesterolemi'yi önlemek için kullanılan simvastatin, CYP3A ilk geçiş metabolizmasına uğrayan ilaçlardandır. Bağırsak baskılayıcı ilaçların (siklosporin), antibiyotiklerin (eritromisin), antiepileptiklerin (difenilhidantoin), steroidlerin (etinilöstrodiol), antidepresanların (imipramin), kalp hastalığı (nifedepin) ve kanser (tomoksijen) tedavisinde kullanılan ilaçlar bulunmaktadır.

CYP1A2 enzim aktivitesi, bireyler arasında önemli ölçüde değişiklik gösteriren P450 aktivitesinden birisidir. Aktivitesi düşük olanlarda etkileşiminin klinik önemi artar.

Kafein N-demetilaz aktivitesi ise sadece karaciğerde sülfite oksidaz yetersiz olan grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. kafein vücudumuzda evrimsel kökenli olarak bulunan bitkisel kökenli bir bileşektir ve CYP1A2 tarafından metabolize edilmektedir. Kafein hayvan çalışmalarında seçici olarak hepatik CYP1A2'yi yükseltmiştir ve daha az ölçüde CYP2B'yi de yükseltmiştir (Ayaloğu 1995). Benzer bulgular, farelere kısa dönem 3 gün intragastrik (50-150 mg/kg) verimini takiben etoksi- ve metoksirezorufin O-dealkilaz aktivitelerinin doz bağımlı stimülasyonunda ve CYP1A1 ve 1A2 mRNA seviyelerinde karaciğerde bir yükseliş gözlenmiştir (Goasduff 1996). Aynı yazarlar ayrıca, kafeinle aynı muameleyi takiben böbreklerde CYP1A1 aktivitesi ve mRNA seviyelerinde bir yükseliş rapor etmişlerdir. Bunun yanında, kafeinin yeşil ve siyah çayla muamele edilen sıçanlarda görülen CYP1A2'nin yükseltilmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Bu-Abbas 1999). Bu çalışmada EROD akciğerde gözlenmezken, diğer dokularda özellikle karaciğerde SOX yetersiz grupta kontrol grubuna göre azalış gözlenmiştir. CYP1A2 tarafından katalize edildiği bilinen MROD aktivitesi, hiçbir denek grubunda ve dokuda ölçülebilir düzeyde gözlemlenmemiştir. Buna rağmen bütün veriler birlikte değerlendirildiğinde CYP1A2 bağımlı aktivitelerin (EROD, MROD ve C3ND) bu çalışmada elde edilen veriler arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Kafein, çok yaygın tüketilen meşrubatların içinde bulunmasından dolayı, potansiyel olarak insanlarda sitokrom P450 aktivitesinin önemli bir modülatörüdür. Aşırı kahve içiciler günlük 3 g kadar kafein tüketebilirler (Barone and Roberts 1996). Balık ve et vb hayli yüksek proteinli yiyeceklerin pişimi esnasında üretilen yiyecek kanserojenlerinin önemli bir sınıfı olan heterosiklik aminlerin biyoaktivasyonu ve metabolizmasında değişimler gerçekleştirdiği gözlenmiştir (McArdle 1999, Embola 2001a, b). Buna göre kafeinin diyetle alımı, teofillin, fluvoksamin, melatonin ve takrin gibi metabolizması ve atılımı CYP1A2 üzerine bağımlı ilaçların etkinliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir.

Sitokrom P450 ekspresyonunu arttıran diğer besinler arasında çay bulunur. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda yeşil ve siyah çaylara maruz kalınmasının CYP1A2'nin artmasıyla sonuçlandığı görülmüş; ancak dekafeinize edilmiş çay bu etkiyi göstermediğinden diğer birçok besinde bulunan kafeinin bu etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de sıçanların içme suyuna kafein katılınca CYP1A2'nin arttığı ve bir miktar da CYP2B aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Ayaloğu vd 1995). Bu çaylar aynı zamanda bazı Faz II konjugasyon enzim aktivitesini artırır. Çaydaki bitkisel kimyasallar, besinsel alım miktarında, karaciğer sitokrom P450 profilini değiştirdiği ve konjugasyon aktivitesini düzenlediği anlaşılmıştır. Ağır kahve içicilerinin günlük 3 gr kafein tükettikleri kayda değer bir bulgudur (Barone ve Roberts 1996).

PROD aktivitesi, karaciğer mikrozoamlarında sülfite oksidaz yetersiz olan grupta kontrol grubuna göre azalış gözlemlenirken, böbrek, akciğer ve ince bağırsakta değişiklik gözlemlenmemiştir. PROD aktivitesi memelilerde, CYP2B ve benzeri izozimlerce katalizlendiği bilinmektedir. CYP2B ailesinin tek aktif üyesi olan CYP2B6'nın aktivitesi son zamanlarda pek çok grup tarafından ciddi araştırmalarda incelenmiştir. Özellikle Ekins ve grubu pek çok kimyasal ve ilacı, bu enzimin özel substratları olarak değerlendirmektedirler. CYP2B6'nın katalize ettiği öne sürülen reaksiyonları arasında 7-etoksi-4-triflorometilkumarin (7-EFC)'nin O-deetilasyonu ve S-mefenitoin N-demetilasyonu vardır. Siklofosamid, diazepam gibi antidepresanların metabolizmasında rol alan CYP2B6 aktivitesinin sülfite oksidaz yetersizliği bulunan sıçanlarda baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu durumda CYP2B ilişkili protein seviyesinin azaldığı diyabetik durumlarla benzerlik göstermektedir.

Amino piren N-demetilaz aktiviteleri incelenmiş olan Wistar albino sıçan böbrek, akciğer ve ince bağırsaklarında kontrol ve sülfite oksidaz yetersizliği olan grupların aktiviteleri arasında farklılık gözlenmezken, karaciğerde sülfite oksidaz yetersiz olan grupta kontrol grubuna göre değişkenlik gözlenmemiştir. Önemli sitokrom P450 ilaç metabolizatörlerinden bir diğeri CYP2C'dir. CYP2C'nin aktivite ölçümleri Aminopiren N-demetilaz aktivite testleriyle belirlendi Antikoagulant varfarin, CYP3A'nın olduğu kadar CYP2C'nin de önemli bir substratıdır. CYP2C'nin diğeri bir substratı, ağrı kesici olarak kullanılan ve baş, kas, sırt, diş, romatik ve sinirsel ağrıları gidermede ve ateş düşürmede kullanılan ibuprofen'dir. İbuprofen'in, sülfite oksidaz yetersizliği olan hastalarda karaciğerde aktivitesinde artış olması CYP2C ile gerçekleşen metabolizmasını artmasına neden olacaktır. Bununla bağlantılı olarak ilacın konsantrasyonlarının azalması ve düşük ve etkin olmayan dozları ortaya sebebiyet verecektir. Bu durumda doz seviyelerinin artırılması tavsiye edilir. CYP2C'nin başka bir substratı da, ağrı ve inflamasyona neden olan hormonları indirgeyen, romatid kireçlenme, menstruasyonla ilişkili abdominal kramplar ve eklem kireçlenmesi gibi durumlarda oluşan acıyı dindirmede kullanılan diklofenaktır. CYP2C'nin karaciğer ve akciğerlerde inhibe edilmesi, bu ilacın

konsantrasyonlarını arttırarak aşırı dozla ilişkilendirilen organ toksisitesine yol açabilir. Fakat böbreklerde indüklenmiş CYP2C aktivitesini takiben ilacın klerensi artar ve bu durumda böbrekle ilgili bir klinik vakanın sağaltımı için ilacın doz artırımı gerekebilir. Antidepresan ilaç olan amitriptilin ve nortriptilin CYP2C ve CYP3A ile katalizlenir. İnsan karaciğerinde diazepam en fazla CYP3A4 ve CYP2C19 ile katalizlenen oksidasyon ile metabolize olur.

İlaç metabolizmasında sitokrom P-450 enzimlerinden CYP2D6, 2C19 ve 2C9'un rolü daha fazladır ve ilaçlarla tedavi yanıtını önemli oranda etkileyen sitokrom P450 enzimlerinin başında da debrizokin 4- hidroksilaz (CYP2D6) gelmektedir (Eichelbaum ve Gross 1990). CYP2D6'nın önemi antiaritmikler, antihipertansifler, blokörler, monoamin oksidaz inhibitörleri, morfin türevleri ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan antipsikotikler ve trisiklik antidepresanlar gibi önemli ilaç gruplarını metabolize etmesinden kaynaklanmaktadır

Sadece trisiklik antidepresanlar değil, yeni kullanıma giren antidepresan ilaçlardan biri olan venlafaksin de CYP2D6 üzerinden metabolize edilmektedir ve yavaş metabolizörlerde kardiyovasküler toksisitenin daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Lessard vd 1999). Ancak şu an için bu veriler az sayıda hasta için geçerlidir. Diğer bir antidepresan grubu olan selektif serotonin geri alım inhibitörleri de (SSRI) CYP2D6 ile etkileşmektedir. Paroksetin, fluvoksamin ve fluoksetin kısmen CYP2D6 ile metabolize edilirler. Ancak bu ilaçların terapötik indeksleri göreceli olarak geniş olduğundan, plazma konsantrasyonları ya da klirenslerindeki fenotip farklılıkları fazla değildir. Diğer yandan, paroksetin ve fluoksetin CYP2D6'nın kompetitif inhibitörleridir. Dolayısıyla, paroksetin ve fluoksetine ek olarak CYP2D6'nın diğer substratlarının (trisiklik antidepresanlar gibi) birlikte ve-rilmeleri durumunda, ek olarak verilen ilaçların eliminasyonları bozulur. Sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin bu tür inhibitör etkileri yoktur ve CYP2D6 enzimiyle spesifik etkileşimlere neden olmazlar. Fluvoksamin aynı zamanda CYP1A2 substratı ve güçlü bir inhibitördür. CYP1A2 enzimiyle kısmen metabolize olan klomipramin, imipramin, klozapin ve teofilin ile önemli etkileşimlere neden olabilir. Maprotilin ve mianserin gibi tetrasiklik bileşiklerin metabolizması da CYP2D6 polimorfizmi ile çeşitli derecelerde etkilenmektedir.

Parkinson depresyonunda en çok kullanılan trisiklik antidepresan (TSA) grubu ilaçlar klomipramin, imipramin, amitriptilin'dir. Bu ilaçların etkililik ve güvenilirlik profilleri açısından belirgin bir farklılıklarının olmadığı belirtilmektedir (Koller vd. 1994). Bu ilaçları kullanırken ana izoenzimlerden biri CYP2D6'dır. Bu izoenzim haloperidol, perfenazin, tiroidazın, TSA grubu antidepresanlar, kodein, bazı beta-blokerler, tip 1-C antiaritmikler, methamfetamin ve fenitoin gibi ilaçların metabolize edilmesinde de önemli görevler üstlenmektedir (Stoudemire 1995). Fluoksetin ve major metaboliti olan norfluoksetin CYP2D6'nın potent inhibitörleridir. CYP2D6'nın substratı olan desipraminin kan düzeyi, terapötik dozlarda fluoksetin alan normal gönüllülerde 4 kata dek artış göstermektedir. Fluvoksaminin metabolik yolları tam olarak bilinmemekle birlikte CYP1A2 ve 2D6 ile metabolize oluyor olması güçlü bir olasılıktır. Bu nedenle de 1A2 ve 2D6'nın indüktör ve inhibitörleri ile de etkileşir. Sigara içenlerde 1A2 indüksiyonu nedeni ile fluvoksaminin kan düzeyi düşer. CYP2D6 aktivitesi düşük olanlarda ise fluvoksaminin kan düzeyi yükselir.

Paroksetin yüksek oranda CYP2D6 ile metabolize olur ve bu enzimin güçlü bir inhibitördür. Diğer P450 enzimleri üzerinde de orta derecede etkisi vardır. Sertralin fluoksetin ve paroksetine göre CYP2D6'nın çok zayıf bir inhibitördür. Bu etkisi fluoksetin ve paroksetinden belirgin olarak az, sitalopram ve fluvoksaminden fazladır. Sertraline bağlı bazal 2D6 aktivitesi yüksek olanlarda daha fazladır. Bu kişilerde etkileşimler önemli olabilir. Mirtazapin CYP1A2 ve 2D6 ile 8-hidroksi metabolitine, 3A4 ile N-desmetil ve N-oksit metabolitlerine dönüşür.

Bu enzimin polimorfik olduğu ve buna bağlı olarak birçok ilacın metabolize edilme hızında bireyler ve toplumlar arası farklılıkların bulunduğu bilinmektedir (Aynacıoğlu vd 1999). Bu enzimin aktivitesi bakımından bireyler yavaş, orta, hızlı ve ultra hızlı metabolizörler olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar. Bu enzimin aktivitesi toplumdan topluma değişiklik gösterebildiği gibi psikiyatrik hasta grubunda bu farklılıkların normal popülasyondan farklı olabileceği belirtilmektedir. A.B.D. ve Avrupa'da yavaş metabolizör oranı yaklaşık %7 iken (Chen vd 1996, Sachse vd 1997), A.B.D.'de bir psikiyatri hastanesinde yatarak tedavi gören 100 hasta üzerinde yapılan çalışmada hastaların %14'ünün yavaş metabolizör oldukları bulunmuştur (De Leon vd 1998). Ultra hızlı hastalarda verilen ilacın etkili kan düzeyine çıkamaması nedeniyle psikotik semptomlar düzelmeyebilir. Antipsikotiklerin etkisiz denebilmesi için 4-6 hafta beklenildiği de göz önünde bulundurulursa hasta ve hekim için vakit ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bork ve arkadaşları (1999), özellikle birden fazla ilaçla tedavi edilmeye çalışılan hastaların CYP2D6 enzim aktivitesinin bilinmesinin yararlı olacağını belirtmektedirler. Diğer yandan yavaş metabolizörlerde bazı ilaçlar etkisiz de kalabilmektedir. Örneğin, ağızdan alınan kodeinin yaklaşık %10'u P4502D6 aracılığı ile metabolize olur ve morfine dönüştürülür.

Bu dönüşüm yavaş metabolizör hastalarda yapılamayacağı için, bu grup bireylerde kodeinin analjezik etkisi çok az olur veya hiç olmaz. Yine yavaş metabolizörlerde CYP2D6 aracılığı ile metabolize edilen ilaçların etki süreleri uzamakta veya kan düzeyleri toksik konsantrasyonlara yükselebilmektedir (Coutts ve Urchuk 1999, Bork vd 1999).

Bu çalışmada; karaciğer, böbrek, akciğer ve ince bağırsak sitozollerinde faz II enzimlerinden GST-CDNB kullanılarak aktiviteleri tayin edildi. Yapılan ölçümler sonucunda; Wistar albino sıçan karaciğer sitozollerindeki GST-CDNB aktivitesinde sülfid oksidaz yetersiz grupta kontrol grubuna göre tüm dokularda değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Glutasyon S-tranferazlar birçok elektrofilik maddeyi veya faz I metabolitlerini glutasyon ile konjüge eden faz II enzimlerinin önemli bir grubudur. SOX yetersiz bireylerde GST aktivitesinde azalma olmaması detoksifikasyon için bir avantaj olarak kabul edilebilir. Ancak bu durumun tam anlamıyla tespit edilebilmesi için diğer faz II enzimlerinden en az birkaç tanesinde incelenmesi gereklidir.

**Şekil 4.1** Kontrol grubuna göre SOX yetersiz grubun enzim aktivitesinin değişimleri

Aktiviteler	Karaciğer	Böbrek	Akciğer	Bağırsak
A4H	↑	—	—	—
NDMA-ND	↑	—	—	—
END	↑	—	—	↑
C3ND	↑	—	—	—
AP-ND	—	—	—	—
EROD	↓	—	—	—
PROD	—	—	—	—
MROD	*	*	*	*
BROD	*	*	*	*
AROMATAZ	↓	**	**	**
GST	↓	—	—	—

↑: Artış ↓: Azalış —: Değişkenlik gözlenmedi \*: Aktivite tayin edilemedi \*\*: Ölçüm yapılmadı

Tablo 4.1'de kontrol grubuna göre SOX yetersiz gruptaki farklar göz önüne alınarak Tablo 4.2'de verilen ilaçların reçete edilmesinde SOX yetersiz bireyler göz önüne alınmalıdır.



**Şekil 4.2** CYP450 ile metabolize olan ilaçlar

<b>CYP2E1</b>	<b>CYP2C19</b>	<b>CYP1A2</b>	<b>CYP2D6</b>	<b>CYP3A4</b>
Anestetikler	Amitriptilin	Amitriptilin	Antiarritmikler	Antiarritmikler
Enfluran	Antiepileptikler	Antiprin	Aprindin	Amiodaron
Halotan	Mefenitoin	Asetaminofn	Enkainid	Lidokain
İzofluran	Diazepam	Estradiol	Flekainid	Propafenon
Metoksifluran	S-mefenitoin	Fenasetin	Meksiletin	Kinidin
Sevofluran	Diazepam	Fluvoksamin	Propafenon	Antihistaminikler
Anilin	Diklofenak	Haloperidol	Beta blokörler	Astemizol
Asetaminofen	Heksobarbital	İmipramin	Alprenolol	Klorfeniramin
Benzen	Varfarin	Kafein	Bufuralol	Antikanser ilaçlar
Etanol	İndometazin	Klomipramin	Karvedilol	İfosfamid
Halotan	Klomipramin	Klozapin	Metoprolol	Tamoksifen
Karbontetraklorür	Mefobarbital	Meksiletin	Propranolol	Toremifen
Kloroform	Moklobemid	Naproksen	Timolol	Vinblastin
Klorzoksazon	Nelfinavir	Olanzapin	Nöroleptikler	Kortizol
Teofilin	Nilutamid	Ondansetron	Perfenazin	Midazolam
<b>CYP2C9</b>	Primidon	Parasetamol	Haloperidol	Triazolam
Amitriptilin	Progesteron	Propranolol	Tiyoridazin	Alprazolam
Rosiglitazon	Proguanil	Riluzol	Zuklopentiksol	Bromazepam
İrbesatran	Propranolol	Ropivakain	Risperidon	Diazepam
Losartan	Proton pompası	Siklobenzaprin	Klozapin	Eritromisin
Valsartan	Tolbutamid	Takrin	Perfenazin	İndinavir
Fenitoin	Lansoprazol	Tamoksifen	Opiyatlar	Nelfinavir
Fluoksetin	Omeprazol	Teofilin	Dekstrometorfan	Simvastatin
Glipizid	Pantoprazol	Varfarin	Dihidroergokodein	Hormonlar
Varfarin	Siklofosfamid	<b>CYP2B6</b>	Etilmorfin	Etinilestradiol
Diklofenak	Sitalopram	Bupropion	Hidrokodein	<b>CYP2A6</b>
İbuprofen	S-mefenitoin	Diazepam	Kodein	Kotinin
Naproksen	Teniposid	Mianserin	Tramadol	Kumarin
Piroksikam		Nikotin	SSRI'lar	Nikotin

## 5. SONUÇ

Günümüzde gelişen endüstri ve artan çevre kirliliği ile birlikte birçok kimyasal maddeye maruz kalınmaktadır. İlaç sektörü de, sosyal gelişmelerin yanı sıra, uygulanan sağlık politikalarına da paralel olarak ileri teknoloji kullanan ve hızla gelişen bir sektör olarak bu büyümeden payını almıştır. Hastalıkların tanı ve tedavileri için gerekli olacak ilaçların tarafsız ve bilimsel biçimde etkinliğinin ve güvenilirliğinin tespit edilebilmesi için aydınlatıcı çalışmalar yapılmalıdır. Bunu yanı sıra kullanılan ilaçların metabolizasyonu ve bu metabolik yollarda rol oynayan bileşenlerin etkinliğinin ve aralarındaki etkileşimin araştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda; GST (glutasyon S-transferaz), EROD (etoksirezorufin O-Deetilaz), MROD (metoksirezorufin O-Demetilaz), PROD (pentiloksirezorufin O-Depentilaz), BROD (benziloksirezorufin O-Debenzilaz), anilin 4-hidroksilaz (A4H), N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz (NDMA-ND), eritromisin N-demetilaz (ERND), kafein N-Demetilaz (CN3D) ve aminopiren N-demetilaz (APND) ve aromataz aktivitelerinin sülfid oksidaz enziminin yetersizliğindeki etkileri tanımlanmıştır. Sülfid oksidaz yetersizliğinde özellikle karaciğerde A4H, NDMA-ND, CN3D ve ERND aktiviteleri artmış, EROD, aromataz ve GST aktiviteleri azalmış ve APND ve PROD aktivitelerinde değişkenlik gözlenmezken, MROD ve BROD aktiviteleri tayin edilememiştir. Bu çalışmamızda vücuda eksojen ya da endojen olarak alınan sülfidin detoksifiye edilmesinde rol oynayan sülfid oksidaz enzimiyle, yine vücuda alınan ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol oynayan enzim sistemleri arasındaki ilişki araştırılmış, sülfid oksidaz enzim eksikliğinin ksenobiyotik metabolizması üzerine olan etkileri ile ilgili literatürde referanslara rastlanmamıştır. Yapılan çalışma sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde sülfid oksidaz yetersizliği bulunan ve çeşitli hastalıklardan dolayı ilaç kullanmak zorunda olan hastalarda ilaçların daha dikkatli reçetelenmesi ve aradaki etkileşimlerin göz önünde bulundurulması önerilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abedinzadeh Z (2001). Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(2):166-70.
- Adali, O. and Arinc, E. (1990). Electrophoretic, Spectral, Catalytic And Immunochemical Properties of Highly Purified Cytochrome P450 From Sheep Lung. *Int. J. Biochem.*, 22: 1433-1444.
- Adams DA, Edwards RJ, Davies DS & Boobis AR (1997) Specific inhibition of human CYP1A2 using a targeted antibody. *Biochem. Pharmacol.* 54: 189-197.
- Agar A., Kucukatay V., Yargicoglu P., Aktekin B., Kipmen-Korgun D., Gumuslu S., Apaydin (2000). The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status and lipid peroxidation in Alloxan-induced diabetic rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 39: 257-264.
- Agúndez JAG, Jiménez-Jiménez FJ, Luengo A, Bernal ML, Molina JA, Ayuso L, Vazquez A, Agúndez JAG, Martínez C, Ladero JM, Ledesma MC, Ramos JM, Martín R, Rodríguez A, Jara C & Benitez J (1994) Debrisoquine oxidation genotype and susceptibility to lung cancer. *Clin.Pharmacol. Ther.* 55: 10-14.
- Amdur M.O (1969). Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur, and sulfuric acid. *J Air Pollut Control Assoc*, 19(9):638-44.
- Ament PW, Bertolino JG, Liszewski JL.(2000). Clinically significant drug interactions. *Am Fam Physician*( 2000); 61:1745-1754 1995; 274:29-34
- Andersson E., Nilsson T., Persson B., Wingren G., Toren K (1998). Mortality from asthma and cancer among sulfite mill workers. *Scand J Work Environ Health*, 24(1):12-7.
- Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Pelkonen O & Raunio H (1997) Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 242-249.
- Arinc, E. and Philpot, R.M. (1976). Preparation And Properties Of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits. *J. Biol. Chem.*, 251: 32 13-3220.
- Arinc, E., Sen, A., and Bozcaarmutlu, A. (2000). Cytochrome P4501A and Associated Mixed-Function Oxidase Induction in Fish as a Biomarker for Toxic Carcinogenic Pollutants in the Aquatic Environment., *Pure Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 6: 985-994.
- Armstrong M, Daly AK, Cholerton S, Bateman DN & Idle JR (1992) Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 339: 1017-1018.
- Armstrong, R. N. (1997). Glutathione Transferases. In: Guengreçih, F. P. (Ed.), *Comprehensive Toxicology, Biotransformation. 3. Elsevier Science.*, Oxford, pp. 307-327.
- Atkinson D.A., Sim T.C., Grant J.A (1993). Sodium metabisulfite and SO<sub>2</sub> release: an under-recognized hazard among shrimp fisherman. *Annals of Allergy*, 71: 563-566.
- Ayalogu, E. O., Snelling, J., Lewis, D. F. V., *et al.* (1995). Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus, *Biochim. Biophys. Acta* 1272, 89– 94.
- Ayesh RA, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ & Hezel MR (1984) Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 312: 169-170.
- Aynacioğlu AS (1999) İlaç metabolizmasındaki genetik farklılıkların ilaç tedavisi ve çeşitli hastalıklara yakalanma riski bakımından önemi. *Anadolu Tıp Dergisi*, 1:32-38.
- Aynacioğlu AS (1999) İlaç metabolizmasındaki genetik farklılıkların ilaç tedavisi ve çeşitli hastalıklara yakalanma riski bakımından önemi. *Anadolu Tıp Dergisi*, 1:32-38.
- Aynacioğlu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schröder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmöller J. Low (1999). frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 66(2):185-92.
- Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE & Chenery RJ (1995) Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P-4503A and 2C9. *Xenobiotica*, 25: 261-270.
- Barbeau A, Cloutier T, Roy M, Plasse L, Paris S & Poirier J (1985) Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *Lancet* 30: 1213-1216.
- Barone, J. J. and Roberts, H. R. (1996). Caffeine consumption, *Food Chem. Toxicol.* 34, 119– 129.
- Belpaire FM, Bogaert MG (1996) Cytochrome P450: Genetic polymorphism and drug interactions. *Acta Clinica Belgica*, 51- 4:254-260.
- Bertz RJ & Granneman GR (1997) Use of *in vitro* and *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.* 32: 210-258.

- Bertz RJ, Granneman GR (1997) Use of in vitro and data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*, 32:210-258.
- Bhattacharyya, K.K.; Brake, P.B.; Eltom, S.E.; Otto, S.A.; Jefcoate, C.R. (1995) Identification of a rat adrenal cytochrome P450 active in polycyclic-hydrocarbon metabolism as rat CYP1B1- demonstration of a unique tissue-specific pattern on hormonal and arylhydrocarbon receptor-linked regulation, *J. Biol. Chem.*, 270, 11595-11602.
- Black, S. D. and Coon, M.Y., (1986). Comparative structures of P-450 cytochromes. In: *Cytochrome P-450, structure, mechanism and biochemistry*, edited by P.R. Ortiz de Montellano, pp.16 **Plenum Press**, New York.
- Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., and Jermini, L. S., Zeta, A. (1997). Novel Class of Glutathione Transferases in a Range of Species from Plants to Humans. *Biochem*. 328: 929-935.
- Boobis AR (1995) Prediction of inhibitory drug-drug interactions by studies *in vitro*. In: **Pacifici GM & Fracchia GN**, (eds.) *Advances in drug metabolism in man*. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 513-539.
- Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. (1961). An Enzyme from Rat Liver Catalyzing Conjugation with Glutathione, *Biochem. J.*, 79: 516-525.
- Bork JA, Pharm TR, Leon J ve ark. (1999) A pilot study on Risperidone Metabolism: The role of Cytochromes P450 2D6 and 3A. *J Clin Psychiatry*, 60:469-476.
- Bouchardy C, Benhamou S & Dayer P. (1996) The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res*. 56: 251-253.
- Bourrie, M., Meunier, V., Berger, Y., and Fabre, G. (1996) Cytochrome P450 Isoform Inhibitors as a Tool for The Investigation of Metabolic Reactions Catalyzed by Human Liver Microsomes. *J. Pharmacol. Experiment. Ther.*, 277, 32 1-332.
- Broly F, Libersa C, L'Hermitte M, Becthel P & Dupuis B (1989) Effect of quinidine on the dextromethorphan O demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br. J.Clin. Pharmacol*. 28: 29-36
- Bu-Abbas, A., Copeland, E., Clifford, M. N., *et al.* (1999). Cytochrome P450 induction by tea, and its consequences on the bioactivation of chemical carcinogens: contribution of caffeine and flavanols, *Environm. Toxicol. Pharmacol*. 7, 41-47.
- Bucheli, T. D., and Fent, K., (1995). Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25, 201-268..
- Bulavin, D. V., Korpishchenko, A. I., Gubanov, A. L., and Rechetov, A. V. (1996). Glutathione S-transferase PI-1 in Normal and Cancerous Lung Tissue: Properties, Function, and Possible Mechanisms for Regulating Activity, *Biokhimiia*, 61: 1015-1027.
- Burke MD, Prough RA & Mayer RT (1977). Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction ethoxy-resorufin O-deethylation. *Drug Metab. Dispos*. 5: 1-8.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T & Mayer RT (1985) Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxy-phenoxazones and homologues: A series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol*. 34: 3337-3345.
- Caporaso N, DeBaun MR & Rothman N (1995) Lung cancer and CYP2D6 (the debrisoquine polymorphism): sources of heterogeneity in the proposed association. *Pharmacogenetics* 5:S129-S134.
- Chamulitrat W (1999). Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite. *Free Radic Biol Med*, 27: 411-421.
- Chang TKH, Weber GF, Crespi CL & Waxman DJ (1993) Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res*. 53: 5629-5637.
- Chen S, Chou W, Blouin R ve ark. (1996) Clinical and Practical aspects to screening for the cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism, *Clin Pharmacol Ther*, 60:522- 534.
- Chen S, Chou W, Blouin R ve ark. (1996) Clinical and Practical aspects to screening for the cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism, *Clin Pharmacol Ther*, 60:522-534.
- Cholerton S, Daly AK & Idle JR (1992) The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol. Sci*. 13: 434-439.
- Clark, A. G. (1989). The Comparative Enzymology of the Glutathione S-Transferases from Non-Vertebrate Organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92b: 419-446.
- Cochin, J., and Axelrod, J. (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125: 105-110.

- Cohen H.J., Fridovich I., Rajagopalan K.V (1971). Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem*, 246(2):374-82.
- Collodi, P., Stekoll, M. S., and Rice, S. D., (1984). Hepatic Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activities in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Exposed to Petroleum Hydrocarbons, *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C, 337-341,
- Conney, A. H. (1982). Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Compounds and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Res.*, 42: 4875-4917.
- Conney, A. H., and Burns, J. J., (1972). Metabolic Interactions Among Environmental Chemicals and Drugs, *Science*, 178, pp. 576-586.
- Cooper A.J (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem*, 52:187-222.
- Cooper. D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., and Estabrook, R. W. (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400-402
- Coutts RT, Urichuk LJ (1999) Polymorphic cytochromes P450 and drugs used in psychiatry. *Cell Mol Neurobiol*, 19:325-354.
- Crespi CL, Penman BW, Steiner DT, Smith T, Yang CS, Sutter TR (1997) Development of a human lymphoblastoid cell line constitutively expressing human CYP1B1 cDNA: substrate specificity with model substrates and promutagens. *Carcinogenesis* 12:83-89
- CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Res*. 54: 1085-1091.
- Czerwinski M, McLemore T, Gelboin H & Gonzalez F (1994) Quantification of CYP2B7,
- Danielson, P.B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Met.* 3, 561-597.
- De Groot MJ, Bijloo GJ, Matens BJ, van Acker FAA & Vermeulen NPE (1997) A refined substratemodel for human cytochrome P450 2D6. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 41-48.
- De Leon J, Barnhill J, Rogers T ve ark. (1998) Pilot study of the cytochrome P450-2D6 genotype in a psychiatric state hospital. *Am J Psychiatry*, 155:1278-1280.
- De Matteis, F.; Dawson, S.J.; Boobis, A.R.; Comoglio, A. Inducible bilirubin-degrading system of rat liver microsomes: role of cytochrome P450IA1. *Mol. Pharmacol.* 1991, 40, 686-691.
- Eaton, D. L., and Bammler, T. K. (1999). Concise Review of the Glutathione S-transferases and Their Significance to Toxicology. *Toxicol. Sci.*, 49: 156-164.
- Eichelbaum M, Gross AS (1990) The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 46:377-394.
- Ekins S, VandenBranden M, Ring BJ & Wrighton SA (1997) Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* 7: 165-179.
- Embola, C. W., Weisburger, J. H. and Weisburger, M. C. (2001b). Urinary excretion of N-OH-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-N-glucuronide in F344 rats is enhanced by green tea, *Carcinogenesis* 22, 1095-1098.
- Embola, C. W., Weisburger, M. C. and Weisburger, J. H. (2001a). Green tea and the metabolism of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 rats, *Food Chem Toxicol.* 39, 629-633.
- Erickson, D. A., Mather, G., Trager, W. F., et al. (1999). Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450, *Drug Metab. Dispos.* 27, 1488-1495.
- Ey, P. L., and Ashman, L. K., (1986). The Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Immunoglobulin with Immunoblots for Determining the Specificity of Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures, *Method in Enzymology*, 121, 497-509,
- Frey C., Hoelscher B., Cyrus J., Wjst M., Wichmann H.E., Heinrich J (2003). Association of lung function with declining ambient air pollution. *Environ Health Perspect*, 111(3):383-7.
- Frey M, Kliem R, Saedler H, Gierl A. (1995). Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Molecular and General Genetics*, 246(1):100-9.
- Funck-Brentano C, Becquemont L, Leneuve A, Roux A, Jaillon P & Beaune P (1997) Inhibition by omeprazole of proguanil metabolism: mechanism of the interaction *in vitro* and prediction of *in vivo* results from the *in vitro* experiments. *J. Pharm. Exp. Ther.* 280: 730-738.
- Garrett R.M., Johnson J.L., Graf T.N., Feigenbaum A., Rajagopalan K.V (1998). Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):6394-8.

- Gasser R. (1997). Importance of drug metabolism in drug discovery and development. *Mol. and Appl. Aspects of Oxidative Drug Met. Enzymes*. 303:183-193.
- Gelboin, H. V. (1980). Benzo(a)pyrene Metabolism, Activation and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. *Physiol. Rev.*, 60: 1107-1166.
- Genter, M.B.; Liang, H.-C.; Gu, J.; Ding, X.; Negishi, M.; McKinnon, R.A.; Nebert, D.W. (1998) Role of CYP2A5 and 2G1 in acetaminophen metabolism and toxicity in the olfactory mucosa of the *Cyp1a2 (-/-)* mouse. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1819-1826.
- Gervot L, Carriere B, Costet P, Cugnenc PH, Berger A, Beaune P & de Waziers I (1996) CYP3A5 is the major cytochrome P450 3A expressed in human colon and colonic cell lines. *Environ. Tox. Pharm.* 2: 381-388.
- Gilewicz, M., Guillaume, J. R., and Bertrand, J. C., (1987). Characterization of the Liver Cytochrome P450 in the Marine Fish *Mugil cephalus* and Effects of Hydrocarbons on the Liver Mixed-Function Oxidase Components, *Mar. Biol.*, 96, 157-162.
- Gill HJ, Thia JF, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Back DJ & Park BK (1999) The effect of genetic polymorphisms in CYP2C9 on sulphamethoxazole *N*-hydroxylation. *Pharmacogenetics* 9: 43-53.
- Goasduff, T., Dréano, Y, Guillois, B., *et al.* (1996). Induction of liver and kidney CYP1A1/1A2 by caffeine in rat, *Biochem. Pharmacol.* 52, 1915-1919.
- Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol.* 1995;25(1):25-65
- Goksøyr, A., and Förlin, L., (1992). The Cytochrome P450 in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring, *Scien. Total Env.*, 287,49-69,.
- Goldstein JA & de Morais SMF (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4: 285-299.
- Golembiewski J.A (2002). Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J Perianesth Nurs*, 17(6):393-8.
- Gonzalez FP (1989) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40: 243-288.
- Gu, J.; Zhang, Q.-Y.; Genter, M.B.; Lipinkas, T.W.; Negishi, M.; Nebert, D.W.; Ding, X. (1998). Purification and characterization of heterologously expressed mouse CYP2A5 and CYP2G1: role metabolic activation of acetaminophen and 2,6-dichlorobenzonitrile in mouse olfactory mucosal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285, 1287-1295.
- Gue A, Raeissi S, White R & Stevens J (1997) Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 25: 390-393.
- Guengerich FP (1999) Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 1-17.
- Guengerich, F. P. (1993). Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes. in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Edited by Schenkman J. B. And Greim 11.) vol. 105, pp. 89-103..
- Guengerich, F.P. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemical by human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 391-407.
- Guengerich, F.P., (1990). Characterization of roles in human cytochrome P-450 enzymes in carcinogen metabolism. *Asia Pacific J. Pharmacol.* 5, 327-345.
- Gum JR, Strobel HW. (1981). Isolation of the membrane-binding peptide of NADPH-cytochrome P-450 reductase. Characterization of the peptide and its role in the interaction of reductase with cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(14):7478-86.
- Gunnison A.F., Farruggella T.J., Chiang G., Dulak L., Zaccardi J., Birkner J (1981). A Sulphite-Oxidase-Deficient Rat Model: Metabolic Characterization. *Fd Cosmet Toxicol*, 19: 209-220.
- Gunnison A.F., Jacobsen D.W (1987). Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. *CRC Crit Rev Toxicol*, 17 (3): 185-214.
- Gunnison A.F., Sellakumar A., Currie D., Synder E.A (1987). Distribution, Metabolism And Toxicity of Inhaled Sulfur Dioxide And Endogenously Generated Sulfite in the Respiratory Tract of Normal and Sulfite Oxidase-Deficient Rats. *J Toxicol Environl Health*, 21: 141-162.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974a). Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974b). Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.*, 246: 7139-7139

- Hakkola J, Pasanen M, Purkunen R., Saarikoski S, Pelkonen O, Mäenpää J, Rane A & Raunio H (1994) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem. Pharmacol.* 48: 59-64.
- Handschin C and Meyer U.A (2003) Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors *American Soc. for Pharm.* 55:649-673
- Hansten (1998). *Science and Medicine*; January/February:16-25.
- Hargreaves MB, Jones B.C. Smith DA & Gescher A (1994) Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules. *Drug Metab. Dispos.* 22: 806-810.
- Harlow GR & Halpert JR (1998) Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6636-6641.
- Harris JW, Rahman A, Kin B-R, Guengerich FP & Collins JM (1994) Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res.* 54: 4026-4035.
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E., and Beaune, P., (1999). Human Cytochromes P450, *Mol. Aspect of Med.*, 20, 1-137.
- Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR (1996) 17 $\beta$ -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome mP450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9776-9781
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J. (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 6: 445-600.
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J., The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30, No. 6, pp. 445-600, 1995.
- Heidelberger, C., Current Trends in Chemical Carcinogenesis, *Fedn. Proc.*, 32, 2154-2161, 1973.
- Heim MH & Meyer UA (1992) Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 14: 49-58.
- Hong J & Yang S (1985) The nature of microsomal N-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation. *Carcinogenesis* 6: 1805-1809.
- Hui JY, Beery JT, Higley NA, Taylor SL. (1989). Comparative subchronic oral toxicity of sulphite and acetaldehyde hydroxysulphonate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 27(6):349-59
- Hukkanen, J.; Pelkonen, O.; Hakkola, J.; Raunio, H. (2002) Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol.* 32, 391-411.
- Idle JR (1981) Hydroxylation phenotype and hepatocellular carcinoma. In: Davis M, Tredger JM & Williams R eds. Drug reactions and the liver. London, *Pitman Medical*, pp. 313-315.
- Imai, Y., Ito, A., and Sato, R. (1966). Evidence for Biochemically Different Types of Vesicles in the Hepatic Microsomal Fraction. *J. Biochem.*, 60, pp. 417-428.
- Inouye B., Morita K., Ishida T., Ogata M (1980). Cooperative effect of sulfite and vanadium compounds on lipid peroxidation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 53. 101-107.
- Jakoby W.B., D.M. (1990) The enzymes of detoxification. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 20715-20718
- Jakoby, W. B., (1978). The Glutathione S-Transferases: A Group of Multifunctional Detoxication Proteins, *Adv. Enzymol.*, Vol. 46, pp. 383-414.
- Jakoby, W. B., and Habig, W. H. (1980). Glutathione Transferases, In: Jakoby, W. B. (Ed.), Enzymatic Basis of Detoxication. *Academic Press*, New York, pp. 63-94.
- Jakus V. (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy*. 101(10):541-51
- James MO. (1987) Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ Health Perspect.* Apr;71:97-103
- James, M. O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M. C. (2005). Properties and Regional Expression of a CYP3A-Like Protein in Channel Catfish Intestine. *Aquatic Toxicol.*, 72: 361-371.
- James, V. H., McNeill, J. M., Lai, L. C., Newton, C. J., Ghilchik, M. W., and Reed, M. J. (1987) Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissues: in vivo and in vitro studies. *Steroids*, 50: 269-279.

- Johnson J.L., Rajagopalan K.V (1976). Purification and Properties of Sulfite Oxidase from Human Liver. *J Clin Invest*, 58: 543-550.
- Johnson J.L., Rajagopalan K.V., Cohen H.J (1974). Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem*, 249(3):859-66.
- Kalinina, E. Y., Spiridanova, S. M., Saprin, A. N., and Berezov, T. T., (1988). Disulfiram and Butylhydroxyanisole Induction of Glutathione-S- and UDP Glucuronosyltransferase Activities in the Liver and its Role in Preventing the Toxic Action of Diethylnitrosamine in Rats, *Farmakol. Toksikol.*, 51, 89-92,.
- Kaminsky, L. C. and Zhang, Z. Y. (1997). Human P450 metabolism of warfarin, *Pharmacol. Ther.* 73, 67-74.
- Kato, S., Bowman, E. D., Harrington, A. M., Blomeke, B., and Shields, P. G., Human Lung (1995). Carcinogen-DNA Adduct Levels Mediated by Genetic Polymorphisms In Vivo., *J. Nat. Cancer Inst.*, 87, 902.
- Kawajiri, K.; Hayashi S-i. The CYP1 family. . In *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*; Ioannides, C.; Ed.; CRC Press Inc: Boca Raton, 1996, pp 77-97.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biol. Chem.*, 25: 6183-6188.
- Ketterer, B., Meyer, D. J., and Clark, A. G. (1988). Soluble Glutathione Transferase Isozymes. in Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance. (Sies, H., and Ketterer, B., Ed.) *Academic Press*, London, pp. 73.
- Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR (1998) Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19:1847-1853 [Erratum in *Carcinogenesis* 20:515]
- Klingenberg, M., (1958). Pigments of Rat Liver Microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 376-386,.
- Klotz U, Ammon E. (1998). Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol*. Mar;54(1):7-12
- Ko Y, Abel J, Harth V, Bröde P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Brüning T (2001) Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res* 61:4398-4404
- Koepke J.W., Selner J.C., Dunhill AL (1983). Presence of sulfur dioxide in commonly used bronchodilator solutions. *J Allergy Clin Immunol*, 72:504-8.
- Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. (1994) Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol*. 267(1 Pt 2):H326-32.
- Koop DR (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J*. 6: 724-730.
- Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ, Tracy TS. (1998). Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry*. (1998).24;37(12):4137-47.
- Koymans L, Vermeylen NPE, Van Acker SABE, Tecopele JM, Heykaants JJP, Lavrijsen K, Meuldermans W & Kelder GMDO (1992) A predictive model for substrates of cytochrome P-450-debrisoquine (2D6). *Chem. Res. Toxicol.* 5: 211-219.
- Kucukatay V., Agar A., Yargicoglu P., Gumuslu S., Aktekin B (2003). Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health*, 58(1):14-22.
- Kunze KL & Trager WF (1993) Isoform-selective mechanism based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 649-656.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10(3-4):203-9.
- Lambrecht, R.W.; Sinclair. P.R.; Gorman, N.; Sinclair, J.F. Uroporphyrinogen oxidation catalyzed by reconstituted cytochrome P4501A2. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 294, 504-510.
- Leclercq I, Farrell G, Field J et al. (2000). CYP2E1 And CYP4A As Microsomal Catalysts Of Lipid Peroxides In Murine Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Invest*, 105:1067-75,.
- Leo MA, Lasker JM, Raucy JL, Kim C-I, Black M & Lieber CS (1989) Metabolism of retinol and retinoic acids by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch. Biochem. Biophys.* 269:305-312.
- Lessard E, Yessine MA, Hamelin BA ve ark. (1999) Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics*, 39:435-443.
- Lewis, D. F. V., Eddershaw, P. J., Goldfarb, P. J., et al. (1996). Molecular modelling of CYP3A4 from an alignment with CYP102: identification of key interactions between putative active site residues and CYP3A-specific chemicals. *Xenobiotica* 26, 1067-1086.



- Lieber CS. (1999). Carbohydrate deficient transferrin in alcoholic liver disease: mechanisms and clinical implications. *Alcohol*. 19(3):249-54
- Listowsky, L, Abramovitz, M., Homma, H. and Niitsu, Y. (1988). Intracellular Binding and Transport of Hormones and Xenobiotics by Glutathione S-Transferases. *Drug Met. Rev.*, 19: 305-318.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fair, A. L., and Randal, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol Chem.*, 193: 265-275.
- Lu, A. Y. H., and Coon, M. J. (1968). Role of Hemoprotein P450 in Fatty Acid W-Hydroxylation in a Soluble Enzyme System From Liver Microsomes. *Biol. Chem.*, 243: 1331-1332.
- Lu, A. Y. H., and Lewin, W. (1974). The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System. *Biochem. Biophys. Acta.*, 344: 205-240.
- Luch A, Coffing SL, Tang YM, Schneider A, Soballa V, Greim H, Jefcoate CR, Seidel A, Greenlee WF, Baird WM, Doehmer J (1998) Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[*a,h*]pyrene. *Chem Res Toxicol* 11:686-695
- Mace, K.; Bowman, E.D.; Vautravers, P.; Shields, P.G.; Harris, C.C.; Pfeifer, A.M.A. Characterization of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur. J. Cancer*. 1998, 34, 914-920.
- Magnusson, M. O., and Sandström, R. (2004). Quantitative analysis of eight testosterone metabolites using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spect.*, 18: 1089-1094.
- Mannervik, B. (1985a). Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.*, 113: 490-495
- Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988). Glutathione Transferases- Structure and Catalytic Activity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 23: 283-337.
- Martínez C, Agúndez JAG, Gervasini G, Martín R & Benítez J (1997) Tryptamine: a possible endogenous substrate for CYP2D6. *Pharmacogenetics* 7: 85-93.
- Marzo A, Balant LP (1996) Investigation of xenobiotic metabolism by CYP2D6 and CYP2C19: importance of enantioselective analytical methods. *J Chromatogr*, 678:73-92. McArdle, N. J., Clifford, M. N. and Ioannides, C. (1999). Consumption of tea modulates the urinary excretion of mutagens in rats treated with IQ. Role of caffeine. *Mutation Res.* 441,197-203.
- McKinnon RA, Hall PM, Quattrochi LC, Tukey RH & McManus ME (1991) Localisation of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal human liver and in hepatocellular carcinoma by *in situ* hybridization. *Hepatology* 14: 848-856.
- Meng Z (2003). Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhal Toxicol*, 15(2):181-95.
- Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., and Ketterer, B. (1991). A New Class of Glutathione Transferases Purified From Rat and Man. *Biochem. J.*, 274: 409-414.
- Mosalou, E., Ekstrom, G., Adang, A. E. P., and Morgenstern, R. (1993). Evidence that Rat Liver Microsomal Glutathione Transferase is Responsible for Glutathione-Dependent Protection Against Lipid Peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 1645-1651.
- Mudd S.H., Irreverre F., Laster L (1967). Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science*, 156(3782):1599-602.
- Murray M & Reidy GF (1990) Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacol. Rev.* 42: 85-101.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K-I, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N & Kuroiwa Y (1996b) Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab. Dispos.* 24: 1212-1217.
- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987). P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.
- Nebbia, C., Dacasto, M., Carletti, M. (2003). Postnatal Development of Hepatic Oxidative, Hydrolytic and Cojugative Drug-Metabolizing Enzymes in Female Horses. *Life Sci.*, 74: 1605-1619.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R., and Waterman, M. R. (1987). The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, 6: 1-13.
- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987). P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujikuriyama, Y., Gonzales, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., and Waxman, D. J.

- (1991). The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10: 1-14.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC & Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6(1):1-42.
- Newton DJ, Wang RW & Lu AYH (1994) Cytochrome P-450 inhibitors: evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 23: 154-158.
- Nichols, R.C.; Cooper, S.; Trask, H.W.; Gorman, N.; Dalton, T.P.; Nebert, D.W.; Sinclair, J.F.; Sinclair, P.R. (2003) Uroporphyrin accumulation in hepatoma cells expressing human or Mouse CYP1A2: relation to the role of CYP1A2 in human porphyria cutanea tarda. *Biochem. Pharmacol.* 65, 545-550.
- Nielsen, P. S., de Pater, N., Okkels, H., and Autrup, H., (1996). Environmental Air Pollution and DNA Adducts in Copenhagen Bus Drivers: Effect of GSTM1 and NAT2 Genotypes on Adduct Levels, *Carcinogenesis*, 17, 1021,.
- Oleksiak MF, Churchill GA, Crawford DL. (2002). Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genetics*, 32(2):261-6.
- Omura, T., and Sato, R. (1964a). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes, I. Evidence for its Hemoprotein Nature. *Biol. Chem.*, 239: 2370-2378.
- Orellana, M., Guajardo, V., Araya, L., Rodrigo, T. (2001). Oxidative Stress, Microsomal and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in The Liver of Rats Treated With Acetone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128: 503-509.
- Park KS, Sohn DH, Veech RL & Song BJ (1993) Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur. J. Pharmacol.* 248: 7-14.
- Parkinson, A. (1995). Biotransformation of Xenobiotics. In: Klaassen CD, Editor, Casarett and Doull's Toxicology, New York, *McGraw Hill*, 113-186.
- Parra J, Duarte J, Coria F, Ladero JM, Alvarez CJ & Benitez J (1995) Association between the oxidative polymorphism and the early onset of Parkinson's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 57:291-298.
- Pasanen, M., and Pelkonen, O., (1994). The Expression and Environmental Regulation of P450 Enzymes in Human Placenta, *Crit. Rev. Toxicol.*, 24, 211-229,
- Payne, J. F. (1976). Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a Monitor for Marine Petroleum Pollution. *Science*, 191: 945-946.
- Payne, J. F., Fancery, L. L., Rahimtula, A. D., and Porter, E. L. (1987). Review and Perspective on the Use of Mixed Function Oxygenase Enzymes in Biological Monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C: 233-245.
- Pelkonen O & Breimer DD (1994) Role of environmental factors in the pharmacokinetics of drugs: Considerations with respect to animal models, P-450 enzymes, and probe drugs. In (Welling PG & Balant LP eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 110, pp 289-332, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A & Raunio H (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 28: 1203-1253.
- Pelkonen O, Rautio A, Raunio H & Pasanen M (2000) CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144: 139-147.
- Perez-Lopez, M., Anglade, P., and Bec-Ferte, M. P. (2000). Characterization of Hepatic and Extrahepatic Glutathione S- transferases in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their Induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish. Physiol. Biochem.*, 22: 21-32.
- Porter T:D and Coon M.J. (1991). Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266: 13469-13472.
- Prohaska, J. R., and Ganther, H. E. (1977). Glutathione Peroxidase Activity of Glutathione S-Transferases Purified from Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76: 437-445.
- Raucy, J. L., Lasker, J. M., Kraner, J. C., Salazar, D. E., Lieber, C. S., and Corcoran, G. B. (1990). Induction of cytochrome P450 in the obese over-fed rat. *Mol. Pharmacol.*, 39, 275-280.
- Raunio H, Pasanen M, Mäenpää J, Hakkola J & Pelkonen O. (1995) In: *Pacifici GM & Fracchia GN*, (eds) Advances in drug metabolism in man. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 234-287.
- Reist M., Jenner P., Halliwell B (1998). Sulphite enhances peroxynitrite-dependent alpha1-antiproteinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide? *FEBS Lett*, 423(2):231-4.
- Rencuzogullari E., Ila H.B., Kayraldiz A., Topaktas M (2001). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res*, 490(2):107-12.

- Rendic S & Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 29: 413-580.
- Rettie AE, Korzekwa R, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ & Trager WF (1992) Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450 2C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 54-59.
- Ronis MJJ, Lindros KO & Ingelman-Sundberg M (1996) The CYP2E subfamily. (Ioannides C & Parke DV eds.) pp. 211-239, *CRC Press*, Boca Raton, USA.
- Rouimi, P., Anglade, P., Debrauwer, L., Tulliez, J., Characterization of Pig Liver Glutathione S-Transferases Using HPLC-Electrospray-Ionization Mass Spectrometry, *Biochem. J.*, 317, 879-884, 1996.
- Ryan, D. E., Thomas, P. E., Korzeniowski, D., and Levin, W., (1979). Separation and Characterization of Highly Purified Forms of Liver Microsomal Cytochrome P450 from Rat Treated with Polychlorinated biphenyls, Phenobarbital and 3-Methylcholantrene, *J. Biol. Chem.*, 254, 1360-1374.
- Sachse C, Brookmüller J, Bauer S ve ark. (1997) Cytocrome P450-2D6 variants in a Caucasian population: allele frequency and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 60:284-195.
- Samet J.M., Dominici F., Curriero F.C., Coursac I., Zeger S.L (2000). Fine Particulate Air Pollution And Mortality in 20 U.S. Cities, 1987-1994. *N Engl J Med*, 343: 1742-1749.
- Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I., and Sato, K. (1985). Purification Induction and Distribution of Placental Glutathione Transferase: A New Marker Enzyme for Preneoplastic Cells in the Rat Chemical Hepatocarcinogenesis. *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 82: 3964-3968.
- Schenkman, J. B. (1991). Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase: An Overview, In *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-10, *Plenum Press*, New York.
- Schenkman, J.B (1999) The fate of xenobiotics in the bod. In *Molecular and Applied of Aspects Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*. ( Arinç, E., Schenkman, J.B., and Hodgson, E., Eds. ), pp. 1-20. *Plenum Publishers*, New York.
- Schuetz JD, Kauma S & Guzelian PS (1993) Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J. Clin. Invest.* 92: 1018-1024.
- Schultz, M.A.; Morin, D.; Chang, A-M.; Buckpitt, A. Metabolic capabilities of CYP2F2 with various pulmonary toxicants and its relative abundance in mouse lung subcompartments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 296, 510-519.
- Sen A, Kirikbakan A (2004). Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*). *Biochem. (Moscow)* 69: 993-1000.
- Shi X., Mao Y (1994). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1):141-7.
- Shimada K. (1999). Treatment of hypertension in the aged Nippon Naika Gakkai Zasshi. (1999) 10;88(2):285-90
- Shimada T, Hayes CL, Spink DC, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-2984
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y & Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 414-423.
- Shou M, Grogan J, Mancewicz JA, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV & Korzekwa KR (1994) Activation of CYP 3A4: Evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* 33: 6450-6455.
- Sijm, D. T. H. M., and Opperhuizen, A., (1989). Biotransformation of Organic Chemicals by Fish: Enzyme Activities and Reactions, In: Hutzinger, O., (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes*, Vol. 2E, Springer, Berlin, pp. 163-235,
- Simon R.A (1986). Sulfite sensitivity *Ann Allergy*, 56(4):281-8.
- Simpson, E. R., Michael, M. D., Agarwal, V. R., Hinshelwood, M. M., Bulun, S. E., and Zhao, A. Y. (1997) Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J.*, 11: 29-36.
- Simpson, E. R., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S., and Jones, M. (1999) Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine- Related Cancer*, 6: 131-137.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D., et al., (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.*, 15: 342-355.

- Sinclair, P.R.; Gorman, N.; Dalton, T.; Walton, H.S.; Bement, W.J.; Sinclair, J.F.; Smith, A.G.; Nebert, D.W. (1998) Uroporphyrin produced in mice by iron and 5-aminolaevulinic acid does not occur in Cyp1a2(-/-) null mutant mice. *Biochem. J.*, 330, 149-153.
- Sivapathasundaram, S.; Magnisali, P.; Coldham, N.G.; Howells, L.C.; Sauer, M.J.; Ioannides, C. (2003) Cytochrome P450 expression and testosterone metabolism in the liver of deer. *Toxicology* 187, 49-65.
- Sivapathasundaram, S.; Magnisali, P.; Coldham, N.G.; Howells, L.C.; Sauer, M.J.; Ioannides, C. (2001). A study of the expression of the xenobiotic-metabolising cytochrome P450 proteins and of testosterone metabolism in bovine liver. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 635-645.
- Sohn OS, Ischizaki H, Yang CS & Fiala ES (1991) Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and *N*-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis* 12: 127-131.
- Sonnichsen DS, Liu Q, Schuetz EG, Schuetz JD, Pappo A, Relling MV (1995). Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(2):566-75.
- Spatzeneger M, Jaeger W (1995) Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Met Rev*, 27:397-417.
- Spies, R. B., Felton, J. S., and Dillard, L., (1982). Hepatic Mixed-Function Oxidases in California Flatfishes are Increased in Contaminated Environments by Oil and PCB Ingestion, *Mar. Biol.*, 70, 117-127.
- Spink DC, Hayes CL, Young NR, Christou M, Sutter TR, Jefcoate CR, Gierthy JF (1994) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of novel 17 $\beta$ -estradiol 4-hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51:251-258.
- Stegeman, J. J. (1995). Diversity and Regulation of Cytochrome P450 in Aquatic Species, In *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health*, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E. Eds.), pp. 135-158. *Springer-Verlag*, Heidelberg.
- Stegeman, J. J., Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Their Metabolism in Marine Environment, In *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, (Gelboin, H. V. and P. O. P. Ts'o, Eds.), pp. 1-60. Academic Press, New York, 1981.
- Stegeman, J. J., and Hahn, M. E. (1994). Induction of Cytochrome P4501A by Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists in Porcine Aorta Endothelial Cells in Culture and Cytochrome P4501A1 Activity in Intact Cells. *Molec. Pharmacol.*, 47: 296-306.
- Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., and Arend, U., Glutathione Transferases in Aquatic and Terrestrial Animals from Nine Phyla, *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C(1): 73-82, 1987.
- Stevens, J.C.; Shipley, L.A.; Cashman, J.R.; Vandenbranden, M.; Wrighton, S.A. Comparison of human and rhesus monkey *in vitro* phase I and phase II hepatic drug metabolism activities. *Drug Met. Disp.* 1993, 21, 753-760.
- Stoudemire A (1995) New antidepressant drugs and the treatment of depression in the medically ill patient. *Psychiatr Clin North Am*; 19: 495-514.
- Streetman DS, Bertino JS & Natziger AN (2000) Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of *in vivo* cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 10: 187-216.
- Stresser DM & Kupfer D (1999) Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-4502B6. *Drug Metab. Dispos.* 27: 517-525.
- Strobl GR, von Kruedener S, Stöckigt J, Guengerich FP, Wolff T. (1993). Development of a pharmacophore for inhibition of human liver cytochrome P-450 2D6: molecular modeling and inhibition studies. *J Med Chem.* 30;36(9):1136-45
- Strom S, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT, Schuetz JD & Schuetz EG (1996) Use of human hepatocytes to study P450 gene induction. *Methods Enzymol.* 272: 388-401.
- Szotakova, B., Baliharova, V., Lamka, J., Nozinova, E., Wsol, V., Velik, J., Machala, M., Neca, J., Soucele, P., Susova, S., and Skalova, L., (2004). Comparison of *In Vitro* Activities of Biotransformation Enzymes in Pig, Cattle, Goat and Sheep, *Research in Veterinary Science*, 76, 43-51.
- Takamatsu, Y., and Inaba, T. (1994). Inter-individual Variability of Human Hepatic Glutathione S-Transferase Isozymes Assessed by Inhibitory Capacity. *Toxicol.*, 88: 191-200.
- Tanaka M, Hashimoto Y, Numano F. (2000). Decreased left ventricular contractility reserve in patients with never-treated essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Nov;27(11):871-5
- Teles M, Gravato C, Pacheco M, Santos MA (2004). Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to beta-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 beta-estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere.* 57(2):147-58

- Thompson EA, Siiteri PK. (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem.* 10;249(17):5373-8.
- Thornton-Manning, J.R.; Ruangyuttikarn, W.; Gonzalez, F.J.; Yost, G.R. (1991). Metabolic activation of the pneumotoxin, 3-methylindole by vaccinia-expressed cytochrome P450s. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181, 100-107
- Thummel, K.E.; Wilkinson, G.R. *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998, 38, 389-430.
- Tiano HF, Wang RL, Hosokawa M, Crespi C, Tindall KR & Langenbach R (1994) Human tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13: 1789-1794.
- Tovey ER, Baldo BA. Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. *J Allergy Clin Immunol.* 1987 Jan;79(1):93-102
- Tsuchida S, Sato K. (1992). Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 27(4-5):337-84.
- Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı maddeleri Tebliği (25.08.2002). *Tebliğ No2002/57, 24857 sayılı Resmi Gazete.*
- Ueng Y-F, Kuwabara T, Chun Y-J & Guengerich FP (1997) Cooperativity in oxidations catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 36: 370-381.
- Ueng, T. H., and Alvares, A. P., (1985). Selective Induction and Inhibition of Liver and Lung Cytochrome P450 Dependent Monooxygenases by the PCBs Mixture, Aroclor 1016, *Toxicol.*, 35, 83-94,
- Wang RW, Newton DJ, Liu N, Atkins WM & Lu AYH (2000) Human cytochrome P-450 3A4: In vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab. Dispos.* 28: 360-366.
- Weltman M, Farrell G, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C: Hepatic Cytochrome P450 2E1 Is Increased In Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 27:128-33, 1998.
- Xie, Q.; Zhang, Q-Y.; Zhang, Y.; Su, T.; Gu, J.; Kaminsky, L.S.; Ding, X. Induction of mouse CYP2J by pyrazole in the eye, kidney, liver, lung, olfactory mucosa and small intestine, but not in the heart. *Drug Met. Disp.* 2000, 28, 1311-1316.
- Yamaguchi K., Sakakibara S., Asamizu J., Ueda I (1973). Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 297(1):48-59
- Yamazaki H, Inoue K, Turvy CG, Guengerich FP & Shimada T (1992) Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 25: 168-174.
- Yang CS, Tu YY, Koop DR & Coon MJ (1985) Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* 45: 1140-1145.
- Yin H, Orcarson M, Johansson I, Yue Q-Y, Dahl M-L, Tabone M, Arinco S, Albano E & Ingelman-Sundberg M (1997) Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Mol. Pharmacol.* 51: 370-376.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 106Y244	
<b>Proje Başlığı:</b> Sülfiteksidaz Yetersizliğinin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkileri	
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b>	Prof. Dr. Alaattin ŞEN Begüm TÛTÛNCÛ
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b>	Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kınıklı Kampüsü 20070 Kınıklı- DENİZLİ
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>	TUBİTAK Atatürk Bulvarı No: 221 06100 Kavaklıdere ANKARA
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b>	01/11/2006      01/05/2007
<b>Öz:</b> Bu çalışmada 7 hafta boyunca AIN-76 yemi ve 200 ppm W içeren suyla beslenen sülfiteksidaz yetersizliği sağlanmış olan sıçanlardan elde edilen dokularda ilaç metabolizmasında rol oynayan anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz, eritromisin N-demetilaz, kafein N-demetilaz ve aminopiren antipiren N-demetilaz etoksirezorufin O-deetilaz, metoksirezorufin O-demetilaz, pentiloksirezorufin O-depentilaz, benziloksirezorufin O-debenzilaz, glutatyon S-transferaz aktiviteleri ölçülerek elde edilen veriler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. Yapılan ölçümler sonucunda; anilin 4-hidroksilaz, N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz, eritromisin N-Demetilaz ve kafein N-demetilaz aktivitelerinde karaciğerde kontrol grubuna göre sülfiteksidaz yetersiz grupta artış gözlemlendi. Eritromisin N-Ddemetilaz aktivitelerinde ince bağırsaktada artış tespit edildi. Aminopiren N-demetilaz, etoksirezorufin O-deetilaz, pentiloksirezorufin O-depentilaz aktivitelerinde, yaklaşık olarak bir değişkenlik gözlenmezken, yapılan ölçümlerde metoksirezorufin O-demetilaz ve benziloksirezorufin O-debenzilaz aktiviteleri ise tayin edilemedi. GST-CDNB aktivitesinde de karaciğerde de sülfiteksidaz yetersiz grupta kontrol grubuna göre azalış gözlenirken çok büyük bir değişkenlik tespit edilemedi.	
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Sülfiteksidaz, Sitokrom P450 enzimleri, İlaçları metabolize eden enzimler	
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Henüz Yayın Yapılmamıştır (şu an <i>Food Chem. Toxicol</i> için bir yayın hazırlanmaktadır).	