

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMIYUM VE NİKELİN BİRLİKTE SIÇAN TESTİSİ
KSENOBİYOTİK METABOLİZE EDEN ENZİM SİSTEMLERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ECZ. AHMET OĞUZ ADA

99447

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MÜMTAZ İŞCAN**

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**ANKARA
2000**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 17 / 08 / 2000



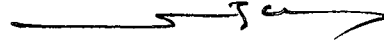
Prof. Dr. Nevin VURAL

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Mesude İŞCAN
ODTÜ Biyoloji Bölümü



Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Benay Can EKE
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Tülay ÇOBAN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bizlerin yetişmesinde emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocamız Prof. Dr. Nevin VURAL' a saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında bana yol gösteren, yüksek lisans tezimin hazırlanması sırasında bana her türlü olanağı sağlayan ve beni yetiştiren değerli hocam Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN' a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve bildiklerini öğreten Doç. Dr. Tülay Çoban' a, yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Benay Can EKE' ye, oda arkadaşım İlker ATEŞ' e ve çalışmalarım sırasında yardım ve teşviklerini esirgemeyen sevgili eşim Didem' e, anneme ve babama teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Tablolar	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Kimyasal Maddelerin Biyotransformasyonları	4
2.1.1. I. Faz Reaksiyonları	5
2.1.1.1. CYP' lerin Tarihçesi	5
2.1.1.2. CYP Enzim Sisteminin Katalizlediği Reaksiyonlar	6
2.1.1.3. CYP Enzim Sisteminin Bileşenleri	7
2.1.1.4. CYP Sistemine Etki Eden Faktörler	12
2.1.1.5. Kimyasal Maddelerle CYP' lerin İndüksiyonu	17
2.1.1.6. Kimyasal Maddelerle CYP' lerin İnhibisyonu	19
2.1.2. Glutasyon	20
2.1.2.1. Hücrel Glutasyonun Tüketilmesi	22
2.1.3. II. Faz Reaksiyonları	23
2.1.3.1. Glutasyon S-transferazlar	24
2.1.3.1.1. Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması	25
2.1.3.1.2. Glutasyon S -Transferaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler	29
2.2. Lipid Peroksidasyon ve Mekanizması	31
2.2.1. Glutasyon Tüketimi ve Lipid Peroksidasyon Arasındaki İlişki	35
2.2.2. Ağır Metaller ve Lipid Peroksidasyon Arasındaki İlişki	36
2.2.3. Lipid Peroksidasyonu Etkileyen Kimyasal Maddeler	36
2.3. Metaller	38
2.3.1. Kadmiyum	39
2.3.1.1. Doğada Bulunuşu ve Maruziyet Yolları	39
2.3.1.2. Genel Toksikitesi	41
2.3.1.3. Karsinojenite	43
2.2.1.4. Kadmiyumun Testisler Üzerindeki Etkileri	43
2.3.2. Nikel	45
2.3.2.1. Doğada Bulunuşu ve Maruziyet Yolları	45
2.3.2.2. Metabolizma ve Genel Toksikite	46
2.3.2.3. Karsinojenite	46
2.3.2.4. Teratojenite ve Embriyotoksikite	48
2.3.2.5. Ni' nin Testisler Üzerindeki Etkileri	50

2.3.3. Kadmiyum ve Nikelin CYP Sistemi Üzerindeki Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	50
2.3.4. Kadmiyum ve Nikelin GSH ve GST' ler Üzerindeki Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	52
2.3.5. Kadmiyum ve Nikelin LP Üzerindeki Etkileri İle İlgili Yapılmış Çalışmalar	53
3. MATERYAL VE METOT	55
3.1. Materyal	55
3.1.1. Kullanılan Maddeler	55
3.1.2. Kullanılan Aletler	56
3.1.3. Kullanılan Hayvanlar	57
3.2. Metot	57
3.2.1. Kimyasal Maddelerin Deney Hayvanlarına Uygulanması	57
3.2.2. Testis Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonunun hazırlanması	57
3.2.3. GSH için doku ekstraktı supernatantının hazırlanması	58
3.2.4. Protein tayini	59
3.2.4.1. İşlem	59
3.2.5. EROD Aktivitesinin Tayini	60
3.2.5.1. Reaksiyon Ortamı	61
3.2.5.2. Standart	61
3.2.5.3. İşlem	61
3.2.6. Lipid Peroksidasyon Ölçümü	62
3.2.6.1. Standart	64
3.2.6.2. İşlem	64
3.2.7. GSH ölçümü	64
3.2.7.1. Reaksiyon Ortamı	65
3.2.7.2. Standart	65
3.2.7.3. İşlem	65
3.2.8. Glutasyon S-transferazların ölçümü	66
3.2.8.1. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	66
3.2.8.1.1. Reaksiyon ortamı	67
3.2.8.1.2. İşlem	67
3.2.8.2. 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB)	68
3.2.8.2.1. Reaksiyon Ortamı	68
3.2.8.2.2. İşlem	69
3.2.8.3. 3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (Etakrinik asit, EAA)	69
3.2.8.3.1. Reaksiyon Ortamı	69
3.2.8.3.2. İşlem	69
3.2.8.4. 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP)	70
3.2.8.4.1. Reaksiyon Ortamı	70
3.2.6.4.2. İşlem	71
3.2.8.5. Kümen hidroperoksit (CHPx)	71
3.2.8.5.1. Reaksiyon Ortamı	71

3.2.8.5.2. İşlem	72
3.2.9. Kullanılan İstatistiksel Yöntem	73
4. BULGULAR	74
4.1. Kullanılacak Yöntemler için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması	74
4.1.1. EROD Enzim Aktivitesi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması	74
4.1.1.1. pH' nın EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi	74
4.1.1.2. Protein Miktarının EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi	74
4.1.1.3. İnkübasyon Süresinin EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi	75
4.1.1.4. Etoksiresorufin Konsantrasyonunun EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi	75
4.1.2. Lipid Peroksidasyon Düzeyi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması	76
4.1.2.1. Doku Miktarının LP Düzeyi Üzerine Etkisi	76
4.1.3. GSH Ölçümünde Maksimum Düzeyin Eldesi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması	76
4.1.3.1. pH' nın GSH Düzeyi Üzerine Etkisi	77
4.1.3.2. Doku Homojenatı Supernatant Miktarının GSH Düzeyi Üzerine Etkisi	77
4.1.3.3. DTNB Konsantrasyonunun GSH Düzeyi Üzerine Etkisi	78
4.1.4. CDNB Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması	78
4.1.4.1. pH' nın CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	78
4.1.4.2. Protein Miktarının CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	79
4.1.4.3. CDNB Konsantrasyonunun CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	79
4.1.4.4. GSH Konsantrasyonunun CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	80
4.1.5. DCNB Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması	80
4.1.5.1. pH' nın DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	80
4.1.5.2. Protein Miktarının DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	81
4.1.5.3. DCNB Konsantrasyonunun DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	81
4.1.5.4. GSH Konsantrasyonunun DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	82
4.1.6. EAA Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması	82
4.1.6.1. pH' nın EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	82
4.1.6.2. Protein Miktarının EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	83

4.1.6.3. EAA Konsantrasyonunun EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	83
4.1.6.4. GSH Konsantrasyonunun EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	83
4.1.7. EPNP Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması	84
4.1.7.1. pH' nın EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	84
4.1.7.2. Protein Miktarının EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	84
4.1.7.3. EPNP Konsantrasyonunun EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	85
4.1.7.4. GSH Konsantrasyonunun EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	85
4.1.8. CHPx Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması	86
4.1.8.1. pH' nın CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	86
4.1.8.2. Protein Miktarının CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	86
4.1.8.3. CHPx Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	87
4.1.8.4. GSH Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	87
4.1.8.5. Glutasyon Redüktaz Miktarının CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	88
4.1.8.6. NADPH Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	88
4.2. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EROD Aktivitesi, GSH ve LP Düzeyleri ile CDNB, DCNB, EAA, EPNP, CHPx GST Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri	89
4.2.1. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EROD Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	89
4.2.2. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste LP Düzeyi Üzerindeki Etkileri	89
4.2.3. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste GSH Düzeyi Üzerindeki Etkileri	91
4.2.4. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste CDNB GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	91
4.2.5. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste DCNB GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	92
4.2.6. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EAA GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	93
4.2.7. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EPNP GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	93

4.2.8. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste CHPx GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	95
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
ÖZET	100
SUMMARY	101
KAYNAKLAR	102



SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	Anilin Hidroksilaz
AMND	Aminopirin N-demetilaz
BSO	Bütionin sülfoksimimin
Cd	Kadmiyum
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CHPx	Kümen hidroperoksit
CYP	Sitokrom P450
DCNB	1,2-dikloro-4-nitrobenzen
DEM	Dietil maleat
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)
ϵ	Molar Absorptivite
EAA	3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (Etakrinik asit)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMND	Etilmorfin N-demetilaz
EPNP	1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan
EROD	7-etoksiresorufin o-deetilaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
LP	Lipid Peroksidasyon
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Ni	Nikel
<i>p</i>	Anlamlılık seviyesi
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
U	Ünite

ŞEKİLLER

1. Protein standart eğrisi	60
2. 7-etoksiresorufin' in 7-etoksiresorufin-0-deetilaz ile resorufine dönüşümü	61
3. Resorufin standart eğrisi	63
4. MDA standart eğrisi	63
5. GSH standart eğrisi	66
6. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen CDNB reaksiyonu	67
7. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen DCNB reaksiyonu	68
8. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen EAA reaksiyonu	69
9. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen EPNP reaksiyonu	70
10. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen CHPx reaksiyonu	72
11. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EROD aktivitesi üzerindeki etkileri	90
12. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste LP düzeyi üzerindeki etkileri	90
13. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste GSH düzeyi üzerindeki etkileri	91
14. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste CDNB GST aktivitesi üzerindeki etkileri	92
15. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste DCNB GST aktivitesi üzerindeki etkileri	93
16. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EAA GST aktivitesi üzerindeki etkileri	94
17. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EPNP GST aktivitesi üzerindeki etkileri	94
18. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste CHPx GST aktivitesi üzerindeki etkileri	95

TABLOLAR

1. İnsan CYP aileleri	9
2. Önemli CYP aileleri	10
3. Bazı CYP izozimleri ve spesifik substratları	11
4. Bazı CYP izozimlerinin indükleyicileri ve inhibitörleri	19
5. GST' lerin sınıflandırılması	27
6. GST izozimlerinin polimorfik özellikleri ve substratları	28
7. EROD aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	62
8. GSH ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları ..	65
9. CDNB aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	67
10. DCNB aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	68
11. EAA aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	70
12. EPNP aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	71
13. CHPx aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	72
14. pH' nın EROD aktivitesi üzerine etkisi	74
15. Protein miktarının EROD aktivitesi üzerine etkisi	75
16. İnkübasyon süresinin EROD aktivitesi tayini üzerine etkisi	75
17. Etoksiresorufin konsantrasyonunun EROD aktivitesi tayini üzerine etkisi	76
18. Doku miktarının LP düzeyi üzerine etkisi	76
19. pH' nın GSH düzeyi üzerine etkisi	77
20. Doku miktarının GSH düzeyi üzerine etkisi	77
21. DTNB konsantrasyonunun GSH düzeyi üzerine etkisi	78
22. pH' nın CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	78
23. Protein miktarının CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	79
24. CDNB konsantrasyonunun CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	79
25. GSH konsantrasyonunun CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	80
26. pH' nın DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	80
27. Protein miktarının DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	81
28. DCNB konsantrasyonunun DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	81
29. GSH konsantrasyonunun DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	82
30. pH' nın EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	82

31. Protein miktarının EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	83
32. EAA konsantrasyonunun EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	83
33. GSH konsantrasyonunun EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	84
34. pH' nın EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	84
35. Protein miktarının EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	85
36. EPNP konsantrasyonunun EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	85
37. GSH konsantrasyonunun EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	86
38. pH' nın CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	86
39. Protein miktarının CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	87
40. CHPx konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	87
41. GSH konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	88
42. Glutasyon redüktaz miktarının CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	88
43. NADPH konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi	89

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişen endüstrileşmeyle birlikte çevremizdeki hava, su ve toprak her geçen gün kirlenmekte ve kirliliğe artan oranlarda maruz kalmaktadır. Doğayı kirleten kimyasal maddelerin önemli bir bölümünü metaller oluşturur. Bilindiği gibi insanlar günlük yaşantılarında çevrede yaygın olarak bulunan metallere kadmiyum (Cd) ve nikel (Ni) mesleki olarak veya meslek dışı maruz kalmaktadırlar (Kasprzak, K.S., 1987; Kazantzis, G., 1987). Deneysel çalışmalar ve epidemiyolojik araştırmalar, bu metallerin insanlarda ve deney hayvanlarında toksik ve karsinojenik etkili olduklarını da göstermiştir.

Sitokrom P450 (CYP) enzimlerinin ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), pestisitler ve aromatik aminler de dahil olmak üzere birçok ksenobiyotiği aktif toksik ve/veya karsinojenik metabolitlerine dönüştürdükleri bilinmektedir. Ayrıca CYP enzimleri, steroidler, yağ ve safra asitleri ve prostaglandinler gibi endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynamakta, karsinogenezis ve mutajenezis gibi özel toksik etkilerin ortaya çıkmasında; ilaveten ilaçların etkinliğinde de belirleyici olabilmektedirler. İndirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon-S-transferazlar (GST) ise mikrozomal oksidasyonlar sonucu oluşan aktif ara ürünlerin bertaraf edilmesinde görev alır. CYP enzimlerini indükleyen maddeler ksenobiyotiklerin aktivasyonunu da arttırmaktadırlar. Aynı şekilde konjugasyon kapasitesini düşüren maddeler de aktif metabolitlerin detoksikasyonunu önemli ölçüde azaltmış olurlar. Aktif ara ürünlerin zarar verme derecesi bunların oluşma hızı ile ortamdaki konjugasyon enzimleri ve konjugasyon ajanlarının miktarına bağlıdır. Eğer çok miktarda aktif ara ürün oluşmuşsa konjugasyon kapasitesi sınırlı olduğundan bu elektrofilik metabolitler doğrudan proteinler veya DNA ile kovalan bağlanarak hücresel hasara sebep olacaktır. Dolayısıyla Cd ve Ni'nin aktivasyon ve detoksikasyon dengesi üzerindeki etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Her iki metalin de tek başına sıçan, fare ve kobay dahil olmak üzere birçok hayvan türünde ve çeşitli dokulardaki CYP enzimlerini inhibe ettikleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. GSH düzeyi ve GST enzimleri üzerine olan etkileri ise hayvan türüne, organa ve GST izozimlerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Ayrıca bu metallerin oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonu (LP) arttırdığı ve bunun sonucunda hücresel hasara sebep olduğu da gösterilmiştir (Sunderman ve ark., 1985; Andersen ve Andersen, 1989; Manca ve ark., 1991). Ancak bu metallerin her birine ayrı ayrı maruz kalınmasının yanı sıra birlikte maruziyet de söz konusudur (örn. Ni-Cd pil üretiminde ve sigara dumanında). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Cd ve Ni' nin birlikte verilmeleri halinde sıçanlarda fenobarbital ve 3-metilkolantrenle indüklenebilen karaciğer CYP' leri ve ilgili bazı enzimlerin aktivitelerini yükselttikleri belirlenmiştir (İşcan ve ark., 1992b). Cd ve Ni' nin tek başlarına hepatik CYP' ler üzerindeki baskılayıcı etkileri düşünüldüğünde, bu durum beklenmeyen bir gözlemdir. Yukarıda bahsettiğimiz gibi spesifik CYP izozimleri ilaçlar ve kimyasal karsinojenler de dahil olmak üzere bazı ksenobiyotikleri aktive ettikleri için bu izozimlerin seviyelerindeki yükselmeler, oluşan aktif ürünlerin toksik ve/veya karsinojenik etkilerini potansiyalize edecektir. Bu sonuçlardan sonra kobay ve fare türleri üzerinde de çalışmalar yapılmış ancak kombine uygulamada CYP enzimlerinde benzer yükselmeler gözlenememiştir. CYP çalışmalarında kullanılan doz rejimi ile sıçan, kobay ve fare karaciğer GST aktiviteleri ölçülmüş ve hayvan türü ile GST izozimine bağlı olarak değişen farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunlara ilaveten akciğer ve böbrekte metal kombinasyonunun CYP ve GST izozimleri üzerinde farklı etkileri gözlenmiştir. Örneğin kombine uygulamanın metallerin tek başlarına verildiklerinde sebep oldukları inhibisyonu düzelttiği görülmüştür.

Testisler de bu çevre kirleticilerininin hedef organları arasında yer almaktadır. Her iki metalin karaciğer ve böbrekte olduğu gibi testiste de

biriktiği (Flick, D.F. ve ark.,1971; Sunderman, F.W., 1981a), Cd' nin testislerde tümör (Flick ve ark.,1971) ve nekroz oluşturduğu (Clegg ve ark., 1967) ayrıca üreme üzerine toksik etkidiği (Saygı ve ark., 1991) saptanmıştır. Ancak Cd ve Ni' nin tek başlarına ve birlikte ksenobiyotiklerin aktivasyonunda rol oynayan CYP enzim sistemi ile ksenobiyotiklerin inaktivasyonunda görev alan GSH ve GST enzim aktivitelerine ve LP üzerine etkilerinin bu organda irdelenmediği gözlenmektedir. Bu yaklaşım, metallerin testiste aktivasyon ve detoksikasyon dengesi üzerindeki olası etkilerini ortaya koyarak toksik etkilerine bir ölçüde ışık tutabilecektir.

Bu nedenle çalışmamızda sıçanlarda Cd ve Ni' nin testisteki 7-etoksiresorufin-0-deetilaz (EROD) aktivitesi, lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi ve çeşitli substratlar kullanılarak (1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), 3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (Etakrinik asit, EAA), 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP), kümen hidroperoksit (CHPx)) GST aktiviteleri üzerinde tek başlarına ve birlikte verildiklerindeki akut etkileri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kimyasal Maddelerin Biyotransformasyonları

Artan endüstrileşme ve kentleşme ile canlılar her geçen gün pek çok yabancı kimyasal maddeye maruz kalmaktadırlar. Organizmaya giren bu yabancı maddelerin (ksenobiyotiklerin) çoğu lipofiliktir ve lipid membranlardan geçerek lipoproteinlerle vücut sıvılarına taşınırlar. Bu lipofilik ksenobiyotikler çok çabuk absorblanırlar, ancak çok az itrah edilirler. Bu yüzden sürekli, veya aralıklarla maruziyet sonucu organizmada bu kimyasal maddeler birikir. Yağda çözünen (lipofil) bileşiklerin, suda çözünen (hidrofil) bileşiklere dönüştüğü ve enzimlerle meydana gelen biyokimyasal olaylara biyotransformasyon denir. Kimyasallar I. Faz ve II. Faz reaksiyonları ile biyotransformasyona uğrarlar. I. Faz reaksiyonları, oksidasyon, indirgenme ve hidroliz; II. Faz Reaksiyonları ise çeşitli konjugasyon veya sentez reaksiyonlarıdır. I. Fazda yağda çözünen ksenobiyotikler daha polar metabolitler haline geçerler. II. Fazda ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif halde elimine olurlar.

I. Faz ve II. Faz reaksiyonları ksenobiyotiklerin vücuttan daha kolay atılmalarını sağlar. Ksenobiyotiklerin atılması esnasında detoksikasyon veya intoksikasyon görülebilir. Genellikle detoksikasyon görülmesine rağmen, bu her zaman geçerli değildir. Bazı kimyasal maddeler de biyotransformasyon sonucu daha toksik bileşiklere dönüşürler. Özellikle kanserojen maddeler, organofosfatlar, bunlara örnek verilebilir. Kimyasal maddelerin biyotransformasyonu sonucu oldukça kuvvetli aktif ara ürünleri oluşur. Bir maddenin biyotransformasyon sonucu toksik olup olmayacağı enzimatik şekillenmede belli olur. Biyotransformasyonun yer aldığı organlar karaciğer başta olmak üzere; akciğer, böbrek, bağırsak, deri, testis, plasenta ve böbreküstü bezlerdir.

2.1.1. I. Faz Reaksiyonları

I. Faz reaksiyonları içinde en önemli reaksiyonlar yükseltgenme reaksiyonlarıdır. Çünkü ksenobiyotiklerin % 90-95'i bu yolla metabolize olur ve yükseltgenmeden sonra genellikle aktivasyon görülür. Yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen sistemler:

1. Mikrozomal Enzim Sistemi

- CYP içeren monooksijenazlar
- Flavın içeren monooksijenazlar.

2. Nonmikrozomal enzim sistemi

- Sitozolik Enzimler (alkol dehidrogenaz, aldehit dehidrogenaz)
- Mitokondriyel enzimler (MAO, DAO) olarak sınıflandırılırlar.

I. Faz reaksiyonlarının önemli bir bölümü, mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Ksenobiyotik metabolize eden enzim sistemi ya da diğer bir adıyla karışık fonksiyonlu oksidazlar birçok ilacın ve ksenobiyotığın metabolizmasından sorumlu olan bir sistemdir. Organizma için yabancı olan birçok kimyasal maddenin yanı sıra safra asitleri, yağ asitleri, hormonlar ve prostoglandinler gibi endojen maddelerin metabolizmasında karışık fonksiyonlu oksidazlar önemli rol oynarlar.

2.1.1.1. CYP' lerin Tarihçesi

İlk kez 1938-1943 yıllarında Albert Claude, memeli hücrelerinin mikrozomal fraksiyonunu izole etmiştir. Dokuyu homojenize ettikten sonra, yüksek devirde çöken partiküllerin fazla miktarda lipid, ribonükleik asit (RNA), hem ve protein içerdiğini saptamış ve bunlara küçük cisimcikler anlamına gelen (microbodies) mikrozomlar adını vermiştir. 1953 yılında da elektron mikroskopunun geliştirilmesi ile mikrozomların gerçekte endoplazmik retikulum oldukları gösterilmiştir (Claude, 1969).

Mueller ve Miller, karaciğer homojenatından elde edilen mikrozomal fraksiyonun aminoazo boyalarının azobağının indirgenmesini ve oksidatif N-

demetilasyonunu katalizlediğini göstermişlerdir. Böylece, karaciğer mikrozomları ile kimyasal maddelerin metabolizması arasındaki ilişki ilk kez gösterilmiştir (Mueller ve Miller, 1953).

Daha sonra, Brodie ve arkadaşları birçok ilacın metabolizmasından karaciğer mikrozomlarında lokalize olduğu sanılan bir enzim sisteminin sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu enzim sisteminin NADPH'ya veya NADPH veren sisteme (NADP⁺, glukoz-6-fosfat ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) gerek duyduğunu ve magnezyum (Mg⁺⁺) iyonunun enzim aktivitesini arttırdığını saptamışlardır. İndirgeme ajanına ve moleküler oksijene gereksinimi olan bu enzim sistemine karışık fonksiyonlu oksidazlar (KFO), ilaç metabolize eden enzim sistemi, CYP enzim sistemi veya monooksijenazlar gibi isimler verilmiştir (Mannering, 1972).

CYP enzim sistemi hücrelerin mikrozomlarında bulunur. Dolayısıyla bu enzimlere mikrozomal ksenobiyotik metabolize eden enzimler de denebilir. Mikrozomal enzimler, birçok hücrenin endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Endoplazmik retikulum, plazma membranından çekirdek ve mitokondriye kadar uzanan bir lipoprotein şebekesi olarak tanımlanabilir. Endoplazmik retikulum hücrenin dış ortamlarla olan madde alışverişini sağlar. Dokunun homojenize edilip kademeli santrifüjlenmesi sonucu hücrelerin endoplazmik retikulum ve golgi sistemleri parçalanarak çöker ve mikrozomları oluştururlar.

2.1.1.2. CYP Enzim Sisteminin Katalizlediği Reaksiyonlar

a- CYP enzim sisteminin katalizlediği yükseltgenme reaksiyonları

- 1- Alifatik hidroksilasyon
- 2- Aromatik hidroksilasyon
- 3- Epoksit oluşumu
- 4- Dealkilasyon
 - a- O- dealkilasyon

- b- N- dealkilasyon
- c- S- dealkilasyon
- 5- Oksidatif deaminasyon
- 6- N- yükseltgenme
- 7- S- yükseltgenme
- 8- P- yükseltgenme
- 9- Desülfürasyon ve ester kırılması olarak sayılabilir.

b- CYP enzim sisteminin katalizlediği indirgenme reaksiyonları

- 1- Nitro indirgenmesi
- 2- Azo indirgenmesi
- 3- Redüktif dehalojenasyon.

2.1.1.3. CYP Enzim Sisteminin Bileşenleri

Organizmaya giren yabancı kimyasal ve endojen maddelerin biyotransformasyonundan sorumlu olan mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminin üç bileşeni vardır. Bunlar;

- a- Sitokrom P450
- b- NADPH – sitokrom c (P450) redüktaz
- c- Lipiddir.

Sitokrom P450 ve NADPH–sitokrom c redüktaz, endoplazmik retikulumun fosfolipid matriksinde yer alırlar (Lu ve West, 1980; Nebert ve ark., 1981).

Fosfolipidler, bu iki enzimin birbiriyle olan ilişkisinde önemli bir rol oynar. NADPH-sitokrom c redüktaz, sitokrom P450' ye elektron transferi yapar. NADPH- sitokrom c redüktazın sadece tek bir şekli izole edilmiştir.

Sitokrom P450 ise bir hemoproteindir. İndirgenmiş şeklinin CO ile yaptığı kompleks 450 nm'de maksimum absorbanı verdiği için bu ismi almıştır. Denatüre olduğu zaman 450 nm'deki pikini kaybeder ve diğer hem

proteinlerine benzer olarak sadece 420 nm'de absobans verir. P ise pigment anlamına gelmektedir. Bu pigment hemden dolayı kırmızı renklidir.

CYP' ler mikrozomlardan iyonik ve noniyonik deterjanlarla, sülfidril ajanlarla, gliserolle ve metal şelatörlerle izole edilirler. Çözünen mikrozomlar pek çok yöntemlerle elde edilirler. Bu yöntemler;

1. Klasik ultrasantrifüj yöntemi
2. CaCl₂ ile düşük devirde çöktürme yöntemi
3. Kolon kromatografisi yöntemi
4. Polietilenglikol ile düşük devirde çöktürme yöntemidir.

Daha sonra CYP şekillerinin tanımlanması; elektroforez, immünokimyasal yöntemler, peptid bağlanması ve aminoasit dizilişleri incelenerek yapılır (Lu ve West, 1980).

CYP enzim sisteminin en önemli bileşeni olan sitokrom P450' nin çok sayıda izozimi olup, her biri farklı gen tarafından kodlanıp sentezlenmektedir. Ayrıca her P450 izozimi belirli substart ve/veya substratlara karşı seçicilik gösterir.

CYP' lerin aminoasit dizilimlerinin benzerliği %40' dan az ise CYP1, CYP2, CYP3, şeklinde farklı ailelere, % 40-55 arasında ise CYP1A, CYP2A, CYP3A, şeklinde alt ailelere bölünürler. Benzerlik, %55'den fazla ise CYP1A1, CYP1A2, şeklinde sembolize edilirler.

Son sınıflandırmalara göre belirlenen 74 CYP gen ailesinin 14' ünün insanlarda bulunduğu belirlenmiştir. İnsan CYP aileleri ve esas fonksiyonları tablo 1' de gösterilmiştir (Nelson ve ark., 1996).

Ksenobiyotiklerin metabolizmasından ilk 3 aile sorumludur (CYP1, CYP2, CYP3). Tablo-2' de ksenobiyotiklerin metabolizması açısından önemli olan CYP aileleri görülmektedir. Bu ailelerden bazıları ksenobiyotikleri karsinogenik ürünlere dönüştürmektedir. Bu aktif ara ürünler oluştuktan sonra

II. Faz enzimleri yardımıyla glukuronik asit, sülfat veya glutatyonla konjuge olarak atılırlar; ya da proteinlere veya DNA'ya kovalan bağlanarak toksik etki oluştururlar.

Tablo 1. İnsan CYP aileleri

<i>CYP Ailesi</i>	<i>Temel Görevi</i>
CYP1	Ksenobiyotik metabolizması
CYP2	Ksenobiyotik metabolizması
CYP3	Ksenobiyotik metabolizması
CYP4	Yağ asitlerinin hidroksilasyonu Ksenobiyotik metabolizması ?*
CYP5	Tromboksan sentezi
CYP7	Kolesterol 7 α -hidroksilasyon
CYP8	Prostasiklin sentezi
CYP11	Kolesterol yan zincir açılması Steroid 11 β -hidroksilasyon Aldosteron sentezi
CYP17	Steroid 17 α -hidroksilasyon
CYP19	Androjen aromatzasyonu
CYP21	Steroid 21-hidroksilasyon
CYP24	Steroid 24-hidroksilasyon
CYP27	Steroid 27-hidroksilasyon
CYP51	Sterol biyosentezi

* ? Kesin bilinmiyor

Biyotransformasyonda bahsedildiği gibi monooksijenazlar tarafından okside olarak aktive olan ara ürünler konjugasyonla polar hale getirilip uzaklaştırılmazsa tehlikeli olurlar. Maddenin aktivasyon ve detoksikasyon dengesi aktivasyon lehine artarsa toksik etki oluşur.

Tablo 2. Önemli CYP aileleri

CYP1		CYP3		CYP4	
1A	- Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) aktivasyonu	3A	- Birçok substratı vardır - 3A5 Polimorfiktir - İndükleyicileri: Glukokortikoidler, rifampisin, makrolit antibiyotikler	4B	- Akciğer ve plasentada sentezlenir - Endojen substratları metabolize eder
1B	-PAH'ların aktivasyonu				
CYP2					
2A	2B	2C	2D	2E	2F
-Karsinojen aktivasyonu - Gerçek rolü kesin değil	-Fenobarbitalle indüklenir	- Mefenitoin polimorfizmi - Türler arası değişken	- Debrizokin polimorfizmi	- Etanolle indüklenir - Karsinojen aktivasyonu	- Akciğerde sentezlenir

CYP' nin önemi, pek çok sayıdaki kimyasal maddeyi kontrol etmesi ve bu olay sonucunda pek çok enzim şeklinin ortaya çıkmasıyla ilgilidir. CYP izozimleri hiçbir kimyasal maddeye maruz kalmamış organizmada varolan CYP izozimleri (konstitütif) veya belirli kimyasal maddelerle indüklenebilen izozimler şeklinde olabilir. Konstitütif CYP şekillerinin belirli kimyasal maddelerle indüklenebilirliği de söz konusudur. Değişik molekül grupları farklı moleküler yapıdaki CYP izozimlerini indüklerler.

Grup 1: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) (3MC, benzopiren, TCDD)

Grup 2: Fenobarbital

Grup 3: Etanol, aseton, izoniyazid, imidazol

Grup 4: Steroidler [pregnenolon 16- α -karbonitril (PCN), deksametazon, makrolit antibiyotikler].

Grup 5: Peroksizom proliferatörler (klofibrat).

Genellikle farklı hayvan türlerinde, aynı kimyasal maddeler, mRNA' nın nükleotid ve aminoasit dizilişleriyle oldukça homolog olan CYP izozimlerini

indüklerler. Yapılarındaki bu benzerlik CYP genlerinin isimlendirilmesine ve yeni sınıflandırmalara olanak verir. Nitekim, son isimlendirmeye göre, 10'u memelilere ait olmak üzere 27 gen ailesinden oluşan CYP süper ailesindeki P450 formunun sayısının 200'e yaklaştığı bildirilmektedir. (Gonzales ve Nebert, 1990; Nebert ve ark., 1991). Bazı CYP izozimleri ve spesifik substratları Tablo 3' de gösterilmektedir.

Tablo 3. Bazı CYP izozimleri ve spesifik substratları

<i>CYP</i>	<i>Polimorfik özellik</i>	<i>Spesifik substrat</i>
1A1	Polimorfik	7-etoksiresorufin
1A2	Polimorfik	Fenasetin, kafein
2A1	Polimorfik	Kumarin
2A6	Polimorfik	Kumarin
2B1	Polimorfik olduğu şüpheli	7-pentoksiresorufin
2C9	Polimorfik	Tolbutamid
2D6	Polimorfik	Debrizokin, spartein, deksstrometorfan
2E1	Polimorfik	Klorzoksazon
3A3/4	Polimorfik	Kortizol, eritromisin, lidokain, dapson
3A5	Polimorfik	Nifedipin, kortizol
4B1	Polimorfik olduğu şüpheli	Testosteron, progesteron

CYP' nin spontan gelişimi ve organizmanın gelişimi boyunca indüklenebilirliği, yeni doğanlarda ve gebe kadınlarda, ilaçların toksisitesinden korunmada oldukça önemlidir. Ancak yapılan denemeler etik nedenlerden dolayı daha çok deney hayvanları ile sınırlıdır (Casserett ve Doull, 1991; Gonzales, 1989; Leroux ve ark., 1989).

2.1.1.4. CYP Sistemine Etki Eden Faktörler

- a- Tür farklılığı
 - b- Genetik
 - c- Yaş
 - d- Cinsiyet
 - e- Beslenme diyet
 - f- Patolojik durum
 - g- Kimyasal maddelerle ön muamele
 - İndüksiyon.
 - İnhibisyon
 - h- Hormonlar
- a- Tür farklılığı*

Biyotransformasyondaki değişimler, türlerdeki nitel ve nicel farklılıklara göre olur. Nitel farklılıklar, metabolik yolları, tür defektleri ve türe has özellikleri içerir. Nicel farklılıklar ise; türlerdeki enzim düzeylerinin farklılığına, doğal inhibitörlere, enzimatik reaksiyon dengelerinin bozulmasına veya yarışmalı reaksiyonların oluşmasına bağlıdır. I. Faz reaksiyonlarındaki tür farklılığı, CYP izozimleri ile kolaylıkla açıklanabilir.

Bunların substrat seçicilikleri benzer olmasına rağmen, türler arasında farklı etkiler görülür. Buna örnek N-asetilaminofluoren verilebilir. Bu karsinojenik amin pek çok metabolizma yolağına sahiptir. N-asetilaminofluoren, N-hidroksilasyona ve aromatik hidroksilasyona uğrayarak sırayla hepatokarsinojenik N-hidroksi türevlerine ve nonkarsinojenik 7-

hidroksi türevlerine dönüşür. Kobaylarda N-hidroksi türevleri *in vivo* veya *in vitro* olarak oluşmaz ve bu türlerde bu maddenin karsinojenik etkileri görülmez. Diğer taraftan N-asetil aminofluorenin karsinojenik aktivitesi, farelerde, tavşanlarda ve köpeklerde N-hidroksi türevler oluşturduğu için görülür. Bu iki reaksiyon farklı iki CYP tarafından katalizlenir (Gonzales ve Nebert, 1990).

b- Genetik:

Soy farklılığı da, genetik kontrol altındadır. Bu farklılık ksenobiyotiklere karşı gözlenen biyolojik cevap şeklindedir.

Soy farklılığına örnek olarak I. Faz reaksiyonlarına hegzobarbitalin farklı sıçan ırklarındaki yükseltgenme hızı verilebilir. Holtzman, Sprague–Dawley, Wistar ırklarında hegzobarbitalin uyuma zamanı farklıdır. CYP' nin aracılık ettiği enzim aktivitesi ile uyuma zamanı arasında bir ilişki vardır (Igari ve ark., 1982). Benzer farklılıklar fare ve tavşan ırkları arasında da görülmüştür.

İnsanlarda ilaçların hidroksilasyonundaki farklılıklar genetik olarak kontrol edilen polimorfizm ile açıklanmaktadır (Gut ve ark., 1984; Kalow, 1987; Lorrey, 1984). Spesifik ilaçların metabolizmasında, insan genetik polimorfizmi, bireysel insan karaciğer CYP izoziminin tanımlanmasına olanak sağlar.

CYP' lerin bir kısmı toplum içinde ve toplumlar arasında farklılık gösterir. Örneğin 40' in üzerinde ilacın metabolizmasından sorumlu olan CYP2D6 Kafkasyalıların % 5 ila 10' unda inaktifken, Asyalıların %1' inden daha azında bu enzim inaktiftir (Hirvonen, 1999). Deney hayvanlarında görülen genetik farklılığı meydana getiren enzim indükleyici ajanların bilineni; C57 BL6J ve DBA2 fare ırklarının 3MC'ye verdikleri cevaptır. C57 fare ırkı karaciğer mikrozomal benzo (a) piren hidroksilaz aktivitesini indükler ve "responsive" olarak tanımlanırken, DBA2 ırkı "nonresponsive" olarak tanımlanır. Bu iki ırk arasındaki fark CYP izozimleriyle düzenlenen sitozolik

resöptörlere kodlanan “Ah locus” ile ilişkilidir. DBA2 ırkı farelerde protein bağlanması defektiftir (Nebert ve ark., 1979).

c- Yaş:

Fötal ve yeni doğmuş hayvanların sınırlı biyotransformasyon kapasitesi vardır ve bu da ksenobiyotiklerin toksisitesini artırır.

Sıçanlarda CYP ile katalizlenen reaksiyon aktiviteleri doğumdan hemen sonra hızla yükselir ve 30 gün içinde maksimum düzeye ulaşır. Enzimatik aktivite daha sonra yaşla beraber azalmaya başlar 600. güne ulaşıldığında, aktivite maksimum değerinin ancak % 50-60' ı kadardır. İnsanlarda CYP aktivitesi gebeliğin ikinci trimesterinde yetişkinlerin % 20-50'si kadardır. Buna rağmen, CYP izozimleri yetişkinlerde kalitatif farklılıklar gösterir.

Biyotransformasyon enzimlerinde gözlenen yaşa bağımlı değişimler, hepatositlerin biyokimyasal değişimleriyle ilgilidir. 1 ve 3 günlük sıçan karaciğer mikrozomal preparatlarında tanecikli ve taneciksiz endoplazmik retikulumun miktarında dikkate değer artışlar gözlenmiştir. Daha sonraki yaşlarda, toksik maddelere doku hassasiyeti artar ve ksenobiyotiklere karşı alınan cevaplarda değişimler gözlenir. Bu olay CYP ve NADPH sitokrom c–redüktazın azalması ile ilişkilidir (Casserett ve Doull, 1991). Ayrıca bazı mikrozomal enzimlerin seviyelerinin yaşlı sıçanlarda düşerken genç sıçanlarda arttığı gözlenmiştir (Eke ve ark. 1997).

d- Cinsiyet:

Kimyasallara duyarlılık iki cinsiyette farklı olabilmektedir (Eke ve ark., 1998a). Dişi ve erkek sıçanlarda yapılan çalışmalarda pek çok ksenobiyotiğin farklı farmakolojik ve toksikolojik etkileri saptanmıştır. Örn; dişi sıçanlar, hegzobarbitale maruz bırakıldıklarında, erkek sıçanlardan daha uzun süre uyurlar. Aynı şekilde organofosforlu bir insektisit olan paration da dişilerde 2 kez daha fazla etkilidir. Bu da dişilerin karaciğerlerinin bu kimyasal maddeleri

metabolizmaya uğratma kapasitesinin daha düşük olduğunu gösterir. Uzun biyolojik yarı ömre sahip bileşikler, dişilerde daha uzun etki gösterirler.

Cinsiyet farklılığı, aynı zamanda ekstrahepatik dokularda da gözlenir. Örn; kloroform erkek fare böbreklerinden elde edilen mikrozomlarda, dişi farelere göre 10 kat daha hızlı fosgene dönüşür. Erkek fareler kloroformla indüklenen nefrotoksiteye daha duyarlıdır, halbuki dişi fareler bu maddeye rezistans gösterirler. Dişi ve erkek cinsiyet hormonları arasındaki denge, CYP'lerin aktivitesinin saptanmasında önemlidir. Dişi sıçanlara testosteron verilmesiyle pek çok sayıda ilaç ve ksenobiyotiğin biyotransformasyonunun arttığı gözlenir.

CYP ve NADPH sitokrom c redüktaz konsantrasyonları sıçanlarda ölçüldüğünde, bu iki enzimin erkek sıçanlarda dişilere nazaran % 20-30 arasında daha fazla olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda erkek veya dişilere spesifik CYP izozimleri tanımlanmıştır.

Sıçan ve farelerde görülen cisiyete bağımlı değişimler, insanlarda gözlenmemiştir (Casserett ve Doull, 1991).

e- Beslenme ve diyet:

Beslenme faktörü biyotransformasyonda oldukça önemlidir. Kalsiyum, bakır, demir, magnezyum, çinko minerallerinin eksikliği CYP' nin katalizlediği yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını azaltır. Mineral alımı normale döndüğünde enzim aktivitesi de normale döner.

Aynı şekilde, vitamin eksikliği (C, E ve B kompleksi) biyotransformasyon hızını azaltır. Bu vitaminler; direkt veya indirekt olarak CYP sisteminin düzenlenmesinde rol alırlar. Ayrıca vitamin eksikliği, enerjiye gerek duyan II. Faz reaksiyonlarında da önemli olur.

Düşük proteinli diyet pek çok sayıdaki ksenobiyotiğin toksisitesini değiştirir. Örn; dimetilnitrozamin hepatotoksitesinin düşük proteinli diyetle beslenen sıçanlarda azaldığı gösterilmiştir. Zira, dimetilnitrozaminin N-

demetilasyonunun azalması toksik metabolitlerinin oluşumunun azalmasına neden olmaktadır.

Biyotransformasyonda lipidler oldukça önemlidirler. Sıçanlarda; doymamış yağlarca zengin besinler, karaciğer CYP konsantrasyonunu azaltırlar. Bu azalma, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu artırır (Casserett ve Doull, 1991).

f- Patolojik durum:

Ksenobiyotik metabolizmasında görev alan organlar, herhangi bir hastalık durumunda, biyotransformasyondaki normal fonksiyonlarını yapamaz. Örneğin metabolizmadan sorumlu en önemli organ olan karaciğer hasar gördüğünde mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz enzim aktiviteleri azalır. Viral enfeksiyonlar, karsinomalar, doğumsal sarılık, hepatit ve siroz karaciğer için zararlıdır ve karaciğer biyotransformasyonunu azaltır. Karaciğer kan akışındaki azalmalar, ksenobiyotiğin klerensini ve biyotransformasyonunu etkiler.

Kardiyak komplikasyonlar, şok ve hipertansiyon bunlara örnek verilebilir. Böbrek hasarları da, ksenobiyotiklerin klerensini azaltır. Testiküler harabiyet, testosteron salgılanmasını ve hormon metabolizmasında görev alan CYP' lerin aktivitelerini azaltır. Bu tür hasarlar, biyotransformasyon kapasitesinde azalmalara ve organ fonksiyonlarının azalmasına neden olur (Casserett ve Doull, 1991).

g- Kimyasal maddeler ile ön muamele:

Herhangi bir kimyasal madde ile muamele CYP' lerin aktivitesini arttırabilir veya azaltabilir. DDT sıçan karaciğeri benzo (a) piren hidroksilaz aktivitesini arttırırken, simetidinin bu enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. (Manis ve Kim, 1980; Pelkonen ve Puurunen, 1980).

Bunlardan başka çeşitli faktörlerin CYP' lere etkidiği, özellikle deney hayvanlarında gösterilmiştir. (Lang ve Vesell, 1976; Nebert ve Felton, 1976; Vesell ve ark., 1976).

h- Hormonlar

Cinsiyet hormonları dışındaki diğer hormonların da eksikliği veya fazlalığı biyotransformasyon hızını etkiler. Tiroid hormonu karaciğer monoamin oksidaz aktivitesini arttırırken aynı enzimlerin böbrekteki aktiviteleri azalır. Adrenal bezleri çıkarılmış erkek sıçanlarda karaciğer mikrozomal enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Tiroid, adrenal ve cinsiyethormonlarının fonksiyonunu düzenleyen hipofiz hormonunun çıkarılması mikrozomal enzim aktivitesini düşürür.

2.1.1.5. Kimyasal Maddelerle CYP' lerin İndüksiyonu

İnsan ve hayvanlar, ilaçlara, pestisitlere, endüstride kullanılan kimyasal maddelere ve doğal ürünlere maruz kalırlar. Genellikle bu maddeler metabolizmada görev alan enzimlerin sentezini artırır. Bu olay "enzim indüksiyonu" olarak isimlendirilir ve "de nova" protein sentezine ihtiyaç gösterir. Daha önceleri indüksiyonun sadece CYP' ye bağımlı monoksijenazlarla sınırlı olduğu düşünülürdü, fakat bugün konjugasyona neden olan enzimlerin de indüksiyonda rolü olduğu düşünülmektedir.

İndüksiyona neden olan kimyasal maddelerin dokularda morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu bilinmektedir.

Son yıllarda, mikrozomal enzim indüksiyonun mekanizması, polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (3-metil kolantren ve benzo (a) piren) ve fenobarbitalle daha net anlaşılır hale gelmiştir (Casserett ve Doull, 1991; İşcan, 1982). Fenobarbital ile muamele sonucunda karaciğerde şu değişiklikler meydana gelir;

a- Hipertrofi

b- Mikrozomal protein konsantrasyonunda artış

c- Düzgün yüzeyli endoplazmik retikulumda çoğalma ile birlikte NADPH- sitokrom c redüktaz sentezinde indüklenme ve de fosfolipd ve protein sentezinde de artış olmaktadır. Etki nonspesifiktir.

CYP şekillerini indükleyen maddeler metabolizma hızında artışa neden olurlar. Ayrıca P-448 şekli oluşur. Etki spesifiktir. Bu indüksiyonda karaciğer ağırlığı protein ve fosfolipd sentezi ve NADPH c redüktazda belirgin bir artış olmamaktadır.

Diğer önemli indükleyiciler halojenli pestisitler (aldrin, heksaklorobenzen, lindan, klordan), poliklorlu ve polibromlu bifeniller, steroidler ve klorlu dioksinlerdir. Bunlar fenobarbital veya polisiklik aromatik hidrokarbonlara benzer indüksiyon spektrumu meydana getirirken diğer CYP şekillerinin sentezini de indüklerler. Düşük dozlarda selektif CYP indüksiyonu meydana gelebilirken, karaciğerde hipertrofi de meydana getirebilirler (Casserett ve Doull, 1991).

Kimyasal maddeler stimüle edici etkilerini mikrozomal enzim miktarını, genellikle CYP ve NADPH-sitokrom-c redüktaz miktarlarını arttırarak gösterirler (Ernster ve Orrenius, 1975; Remmer ve Herker, 1965). Bu da protein miktarının ve dolayısıyla enzim sentezinin artmasına bağlıdır. Ancak artan CYP ile her zaman karışık fonksiyonlu oksidazların aktivitesinde artma görülmeyebilir. Örn; 3MC sıçan karaciğeri CYP miktarını arttırırken, etil morfin-N-demetilaz aktivitesini arttırmamaktadır (Madhukar ve Matsumura, 1978).

Fenobarbitalin parenteral alımından sonra maksimal indüksiyonu 3-5 gün içerisinde olur. 3MC ile bu etki 48 saat içerisinde görülür. İndüksiyon geri dönüşümlü bir olaydır. İndükleyici ajanın geri çekilmesiyle aktivite basal düzeye erişir. Fenobarbitalin geri çekilmesiyle bazal aktivite 7-10 gün içerisinde normale döner Buna rağmen eğer indükleyici ajan oldukça lipofilik ve zor biyotransformasyona uğruyorsa, vücutta alıkonması uzar ve indüksiyon devam eder.

Ekstrahepatik dokulardaki CYP enzimleri fenobarbitalle kolaylıkla indüklenirler. Buna rağmen PAH'lar akciğer, böbrek, intestinal sistem ve cilt gibi ekstra hepatik dokularda etkilidirler (Casserett ve Doull, 1991).

Farklı CYP izozimleri farklı maddelerce indüklenir. CYP2D6 indüklenemekte beraber birçok ilacın metabolizmasından sorumludur. Bazı CYP izozimleri ve indükleyicileri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Bazı CYP izozimlerinin indükleyicileri ve inhibitörleri

<i>İzozim</i>	<i>İndükleyici</i>	<i>İnhibitör</i>
CYP1A1	PAH' lar	7-8 benzoflavon, eliptisin
CYP1A2	PAH' lar	7-8 benzoflavon, furfuralin
CYP2A6, C8, C9, C10	Rifampisin, barbitüratlar	Sülfofenazol, simetidin
CYP2D6	_____	Kinidin, ajmalin, yohimbin, fenformin, dekstrapropoksifen
CYP2E1	Etanol, izoniyazid	Aminoasetonitril, organik çözücüler, disülfiram, dietilditiyokarbamat
CYP3A4	Rifampisin, barbitüratlar	Toleandomisin, naringenin

2.1.1.6. Kimyasal Maddelerle CYP' lerin İnhibisyonu

Ksenobiyotiklerin metabolizmasının inhibisyonu *in vitro* ve *in vivo* koşullarda, ekzojen substratları metabolize eden enzim veya enzim sistemlerinin aktivasyonunun kontrol aktiviteye göre azalması şeklinde açıklanmaktadır (Lee ve ark., 1976).

Biyotransformasyon reaksiyonlarını inhibe eden pek çok kimyasal madde vardır. Bu maddeler protein sentezini inhibe ederler. Örn; 3 amino-1,2,3 triazol, porfirin sentezindeki inhibitör etkisi dolayısıyla, CYP sentezini azaltır. Akut kobalt klorür alımıyla karaciğer CYP konsantrasyonu azalır. Bunun nedeni hem oksijenaz üzerindeki indüktif etkisi kadar hem sentezi üzerindeki inhibitör etkisi sonucudur (Casserett ve Doull, 1991).

Kimyasal maddeler, aynı zamanda; kofaktörlerin ve konjugasyon yapıcı maddelerin doku düzeylerini etkiler. Pek çok kimyasal madde, CYP sisteminde inhibitör etki gösterir CO ve etil izosiyanid indirgenmiş hem için ligand gibi hareket eder ve endojen ligand olan O₂ ile yarışır. Bunlar oksidatif reaksiyonların potent inhibitörleridir. CO ayrıca CYP' nin aracılık yaptığı redüktif reaksiyonları da inhibe eder.

Bu inhibisyon genellikle CYP' ye bağlanan iki farklı substrat arasında yarışma şeklinde olur ve bu yarışma genellikle her iki tarafta da metabolik inhibisyonla sonuçlanır (Casserett ve Doull, 1991).

Farklı CYP izozimleri farklı maddelerce inhibe olur. Örn; 7,8-benzoflavon sitokrom P-448' e yüksek affinite gösterir. Halbuki, SKF-525 ve metirapon, CYP' nin fenobarbitalle indüklenebilen şekline daha spesifiktir.

Bazı CYP izozimleri ve inhibitörleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

2.1.2. Glutasyon

İndirgenmiş glutasyon (GSH) 1934 yılında, yapısının γ -glutamil-sistenil glisin olduğu saptandıktan sonra tam olarak tanımlanmıştır. Glutasyon, L-glutamik asit, L- sistein ve glisinden iki basamaklı bir reaksiyonla meydana gelen bir tripeptittir. Halojenli hidrokarbonlar, alkilleyici antikanser ilaçlar gibi elektrofilik maddelerle konjugatlar vermek üzere reaksiyona girer. Oluşan glutasyon konjugatları safrayla veya merkapturlara dönüşerek idrarla atılırlar. Merkapturat türevleri bazen toksik metil tiyo bileşiklerine metabolize olurlar (Ketterer ve Mulder, 1990).

GSH, konjugasyon reaksiyonlarında, H₂O₂ ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında tüketilir.

GSH pek çok metabolik yolağa katılır. Bunlardan en önemlisi, hücreleri özellikle oksidatif hasara uğratan pek çok ajana ve hastalığa karşı korumaktır. Örn; sıçanlarda dietil maleat (DEM) ile, glandular mide mukozasında glutasyon eksikliğinde ülserler görülür. İnsanlarda da glutasyon

metabolizmasını etkileyen pek çok genetik hastalık saptanmıştır. Bu kişilerde parasetamol gibi ilaçların toksisitesi yüksektir.

GSH pek çok hücrede bulunur. Ancak hücre tipine göre değişen miktarlarda intrasellüler konsantrasyonu mevcuttur. İnsan ve sıçanlarda karaciğerde glutatyon 5 $\mu\text{mol/g}$ doku miktarında bulunur. Karaciğerde glutatyonun yüksek düzeyde bulunması bu dokunun ksenobiyotiklerin detoksikasyonu veya atılımında niçin önemli rol oynadığını açıklar. İnsan eritrositleri de, mililitrede 3 μmol düzeyinde glutatyon içerir. Diğer pek çok hücre ve dokularda da glutatyon düzeyi 1-2 $\mu\text{mol/g}$ seviyesindedir.

Doku içinde glutatyon homojen olarak dağılmamıştır. Örn; beyinde, astroglial ve ependimal hücrelerde yüksekken, nöronal stroma' da yoktur. Aynı şekilde karaciğerde, korteksde daha yüksek düzeyde bulunur, inner medullada daha düşüktür. Karaciğer hepatosit popülasyonu incelendiğinde, periportal bölgedeki glutatyon sentezinin perivenöz bölgedekinden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

GSH sitozol, mitokondri ve nükleusta bulunur. DEM alımıyla glutatyon düzeyinde azalma görülür ki bu azalma karaciğer glutatyonunun %90-95 'ini aşamaz. Çünkü, mitokondrideki, çok az miktardaki glutatyon havuzunda herhangi bir etki olmaz. Etakrinik asit ve phron da mitokondriye geçerek glutatyon havuzunu tüketir. Sıçanlardaki glutatyonun %20-30' unun sitozolik proteinlere bağlı olduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Nükleusa bağlanma düzeyi, makromoleküllere benzer şekildedir (Ketterer ve Mulder, 1990).

Karaciger ve diğer organlardaki GSH ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) düzeyi değişim gösterir. İnsan lenfositlerinde ve eritrositlerinde glutatyon içeriği yaşa bağlıdır. Glutatyon düzeyi insanlarda 25-40 yaşlarında en yüksek düzeydedir. Farelerde ise iki yaşından sonra glutatyon düzeyi düşer.

2.1.2.1. Hücresel Glutasyonun Tüketilmesi

Sistein, metionin ve proteince zayıf diyetler glutasyon eksikliğine yol açar. Bu olay GSH ile konjugasyonu yapabilen substratın yüksek dozda alınmasıyla görülür. Sıçanlarda glutasyonun tüketimi bir günde %50' ye kadar ulaşabilir. Ancak, ekstrahepatik kaynaklardan sistein mobilizasyonu ile bu tüketim 48 saatte normal konsantrasyonuna ulaşır. Sıçanlarda proteince kısıtlı diyetlerde gözlenen glutasyon tüketimi cinsiyete bağlıdır. Örn; 7 haftalık erkek ve 12 haftalık dişi sıçanlarda karaciğerdeki glutasyon konsantrasyonu normal diyetle birbirine yakındır. Buna rağmen, düşük proteinli diyetlerde (Kazein miktarı %20' den %5' e indirilmiş) karaciğer glutasyon düzeyi, erkek ve dişi sıçanlarda sırasıyla %70 ve %40 azalma gösterir.

Antikanser bir ilaç olan bütionin sülfoksimin (BSO) de birkaç saat içinde glutasyon tüketimine neden olabilir. Eğer içme suyuna birkaç hafta süreyle katılırsa, karaciğer ve diğer organlarda ciddi glutasyon tüketimine neden olur. Bu maddenin kullanımını takiben glutasyon ile konjugasyon yapan maddeler yüksek dozda alındıklarında, *in vivo* ve izole hücrelerde hızla, glutasyon tüketimine neden olurlar. Dietil maleat (DEM) ve phoron bu amaçla kullanılan maddelerdir. Bu tüketim, yeterince L-sistein kaynağı varsa, hızla eski haline döner. Bu tür maruz kalmalar sonucunda, organ fonksiyonları üzerinde glutasyona bağımlı olarak direkt ve indirekt etkiler gözlenir. Bu sırada, protein sentezi ve pek çok enzim inhibe olurken, diğer aktiviteler indüklenir.

Etil alkol de, izole hepatositlerdeki GSH düzeyini azaltır. Bunun nedeni, etil alkolün metabolizması sonucunda oluşan asetaldehit' in GSH ile reaksiyona girerek tiyohemiasetal vermesidir.

Fiziksel egzersiz de karaciğerde glutasyonu tüketirken, kaslarda bir etkiye neden olmaz. Yüksek dozda, L-sistein, sıçanlara oral veya intra-peritoneal olarak verildiğinde, glutasyon düzeyinde azalma görülür. Fiziksel egzersiz ve

sisteinle ilgili olarak görülen bu azalmanın nedeni, oksijen radikallerinin oluşmasıdır (Ketterer ve Mulder, 1990).

2.1.3. II. Faz Reaksiyonları

II. Faz reaksiyonları I. Faz reaksiyonları sonucu oluşan aktif ara ürünlerin detoksikasyonu açısından oldukça önemlidir. Genellikle konjugasyon ürünleri daha polardır ve vücuttan kolaylıkla atılırlar. II. Faz reaksiyonları; glukuronik asitle konjugasyon, sülfat konjugasyonu, metilasyon, asetilasyon, aminoasit konjugasyonu, rodanez reaksiyonu ve glutatyon konjugasyonudur.

CYP sistemi ile oluşan elektrofilik ara ürünler glutatyonla birleştikleri takdirde hücre ve DNA hasarı oluşturmazlar. Bu sebeple glutatyon konjugasyonu hücreleri özellikle oksidatif hasara uğratan pek çok ajana karşı koruyucu bir mekanizmadır.

Ancak glutatyon konjugasyonu her zaman inaktif bileşiklerin oluşacağı anlamına gelmez. Bazı halojenli hidrokarbonlar (dibromoetilen, dikloroetilen, dikloroetan v.s.) merkaptürik asit oluşum basamağına gelmeden β -liyazlar tarafından parçalanarak nefrotoksik bileşikler haline dönüşürler.

Glutatyon konjugasyonu, glutatyon ile reaksiyona giren bileşiklerin elektrofilik merkezlerinin birleşmesi sonucu tioeter oluşmasıyla (merkaptürik asit, N-asetilsistein türevleri) meydana gelir. GST' ler GSH' nin nükleofilik sülfidril grubunun substrattaki elektrofilik karbon atomuna bağlanmasını sağlayan enzimler olarak bilinirler. Bu şekilde organizmaya alınan mutajenik, karsinojenik ve diğer zararlı kimyasal maddelerin detoksikasyonu sağlanır (Casserett ve Doull, 1991; Habig ve ark, 1974; Levine, 1983; Mannervik, 1985; Manervik ve Danielson, 1988; Reed, 1986, 1990; Trakshel ve Maines, 1988).

GST' lerin enzimatik fonksiyonlarına ilaveten intraselüler protein taşıyıcı gibi görev yaptığı da düşünülmektedir. Ayrıca, aktif elektrofilik moleküllerin, kovalan bağlanması ve bunun sonucunda görülen inaktivasyon ve

immobilizasyonda GST' lerin koruyucu rolü olduğu düşünölmektedir (Jakoby, 1976; Ketterer ve ark., 1967).

Bu konudaki ilk çalışmalar 1979 yılında bromobenzenin idrardan, N-asetil-4-bromobenzen şeklinde atılımının saptanmasıyla başlamıştır. Glutasyon tüketimi ile merkapturik asit türevlerinin arasındaki ilişki saptandıktan sonra, glutasyon konjugatlarının merkaptürik asit türevlerine dönüştüğu belirtilmiştir.

2.1.3.1. Glutasyon S-transferazlar

Glutasyon S-transferazar (GST), substratın elektrofilik karbon atomu ile glutasyonun nükleofilik sülfidril grubu arasındaki reaksiyonları katalizleyerek, kimyasal maddelerin değişik fonksiyonel gruplarının N-asetilsistein (merkaptürik asit) oluşturmasına neden olur. GST için substrat olan maddeler 2 özelliğe sahip olmalıdır:

- Lipofilik olmak,
- Elektrofilik karbon atomu içermek.

Bu özelliklere sahip maddeler glutasyon ile ölçülebilir düzeyde nonenzimatik reaksiyon vermelidir. Ayrıca, bu transferazlar enzimatik reaksiyonlar için substrat olmayacak pek çok kimyasal madde için ligand gibi hareket ederler. Transferazların lipofilik bölgeleri, ekzojen ve endojen maddeler için bağlanma bölgesi olarak yardımcı olurlar. GST' ler için depo veya transport görevi yaparlar (Casserett ve Doull, 1991).

Glutasyon konjugatından, glutamik asit çıkarılması γ -glutamil-transpeptidaz ile katalizlenir. Bu enzim hücrelerde emilim veya atılım fonksiyonları için bulunur. Sisteinil glisinaz ise, sistein konjugatından glisini koparır ve sonuçta N-asetil merkapturik asit oluşumuna neden olur. Bu asetilasyon reaksiyonu için kofaktör asetil ko-A' dır (Casserett ve Doull, 1991; Chasseand, 1979).

Glutasyon konjugatları böbrekte lokalize olan enzimlerde sistein türevlerine dönüşürler. Bu türevler daha sonra N-asetil sistein (merkaptürik

asit) konjugatlarını vermek üzere asetillenerek idrarla atılırlar (Casserett ve Doull, 1991).

GST ile katalizlenen nükleofilik reaksiyonların önemi son yıllarda artmıştır. GST' ler, daha önce de bahsedildiği gibi pek çok elektrofilik bileşiklerin ki, bunların arasında pek çok ksenobiyotik ve lipid peroksidasyon sonucu oluşan ürünler vardır, detoksikasyonunda önemli rol oynarlar (Manervik, 1985; Mantle ve ark., 1987; Trakshel ve Maines, 1988).

GSH ayrıca, glutatyon peroksidaz için bir kofaktördür. GSH' in eksikliği lipid peroksidasyonu artırır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, hepatositlerde GSH havuzunun tüketiminden sonra, lipid peroksidasyonun arttığı gözlenmiştir. Oluşan peroksitlere karşı GSH peroksidazların koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (Cantford ve Giegelen, 1975). Glutatyon eksikliği, total glutatyonun %20-30' u civarında olursa, hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanan olaylar görülebilir (Modeus ve Quanguan, 1987; Reed, 1985, 1990).

Aerobik organizmalarda, moleküler O₂' nin indirgenmesi süperoksit ve peroksitlerin oluşumu demektir ki, bu ürünler de hücre için toksiktir. H₂O₂ ve organik peroksitler lipid peroksidasyonu artırır. Endoplazmik retikulumda meydana gelen H₂O₂, glutatyon peroksidaz ile inaktif hale getirilir. Hepatositlerde, GSH havuzu tükendiği takdirde H₂O₂ birikmeye başlar.

2.1.3.1.1. Glutatyon-S-Transferazların Sınıflandırılması

GST' ler, glutatyonun elektrofilik karbon atomu içeren substratla birleşmesini katalizleyen enzimlerdir. GST' ler pek çok türde bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli dokularda bulunmaktadırlar. Ancak dokular arasında miktar olarak farklılık olduğu gibi, farklı tür hayvanların aynı dokularında da nitel ve nicel farklılıklar gözlenmektedir (Jakoby, 1978; Ketterer ve Mulder, 1990; Manervik ve ark., 1984).

GST' lerin doğal substratlarının tam olarak bilinmesine rağmen, bilinen substrat spesifiteleri ile farklı şekillerinin birbirlerinden ayrılması mümkün olmamıştır (Mannervik ve Danielson, 1988).

GST' lerin en eski sınıflandırılması Boyland ve Chasseaud tarafından 1969' da yapılmıştır ve aril transferaz, epoksit transferaz, alkil transferaz, arilalkil transferaz ve alken transferaz deyimleri ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda, glutasyon transferazlar elektrofilik substratlarına göre ayrılmışlardır. Glutasyon transferazların saflaştırılmaları sağlanmış olmasına karşın, substrat spesifitesi tam olarak saptanamamıştır. Örn; Epoksit transferaz, hem alkil, hem de arilalkil halojenürler için aktiftir ve aril transferazın her iki şekli de epoksit substratlar için aktiftir (Pabst ve ark., 1973). Buna rağmen, orjinal adlandırma, enzimatik özelliklerinden çok proteinin fiziksel ve yapısal özelliklerine dayanır. Substrat dayalı adlandırmada, bütün araştırmacılar kloronitrobenzenler ve halojenmiş hidrokarbonlar gibi substratları kullanmışlardır. Son tanımlamalarda ise, sıçan dokularında GST' lerin hidrosialkenallere yüksek affinite gösterdiği görülmüştür. Buna rağmen, şu anda bu tip adlandırma kesin temellere dayanmamaktadır (Jensson ve ark., 1986).

Sıçan karaciğerinde 6 tane GST şekli olduğu öne sürülmüş ve bu şekiller, karboksimetilselüloz iyon değiştirici matriksinden elde edilmesine göre E, D, C, B, A ve AA olarak isimlendirilmişlerdir (Habig ve ark., 1974, 1976; Jakoby ve ark., 1976). 7. şekil ise daha önce menafitil sülfat ile tanımlanarak M ismi verilmiştir (Gillham, 1973).

Sıçan sitozolündeki GST' ler dimerik proteinlerdir. Bu 6 majör şekil, farklı substrat spesifitelerine göre 4 farklı alt grubun homomerik ve heterodimerik şekilleridir (Mannervik ve Jensson, 1982).

GST' lerle çalışan bütün araştırmacılar daha sonra adlandırmada, Arabik sayılarla sınıflandırmayı göz önüne almışlardır (Jakoby ve ark., 1984).

Buna ek olarak, sıçan GST' lerinin sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemi üzerindeki hareketine göre bir adlandırma geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, GST' lerin adlandırılmasında diğer memeli türlerinde de aynı prensiplerin kullanılması kararlaştırılmıştır. Ancak, bunun sonucunda farklı türlerdeki enzimleri karşılaştırmak güçleşmektedir. Örn; Farelerdeki GST şekilleri elde edildikleri enzimlere göre de yapılmıştır (Warholm ve ark., 1986).

Sitozolik GST' lerin; alfa (GSTA), mü (GSTM), pi (GSTP) ve teta (GSTT) olmak üzere 4 sınıf oldukları bilinmektedir. Son yıllardaki araştırmalarda, GST' lerin sigma (GSTS) ve zeta (GSTZ) olmak üzere iki sınıfının daha olduğu anlaşılmıştır. Hatta bazı araştırmacılar tarafından şimdiye kadar bulunanlardan başka, birbirinden farklı yapıda en az 25 sınıf GST daha olduğu öne sürülmektedir. (Snyder ve Maddison, 1997).

İnsan ve sıçanlardaki sitozolik GST' lerin sınıflandırılması Tablo 5' de gösterilmiştir .

Tablo 5. GST' lerin sınıflandırılması

<i>Türler</i>	<i>Sınıf</i>					
	Alfa (α)	Mu (μ)	Pi (π)	Teta (θ)	Zeta (Z)	Sigma (δ)
Sıçan	1-1	3-3	7-7	5-5		1-1
	1-2	3-4		12-12		
	2-2	4-4		13-13		
	8-8	3-6				
	4-6					
	6-6					
İnsan	α , β , τ (B2B2)	μ	π	θ (T1-1)	1-1	1-1
	δ (B1B2)			θ (T2-2)		
	ε (B1B1)					

GSTA, organik peroksitlerin inaktivasyonunda; GSTM, diol epoksitlerin inaktivasyonunda; GSTP, epoksitler, aren epoksitler ve diol epoksitlerin inaktivasyonunda; GSTT, küçük moleküler yapıdaki organik çözücülerin inaktivasyonunda veya aktivasyonunda rol oynarlar. GSTZ' nin insanlardan bitkilere kadar birçok türde bulunduğu ve insanda fenil alanin katabolizmasında görev aldığı saptanmıştır (Blackburn ve ark., 1998). Tablo 6' da GST izozimlerinin polimorfik özellikleri ve substratları görülmektedir.

Memeli testisi iki ana kompartmana ayrılır; spermatogenezden sorumlu olan bölge semnifer tübüllerdir ve sertoli hücrelerini içerirler. Hormon sentezinden sorumlu olan bölge intersitium' dur ve leydig hücrelerinden oluşur.

Western blot analizleri ile bu kompartmanlardan her birinde α , μ ve π sınıfı GST'lerin varlığı; HPLC analizleri ile de testis sitozolünde GST izoformlarından 1, 2, 3 , 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 11'in varlığı gösterilmiştir (Gandy ve ark., 1996). μ sınıfı GST' lerden hGSTM3 alt ünitesinin en çok testis ve beyinde bulunduğu gösterilmiştir (Listowsky ve ark., 1998).

Tablo 6. GST izozimlerinin polimorfik özellikleri ve substratları

<i>İzozim</i>	<i>Polimorfik Özellik</i>	<i>Substrat</i>
GST-A (α)	Polimorfik olduğu şüpheli	Organik hidroperoksitler (Kümenhidroperoksit)
GST-M (μ)	Polimorfik	DCNB
GST-P (π)	Polimorfik	EAA
GST-T (θ)	Polimorfik	EPNP
GST-Z (Z)	Polimorfik	t-bütül hidroperoksit
GST-S (δ)	Polimorfik olduğu şüpheli	CDNB

Testiste diğer organlara kıyasla daha yüksek seviyelerde bulunan hGSTM3'ün yüksek katalitik kapasitesi sayesinde testiste oluşan zararlı reaksiyonların sonuçlarını önleyici ya da düzeltici etkili olduğu düşünülebilir. Testisteki GST'lerin reaktif kimyasallar, hidroperoksitler ve oksidatif stresi indükleyen diğer maddelere karşı sperm hücrelerini koruyucu kapasitede oldukları muhtemeldir. Kemiricilerde GST'lerin hormonlar ve ksenobiyotikler tarafından indüklendiği bilinse de, insanlardaki GST enzimlerinin benzer şekilde indüklenip kontrol edildiği henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Listowsky ve ark., 1998).

Çeşitli toksikanların üreme üzerinde farklı yaşlarda farklı etkiler göstermeleri üreme organlarındaki aktivasyon veya detoksikasyondan sorumlu enzimlerin yaşa bağlı sentezinden ileri geldiği düşünülmektedir (Gandy ve ark., 1996).

2.1.3.1.2. Glutasyon S -Transferaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler

GST aktivitesi ve doku glutasyon düzeyleri de CYP sistemi gibi tür, yaş, cinsiyet, genetik gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir.

a- Tür Farklılığı

Karaciğerde sitozolik GST aktivitesi bütün türlerde saptanmıştır. Deney hayvanlarındaki enzim aktivitesi genellikle insanlara göre daha yüksektir. Buna rağmen insanlardan elde edilen sonuçların kısıtlı sayıda verilere göre olduğu belirtilmiştir. Örn; CDNB ile insan karaciğerinde yapılan aktivite çalışmaları, sıçanlarla yapılan çalışmaların sonuçlarına benzerlik göstermiştir (Chasseand, 1979).

b- Cinsiyet Farklılığı

Yapılan çalışmalarda, erkek sıçan karaciğerinde aktivitenin, dişilerdeki aktiviteye göre yaklaşık 3 kez fazla olduğu saptanırken, diğer bir araştırmada bu farklılık sıçan böbreğinde gösterilmiştir. GST'lerle yapılan cinsiyet

farklılığına dayanan aktivite çalışmalarında çok kesin bilgiler elde edilememiştir. Ancak substratların dışılarda daha toksik olduğu saptanmıştır. DCNB kullanılarak kır faresinde yapılan aktivite çalışmasında, dışi karaciğerinde daha yüksek enzim aktivitesi saptanmıştır. İnsan biyopsi veya postmortem çalışmalarında CDNB ile yapılan aktivite belirlemelerinde cinsiyet farkına bağımlı bir farklılık gözlenememiştir (Chasseand, 1979).

c- Yaş

Dışı farelerin karaciğer, akciğer ve bağırsaklarında yapılan çalışmalarda; doğumu takip eden 10. ayda, karaciğerdeki GST düzeyi 40 nmol/mg protein/dk.' dan 160 nmol/mg protein/dk.' ya yükselmektedir. Daha sonra 15 aya kadar postnatal düzeye ulaşmaktadır. Benzer değişiklikler akciğer ve bağırsaklarda da gözlenmiştir (Farooqui ve ark., 1987). İndirgenmiş glutatyon düzeyi ileri yaşlarda gözlenen hastalıklarla ilişkili olarak da değişmektedir (Stohs ve ark., 1982).

d- Genetik

GST aktiviteleri toplumlara göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin Çinlilerin % 58, Malezyalıların % 38 ve Hindistanlıların % 16' sında GSTM1 izozimi (Lee ve ark., 1995); Alman popülasyonunun yaklaşık %30-40' ında GSTT1 izozimi çalışmamaktadır (Warholm ve ark., 1995). Benzer şekilde GSTM1 izoziminin bulunmama sıklığı beyazlarda, GSTT1 izoziminin bulunmama sıklığı ise zencilerde daha fazladır (Chen ve ark., 1996). Bu ve benzeri genetik farklılıklar, ilgili izozimin katalizlediği konjugasyon reaksiyonlarının, dolayısıyla da kimyasalların toksik ve karsinojenik etkilerinin artmasına ya da azalmasına sebep olur.

e- İndüksiyon

Sıçan karaciğerinde barbitüratlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), antioksidanlar bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), trans-stilbenoksid, ve bazı doğal ürünler GST düzeyini indükler,

farelerde ise bu maddeler sıçanlara göre daha fazla indüksiyona neden olurlar. İndükleyici pek çok madde aynı zamanda özefagusta, midede ve bağırsaklarda da etki gösterirler (Ketterer ve ark., 1990; Severson ve ark., 1978).

f- İnhibisyon

Glutatyon S- transferaz aktivitesi endojen ve ekzojen pek çok madde ile inhibe olur. Doymamış yağ asitleri, lökotrien C4, safra asitleri, hematin, bilirubin gibi endojen metabolitler GST aktivitesinin güçlü inhibitörleridir. Ekzojen inhibitörler arasında ise trialkil kalay tuzları, tetrabromosülfalein, Cibacron Blue F3GA, quersetin ve elajik asit gibi bitki fenoller ve herbisitler (di ve triklorofenoksiasetik asit) sayılabilir. Bazı inhibitör maddeler GST isoenzimlerini birbirinden ayırmada önem kazanırlar (Ketterer ve ark., 1990; Vos ve ark., 1990).

2.2. Lipid Peroksidasyon ve Mekanizması

Atmosferin % 20 sini teşkil eden moleküler oksijen, aerobik organizmaların enerji kaynağıdır. Ancak oksijen (O_2), biyolojik sistemlerde hasara da sebep olmaktadır (Bert, 1978; Doroshov, 1989; Harman, 1986; Rice-Evans ve Dormandy, 1988). Oksijenin toksisitesi O_2 ile insan vücudunda ve çevrede bulunan diğer moleküller arasındaki kimyasal reaksiyonlarla ilgilidir. Bu reaksiyonlar, reaktif O_2 türlerinin (serbest radikaller) oluşumu ile sonlanır.

Reaktif O_2 türlerinin hücrelerde lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllerle etkileşmesi, hücre ölümü, doku hasarı ve organ fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir. Birçok hastalığın fizyopatolojisi ile yaşlanma ve ksenobiyotik toksisitesinde serbest radikallerin rolü vardır (Freeman ve Crapo, 1982; Sies ve Groot, 1991).

Oksidatif stres, pro-oksidan – antioksidan dengesinin pro-oksidan tarafına kayması sonucu potansiyel hasara yol açacak şekilde bozulması olarak tanımlanır (Ahmad, 1993; Ahmad ve ark., 1995; Sies, 1991). Tüm aerobik organizmalar moleküler oksijenin temel halinin indirgenmesi sırasında oluşan

süperoksit anyonu radikalinin ($O_2^{\cdot -}$) sebep olduğu oksidatif stresle karşı karşıyadır. Süperoksit radikali, hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot}) ile denge halindedir. Serbest radikallerin artması durumunda hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşürler. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) birçok hücrel reaksiyon sonucu oluşabilir (Fridovich, 1983; Halliwell ve Gutteridge, 1984). Geçiş metal iyonlarının (örn: demir) varlığında, süperoksit ve hidrojen peroksit; fenton reaksiyonu aracılığı ile hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşür. Hidroksil radikalleri, serbest radikaller arasında en aktif olanıdır. $\cdot OH$ radikallerinin DNA ile etkileşmesi, peroksidasyon ve sarmal kırıklarına; daha da ileri düzeyde tümör gelişimi ve kansere yol açar. Diğer taraftan membran lipidlerinin peroksidasyonu membran bütünlüğünü bozarak hücre fonksiyonlarının durmasına ve nihai olarak hücre ölümüne sebep olur. Proteinlerin oksidasyonu ise membran hasarına ve enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmaktadır (Stadtman, 1990).

Serbest radikallerin, hücrede çeşitli fizyolojik fonksiyonları da vardır. Yabancı organizmaların fagositlerce öldürülmesinde (Morelli ve ark., 1991), ayrıca nöronlar ve endotelial hücrelerde nitrik oksit regülasyonunda (Gryglewsky ve ark., 1986) görev alırlar.

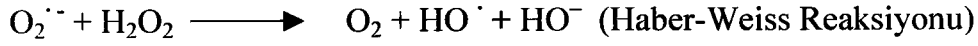
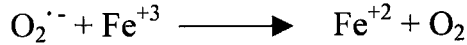
Testis fizyolojisi ve toksikolojisi açısından serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyon önemli mediatörlerdir. Steroidojenik yolaktaki CYP enzimlerinin serbest radikal oluşturdukları bilinmektedir. Serbest radikaller, normal hücre metabolizması sırasında üretilmektedir. Testis metabolizması, hormonal kontrol altındadır. LH (lüteinleştirici hormon), Leydig hücrelerindeki steroidogenezi ve FSH (folikül stimüle edici hormon) sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını dolayısıyla da indirekt olarak spermatogenezi stimüle eder. Steroidojenik yolaktaki CYP enzimleri moleküler oksijeni ve substratı hidroksillemek için NADPH'dan transfer edilen elektronları kullanırlar. Bu olayda süperoksit anyonu ya da diğer serbest radikaller normal

reaksiyonlardan dışarı elektron sızması veya steroid ürünlerin ya da diğer pseudosubstratların enzimle etkileşmesi sonucu oluşur (Peltola ve ark., 1996).

Membran lipdlerinin oksidatif bozunması lipid peroksidasyon olarak bilinir. Kısaca özetlenirse lipd peroksidasyon, hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşerek bir seri reaksiyon sonucu bozulması ve lipd hidroperoksitlerin oluşmasıdır. Oluşan lipid peroksitler stabil değildir ve aldehit, alkan veya alken türevlerine dönüşürler (örn: malondialdehit). Lipid peroksidasyon ağır metallerin sebep olduğu toksisitenin altında yatan önemli bir oksidatif reaksiyondur. Hücre membranındaki yağ asitleri bu zincir reaksiyonu ile degradasyona uğrayarak lipid peroksitleri oluştururlar. Lipid peroksidasyon, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Ayrıca hücresel hasara yola açan en önemli etkenlerden biri olarak kabul edilir (Schalch, 1992).

Hücresel lipid peroksidasyonun başlaması serbest radikallerle olur. Ancak tüm serbest radikaller bu reaksiyonun başlamasına neden olmaz. Lipid peroksidasyonun başlaması için superoksit anyonunun bulunması gereklidir, ancak tek başına süperoksit radikali de lipid peroksidasyonun başlaması için yeterli değildir. Lipid peroksidasyonun başlaması için indirgenmiş demir iyonunun (Fe^{+2}) bulunması gereklidir. ADP ve diğer di ve tri fosfatlar demir ve NADPH ile lipid peroksidasyonu indüklerler. Bu enzim Fe^{+3} ü Fe^{+2} ye indirgemek için elektron vericisi olarak NADPH P450 redüktaz kullanılır. Bu ADP Fe^{+2} kompleksi lipid peroksidasyonu başlatır.

Lipid peroksidasyonu katalizleyen en önemli faktörlerden birisi demir iyonudur. Demir iyonunun katalizlediği bu reaksiyon süperoksit (O_2^-) anyonu ile başlar ve hidroksi (HO^{\cdot}) radikalinin oluşmasıyla sona erer. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir. Mevcut olan Fe^{+2} iyonları Fenton tipi reaksiyon olarak bilinen reaksiyonlarla tekrar HO^{\cdot} radikali oluşturmak üzere H_2O_2 ile reaksiyona girer:



Demir iyonuyla indüklenebilen lipid peroksidasyon pek çok *in vitro* sistemde (mikrozom, mitokondri, izole hücrelerde veya izole organlarda) görülebilir. Demir kompleksi ile muamele edilen deney hayvanlarında, lipid peroksidasyonun anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır (Droper,1990; Kappus, 1987).

Hücre membranlarında en önemli antioksidan α -tokoferoldür. Vitamin E ailesinin en önemli üyesi olan bu molekülün fonksiyonu lipid peroksil (LOO^{\cdot}) radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engellemektir. Plazma ve hücrelerde bulunan diğer bir antioksidan askorbik asittir (vitamin C). Ayrıca askorbik asit biyolojik membranlarda, α -tokoferil radikallerini indirgeyerek α -tokoferole tekrar dönüşümünü sağlar. Bu da lipid peroksidasyonu önleyici etkisi olan α -tokoferolün sürekli aynı düzeyde kalmasını sağlar (Gutteridge ve Halliwell, 1990). Plazmadaki ürik asit ve hücre sitozolündeki GSH'nın da radikalleri bertaraf etmede önemli rolleri vardır.

Bunlara ilaveten, organizmalarda oksijen radikallerinin artmasını ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek toksik oksijen türevlerinin bertaraf edilmesini sağlayan çeşitli enzimatik mekanizmalar vardır. Memeli türlerinde en iyi bilinen antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktazdır (GRd).

Serbest radikallerin hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri üzerine olan etkileri deneysel olarak TBARS (thiobarbituric acid-reactive

substances) yani tiyobarbitürük asit-reaktif maddelerin oluşmasının ölçümüne dayanır.

Peroksidasyon sonucunda lipid hidroperoksitler, lipid epoksitler, epoksialkoller ve kısa zincirli bir bileşik olan malondialdehit (MDA), etan, pentan, hidroksi alkenaller oluşur. Lipid peroksidasyon ölçümleri sırasında, bu ürünler ölçülebilir. Ancak en yaygın medhod lipid hidroperoksin bozunma ürünü olan MDA ölçülmesidir. Bu ürün tiyobarbitürük asitle ölçüme olanak verir.

2.2.1. Glutasyon Tüketimi ve Lipid Peroksidasyon Arasındaki İlişki

Glutasyon tüketimine neden olan maddeler hücresel hasara neden olurlar. Bu maddeler arasında bromobenzen ve asetaminofen sayılabilir. Bu bileşikler metabolizmaları sonucunda kolaylıkla glutasyon ile konjugasyona uğrayabilecek elektrofilik metabolit oluştururlar. Glutasyonun, tüketimiyle aktif metabolit makromoleküllere kovalan bağlanır ve glutasyon tüketimi eşit düzeye geldiğinde lipid peroksidasyon gelişerek, ciddi hücre hasarları meydana gelir. Deneysel çalışmalar lipid peroksidasyona bağımlı olarak meydana gelen hücre hasarının, kovalan bağlanmadan daha büyük boyutlarda olduğunu göstermiştir.

Proteinin südfidril gruplarıyla reaksiyona girerek bu grupların azalmasına neden olan bromobenzen gibi bileşikler kalsiyum homeostazisinin bozulmasında önemli faktörlerdir (Comporti, 1987).

Yakın zamanlarda tanımlanması yapılan glutasyon peroksidaz, lipid peroksidasyona karşı gösterilen koruyucu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Glutasyon, selenyuma bağımlı ve bağımsız olan glutasyon peroksidaz için hidrojen d6n6r6u olarak rol oynar.

Yapılan çalışmalarda karaciğer h6crelerinde iki 6nemli glutasyon havuzunun varlığı saptanmıştır. Bunlardan birisi sitoplazmada total

glutasyonun % 85'i oranında lokalize olmuştur ve yarılanma ömrü 2 saattir. Diğeri ise mitokondride total glutasyonun % 10-15'i oranında lokalize olmuştur ve yarılanma ömrü 30 saattir. Bu nedenle hücre hasarında mitokondriyel glutasyon havuzunun tüketimi önemlidir (Comporti, 1987).

2.2.2. Ağır Metaller ve Lipid Peroksidasyon Arasındaki İlişki

Geşiş metallerinin iki değerlikli iyonlarının lipid peroksidasyonu arttırdığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Rodentlerde bakır, kurşun, alüminyum, kobalt, cıva, kalay, vanadyum, nikel ve kadmiyumun lipid peroksidasyonu arttırdığı bilinmektedir (Sunderman, 1986). CdCl₂' ye maruz kalmış kemiricilerin hedef dokularında lipid peroksidasyonun arttığı gözlenmiştir. Kadmiyum iyonları, hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin, lipid hidroperoksitlerin meydana geldiği bir zincir reaksiyonu tarafından degradasyona uğraması ve malondialdehit gibi aldehitler ile alkanları içeren degradasyon ürünlerinin oluşumu ile sonuçlanan serbest radikal reaksiyonlarını artırır. Bu reaksiyonlar çeşitli doku hasarlarının genel mekanizması olarak kabul edilir, metal karsinogenesitesinin başlama (initiation) ve gelişme (promotion) safhalarında rolü olduğu düşünülür ayrıca kadmiyumun akut toksisitesine de iştirak ettiği düşünülür (Kazantzis, 1987). Cd ve Ni' nin lipid peroksidasyon üzerine etkisi bölüm 2.3.5.' de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.2.3. Lipid Peroksidasyonu Etkileyen Kimyasal Maddeler

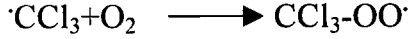
a. İlaçlar

Pekçok ilaç, örn; paraquat, mitomisin c, menadion, aromatik nitro bileşikleri biyolojik sistemde superoksit anyonu oluşumuna neden olurlar (Kappus, 1986, 1987).

b. Karbon tetraklorür ve halothan

Lipid peroksidasyona *in vivo* ve *in vitro* neden olduğu bilinen ilk toksik madde CCl₄ dür. CCl₄ mikrozomal CYP ile metabolize olarak triklorometil

radikallerini ($\cdot\text{CCl}_3$) oluşturur. Bu radikal O_2 varlığında lipid peroksidasyonu başlatır.



Halothan (CF_3CHBrCl) ile indüklenen lipid peroksidasyon CYP'nin indirgenmesi ile serbest radikaller oluşturur. Ancak bu konuda yeterli bilgi yoktur (Kapus, 1987).

c. Organik hidroperoksitler

Model bileşik olarak alınan bütilhidroksiperoksitle lipid peroksidasyonun indüklendiği saptanmıştır. Genellikle organik hidroperoksitler direkt olarak lipid peroksidasyonu indüklemeyebilirler. Organik hidroperoksitler, CYP'yi aktive ederek lipid peroksidasyonu başlatırlar (Gutteridge ve Halliwell 1990; Kapus, 1987).

e. Sigara

Sigara dumanının lipid peroksidasyonu stimüle ettiği, ancak bu etkinin spesifik olarak serbest radikaller nedeni ile mi yoksa nonspesifik bir etki mi olduğu tam olarak bilinmemektedir (Church ve Pryor, 1985; Kappus, 1987).

Buna ilaveten LP seviyeleri sigara içimi ile erkek sıçanlarda düşerken dişi sıçanlarda değişmemektedir (Eke ve ark., 1998). Ayrıca LP seviyeleri sigara içimiyle genç sıçanlarda yükselirken yaşlı sıçanlarda düşük bulunmuştur (Eke ve ark., 1997).

f. Alkol

Lipid peroksidasyonun etanolle stimülasyonu tam olarak anlaşılabilmiştir. Akut alkol intoksikasyonunda, CYP sistemi aracılığıyla hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Etanol verilmiş sıçanların mikrozomlarında süperoksit, peroksit ve hidroksiradikaller gibi aktif ara ürünlerinin arttığı gözlenmiştir.

Etanol, izole karaciğer hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak hepatosit GSH düzeyini azaltır. GSH azalması asetaldehitin oluşumuyla ilgilidir ve asetaldehit-GSH konjugasyonuna katılır. Bu durumda *in vivo* olarak GSH'

nın azalması %20-30 arasında ise de, GSH düzeyindeki bu azalmanın peroksidasyona karşı bir defans mekanizması olup olmadığı tartışmalıdır. Sıçan karaciğer homojenatında malondialdehit (MDA) oluşumunun etanol ilavesiyle arttığı görülmüştür. Aç bırakılan sıçanların hepatositlerinde *in vivo* GSH azalması ve MDA oluşması gözlenmiştir.

Deney hayvanlarında, kronik alkol intoksikasyonu, artan lipid peroksidasyonla ilişkilidir. Kronik alkol intoksikasyonunda, mikrozomal fraksiyonda serbest radikallerin oluşumunun indüksiyonuyla ve hepatosit lipid peroksidasyon defans mekanizmasının tüketilmesiyle lipid peroksidasyon artar. Tekrarlanan dozlarda sıçanlara etanol verilmesiyle homojenat ve subsellüler fraksiyonda, *in vitro* olarak lipid peroksidasyonun arttığı gözlenmiştir (Horton, 1987; Kappus, 1986)

2.3. Metaller

İnsan vücudu için esansiyel olan ve olmayan metaller başta besinler olmak üzere su, hava gibi yollarla alınmaktadır. Böylelikle bu metaller insan vücudunda birikmekte ve “vücut metal yükü” oluşmaktadır. Metaller, esansiyel olanlar da dahil olmak üzere fazla miktarda alındıklarında zararlı etki göstermektedirler. İnsanlar metallere çevrelerinde çok çeşitli yollarla maruz kalmaktadırlar.

Besinler ve içme sularıyla birçok yabancı maddeyle birlikte metaller de organizmaya alınmaktadır. Bu metaller besinlerin normal bileşenleri olabildikleri gibi kirlilik olarak da bulunabilirler. Metal içeren pestisit kalıntıları, çevre kirlenmesi sonucu metallerin biyoakümüülasyonu ile besin zincirine geçmesi, metalden yapılmış veya metal bileşikleri içeren besin kaplarından metallerin besinlere geçmesi sonucu besinlerle birçok metal organizmaya girmektedir. Hava, su ve toprak, doğal kaynaklar ve teknolojik nedenlerle metaller tarafından kirletilebilir. Böylece metaller çevrede jeolojik

ve biyolojik olarak dağılıma uğrarlar. Bu dağılım ve taşınma sonucu metaller emisiyona uğradıkları yerlerin çok uzağında da birikebilirler.

Endüstride metallerin işlenmesi ve teknolojik prosesler sırasında metallere direkt maruziyet sonucu birçok mesleki zehirlenme vakaları olmaktadır. Kronik kurşun zehirlenmesi (plumbizm), kronik cıva zehirlenmesi (merkürizizm), kronik kadmiyum zehirlenmesi mesleki zehirlenmelere örnektir.

2.3.1. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd), artan endüstriyel gelişmeye paralel olarak çevreden insanlara ulaşarak zarar veren çok toksik bir metaldir. Endüstrileşmiş ülkelerde çevreye verilen Cd, bu yüzyılın 2. yarısında düşündürücü bir şekilde artmıştır.

2.3.1.1. Doğada Bulunuşu ve Maruziyet Yolları

Kadmiyum, kimyasal olarak çinko ile benzerlik gösterir ve sülfid filizlerinde doğal olarak çinko ve kurşunla birlikte bulunur. Dolayısıyla bir metal elde edilirken diğerleri işlenmezse çevreye geri verilir. İşte kurşun ve çinko eldesi sırasında yıllardır önemli ölçüde kadmiyum doğaya yayılmıştır. Hava, su ve topraktaki yüksek kadmiyum konsantrasyonları önemli ölçüde endüstriyel emisyon kaynaklarına, bir miktar da madencilik ve metal işlenmesine bağlıdır.

Kadmiyum canlı organizmada yaşam süresi ile orantılı olarak birikime uğramaktadır. Kadmiyumun madenciler ve endüstri işçilerinde, daha yoğun olarak da alkali pil üretiminde çalışanlarda olumsuz sağlık etkileri gözlemlenmiştir. Kadmiyuma mesleki olmayan (çevresel) maruziyet genellikle besinsel kaynaklarla olmaktadır. Kadmiyumun vücuttaki miktarının artması genellikle kadmiyumla kontamine olmuş topraklarda yetişen meyve, sebzeler ile Cd ihtiva eden suların bilinmeden içilmesi ve yemek pişirmede kullanılması ile olmaktadır (Sartor ve ark., 1992).

Kadmiyum endüstride sayısız işlemde kullanılır. Kadmiyum metali, genel olarak demir ürünleri üzerine yıpranma önleyici kaplama olarak

kullanılır. Cd sülfid ve selenit plastiklerde ayrıca boyalarda kırmızı, sarı ve portakal rengi pigment olarak kullanılır. Bazı ülkelerde kadmiyumun bu amaçla kullanımını yasaklanarak yerine toksik etkisi daha düşük başka metaller kullanılmaya başlanmıştır. Kadmiyum, bakırı sertleştirmesi ve yüksek sıcaklıklara dayanıklılığını arttırması sebebiyle otomobil radyatörlerinde de kullanılmaktadır. Cd bileşikleri, nikel-kadmiyum pillerde katod maddesi olarak, ayrıca elektronik birimlerde ve nükleer reaktörlerde de kullanılır. Ancak bu alanlarda Cd'nin yerini tutacak başka metal kullanmak daha zordur.

Kontamine olmamış bölgelerin havasında $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'den az kadmiyum bulunur. Et balık ve meyveler $1-50 \mu\text{g}/\text{kg}$, hububatlar $10-150 \mu\text{g}/\text{kg}$ civarında kadmiyum içerir. En yüksek konsantrasyonlar hayvanların karaciğer ve böbreğinde mevcuttur. Midye vs. gibi kabuklu deniz hayvanları diyetle alınan kadmiyum major kaynağı olabilirler ($100-1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ civarında Cd içerirler). Midyeler, Cd'yi sudan alarak Cd bağlayabilen peptid yapılarında biriktirirler. Su, hava ve yiyeceklerle alınan günlük Cd miktarı Kuzey Amerika ve Avrupa için farklılık gösterse de birçok ülkede ortalama $10-25 \mu\text{g}$ arasında değişmektedir.

Solunum yoluyla alınan Cd %15 ila %30 civarında absorbe olur. Havadaki kadmiyum konsantrasyonu yüksek işyeri ortamlarında direkt Cd maruziyeti daha zararlı olmaktadır. Mesleki maruziyet dışında inhalasyon yoluyla Cd'ye en fazla sigara dumanı ile maruz kalınmaktadır. Bir sigara $1-2 \mu\text{g}$ Cd içerir ve bu miktarın %10'u inhale edilir ($0,1-0,2 \mu\text{g}$). Günde bir paket ya da daha fazla sigara içilmesi sonucu günlük absorblanan Cd miktarı yükselmektedir. Ankara'da yaşayan insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada sigara içen kişilerde, içmeyenlere oranla kan Cd düzeyleri yaklaşık iki kat bulunmuştur (Vural ve Güvendik, 1984).

Gastrointestinal absorpsiyon, solunumla absorpsiyondan daha azdır (%5-8). Besinlerle yeterli miktarda kalsiyum ve demir alınmaması, ayrıca düşük

proteinli diyet Cd absorpsiyonunu artırır. Demir eksikliği olan kişilerde gastrointestinal absorpsiyon oranı %20'ye çıkabilir.

Kadmiyum plazmada proteinlere, bir miktar da albumine bağlı olarak taşınır. Kandaki Cd' nin küçük bir miktarı düşük molekül ağırlıklı proteine (metallotiyonein) bağlı olarak taşınır. Kadmiyum birçok dokuda birikir ve yarı ömrü uzundur. Kaslar, karaciğer ve böbrek için bu miktarın 10 ila 30 yıl arasında olduğu saptanmıştır. Metallotiyonein oluşumu Cd, Zn, Cu, Hg ve diğer 2 değerlikli metaller tarafından stimüle olur. Cd ve metallotiyonein arasındaki ilişki Cd' nin dokularda birikimi ve toksisitesi açısından temel teşkil etmektedir.

Kadmiyum organizma için essansiyel olmayan bir elementtir. Karaciğer, böbrek, iskelet sistemi vs. üzerindeki toksik etkileri araştırmacılar tarafından kapsamlı olarak açıklanmıştır (Friberg ve ark., 1979; Coipus Pereboom-Stegeman ve Jongstra-Spaapen, 1979; Morselt ve ark., 1983).

2.3.1.2. Genel Toksisitesi

Akut toksisite: Akut toksisite yüksek konsantrasyonlarda Cd ile kontamine olmuş yiyecek veya içeceklerle oluşabilir. Yaklaşık 16 mg/lt Cd içeren içeceklerin tüketimi sonucu bulantı, kusma ve karın ağrısı görülür. Kadmiyum fume'larının ya da Cd içeren ısıtılmış diğer materyallerin inhalasyonu ile akut kimyasal pnömoni ve pulmoner ödem oluşur.

Kronik toksisite: Kadmiyum başlıca karaciğer ve böbrekte toplanır. Ayrıca testisler ve üreme üzerinde de toksik etki gösterir. Uzun süre düşük seviyelerde kadmiyuma maruziyetin esas etkileri kronik obstruktif pulmoner hasar, amfizem ve kronik renal tübüler hasardır. Kardiovasküler ve iskelet sisteminde de bazı etkiler görülebilmektedir. Cd' nin immün sistemi de etkilediği bilinmektedir. Cd' ye maruz kalan işçilerde monosit sayısında artma olmaktadır (Karakaya ve ark., 1994). Kronik olarak yüksek seviyelerde Cd' ye

maruz kalan insanlarda bazı sitokin seviyelerinin etkilendiği gözlenmiştir (Yücesoy ve ark., 1997).

Kadmiyumun böbrekler üzerindeki primer toksisitesi renal tübüler fonksiyonları etkilemesidir ve idrarda kadmiyumun artması, proteinüri, aminositürü, glukozüri ve proksimal tübüler hasar ile kendini gösterir. Proteinüri düşük molekül ağırlıklı proteinlerin proksimal tubuluslardan geri emiliminin bozulması sonucu oluşur. İdrarla en çok atılan düşük molekül ağırlıklı protein β_2 -mikroglobulindir. Cd ye maruz kalan kişilerde böbrek toksisitesinin önemli göstergeleri olan β_2 -mikroglobulin ve N-asetil- β -D-glukozaminidaz itrahi incelenmiş, Cd ile idrar β_2 -mikroglobulin ve idrar N-asetil- β -D-glukozaminidaz aktivitesi arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur (Karaaslan, Z., 1998).

Yüksek miktarda kadmiyuma maruz kalan işçilerin idrarlarında ayrıca retinol bağlayıcı protein, lizozim, ribonükleaz ve immünglobulin zincirleri gibi düşük molekül ağırlıklı diğer proteinlere de rastlanmıştır. Kadmiyum ayrıca glomeruler lezyonlar da oluşturmaktadır. Kadmiyumun böbrekte oluşturduğu hasar geri dönüşümsüzdür.

Kadmiyumun böbreklerde belirgin bir toksik etki ortaya çıkarmadan birikmesi Cd-tiyonein veya Cd-metallotiyonein kompleksinin oluşumu ile mümkün olmaktadır. Kadmiyum birikme yerlerinde metallotiyoneinle bağlanır. Kadmiyumun dokularda metallotiyoneinle bağlanmışken toksik olmadığı düşünülmektedir. Ancak Cd seviyesi kritik konsantrasyonu aşarsa toksik hale gelir. Metallotiyonein 61 aminoasitten oluşur ve bunlardan 20 tanesi sisteindir (%30). En çok karaciğer ve böbrekte bulunur ve ağır metallerle bağlanabilme kapasitesi oldukça yüksektir.

Kadmiyum toksisitesi, kalsiyum metabolizmasını etkiler. Kadmiyum nefropatisi sonucu kalsiyumun atılımı artar ve kalsiyum eksikliğine bağlı olarak kemik ağrıları, osteomalazi ve osteoporoz oluşur. Japonya'da Cd ile kontamine olmuş besinleri tüketen kişilerde şiddetli romatizmal ağrılar, ciddi

kemik deformasyonları ve kronik renal hasar görülmüştür. İtai-itai hastalığı adı verilen bu olayın Cd zehirlenmesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda Cd' nin esansiyel hipertansiyon etiolojisinde rol oynayan faktörlerden biri olduğu görülmüştür. Cd' ye maruz kalan işçilerin sistolik ve diastolik basınçlarında yükselme gözlemlenmiştir. Ayrıca içme suyu ile Cd verilen sıçanların miyokardiumunda fonksiyonel, elektrokardiografik ve biyokimyasal değişimler görülmüştür (Goyer, 1996).

2.3.1.3. Karsinojenite

Kadmiyuma mesleki maruziyet ile akciğer ve prostat kanseri arasındaki ilişkiyi göstermek için bir çok epidemiyolojik araştırma yapılmıştır. İngiltere ve İsveç'te Ni-Cd pil üretiminde çalışan işçiler üzerinde yapılan araştırmalarda akciğer ve prostat kanser riskinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Kadmiyum son olarak IARC tarafından pulmoner tümörlerle ilişkisinden dolayı insan karsinojeni olarak kabul edilmiştir (IARC, 1994).

2.2.1.4. Kadmiyumun Testisler Üzerindeki Etkileri

Kadmiyumun birçok doku ve organ üzerindeki etkisi vücutta basit hücresel fonksiyonları bozması ile açıklanabilir. Hücresel düzeyde kadmiyumun kromatin kondenzasyonuna (yoğunlaşmasına) yol açtığı gösterilmiştir. Oluşan kromatin kondenzasyonu ve membran bütünlüğünün geri dönüşümsüz olarak bozulması hücre ölümü ile sonuçlanır. Kadmiyumun etkilerine hücre çekirdeğinin primer hedef olduğu düşünülmektedir (Morselt ve ark., 1983). Kadmiyum toksisitesinde hedef organlardan biri de testisdir (Chung ve Maines, 1987). Kadmiyumun testiküler tümörler dahil olmak üzere birçok patolojik olguda etiolojik bir faktör olduğu düşünülmektedir. Kadmiyum sıçanlarda üreme üzerine toksik etkimekte ve testiküler nekroz oluşturmaktadır. Kadmiyum spermatojenik hücrelere de etki etmekte ve fertilitiyi önemli ölçüde düşürmektedir (Fowler ve ark., 1982; Ono ve ark., 1997). Oral yolla 52 hafta boyunca Cd verilen sıçanlarda üreme kapasitesinin

hayvanların % 39,98' inde yok olduğu saptanmıştır (Saygı ve ark., 1991). Deneysel hayvanlarında kadmiyum karaciğer böbrek ve testiste ciddi lezyonlara sebep olur. Ancak Cd sıçan testisinde diğer organlara toksik olan dozlara göre daha düşük dozlarda ciddi zararlı etkiler oluşturur. Bu etkiler, ciddi hemoraji, ödem, nekroz ve semnifer tübüllerin tahribatıyla birlikte oluşan atrofi olarak özetlenebilir (Parizek ve Zahor, 1956; Cameron ve Foster, 1963). Kadmiyum 3 mg/kg dozda verildikten 7 gün sonra oluşan atrofi sonucu testis ağırlığı azalmaktadır (Ono ve ark., 1997). Semnifer tübüllerdeki atrofi sonucu sperm yapımı da durmaktadır (Saygı ve ark., 1991).

Kronik Cd alımı testislerde makroskobik ve mikroskobik değişikliklere sebep olmaktadır. Bu değişimler ve oluşan hasar maruziyet zamanı ile doğru orantılıdır.

Kadmiyum enjeksiyonundan sonra sıçan testisinde hemoglobin konsantrasyonu anlamlı olarak artmaktadır. Hemoglobin konsantrasyonunun artması testiste oluşan hemorajinin miktarı ile korelasyon göstermektedir. Kadmiyumla tüm testisin mikrozomal ve granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum fraksiyonlarında Leydig ve Sertoli hücrelerinin mikrozomal fraksiyonlarında olduğu gibi hem konsantrasyonunda artma gözlemlenmiştir (Chung ve Maines, 1987).

Torbali testislere sahip hayvan türlerinde kadmiyum, testis ve kaput epididimis'e toksiktir. Cd' nin primer etkisi kadmiyumun kapiller endotele bağlanmasından dolayı testiküler damarlar üzerindedir. Bu da endotelial devamlılığı engellemekte ve testiküler interstitium'da sıvı birikimi sonucu interstisyel ödem ve kan viskozitesinde artmaya neden olmaktadır. Bu olayları venöz tromboz ve tüm testis ile kaput epididimisin özellikle proksimal bölümlerinde iskemik nekroz takip eder. Cd' ye ilk maruziyetten 3 ay sonra testisin morfolojik ve histopatolojik incelenmesi sonucu hasarın geri dönüşümsüz olduğu görülmüştür. Deliller kan testis bariyeri ve Sertoli

hücrelerinin çok düşük dozlarda kadmiyuma oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir (Walker ve ark., 1984).

Cıva, Kadmiyum, Kobalt ve bakırın 100 µM konsantrasyonda sıçan adrenal bezlerinden izole edilen hücreler ve sıçan testisinden izole edilmiş leydig hücrelerinin yaşama kabiliyetinde advers etki oluşturmaktadırlar. Kurşun, çinko, alüminyum, krom, demir, nikel ve lityum 100 µM konsantrasyonda bile adrenal ve leydig hücrelerinin yaşama oranı veya bu hücrelerdeki hormon kontrollü steroidogenez üzerinde herhangi bir zararlı etki yapmamıştır (Ng ve Liu, 1990).

Kadmiyum testis üzerinde selektif toksik etki göstermektedir. 1.1-2.2 mg/kg gibi düşük dozlarda bile diğer organlarda patolojik hasar oluşturmaksızın testiküler hasara yol açmaktadır. 10 mg/kg'lık yüksek tek dozda rodent testisinde selektif hasar oluşturmaktadır (Parizek ve Zahor, 1956).

Kadmiyum tarafından indüklenen testiküler harabiyet vasküler hasar sonucu oluşan dolaşım yetersizliği veya Cd' nin spermatojenik hücrelere olan direkt etkisi ile açıklanabilir. Kadmiyumun spermatogonal hücrelerde DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Cd' nin sülfidril ve disülfid gruplarına olan affinitesinden dolayı hücre bölünmesi üzerindeki etkisi iş ipliklerini oluşturan proteinlerin sülfidril grupları ile etkileşmesi sonucu oluşmaktadır (Fowler ve ark., 1982).

2.3.2. Nikel

2.3.2.1. Doğada Bulunuşu ve Maruziyet Yolları

Nikelin önemli bir çevre kirleticisi olduğu son 10-20 yılda farkedilmiştir (IARC 1990). İnsanlar bu çevre kirleticisine mesleki veya meslek dışı yollarla maruz kalmaktadır.

Nikelin asıl kullanım sahası metal endüstrisidir. Üretilen nikelin %50'den fazlası demir ile alaşım halinde paslanmaz çelik üretiminde, %25'i

bakır ve kromla alaşım halinde; %25 'i de saf halde veya koruyucu kaplama olarak kullanılır. Ayrıca nikel elektronik, pil ve besin endüstrisinde (katalizör olarak), madeni para üretiminde kullanılmaktadır. Endüstride nikel kaplama sırasında, nikel tozlarının öğütülmesi sırasında ve nikel karbonil [Ni (CO)₄] ile maruz kalınmaktadır. Nikel karbonil oldukça toksik bir gaz olup metalik nikel karbon monoksitinin birleşmesi sonucu oluşur. Sigara dumanı da önemli miktarda nikel karbonil içermektedir. Nikel karbonile uzun süre maruziyet ciddi akut ve bazen fatal toksisiteye neden olmaktadır.

Yakın çevrede nikel, fosil kaynaklı sıvı yakıtların yanması sonucu havada bulunabilir. İlâveten atık sular da dünya çapında nikel bakımından zengindir (Snodgrass, 1980). Bazı yapay besin maddelerinde, (kabartma tozu v.s.) sebzelerde, hububatlarda nikel doğal olarak bulunmaktadır. Normalde suda nikel bulunmaz.

2.3.2.2. Metabolizma ve Genel Toksikite

Nikel (Ni) gastrointestinal kanaldan çok düşük miktarda absorbe olur. Yiyeceklerle günde ortalama 250 mg olarak alınan nikelin yalnızca %5' inin absorplandığı, bu yüzden nikel maruziyette solunum yolunun daha önemli olduğu belirtilmiştir (Rondia,1979). Plazmada serum albüminine küçük organik moleküllere aminoasitlere veya polipeptidlere bağlanarak taşınır. Nikel kanda albümin ve nikeloplasmin adı verilen makroglobuline bağlı olarak bulunmaktadır.

Hayvanlara parenteral yolla verilen nikel böbrekler akciğer, deri hipofiz, adrenal bezler, yumurtalıklar ve testise kısa zamanda dağılır (Sunderman, 1981). Vücut nikel yükü ortalama 20 mg' dır ve yarı ömrü diğer metallerle göre kısadır. Büyük miktarda idrarla, bir kısmı da terle atılır (Leonard ve ark., 1981). Safra ve dışkı nikel için minör atılım yollarıdır.

2.3.2.3. Karsinojenite

Nikel, immünotoksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak bildirilmiştir. Nikel bileşiklerinden katı olanları en toksik olarak belirtilmişse de $NiCl_2$ gibi suda çözünen nikel tuzları da mutajenik etkilidir (Kakela ve ark., 1999).

Rafineri işçilerinde nikelin epidemiyolojisi iyi bilinmektedir (Sunderman, 1978). Nikele mesleksi maruziyetin insanlarda akciğer ve nazal kansere eğilimi arttırdığı 40 yıldır bilinmektedir (Jacquet ve Mayence, 1982). İngiltere'de yapılan epidemiolojik çalışmalarda nikel rafinesinde çalışan işçilerde popülasyondaki diğer insanlara göre akciğer kanseri riskinin beş kat, nazal kanser riskinin ise 150 kat olduğu gösterilmiştir.

Nikel rafinerisinde çalışan Norveçli işçilerde larenks kanseri riskinde artış ve Rusya'da çalışan işçilerde gastrik karsinom ve yumuşak doku sarkomları gözlenmiştir. Elektrolitik nikel rafinasyonunda çalışan Kanadalı ve Norveçli işçiler arasında altı tane renal kanser vakası rapor edilmiştir (Sunderman, 1981b).

Çalışmalar işyeri havasında nikel karbonil kadar nikel sülfidlerin de kanser insidansını arttırdığını göstermektedir. Gerçekten de hayvanlar üzerinde yapılan deneylerle nikel sülfidin (Ni_3S_2) bu bileşikler içinde en potent karsinojenik bileşik olduğu ve enjeksiyon yerlerinde tümör oluşturduğu gösterilmiştir. Kaslar ve testiste sarkomlar oluşturma insidansı yüksek bulunmuştur. Ayrıca çeşitli nikel bileşikleriyle farklı parenteral uygulamalar sonucu farklı doku ve organlarda tümörler oluşmaktadır. Birkaç aylık latent periyod sonunda uygulama yeri ve nadiren bir başka bölgede çeşitli malign tümörlerin oluştuğu gösterilmiştir (Leonard ve ark., 1981). Sıçanlarda nikel tuzlarının enjeksiyonundan 17-41 hafta sonra sarkomlarda artma oluşmaktadır (Heath ve Daniel, 1964).

Kemiricilerde nikel karbonil veya nikel tuzlarının inhalasyonu sonucu akciğerde tümör insidansı çok yüksek bulunmuştur. Nikele maruziyet sonucu akciğerlerden başka sinüsler, larenks, böbrek, yumuşak dokular ve midenin

çeşitli yerlerinde sarkomlar oluştuğu gözlemlenmiştir (Pederson ve ark., 1973).

Yapılan epidemiolojik ve deneysel çalışmalar sonucu belirli nikel bileşiklerinin potent karsinojen olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda karsinojenik riskin maruz kalınan miktarla sınırlı olduğu ve doz cevap ilişkisinin varlığı da gösterilmiştir. Ayrıca deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda nikel bileşiklerinden kaynaklanan kanser riskinin uygulama şekline bağlı olduğu kadar bu bileşiklerin sudaki çözünürlüklerine de bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Lau ve ark., 1972, Sunderman, 1976).

Akciğerlerde biriken metalik ve oksitlenmiş nikel tuzları yavaş, çözünebilen nikel tuzları hızlı, uçucu ve yağda çözünen nikel bileşiklerinin uzaklaştırılması çok hızlıdır. Çözünebilen ve absorblanabilen nikel tuzlarının herhangi bir organda belirli miktarda konsantre olmamakla beraber karaciğer, böbrek hipofiz bezi ve iskelet sisteminde yüksek oranda biriktiği belirlenmiştir.

Sigara dumanı veya PAH'larla birlikte nikel maruziyetin kanser riskini artırdığı deney hayvanlarında gösterilmiştir. Yine hayvan deneylerinde bu riskin mangan ile önlendiği de gözlenmiştir. Bununla beraber sigara dumanındaki Nikel karbonilin zayıf olasılıkla sigara içiminde kanser riskine katkıda bulunduğu sanılmaktadır (Sunderman ve Sunderman, 1961; Sunderman ve Donnel, 1965). Nikelin sebep olduğu kanser mekanizması halen açıklığa kavuşmamış olup nikel karbonilin mRNA düzeyinde RNA sentezini ve DNA'ya bağlı RNA polimerazı inhibe ederek genetik şifreyi değiştirdiği gösterilmiştir (Sunderman ve Esfahani, 1968).

2.3.2.4. Teratojenite ve Embriyotoksisite

Nikelin ayrıca teratojenik etkili olduğu kemiriciler üzerinde gösterilmiştir. Nikel plasentayı geçerek fetüse ulaşabilmektedir (Lu ve ark., 1976; Mas ve ark., 1985). Nikelin plasentayı geçtiği ve annedeki düzeye eriştiği insan fetal

dokusunda da gösterilmiştir (Stack ve ark., 1976). Nikel annenin hormonal dengesini bozarak hamileliğe etki eder. Sıçanlarda hipofiz bezinden salgılanan prolaktinin nikelle inhibe edildiği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (Labella ve ark., 1973). Bu olay hamileliğin devamı için gereken hipotalomus ve hipofiz arası etkileşmeyi bozmaktadır.

Nikelin, karsinojenik ve teratojenik etkilerinden başka bir diğer önemli etkisi de allerjik kontakt dermatite neden olmasıdır. Nikel dermatiti, allerjik kontakt dermatit türlerinin en yaygın şeklidir. Öyle ki kontakt dermatitli kişilerin %4 ile 9' u nikel duyarlılık testine pozitif yanıt vermektedir. Duyarlılık metal paralar, takılar gibi günlük kullanımı olan sayısız metal ürünlerinden ayrıca nikel içeren besinlerin tüketiminden kaynaklanabilmektedir. Popülasyonda özellikle kuyumcular ve nikel endüstrisinde çalışan kişilerde nikel dermatitine daha sık rastlanmış olup bu grupların % 5' inde egzama ve %10' unda potent allerji gözlenmiştir (Baer ve ark., 1973).

Nikel lenfoblastik biyotransformasyonu indükleyebilir ve bu nikel duyarlılık testinde kullanılır. Bu olay sırasında nikel lenfositlerin yüzeyine bağlanır (Hutchinson ve ark., 1975). Deride nikelin epidermisi geçtikten sonra proteinle bağlandığı ve oluşan antijen kompleksi ile duyarlılık reaksiyonuna neden olduğu düşünülmektedir.

Nikelin nöroendokrin etkileri de olduğu bilinmektedir (Carlson, 1984; Clemons ve Garcia, 1981). Nikelin farelerde steroidogenezi inhibe ettiği bulunmuştur. Nikel iyonlarının prolaktin salınımında potent inhibitör oldukları ve büyüme (growth) hormonu salınımının regülasyonuna etkidikleri gösterilmiştir (Labella ve ark., 1973). Nikel insülin salınımını etkiler ve plazma glukozunun yükselmesi sonucu hiperglisemi oluşur (Dormer ve ark., 1973).

Son zamanlarda araştırmalar Cd ve Ni' nin karaciğer, akciğer ve böbrekteki CYP' ler ve GST' ler üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. CYP enzim sistemi; ilaçlar, PAH'lar, pestisitler ve aromatik aminler de dahil olmak

üzere birçok ksenobiyotiği çok toksik ve karsinojenik aktif metabolitlerine dönüştürebilmektedir. GST' ler de genel olarak aktif elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksikasyonunda görev alırlar. Bu nedenle kadmiyum ve nikelin toksikasyon ve detoksikasyon dengesine etkisinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bunlara ilaveten son zamanlarda birlikte verildiğinde Ni' nin Cd' nin toksisitesini azaltıcı yönde etkilerinin olabildiğini gösteren veriler ortaya çıkmıştır. Bu veriler, konunun bir başka boyutunu da ortaya çıkarmaktadır.

2.3.2.5. Ni' nin Testisler Üzerindeki Etkileri

Ni' nin üreme üzerine de toksik etkili olduğu bilinmektedir. Günde 30 ppm nikel verilen erkek sıçanlarda fertilitenin büyük oranda düştüğü gözlemlenmiştir (Kakela ve ark., 1999). Nikele maruz kalan erkek sıçanların testislerindeki değişimler histolojik olarak incelenmiş; küçülmüş ve bir kısmı anormal olan semnifer tübüllerin az miktarda spermatid içerdiği gözlemlenmiştir. Nikel ile oluşan anormallikler semnifer tübüllerde küçülme ve bunun sonucu bazal spermatogonia sayısındaki azalmadır. Tübüllerin küçülmesinin membranlardaki değişen permeabilite ve değişen iyon akımlarının sonucu olduğu düşünülmektedir (Hoey, 1966). 30 ppm nikel 42 gün maruz kalan hayvanlarda 28 gün maruz kalanlara göre üremede daha küçük defektler ve testis histolojisinde daha az değişme gözlemlenmiştir. Bu ise daha önceden de düşünüldüğü gibi maruziyetin devamı durumunda bir toparlanmanın mümkün olabileceğini göstermektedir (Kakela ve ark., 1999).

2.3.3. Kadmiyum ve Nikelin CYP Sistemi Üzerindeki Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Ni ve Cd' nin tek başlarına *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli deney hayvanlarında ve insanda akciğer ve böbrekte birikerek fonksiyon bozukluklarına ve bazı CYP enzim aktivitelerinde değişmelere yol açtığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Eke ve ark., 1998b).

İnkübasyon ortamına *in vitro* olarak Ni' nin düşük konsantrasyonlarda ilave edildiğinde erkek fare karaciğeri anilin hidroksilaz (AH) (CYP2E1) enzim aktivitesini etkilemediği ancak yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettiği; etilmorfin N-demetilaz (EMND) (CYP3A1) aktivitesini ise düşük konsantrasyonlarda artırırken, yüksek konsantrasyonlarda düşürdüğü gözlenmiştir. Mikrozomal aminopirin N-demetilaz (AMND) (CYP2B1/2) aktivitesi düşük konsantrasyonlarda kontrol değerinin biraz üzerinde kalmış, daha yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin inhibe olduğu saptanmıştır (Çoban ve İşcan, 1990).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda farklı hayvan türü ve farklı dokulardaki CYP izozimlerinin farklı etkilendikleri, dolayısıyla Cd ve Ni' ye ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında tür ve dokuya bağlı olarak değişik yanıtlar verdikleri dolayısıyla da farklı etkilendikleri ortaya konmuştur. Doz ve zamana bağlı olarak Ni' nin fare karaciğer monooksijenaz aktivitelerinde meydana getirdiği değişiklikler de gösterilmiştir. Ni ile farelerde 8 saat sonra karaciğer AH ve EMND aktivitelerinde azalmalar gözlenmiştir. Nikel ile karaciğer monooksijenazlarında oluşan maksimum inhibisyon 59.5 mg/kg dozda s.c. yolla verildikten 16 saat sonra gözlenmiştir. Daha yukarı dozlarda ve uzun zaman sürelerinde normale dönmektedir (İşcan ve Çoban, 1989).

Cd, kobaylarda böbrek ve akciğer AH ve EMND aktivitelerinde kontrole göre anlamlı olmamakla birlikte yükselmelere neden olmuştur. Cd' nin akciğerde EMND aktivitesi üzerindeki etkisi AH' den fazla iken böbrekte bunun tersidir (Karakaya ve İşcan, 1988). Cd, sıçanlarda karaciğer AH ve EMND aktivitelerini kobayla karşılaştırıldığında daha yüksek oranda inhibe etmektedir (İşcan ve Karakaya, 1988).

Ni fare, sıçan ve kobayda karaciğer AH, EMND ve AMND aktivitelerini inhibe etmektedir (İşcan ve ark., 1992a). Cd ve Ni birlikte verildiklerinde sıçan karaciğerinde EMND ve AMND aktiviteleri kontrole göre anlamlı olarak artmakta, AH aktivitesi değişmemektedir (İşcan ve ark.,

1992b). Cd ve Ni, tek başlarına ve birlikte verildiklerinde kobay ve fare karaciğerinde mikrozomal AH, EMND ve AMND aktivitelerinde inhibisyona neden olmaktadır (İşcan ve ark., 1993a; İşcan ve ark., 1995).

Sıçanlara Ni ve Cd tek başlarına verildiğinde, Ni böbrekte etoksiresorufin-O-deetilaz (EROD) aktivitesini artırırken Cd anlamlı olarak azaltılmıştır. Birlikte verildiklerinde EROD aktivitesi kontrole yakın bulunmuştur. Bu da metallerin birlikte verildiklerinde böbrekte birbirlerine negatif etki ettiklerini göstermektedir. Sıçan akciğerinde EROD aktivitesinin Ni ve Cd'un tek başlarına ve birlikte uygulanmasıyla azaldığı gözlenmiştir. Birlikte maruziyetle gözlenen azalmanın metallerin yalnız başlarına uygulanmasına ve kontrole göre daha fazla olması bu iki metalin akciğerde birbirlerinin inhibitör etkilerini arttırdığını gösterebilir (Eke ve ark., 1998b).

2.3.4. Kadmiyum ve Nikelin GSH ve GST' ler Üzerindeki Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

İnsan ve sıçan böbreğinde yapılan *in vitro* karşılaştırmalı çalışmalarda CdCl₂ ve Ni' nin 10⁻³ ile 10⁻⁷ M arası dozlarda GSH düzeylerine etkili olmadığı ancak, CdCl₂' nin doza bağlı olarak CDNB GST aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. Ni ile herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir (Çoban ve ark., 1995).

Farklı hayvan türü ve farklı dokularda yapılan *in vivo* çalışmalarda ise GSH ve GST' lerin farklı etkilendikleri, dolayısıyla Cd ve Ni' ye ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında tür ve dokuya bağlı olarak değişik yanıtlar verdikleri dolayısıyla da farklı etkilendikleri gösterilmiştir.

Cd, tek başına sıçanlarda karaciğer GST aktiviteleri üzerinde değişiklik yapmazken, Ni tek başına ve Cd ile birlikte uygulandığında EAA GST aktivitesini arttırmış, CDNB GST ve DCNB GST aktivitelerinde değişiklik yapmamıştır (İşcan, M. ve ark., 1993b). Cd tek başına kobayda karaciğer ve böbrekte GSH düzeylerini etkilememektedir. Ni tek başına uygulandığında karaciğerde GSH seviyesini arttırmakta, böbrekte tek başına ve Cd ile

birlikte verildiğinde düşürmektedir. Cd ve Ni tek başlarına ve birlikte uygulandıklarında karaciğer CDNB, DCNB, EAA ve EPNP GST aktivitelerini arttırmaktadır. Cd, böbrekte DCNB aktivitesini artırırken EPNP GST aktivitesini düşürmekte; Ni CDNB, DCNB ve EPNP GST aktivitesini düşürmektedir. Cd ve Ni birlikte uygulandıklarında böbrekte CDNB ve EPNP GST aktiviteleri düşmektedir (İşcan ve ark., 1994). Cd tek başına uygulandığında fare karaciğeri GSH düzeyini ve sitozolik CDNB, EAA ve EPNP GST aktivitelerini düşürmektedir. Ni tek başına uygulandığında fare karaciğeri GSH düzeyini ve sitozolik GST'lerden CDNB, DCNB, EAA ve EPNP GST aktivitelerini düşürmektedir. İki metal birlikte verildiklerinde CDNB ve DCNB GST aktiviteleri yükselirken EAA GST aktivitesi değişmemiş, EPNP GST aktivitesi ise düşmüştür (İşcan ve ark., 1995).

Cd' nin, ayrıca detoksikasyon mekanizmasına katılan glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz seviyelerini azalttığı ileri sürülmektedir (Kappus, 1987; Sato ve Nagai, 1986). Cd asetat verilen sıçanların testislerinde glutatyon peroksidaz aktivitesi artmaktadır. Aynı zamanda glutatyon redüktaz ve hücrel GSH konsantrasyonları anlamlı şekilde düşmektedir (Chung ve Maines, 1987).

Ni' nin fare karaciğerinde GSH' yı tükettiği gösterilmiştir (Andersen ve Andersen, 1989). Ni farelerde karaciğer GSH düzeyini azaltmakta, kobaylarda arttırmakta, sıçanlarda ise değiştirmemektedir. CDNB ve DCNB GST aktiviteleri de Ni ile türler arasında GSH düzeyine benzer bir profil göstermektedir. Ancak EAA GST aktivitesi farede anlamlı olarak düşerken sıçan ve kobayda artmaktadır (İşcan ve ark., 1992a).

Cd ve Ni ayrı ayrı verildiklerinde farede karaciğerinde GSH' yı tüketmektedir. Bu metaller birlikte verildiğinde GSH seviyesinde kontrole göre fazla bir değişiklik yapmazlar. Ancak farklı hayvan türlerinde karaciğer GSH düzeyleri Cd ve Ni' ye farklı yanıtlar vermektedir. Örneğin Cd ile farede

karaciğer GSH düzeyi düşerken (İşcan ve ark., 1995) sıçanda değişmemektedir. (İşcan ve ark., 1992a; İşcan ve ark., 1993b).

2.3.5. Kadmiyum ve Nikelin LP Üzerindeki Etkileri İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Cd' nin sıçanda karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, kalp ve testis dokularında LP' yi arttırdığı gösterilmiştir (Manca ve ark., 1991). Farelerde, testiste Cd' nin LP' yi yüksek oranda arttırdığı, bu artışın da Selenyumla bertaraf edildiği gösterilmiştir (Sugawara ve Sugawara, 1984).

Ni verilen sıçanlarda karaciğer, böbrek ve akciğerde LP' nin arttığı görülmüştür (Sunderman ve ark., 1985). Ni' nin farelerde karaciğer LP düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Andersen ve Andersen, 1989).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Maddeler

Kadmiyum klorür (Riedel de Haen-Almanya)
Nikel klorür (Merck-Almanya)
Tiyobarbitürik asit (Merck-Almanya)
Sığır serum albümin (BDH-İngiltere)
D-glukoz-6-fosfat monosodyum tuzu (Sigma-ABD)
Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, NADP⁺ (Sigma-ABD)
Magnezyum klorür (Merck-Almanya)
Potasyum klorür (Merck-Almanya)
Sodyum klorür (Merck-Almanya)
Gliserin (Merck-Almanya)
Bakır sülfat (BDH-İngiltere)
Sodyum potasyum tartarat (Merck-Almanya)
Sodyum karbonat (BDH-İngiltere)
Anilin (Fisher-ABD)
Fenol (BDH-İngiltere)
Potasyum dihidrojen fosfat (Merck-Almanya)
Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck -Almanya)
Folin-ciocalteu (Merck-Almanya)
Trikloroasetik asit (Merck-Almanya)
Perklorik asit (Riedel-Almanya)
Amonyum asetat (Merck-Almanya)
İndirgenmiş glutatyon (Sigma-ABD)
5.5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma-ABD)
Etilalkol (Merck-Almanya)
Disodyum etilendiamin tetra asetat (Na₂EDTA) (Fluka-İsviçre)
Etoksiresorufin (Pierce-ABD)

Resorufin (Eastman Kodak-ABD)
Glukoz-6-fosfat monosodyum tuzu (Sigma-ABD)
DMSO (Sigma-ABD)
Tris HCL (Sigma-ABD)
p-nitrofenol (Merck -Almanya)
Kümen hidroperoksit (CHPx) (Sigma-ABD)
1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Fluka-ABD)
1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) (Fluka-ABD)
3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (EAA) (Sigma-ABD)
1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) (Eastman-Kodak ABD)
Metil alkol (Merck-B. Almanya)

3.1.2. Kullanılan Aletler:

Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)
Spektroflorimetre (Shimadzu RF-1501)
Soğutmalı santrifüj (IEC Centra MP4R)
Yüksek devirli santrifüj (Hettich EBA12)
Ultrasantrifüj (Sorval SS-3)
Sallamalı su banyosu (Elektro –Mag)
pH metre (Sesa, Model-1400)
Matkap (Black & Decker)
Teflon homojenizatör başlık
Vortex (Whirlimixer Fisons Scientific Apparatus)
Spektrofotometre küveti (Starna)

3.1.3. Kullanılan Hayvanlar

Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Merkez Hıfzısıha Enstitüsü serum çiftliğinden alınan 3-4 aylık (225-275 g) erkek Wistar ırkı sıçanlar kullanıldı. A.Ü. Eczacılık Fakültesi hayvan evinde bakıma alınan hayvanlar Türk Yem Sanayi A.Ş. Ankara Yem Fabrikası tarafından imal edilen pellet sıçan yemi ile beslendiler.

3.2. Metot

3.2.1. Kimyasal Maddelerin Deney Hayvanlarına Uygulanması

Deney hayvanları, her grupta 5 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. İlk grup hayvanlara öldürülmeden 72 saat önce %0.9' luk NaCl (salin) (2 ml/kg) içinde sadece Cd (3.58 mg CdCl₂.H₂O/kg, i.p.); ikinci grup hayvanlara öldürülmeden 16 saat önce salin (2 ml/kg) içinde sadece Ni (59.5 mg NiCl₂.6H₂O/kg, s.c.) verildi. Üçüncü grup hayvanlara Cd (3.58 mg CdCl₂.H₂O/kg, i.p.) verildikten 56 saat sonra Ni (59.5 mg NiCl₂.6H₂O/kg, s.c.) verildi ve Ni uygulamasından 16 saat sonra öldürüldüler. Dördüncü grup hayvanlar ise kontrol grubunu oluşturdu ve bu hayvanlara da 2 ml/kg olmak üzere salin enjekte edildi.

3.2.2. Testis Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonunun hazırlanması

Deney hayvanları, başları hızla sert bir yere vurularak bayıldıktan sonra başları kesilerek öldürüldüler. Testis dokuları çıkarıldıktan hemen sonra beher içinde soğuk saf su ile yıkanarak kanlarından arıtıldılar. Sonra suları süzülerek emici bir kağıt üzerinde kurulandılar. Ağırlıkları 0.1 grama kadar hassasiyetle ölçülerek kaydedildi. Bu sırada , tüm işlemler buz banyosu içinde yapıldı.

1. Tüm testis dokuları bir beher içine makasla ufak parçalara ayrılarak kabaca homojenize edildi. 1 gram doku ağırlığı için 3 ml olacak şekilde % 1.15'lik KCl çözeltisi kullanıldı. Bu arada indirgenmiş glutatyon tayini için yaklaşık 200 mg doku ayrıldı.

2. Kıyılmış organ, teflon cam homojenize aygıtının buza yerleştirilmiş cam kısmına konuldu. Üzerine 1 g. doku başına 3 ml. olacak şekilde %1.15' lik KCl çözeltisinden ilave edildi. Homojenize aletinin teflon ucu matkabın ucuna takıldı ve matkap 3000 rpm'de döndürülerek doku 9-10 kez indirilip çıkarılma işlemi ile homojenize edildi. Bu arada , teflon ucun fazlaca yukarıya çekilmemesine dikkat edildi.

3. Homojenize edilen organ santrifüj tüplerine dolduruldu. Tüpler Ecco-Superior-IV BK soğutmalı santrifüjünde 10.000g' de 20 dakika çevrildi.

4. 10.000g' de çöken organ fraksiyonu başlıca mitokondri ve hücre çekirdeğini içerir. Sıvı kısımda ise, endoplazmik retikulum parçaları ile çözünür halde bulunan stoplazma vardır. Bu kısım yani üst faz, tüplere alınarak Sorvall SS-3 marka soğutmalı ultrasantrifüjde 100.000g' de 1 saat çevrildi.

5. Santrifüj sonucunda mikrozomlar çöker ve sitozol üst fazda kalır. Elde edilen çökelti mikrozomal; üst faz ise Sitolitik (çözünür) fraksiyon olarak adlandırılır. Mikrozomal faz, mikrozom eldeside kullanılan doku ağırlığının 1:4' ü oranında %20' lik gliserol çözeltisi ilave edilerek teflon cam homojenize aygıtında homojenize edildi. Sitolitik faza ayrıca bir işlem yapılmadı. Elde edilen homojen mikrozomal fraksiyon EROD aktivitesi, sitozolik faz da GST aktiviteleri tayininde kullanılmak üzere -75°C ' lik derin dondurucuda saklandı.

6. Mikrozomal ve sitozolik fraksiyonunun bir kısmı protein tayini için ayrıldılar. Geriye kalanlar yukarıda anlatıldığı üzere enzim aktivitesinin saptanmasında kullanıldılar.

3.2.3. GSH için doku ekstraktı supernatantının hazırlanması

Deney hayvanlarının dokuları 3.2.1. bölümünde anlatıldığı gibi çıkarılıp tartıldıktan sonra;

1. GSH ölçümü için ayrılan testis dokuları ayrı ayrı buz içindeki beherlere alındı. Üzerlerine 1 g doku başına 3ml olacak şekilde ölçülen % 1.15'lik KCI çözeltisinin az bir miktarı konularak makasla ufak parçalara kıymak suretiyle kabaca homojenize edildi.

2. Kıyılmış organ teflon cam homojenize aygıtının buza yerleştirilmiş cam kısmına konuldu. Üzerine 1 g doku başına 3ml olacak şekilde % 1.15'lik KCI çözeltisinin kalanı ilave edildi ve 3.2.1. bölümünde olduğu gibi homojenize edildi.

3. Homojenize edilen organ üzerine 1 ml homojenat için 1 ml olacak şekilde 5 mM EDTA içeren % 10'luk trikloroasetik asit ilave edilerek 10 dakika 10.000g' de santrifüj edildi.

4. Çöken kısım atılarak, üst sıvı kısım GSH düzeyinin saptanması için saklandı.

3.2.4. Protein tayini

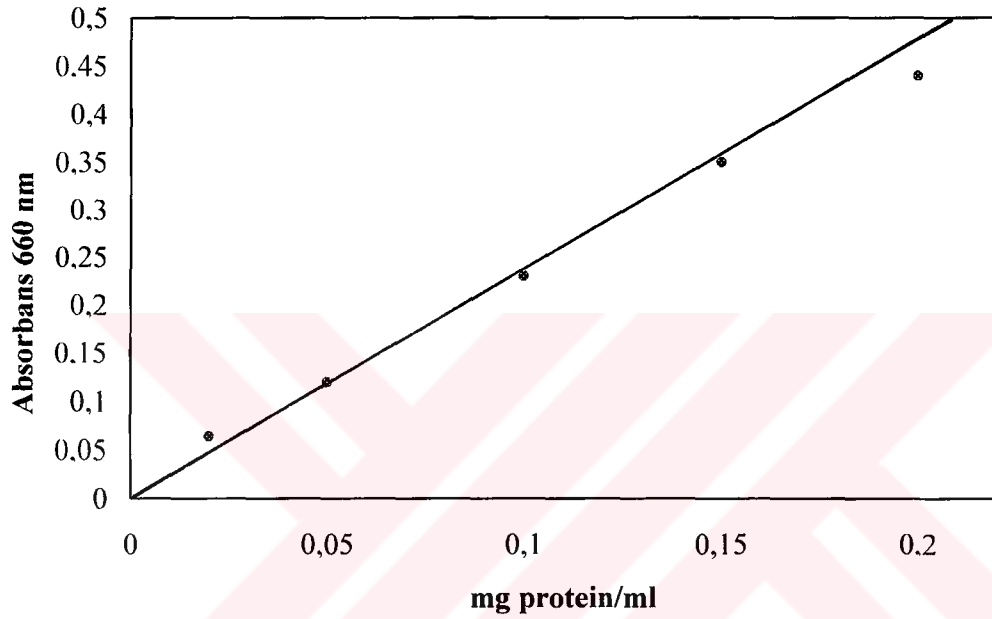
Hazırlanan mikrozom ve sitozollerin protein miktarları tayin edildi (Lowry ve ark., 1951). Kristalize sığır serum albümini 0.02 mg/ml., 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.20 mg/ml konsantrasyonlar halinde kullanıldı. Testis mikrozom ve sitozolleri 1:100 oranında seyreltildiler. Reaktif I olarak % 2'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, reaktif II olarak % 2'lik sodyum potasyum tartarat, reaktif A olarak % 2'lik Na_2CO_3 'ün, 0.1 N NaOH içindeki çözeltisi kullanıldı. Bu üç reaktifin karışımı, reaktif B adı altında kullanıldı.

Karışım şöyle hazırlandı: 0.1 ml. reaktif I. 0.1 ml. reaktif II, 10 ml. reaktif A (Bu karışım kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır). 2N folin reaktifi, 1:1 oranında saf su ile seyreltildi.

3.2.4.1. İşlem

Her konsantrasyondaki sığır serumu albümininden 0.5'er ml. tüplere konuldu. Ayrıca 0.5'er ml. saf su kör deney için 2 tüpe kondu. 1:100 oranında seyreltilmiş mikrozomal ve sitozolik fraksiyonlardan 0.5, 0.25 ve

0.1 ml. çekilip tüplere kondu ve bunlar saf su ile 0.5 ml.'ye tamamlandı. Üzerlerine 2.5 ml reaktif B ilave edildi. Vortex yardımıyla karıştırıldı ve 10 dakika beklendi. 0.25 ml. folin reaktifi ilave edildi. 50°C'de 10 dakika veya 37 °C'de 30 dakika bekletildi. 660 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Çizilen standart eğriden protein miktarları hesaplandı (Şekil1).



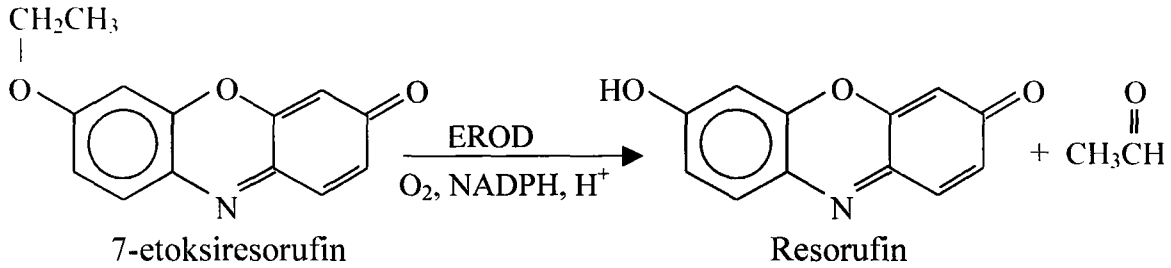
Şekil 1. Protein standart eğrisi

3.2.5. EROD Aktivitesinin Tayini

Mikrozomlarda 3.2.4.' de tarif edildiği gibi protein tayini yapıldıktan sonra 7-etoksi resorufin 0-deetilaz (EROD) aktivitesinin tayinine geçildi. EROD aktivitesi, oluşan resorufin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan yöntemle saptandı (Burke ve Mayer, 1974). Kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanıldı. Resorufin oluşumu şekil 2' de gösterilmiştir.

3.2.5.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 7' de görüldüğü gibi reaksiyon ortamı 1.0 ml'lik toplam hacimde 1 mg mikrozomal protein, pH' sı 7.8 olan 45 mM Tris HCl tamponu ve kofaktör olarak 2.5 mM glukoz-6-fosfat, 0.25 mM NADP⁺ ve 2.5 mM MgCl₂ ihtiva etmektedir.



Şekil 2. 7-etoksiresorufin' in 7-etoksiresorufin-0-deetilaz ile resorufine dönüşümü.

3.2.5.2. Standart

Standart olarak resorufin çözeltisi kullanıldı. Her deneyde 0.5 mM resorufin çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (125, 62.5, 32, 16 pmol resorufin) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen absorbans değerleri farklı resorufin miktarlarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı (Şekil 3).

3.2.5.3. İşlem

Tablo 7' de görülen reaksiyon ortamı elemanlarından NADPH üreten sistem hariç diğer maddeleri içeren tüplere NADPH üreten sistem ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve tüplerin ağzı açık olarak sallamalı su banyosunda, 37°C' de 1 saat reaksiyon devam ettirildi. Süre sonunda reaksiyon 3 ml metanol ilavesi ile durduruldu. Tüpler buz banyosuna konuldu. Denatüre olmuş protein 3.000 rpm'de (Hettich EBA12) 10 dakika kadar döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözeltinin 3 ml' si otomatik pipetle başka bir tüpe alındı.

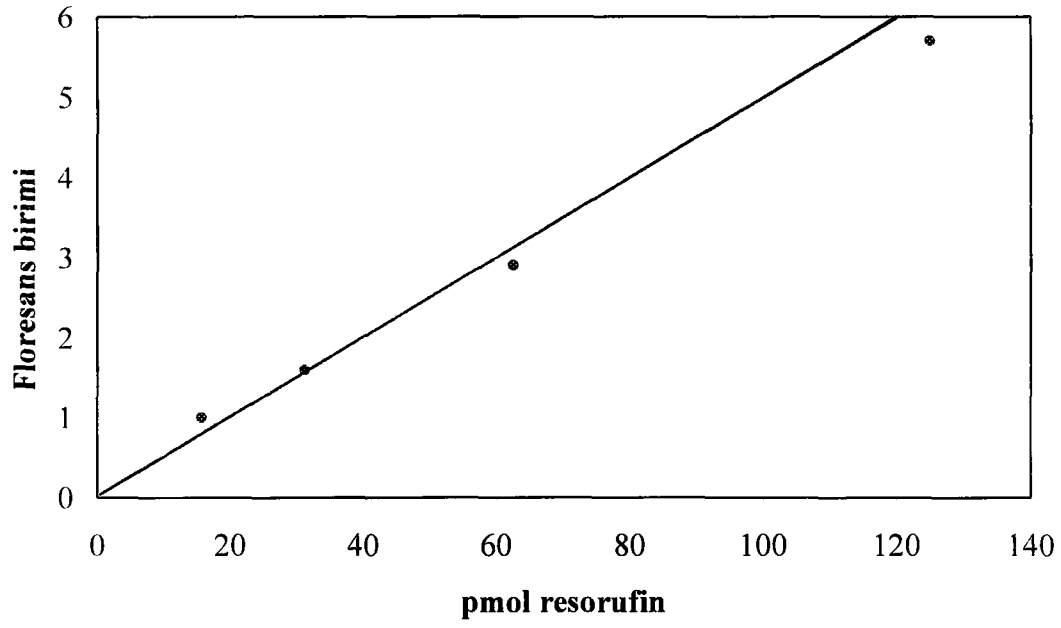
Bu çözeltinin spektrofotometrik yöntemle (eksitasyon 538, emisyon 587) absorbanı ölçüldükten sonra EROD aktivitesi hesaplandı.

Tablo 7. EROD aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

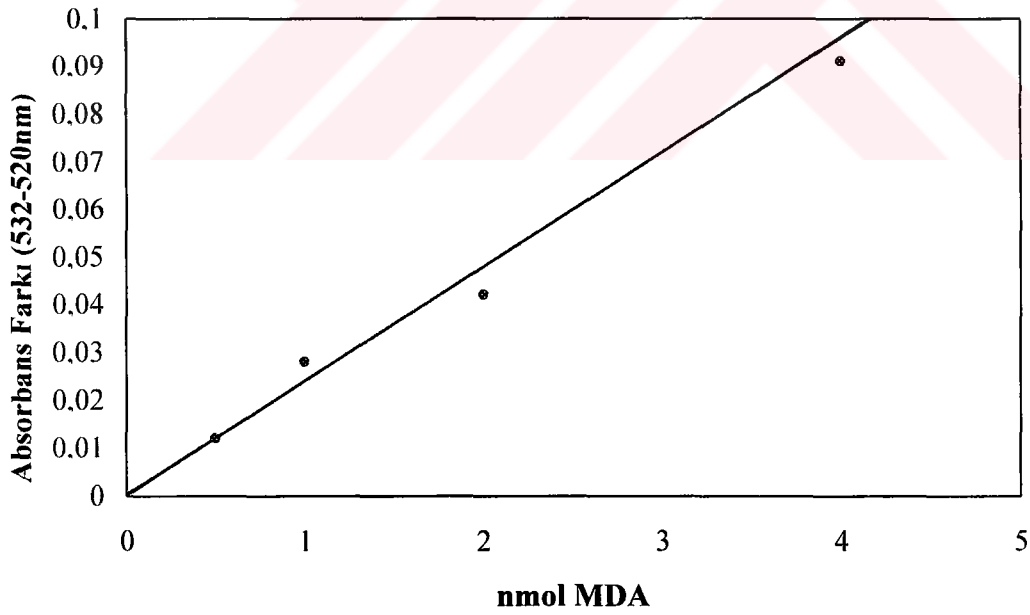
<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave edilen hacim (ml)</i>	<i>1 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Etoksiresorufin	10 μ M	0.100	1 μ M
Albumin	12 mg/ml	0.100	1.2 mg/ml
Tris HCl tamponu pH: 7.8	100 mM	0.250	45 mM
Mikrozomal protein	5 mg/ml	0.200	1 mg
H ₂ O		0.200	
NADPH üreten sistem			
Glukoz-6-fosfat	100 mM	0.025	2.5 mM
NADP ⁺	10 mM	0.025	0.25 mM
MgCl ₂	100 mM	0.025	2.5 mM
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	300 Ünite(U)/ml	0.003	1 U
PH 7.8 potasyum fosfat tamponu	200 mM	0.072	14.4 mM

3.2.6. Lipid Peroksidasyon Ölçümü

Dokularda lipid peroksidasyon, TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) yani tiobarbitürik asit-reaktif maddelerin ölçümüne dayanan yöntemle belirlendi (Mihara ve ark., 1980).



Şekil 3. Resorufin standart eğrisi



Şekil 4. MDA standart eğrisi

3.2.6.1. Standart

Standart olarak MDA çözeltisi kullanıldı. Her deneyde 0.5 mM MDA çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 nmol) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen absorbans değerleri farklı MDA miktarlarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı (Şekil 10).

3.2.6.2. İşlem

Ağız kapaklı cam tüplere 5 ml % 2.5' lik doku homojenatı üzerine 3 ml % 1' lik o-fosforik asit ve 1ml % 6' lık tiyobarbitürik asit (TBA) reaktifi (0.1 gr TBA + 0.33 ml 2 N NaOH/ 20 ml distile su) ilave edildikten sonra tüpler vortekslendi. Tüpler 100⁰ C' de su banyosunda ağızları kapalı olarak 45 dakika kaynatıldı. Süre bitiminde su banyosundan alınan tüpler soğutulduktan sonra 4' er ml n-bütanolle 1 dakika ekstraksiyon yapıldı. Bütanol fazı Hettich EBA12 santrifüjünde 3000 rpm'de 15 dakika döndürülerek ayrıldıktan sonra spektrofotometrede 532 ve 520 nm' de absorbansları okundu. Absorbanslar arasındaki fark, çizilen standart eğrinin yardımıyla MDA miktarlarının hesaplanmasında kullanıldı.

3.2.7. GSH ölçümü

GSH ölçümü spektrofotometrik yöntemle saptandı (Ellman ve Lysko, 1979; Sedlak ve Lindsay, 1968). Bu yöntem, dokulardaki sülfidril gruplarının spektrofotometrik ölçümlerine dayanır. Reaksiyon ortamında kullanılan 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) sülfidril gruplarıyla (-SH) indirgenerek bir mol -SH grubuna karşılık bir mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asiti verir. Nitromerkaptobenzoik asitin oluşturduğu kuvvetli sarı renk spektrofotometrede okunur.

3.2.7.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 8’ de görüldüğü gibi, reaksiyon ortamı 3 ml’lik toplam hacimde, 0,2 ml doku ekstraktı supernatantı, 5mM EDTA içeren pH’ sı 8.0 olan 100 mM potasyum fosfat tamponu ve 10 mM DTNB’ nin metanoldeki çözeltisi ihtiva etmektedir.

3.2.7.2. Standart

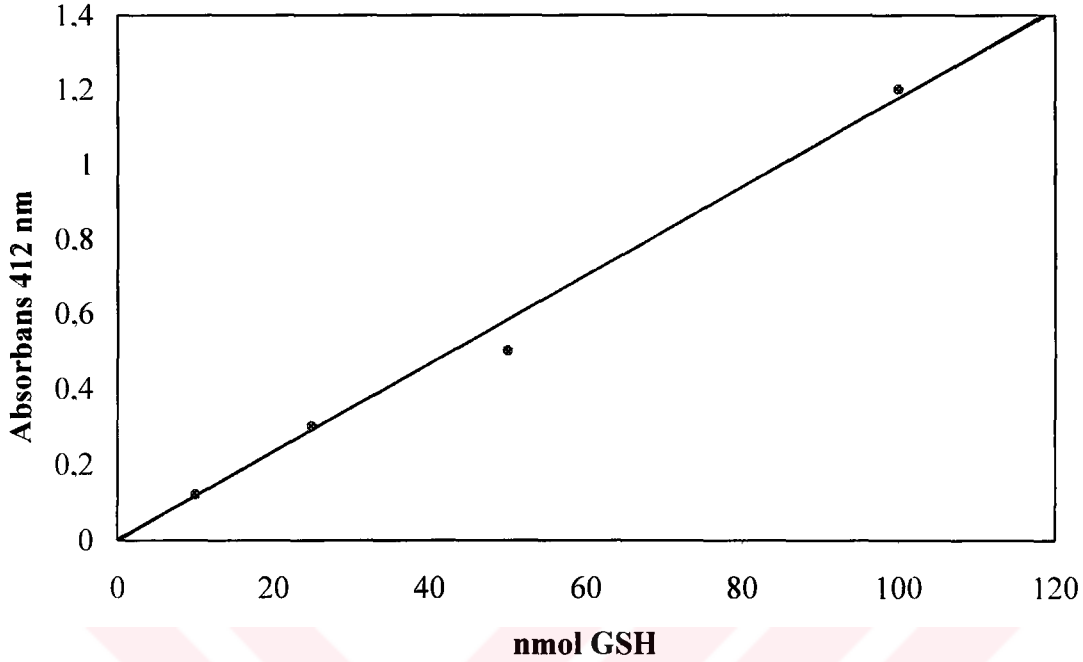
Standart olarak indirgenmiş GSH kullanıldı. Her deneyde 0.1 mM indirgenmiş GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (6.78, 13.56, 27.12, 54.24 nmol) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen absorbans değerleri farklı GSH miktarlarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı (Şekil 5).

3.2.7.3. İşlem

Yukarıda, “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen reaksiyon maddeleri spektrofotometrik küvetlere konularak, DTNB ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. Oluşan sarı rengin absorbansı 412 nm’ de spektrofotometrede ölçüldü.

Tablo 8. GSH ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave Edilen hacim (ml)</i>	<i>3 ml reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH:8 (5mM EDTA içeren)	100 mM	2.7	90 mM
DTNB	10 mM	0.1	0.33 mM
Doku ekstraktı supernatantı miktarı		0.2	



Şekil 5. GSH standart eğrisi

3.2.8. Glutasyon S-transferazların ölçümü

Farklı substratlar farklı glutasyon-S-transferaz (GST) izozimlerine gösterge olmaları nedeni ile aşağıdaki substratlar kullanılmıştır.

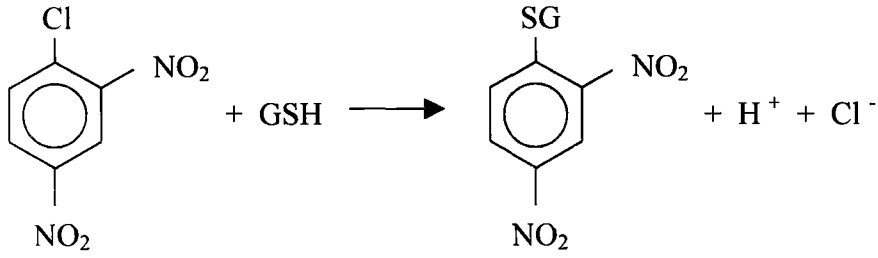
1. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). GST' ler için genel bir substrattır.
2. 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB). μ sınıfının göstergesi olarak kullanılır.
3. 3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (Etakrinik asit, EAA). π sınıfının göstergesi olarak kullanılır.
4. 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP). θ sınıfının göstergesi olarak kullanılır.
5. Kümen hidroperoksit (CHPx). α sınıfının göstergesi olarak kullanılır.

3.2.8.1. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

CDNB GST enzim aktivitesi, 30° C' de 340 nm' de oluşan ürünün spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanan yöntemle göre belirlendi (Habig ve ark., 1974). Enzim aktivitesi için optimum şartlar 4. bölümde gösterildiği gibi saptandı.

3.2.8.1.1. Reaksiyon ortamı

Tablo 9’ da görüldüğü gibi reaksiyon ortamı 0.750 ml’lik toplam hacimde, 40 µg sitozolik protein, 2.66 mM GSH, 1.33mM CDNB ve 80 mM pH: 7.2 potasyum fosfat tamponu içermektedir.



Şekil 6. Glutasyon-S-transferaz tarafından katalizlenen CDNB reaksiyonu

3.2.8.1.2. İşlem

Yukarıda “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen sitozolik protein test küvete ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve 340 nm’ de 30⁰C’ de spektrofotometreden oluşan ürün kinetik olarak izlendi ($\epsilon = 0.0096 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Tablo 9. CDNB aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

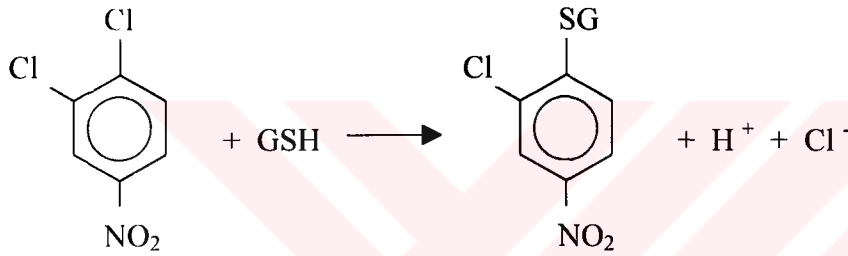
<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave Edilen hacim (ml)</i>	<i>0.75 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH: 7.2	100 mM	0.600	80 mM
GSH	40 mM	0.050	2.66 mM
CDNB	20 mM	0.050	1.33 mM
Sitozolik protein	0.8 mg/ml	0.050	40 µg

3.2.8.2. 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB)

DCNB GST enzim aktivitesi, 30⁰ C' de 344 nm' de oluşan ürünün spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanan yöntemle göre belirlendi (Habig ve ark., 1974). Enzim aktivitesi için optimum şartlar 4. bölümde gösterildiği gibi saptandı.

3.2.8.2.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 10' da görüldüğü gibi, reaksiyon ortamı 0.750 ml'lik toplam hacimde, 100 µg sitozolik protein, 1.33 mM GSH, 0.66 mM DCNB ve 80 mM pH: 7.6 potasyum fosfat tamponu içermektedir.



Şekil 7: Glutasyon-S-transferaz tarafından katalizlenen DCNB reaksiyonu

Tablo 10: DCNB aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave Edilen hacim (ml)</i>	<i>0.75 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH: 7.6	100 mM	0.600	80 mM
GSH	20 mM	0.050	1.33 mM
DCNB	10 mM	0.050	0.66 mM
Sitozolik protein	2 mg/ml	0.050	100 µg

3.2.8.2.2. İşlem

Yukarıda “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen sitozolik protein test küvete ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 344 nm. de 30⁰ C’ de spektrofotometreden oluşan ürün kinetik olarak izlendi ($\epsilon = 0.0085 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.2.8.3. 3-dikloro-4-(2-metilen bütiril) fenoksi asetik asit (Etakrinik asit, EAA)

EAA GST enzim aktivitesi, 30⁰ C’ de 270 nm’ de oluşan ürünün spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanan yöntemle göre belirlendi (Habig ve ark.. 1974). Enzim aktivitesi için optimum şartlar 4. bölümde gösterildiği gibi saptandı.

3.2.8.3.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 11’ de görüldüğü gibi, reaksiyon ortamı 0.750 ml’lik toplam hacimde, 20 μg sitozolik protein, 0.33 mM GSH, 0,27 mM etakrinik asit ve 80 mM pH: 6.6 potasyum fosfat tamponu içermektedir.



Şekil 8. Glutasyon-S-transferaz tarafından katalizlenen EAA reaksiyonu.

3.2.8.3.2. İşlem

Yukarıda “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen sitozolik protein test küvete ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 270 nm. de 30⁰ C’ de spektrofotometreden oluşan ürün kinetik olarak izlendi ($\epsilon = 0.005 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Tablo 11. Etakrinik asit aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

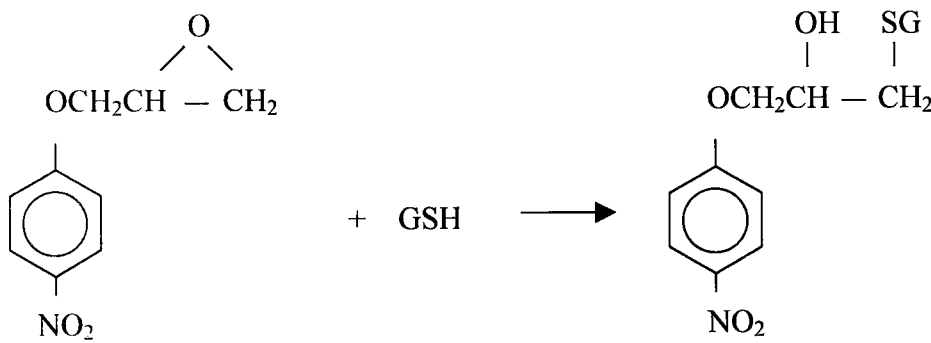
<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave edilen hacim (ml)</i>	<i>0.75 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH: 6.6	100 mM	0.600	80 mM
GSH	5 mM	0.050	0.33 mM
EAA	4 mM	0.050	0.27 mM
Sitozolik protein	0.4 mg/ml	0.050	20 µg

3.2.8.4. 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP)

EPNP GST enzim aktivitesi, 30⁰ C' de 360 nm' de oluşan ürünün spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanan yöntemle göre belirlendi (Habig ve ark., 1974). Enzim aktivitesi için optimum şartlar 4. bölümde gösterildiği gibi saptandı.

3.2.8.4.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 12' de görüldüğü gibi, reaksiyon ortamı, 0,750 ml' lik toplam hacimde, 300 µg sitozolik protein, 3.33 mM GSH, 0.06 mM EPNP ve 80 mM pH: 6.6 potasyum fosfat tamponu içermektedir.



Şekil 9. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen EPNP konjugasyonu

3.2.6.4.2. İşlem

Yukarıda “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen sitozolik protein test küvete ilave edilerek, 360 nm. de 30° C’ de spektrofotometreden oluşan ürün kinetik olarak izlendi ($\epsilon = 0.0005 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.2.8.5. Kümen hidroperoksit (CHPx)

CHPx’ in substrat olarak kullanıldığı GST enzim aktivitesi 25° C’ de 340 nm’ de NADPH azalmasının spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanan yöntemle göre tayin edildi (Lavrence ve Burk, 1976). Enzim aktivitesi için optimum şartlar 4. bölümde gösterildiği gibi saptandı.

Tablo 12. EPNP aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

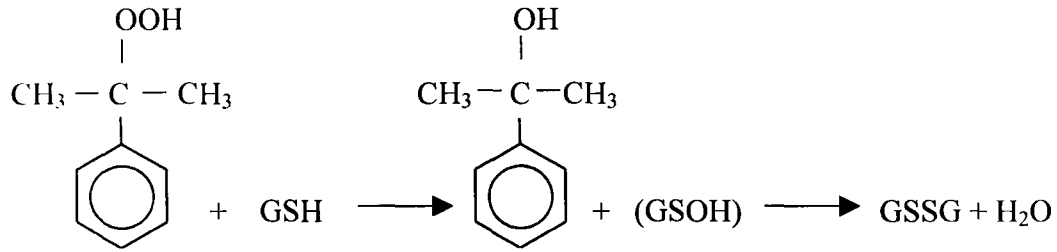
<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave edilen hacim (ml)</i>	<i>0.75 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH: 6.6	100 mM	0.600	80 mM
GSH	50 mM	0.050	3.33 mM
EPNP	1 mM	0.050	0.06 mM
Sitozolik protein	6 mg/ml	0.050	300 μg

3.2.8.5.1. Reaksiyon Ortamı

Tablo 13’ de görüldüğü gibi, reaksiyon ortamı, 1 ml’ lik toplam hacimde, 150 μg sitozolik protein, 1 mM GSH, 6 mM CHPx, 0.2 mM NADPH, 1 U glutatyon redüktaz ve 50 mM pH: 7.0 potasyum fosfat tamponu içermektedir.

3.2.8.5.2. İşlem

Yukarıda “reaksiyon ortamı” kısmında tarif edilen substrat test küvete ilave edilerek, 340 nm de 25° C’ de spektrofotometreden oluşan ürün kinetik olarak izlendi ($\epsilon = 0.0062 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).



Şekil 10. Glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenen CHPx konjugasyonu

Tablo 13. CHPx aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

<i>Elemanlar</i>	<i>Stok çözeltiler</i>	<i>İlave edilen hacim (ml)</i>	<i>1 ml reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon</i>
Potasyum fosfat tamponu pH: 7.0	100 mM	0.500	50 mM
GSH	50 mM	0.020	1 mM
NADPH	2 mM	0.100	0.2 mM
Glutatyon redüktaz	20 U/ml	0.050	1 U
H ₂ O		0.180	
CHPx	120 mM	0.050	6 mM
Sitozolik protein	1.5 mg/ml	0.100	150 μg

3.2.9. Kullanılan İstatistiksel Yöntem

Ortalamaları alınan deney sonuçlarında ortalamalar \pm standart hataları (SH) ile beraber gösterildi. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Student t-testi uygulanarak belirlendi. Anlamlılık seviyesi $P < 0.05$ ' dir.



4. BULGULAR

4.1. Kullanılacak Yöntemler için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması

Çalışmada öncelikle kullanılacak olan yöntemler için gerekli olan optimum koşullar saptandı. Araştırmada yararlanılan yöntemlerde, saptanan bu optimum koşullarda ölçümler yapıldı. Tablolarda görülen değerler, her deneyden elde edilen iki değer ortalamasını göstermektedir.

4.1.1. EROD Enzim Aktivitesi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması

Sıçan testis dokusu EROD enziminin maksimum aktivitesi için optimum koşullar mikrozomal protein kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine protein miktarının, inkübasyon süresinin ve etoksiresorufin konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.1.1. pH' nın EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi

EROD aktivitesi üzerine pH' nın etkisi, 1 ml inkübasyon ortamında pH' sı 7.6 ile 8.0 arasında değişen 45 mM tris HCl tamponu kullanılarak incelendi. Aktivitenin pH 7.8' de maksimum olduğu görüldü (Tablo 14). Aktivite ölçümlerinde pH 7.8 tris HCl tampon kullanılması uygun bulundu.

Tablo 14. pH' nın EROD aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (pmol/mg protein)</i>
7.6	7.46
7.8	9.91
8.0	8.79

4.1.1.2. Protein Miktarının EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi

EROD aktivitesi ölçümlerinde mikrozomal protein miktarının etkisi 1ml'lik inkübasyon ortamına 0.25 ile 2 mg arasında protein ilave edilerek incelendi. 1 mg proteine kadar aktivitenin doğrusal olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 15).

Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 1mg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 15. Protein miktarının EROD aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein miktarı (mg)</i>	<i>Aktivite (pmol/dk.)</i>
0.25	0.31
0.5	0.57
1	1.28
2	1.76

4.1.1.3. İnkübasyon Süresinin EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi

1 mg mikrozomal protein kullanılarak, 1 ml inkübasyon ortamında inkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisi incelendi. Maksimum aktivite 10 dakika sonunda elde edildi (Tablo 16). EROD enzim aktivitesi düzeyinin belirlenmesinde optimum inkübasyon süresi 10 dk. olarak saptandı.

Tablo 16. İnkübasyon süresinin EROD aktivitesi tayini üzerine etkisi

<i>İnkübasyon süresi (dk.)</i>	<i>Aktivite (pmol/mg protein)</i>
1	1.33
5	5.94
10	10.45

4.1.1.4. Etoksiresorufin Konsantrasyonunun EROD Aktivitesi Üzerine Etkisi

EROD aktivitesi ölçümlerinde etoksiresorufin konsantrasyonunun etkisi 1ml'lik inkübasyon ortamına 0.5 ile 2 μ M arasındaki konsantrasyonlarda etoksiresorufin ilave edilerek incelendi (Tablo 17). 1 μ M konsantrasyonda aktivite maksimum olduğundan, ölçümlerde reaksiyon ortamında 1 μ M etoksiresorufin kullanılması uygun bulundu.

Tablo 17. Etoksiresorufin konsantrasyonunun EROD aktivitesi tayini üzerine etkisi

<i>Etoksiresorufin konsantrasyonu (μM)</i>	<i>Aktivite (pmol/mg protein.)</i>
0.5	3.61
1	9.85
2	8.22

4.1.2. Lipid Peroksidasyon Düzeyi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması

Sıçan testis dokusu LP ölçümünde maksimum düzeyin eldesi için gerekli olan optimum koşullar, doku homojenatı kullanılarak araştırıldı. LP düzeyine doku homojenatı miktarının ve ekstraksiyon süresinin etkileri incelendi.

4.1.2.1. Doku Miktarının LP Düzeyi Üzerine Etkisi

LP düzeyine doku homojenatı miktarının etkisi %1.25 ile %5 (0.05 - 0.2 g) arasında değişen miktarlarda doku homojenatı kullanılarak araştırıldı. 0.1 g` a kadar LP düzeyinin doğru orantılı olarak arttığı saptandı (Tablo 18). Bu sebeple LP düzeyi ölçümlerinde reaksiyon ortamında 0.1 g doku kullanılması uygun bulundu.

Tablo 18. Doku miktarının LP düzeyi üzerine etkisi

<i>Doku miktarı (g)</i>	<i>LP düzeyi (nmol MDA)</i>
0.05	10.97
0.1	24.85
0.2	26.21

4.1.3. GSH Ölçümünde Maksimum Düzeyin Eldesi için Gerekli Olan Optimum Koşulların Saptanması

Testis dokusu GSH ölçümünde maksimum düzeyin eldesi için gerekli olan optimum koşullar, GSH için doku ekstraktının hazırlanması kısmında (3.2.3) tarif edilen yöntemle elde edilen doku ekstraktı kullanılarak araştırıldı. GSH

düzeyine pH' nın, doku ekstraktı miktarının ve DTNB konsantrasyonunun etkileri incelendi.

4.1.3.1. pH' nın GSH Düzeyi Üzerine Etkisi

GSH düzeyine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 7.6 ile 8.4 arasında değişen ve 5mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tampon kullanılarak incelendi GSH düzeyinin pH 8.0' da maksimum olduğu belirlendi (Tablo 19). Optimum pH 8.0 olarak saptandı.

Tablo 19. pH' nın GSH düzeyi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>GSH (μmol/g doku)</i>
7.6	1.27
8.0	1.96
8.4	1.78

4.1.3.2. Doku Homojenatı Supernatant Miktarının GSH Düzeyi Üzerine Etkisi

Doku homojenatı supernatant miktarının GSH düzeyi üzerine etkisi 3.0 ml' lik reaksiyon ortamında 0.05 ml' den 0.4 ml' ye (0.006 - 0.048 g) kadar değişen doku ekstraktı supernatantı kullanılarak araştırıldı. GSH düzeyinin bu miktarlar kullanıldığında doğrusal olarak arttığı belirlendi (Tablo 20). Testis dokusu GSH ölçümlerinde 0.2 ml (0.024 g) doku ekstraktı supernatantı kullanılmıştır.

Tablo 20. Doku miktarının GSH düzeyi üzerine etkisi

<i>Doku miktarı (g)</i>	<i>GSH (nmol)</i>
0.006	46.89
0.012	95.22
0.024	186.32
0.048	371.16

4.1.3.3. DTNB Konsantrasyonunun GSH Düzeyi Üzerine Etkisi

DTNB konsantrasyonunun testis dokusu GSH düzeyi üzerine etkisi incelendiğinde; GSH düzeyinin 0.166 ile 0.66 mM arasında kullanılan DTNB konsantrasyonlarından 0.33 mM konsantrasyonda en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür (Tablo 21). Bu sebeple GSH ölçümlerinde optimum DTNB konsantrasyonu 0.33 mM olarak alınmıştır.

Tablo 21. DTNB konsantrasyonunun GSH düzeyi üzerine etkisi

<i>DTNB (mM)</i>	<i>GSH ($\mu\text{mol/g doku}$)</i>
0.166	1.48
0.33	2.11
0.66	1.55

4.1.4. CDNB Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması

Sıçan testis dokusu CDNB GST enzim aktivitesi için optimum koşullar sitozolik testis proteini kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine pH' nın, protein miktarının, CDNB ve GSH konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.4.1. pH' nın CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 6.8 ile 7.6 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Testis dokusu sitozolik proteini kullanılarak pH 7.2' de maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinden optimum pH 7.2 olarak saptandı (Tablo 22).

Tablo 22. pH' nın CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
6.8	176.54
7.2	235.38
7.6	180.46

4.1.4.2. Protein Miktarının CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 0.75 ml reaksiyon ortamında 10 µg ile 80 µg arasında değişen miktarlarda protein kullanılarak incelendi. CDNB GST enzim aktivitesinin 80 µg' a kadar doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo 23). Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 40 µg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 23. Protein miktarının CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein (µg)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk)</i>
10	43.85
20	92.56
40	188.31
80	358.33

4.1.4.3. CDNB Konsantrasyonunun CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

10 mM ile 40 mM arasında değişen CDNB konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik CDNB GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 20 mM substrat konsantrasyonunda doyumluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 24). Aktivite ölçümlerinde optimum CDNB konsantrasyonu 20 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 24. CDNB konsantrasyonunun CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>CDNB (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
10	150.12
20	239.36
40	241.83

4.1.4.4. GSH Konsantrasyonunun CDNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

20 mM ile 80 mM arasında değişen GSH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik CDNB GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 40 mM GSH konsantrasyonunda doğgunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 25). Aktivite ölçümlerinde optimum GSH konsantrasyonu 40 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 25.GSH konsantrasyonunun CDNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>GSH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
20	95.26
40	242.15
80	208.99

4.1.5. DCNB Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması

Sıçan testis dokusu DCNB GST enziminin maksimum aktivitesi için optimum koşullar testis sitozolik proteini kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine pH' nın, protein miktarının, DCNB ve GSH konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.5.1. pH' nın DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 7.2 ile 8.0 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Testis dokusu sitozolik proteini kullanılarak pH 7.6' da maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinden optimum pH 7.6 olarak saptandı (Tablo 26).

Tablo 26. pH' nın DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
7.2	7.06
7.6	13.59
8.0	2.25

4.1.5.2. Protein Miktarının DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 0.75 ml reaksiyon ortamında 50 µg ile 400 µg arasında değişen miktarlarda protein kullanılarak incelendi. DCNB GST enzim aktivitesinin 200 µg' a kadar doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo 27). Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 100 µg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 27. Protein miktarının DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein (µg)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk)</i>
50	12.4
100	29.12
200	55.38
400	72.84

4.1.5.3. DCNB Konsantrasyonunun DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

5 mM ile 20 mM arasında değişen DCNB konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik DCNB GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 10 mM substrat konsantrasyonlarında doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 28). Aktivite ölçümlerinde optimum DCNB konsantrasyonu 10 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 28. DCNB konsantrasyonunun DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>DCNB (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
5	9.71
10	11.47
20	10.59

4.1.5.4. GSH Konsantrasyonunun DCNB GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

5 mM ile 40 mM arasında değişen GSH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik DCNB GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 5 mM GSH konsantrasyonundan sonra doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 29). Aktivite ölçümlerinde optimum GSH konsantrasyonu 20 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 29.GSH konsantrasyonunun DCNB GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>GSH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
5	9.23
10	9.71
20	10.59
40	9.97

4.1.6. EAA Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması

Sıçan testis dokusu EAA GST enziminin maksimum aktivitesi için optimum koşullar testis sitozolik proteini kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine pH'nın, protein miktarının, EAA ve GSH konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.6.1. pH' nın EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 6.4 ile 6.8 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Testis dokusu sitozolik proteini kullanılarak pH 6.6' da maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinden optimum pH 6.6 olarak saptandı (Tablo 30).

Tablo 30. pH' nın EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
6.4	58.64
6.6	63.98
6.8	61.12

4.1.6.2. Protein Miktarının EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 0.75 ml reaksiyon ortamında 10 µg ile 80 µg arasında değişen miktarlarda protein kullanılarak incelendi. EAA GST enzim aktivitesinin 20 µg' a kadar doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo 31). Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 20 µg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 31. Protein miktarının EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein (µg)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk)</i>
10	12.85
20	24.94
40	23.69
80	19.04

4.1.6.3. EAA Konsantrasyonunun EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

2 mM ile 8 mM arasında değişen EAA konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik EAA GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 4 mM substrat konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 32). Aktivite ölçümlerinde optimum EAA konsantrasyonu 4 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 32. EAA konsantrasyonunun EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>EAA (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
2	31.59
4	60.33
8	22.73

4.1.6.4. GSH Konsantrasyonunun EAA GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

2.5 mM ile 10 mM arasında değişen GSH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik EAA GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 2.5-5 mM GSH konsantrasyonlarında doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 33). Aktivite ölçümlerinde optimum GSH konsantrasyonu 5 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 33. GSH konsantrasyonunun EAA GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>GSH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
2.5	24.71
5	61.57
10	59.32

4.1.7. EPNP Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması

Testis dokusu EPNP GST enziminin maksimum aktivitesi için optimum koşullar sitozolik protein kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine pH' nın, protein miktarının, EPNP ve GSH konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.7.1. pH' nın EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 6.4 ile 6.8 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Testis dokusu sitozolik proteini kullanılarak pH 6.6' da maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinden optimum pH 6.6 olarak saptandı (Tablo 34).

Tablo 34. pH' nın EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
6.4	62.58
6.6	70.22
6.8	68.85

4.1.7.2. Protein Miktarının EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 0.75 ml reaksiyon ortamında 150 µg ile 600 µg arasında değişen miktarlarda protein kullanılarak incelendi. EPNP GST enzim aktivitesinin 300 µg' a kadar doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo 35). Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 300 µg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 35. Protein miktarının EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein (µg)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk)</i>
150	210.44
300	426.72
600	503.69

4.1.7.3. EPNP Konsantrasyonunun EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.5 mM ile 2 mM arasında değişen EPNP konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik EPNP GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 1 mM substrat konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 36). Aktivite ölçümlerinde optimum EPNP konsantrasyonu 1 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 36. EPNP konsantrasyonunun EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>EPNP (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
0.5	43.35
1	82.12
2	50.62

4.1.7.4. GSH Konsantrasyonunun EPNP GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

25 mM ile 100 mM arasında değişen GSH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik EPNP GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Enzimin 50 mM GSH konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 37). Aktivite ölçümlerinde optimum GSH konsantrasyonu 50 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 37. GSH konsantrasyonunun EPNP GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>GSH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
25	59.87
50	70.33
100	45.61

4.1.8. CHPx Substratına Karşı GST Enzim Aktivitesi için Optimum Koşulların Saptanması

Testis dokusu CHPx GST enziminin maksimum aktivitesi için optimum koşullar sitozolik protein kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitesine pH' nın, protein miktarının, CHPx ve GSH konsantrasyonlarının etkileri incelendi.

4.1.8.1. pH' nın CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine pH' nın etkisi 25⁰ C' de pH değerleri 6.8 ile 7.2 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Testis dokusu sitozolik proteini kullanılarak pH 7.0' da maksimum enzim aktivitesi elde edildiğinden optimum pH 7.0 olarak saptandı (Tablo 38).

Tablo 38. pH' nın CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>pH</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
6.8	72.46
7.0	85.36
7.2	80.92

4.1.8.2. Protein Miktarının CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 1 ml reaksiyon ortamında 75 µg ile 600 µg arasında değişen miktarlarda protein kullanılarak incelendi. CHPx GST enzim aktivitesinin 300 µg' a kadar doğru orantılı olarak arttığı

saptanmıştır (Tablo 39). Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 150 µg protein kullanılması uygun bulundu.

Tablo 39. Protein miktarının CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Protein (µg)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk)</i>
75	65.81
150	129.17
300	200.99
600	349.08

4.1.8.3. CHPx Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

60 mM ile 240 mM arasında değişen CHPx konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik CHPx GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 120 mM substrat konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 40). Aktivite ölçümlerinde optimum CHPx konsantrasyonu 120 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 40. CHPx konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>CHPx (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
60	46.17
120	93.96
240	72.38

4.1.8.4. GSH Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

25 mM ile 100 mM arasında değişen GSH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik CHPx GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzimin 50 mM GSH konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 41). Aktivite ölçümlerinde optimum GSH konsantrasyonu 50 mM olarak saptanmıştır.

Tablo 41. GSH konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>GSH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
25	56.13
50	90.38
100	85.22

4.1.8.5. Glutasyon Redüktaz Miktarının CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesine sitozolik protein miktarının etkisi 1 ml reaksiyon ortamında 0.5 ile 2 ünite (ü) arasında değişen miktarlarda glutasyon redüktaz kullanılarak incelendi. 1 ü glutasyon redüktaz kullanıldığında enzim aktivitesi maksimum olduğundan aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında 1 ü glutasyon redüktaz kullanılması uygun bulunmuştur (Tablo 42).

Tablo 42. Glutasyon redüktaz miktarının CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>Glutasyon redüktaz (U)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
0.5	40.81
1	88.23
2	80.35

4.1.8.6. NADPH Konsantrasyonunun CHPx GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

1 mM ile 4 mM arasında değişen NADPH konsantrasyonlarının testis dokusu sitozolik CHPx GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Enzim 2 mM NADPH konsantrasyonunda doygunluğa ulaştığından, aktivite ölçümlerinde 2 mM NADPH kullanılması uygun bulunmuştur (Tablo 43).

Tablo 43. NADPH konsantrasyonunun CHPx GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

<i>NADPH (mM)</i>	<i>Aktivite (nmol/dk/mg prot.)</i>
1	52.26
2	84.55
4	73.42

4.2. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EROD Aktivitesi, GSH ve LP Düzeyleri ile CDNB, DCNB, EAA, EPNP, CHPx GST Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri

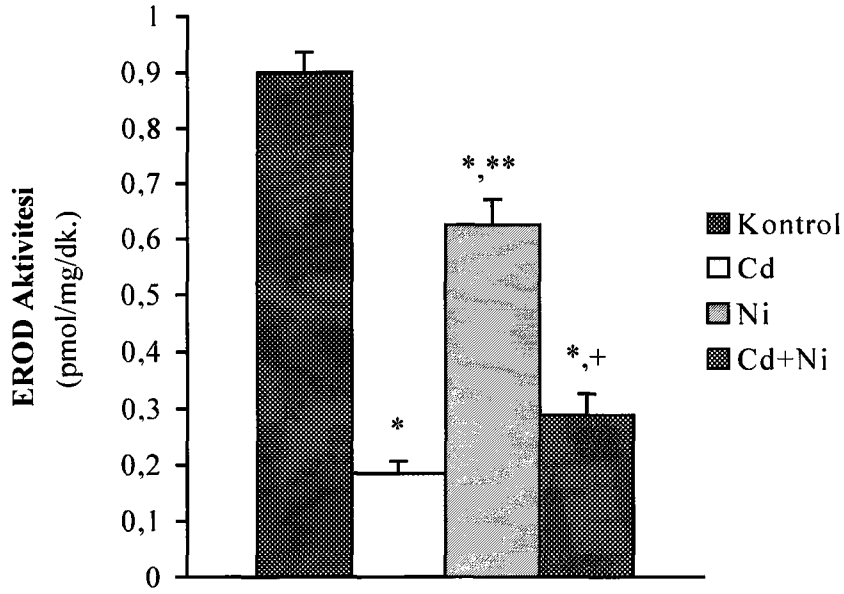
Bu çalışmada kullanılan yöntemler için gerekli optimum koşullar belirlendikten sonra sıçanlarda Cd ve Ni' nin birlikte ve ayrı ayrı uygulandıklarında testiste EROD aktivitesi, LP ve GSH düzeyleri ile GST enzim aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir. Ölçülen parametrelerin ortalama değerleri \pm SH ile birlikte şekillerde gösterilmiştir.

4.2.1. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EROD Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

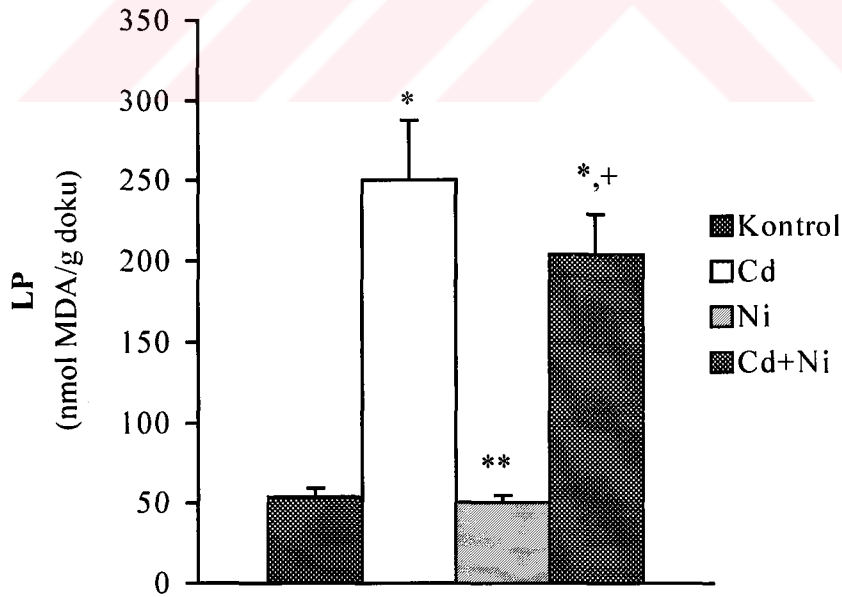
Cd ve Ni ayrı ayrı uygulandıklarında testis EROD aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak sırasıyla %79 ve %32 azalmıştır (Şekil 11). Ni' nin tek başına EROD aktivitesi üzerindeki etkisi Cd kadar değildir. Ni uygulanan hayvanlarda testis EROD aktivitesi Cd uygulanmış hayvanlara göre anlamlı olarak yüksektir. Cd ve Ni birlikte uygulandığında testis EROD aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %68 azalmıştır. Ayrıca Ni' ye göre de anlamlı olarak düşüktür. Bu azalma Cd' nin meydana getirdiği azalmaya göre yüksek olmakla beraber anlamlı değildir.

4.2.2. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste LP Düzeyi Üzerindeki Etkileri

Cd ile testis LP düzeyini kontrole göre anlamlı olarak %400 arttırmıştır. Ni tek başına LP düzeyini etkilememiştir. Cd ve Ni birlikte uygulandığında testis LP düzeyi kontrole göre anlamlı olarak %300 artmıştır (Şekil 12).



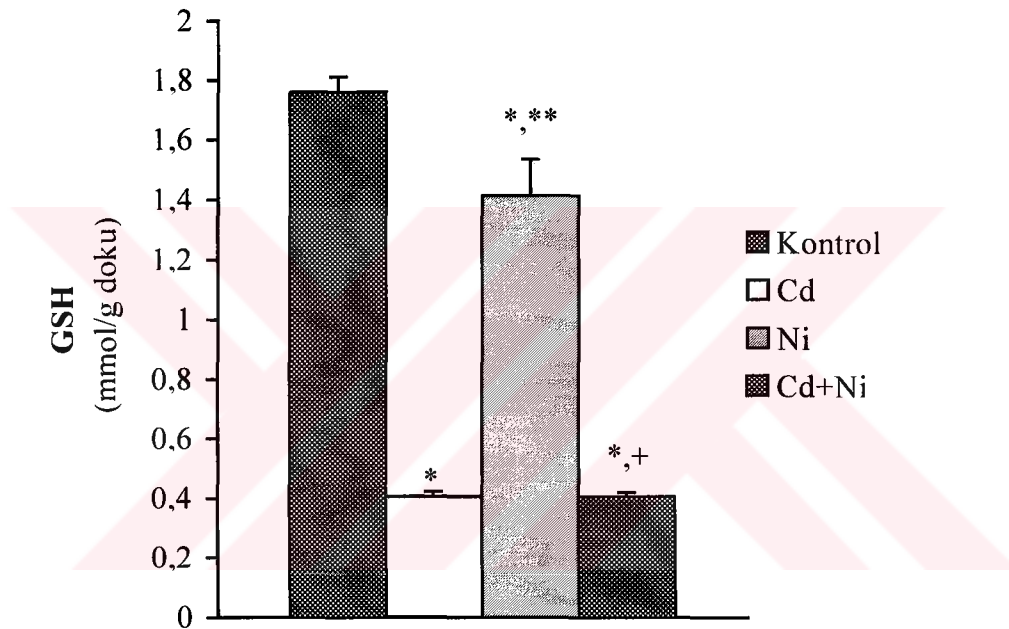
Şekil 11. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EROD aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrolle göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).



Şekil 12. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste LP düzeyi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrolle göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

4.2.3. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste GSH Düzeyi Üzerindeki Etkileri

Cd ve Ni ayrı ayrı uygulandıklarında testis GSH düzeyi kontrole göre anlamlı olarak sırasıyla % 78 ve %22 azalmıştır (Şekil 13). Ni uygulanan hayvanlarda testis GSH düzeyi Cd uygulanmış hayvanlara göre anlamlı olarak yüksektir. Cd ve Ni birlikte uygulandığında testis GSH düzeyi kontrole göre anlamlı olarak %78 azalmıştır. Ayrıca Ni' ye göre de anlamlı olarak düşüktür.

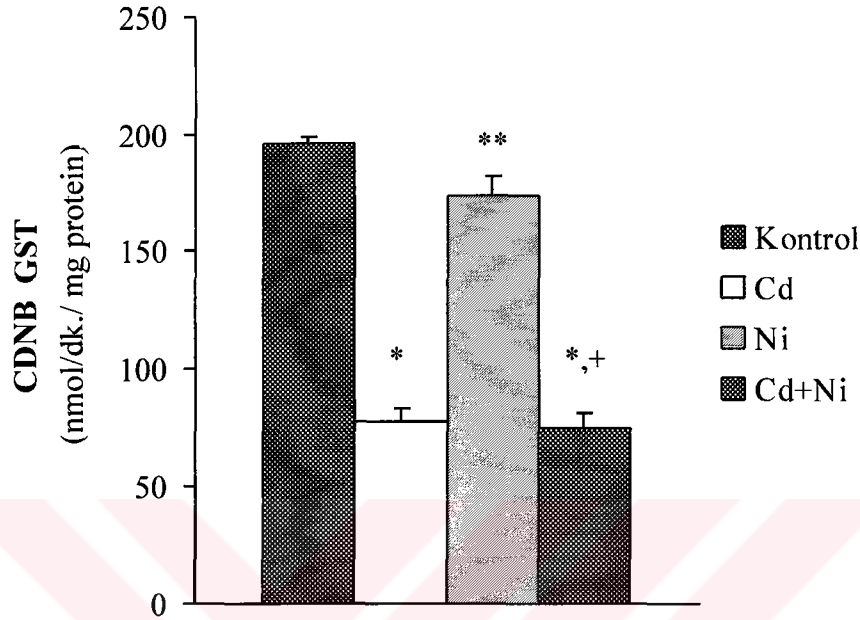


Şekil 13. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste GSH düzeyi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

4.2.4. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste CDNB GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

Cd uygulaması ile testiste CDNB GST aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %62 azalmıştır (Şekil 14). Ni ile testis CDNB GST aktivitesinde görülen azalma kontrole göre anlamlı olmamakla beraber düşme göstermiştir (%18) ancak anlamlı değildir. Ni uygulanan hayvanlarda testis CDNB GST aktivitesi Cd uygulanmış hayvanlara göre anlamlı olarak yüksektir. Cd ve Ni birlikte

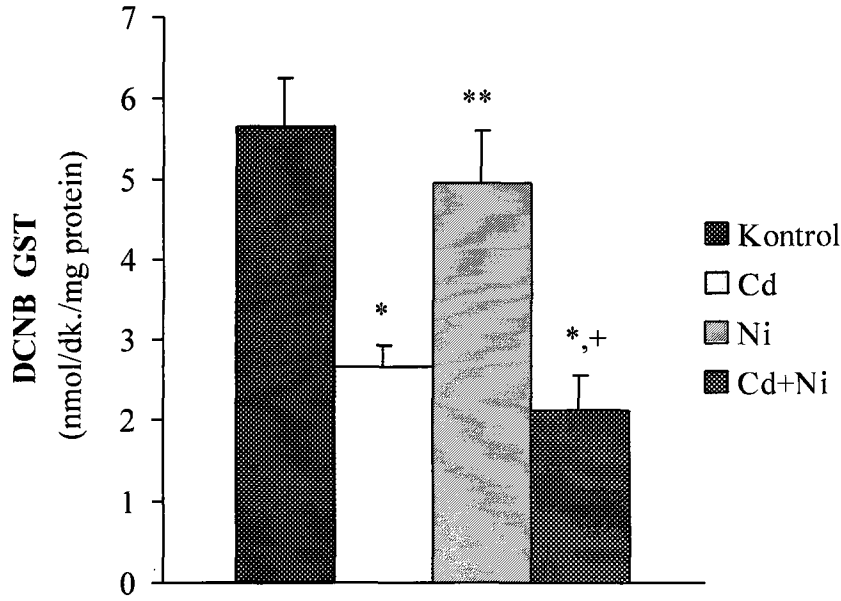
uygulandığında testis CDNB GST aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %63 azalmıştır. Ayrıca Ni' ye göre de anlamlı olarak düşüktür.



Şekil 14. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste CDNB GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

4.2.5. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste DCNB GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

Cd uygulaması ile DCNB GST aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %50 azalmıştır (Şekil 15). Ni ile DCNB GST aktivitesi kontrole göre %17' lik bir azalma olmakla beraber anlamlı değildir. Ni uygulanan hayvanlarda testis DCNB GST aktivitesi Cd uygulanmış hayvanlara göre anlamlı olarak yüksektir. Cd ve Ni birlikte uygulandığında testis DCNB GST aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %58 azalmıştır. Ayrıca Ni' ye göre de anlamlı olarak düşüktür.



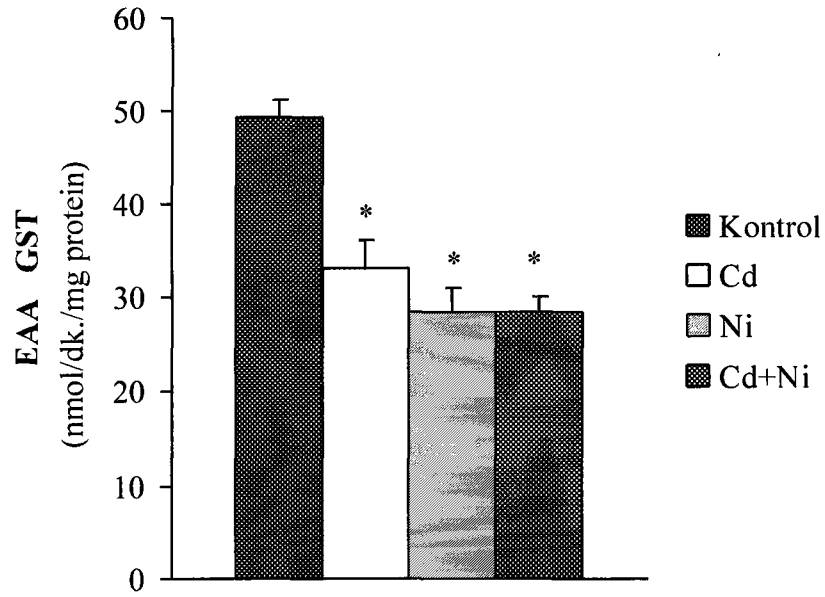
Şekil 15. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste DCNB GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

4.2.6. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EAA GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

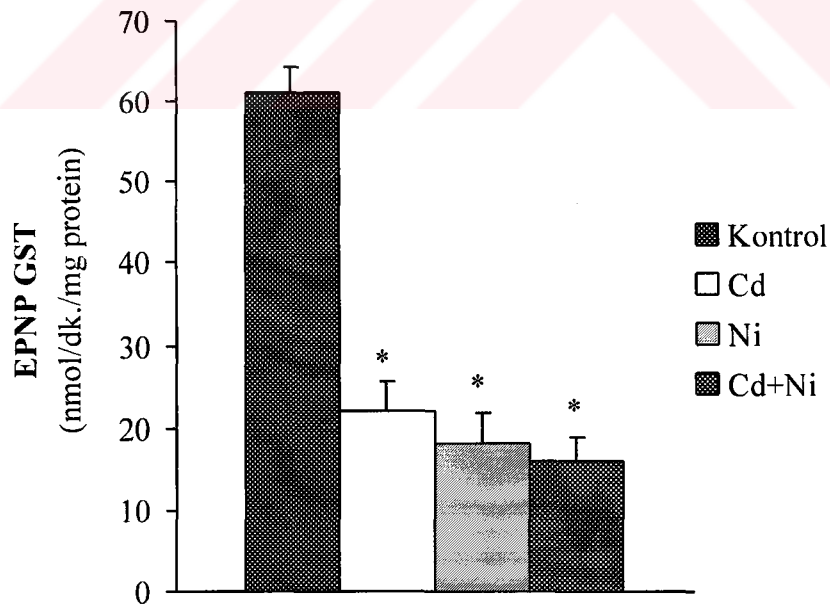
Cd uygulaması ile testis EAA GST aktivitesinde kontrole göre anlamlı olarak %20 azalmıştır. Ni testis EAA GST aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak %40 azaltmıştır (Şekil 16). Cd ve Ni birlikte uygulandığında testis EAA GST aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak %41 azalmıştır.

4.2.7. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste EPNP GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

Cd ve Ni, ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testis EPNP GST aktivitesinde kontrole göre sırasıyla %63, %70 ve %75 anlamlı azalmalar olmuştur (Şekil 17).



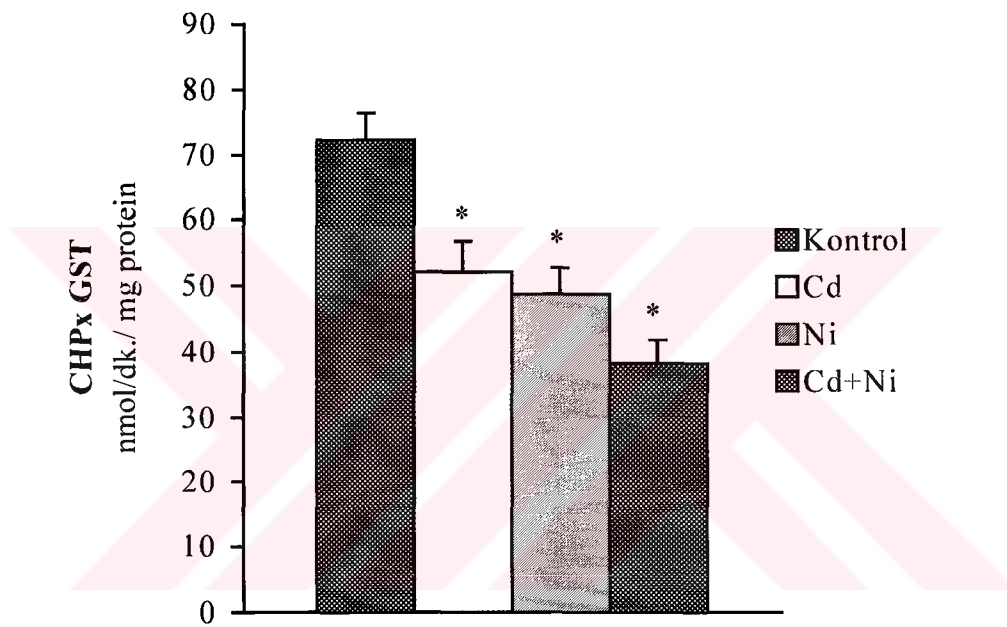
Şekil 16. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EAA GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).



Şekil 17. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste EPNP GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

4.2.8. Cd ve Ni' nin Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulandıklarında Testiste CHPx GST Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

Cd ve Ni, ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testis CHPx GST aktivitesinde kontrole göre sırasıyla %29, %31 ve %50 anlamlı azalmalar olmuştur (Şekil 18). Ni' nin tek başına uygulanması ile Cd' ye; Cd ve Ni' nin birlikte uygulanmasında ise Ni' ye göre anlamlı olmamakla beraber hafif azalmalar vardır.



Şekil 18. Cd ve Ni' nin ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında testiste CHPx GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Değerler 5 hayvana ait değerlerin ortalamasını \pm SH ile birlikte göstermektedir. * Kontrole göre anlamlı ($P < 0.05$). ** Cd' ye göre anlamlı ($P < 0.05$). + Ni' ye göre anlamlı ($P < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Cd ve Ni' nin hedef organlarından biri de testisdir. Bu metallerin ayrı ayrı ve birlikte karaciğer, akciğer ve böbrekte ksenobiyotik metabolize eden enzimlerden CYP ve GST aktiviteleri üzerine etkileri irdelenmiş olmasına karşın, testis üzerindeki olası etkileri ile ilgili veriye rastlanmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada, Cd ve Ni' nin tek başlarına ve birlikte sıçan testisi CYP ve GST aktiviteleri ile GSH ve LP düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Cd ve Ni, tek başlarına CYP1A1/2 ile katalizlenen ve polisiklik aromatik hidrokarbonları karsinojenik ara ürünlerine dönüştüren EROD aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak düşürmüştür. Benzeri sonuç sıçan akciğerinde de belirlenmiştir (Eke ve ark., 1998b). EROD enzim aktivitesindeki düşüş hem katabolizmasında hız sınırlayıcı bir enzim olan hem oksijenaz aktivitesindeki (Maines ve Kappas, 1976; Maines, 1984) ve lipid peroksidasyondaki artışa (Levin ve ark., 1974; Kitada ve ark., 1974, 1977; Maines, 1984) bağlı olabilir. Nitekim, Cd uygulaması ile aşırı artan LP düzeyi bu savı desteklemektedir. Ancak, Cd' nin bu enzim aktivitesi üzerindeki baskılayıcı etkisinin Ni' den daha güçlü olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni de Cd' nin LP' yi arttırmasına karşın Ni' nin LP düzeyini değiştirememesi olabilir (Şekil 12). Ayrıca Cd' nin hücre membran geçirgenliğini ve bütünlüğünü bozması da bu farklılığın oluşmasına katkıda bulunabilir (Ada ve ark., 2000; Novelli et al. 1996). Cd ve Ni birlikte uygulandıklarında EROD aktivitesinin kontrole doğru artma eğiliminde olduğu görülmektedir. Bu durum, iki metalin birlikte uygulanmasında Ni' nin EROD aktivitesini düzeltici bir rol üstlendiği izlenimini vermektedir.

Daha önce belirtildiği gibi Cd tek başına testis LP düzeyini kontrole göre oldukça yüksek oranda arttırmaktadır (Şekil 12). Bu sonuç, sıçan ve fare testisinde yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına uymaktadır (Manca ve ark..

1991; Sugawara ve Sugawara, 1985). LP düzeyinde Cd ile görülen dramatik artış, hem oksijenazın aşırı indüklenerek yüksek miktarda aktif oksijen radikallerinin ve toksik lipid peroksit ürünlerinin oluşumuna bağlanabilir (Maines ve Kappas, 1976; Sunderman ve ark., 1983; Kazantzis, 1987, Novelli, 1998). Ni, LP düzeyini tek başına değiştirememektedir. Oysa Ni' nin hem oksijenaz düzeyini arttırdığı ve daha yüksek dozda LP' yi arttırdığı bilinmektedir (Sunderman ve ark, 1985; Andersen ve Andersen, 1985). Ancak bu çalışmada uygulanan dozda hem oksijenaz aktivitesini Cd' den daha az arttırması ve oluşan aktif oksijen radikallerinin elimine edilmesinde GSH ve GST' lerin yeterli olması LP düzeyinin kontrol düzeyinde kalmasını sağlamış olabilir. Cd ile Ni birlikte verildiğinde LP düzeyi Cd' ye oranla daha düşük düzeyde kalmaktadır. Bu durum EROD aktivitesinde görüldüğü gibi Ni' nin Cd ile birlikte verildiğinde LP üzerinde de düzeltici bir etkisinin olabileceği izlenimini vermektedir.

Cd GSH düzeyini Ni' den daha çok deprese etmiştir (Şekil 13). Cd uygulaması ile GSH düzeyinin aşırı düşmesi yüksek miktarlarda oluşan serbest radikallerin ve LP ürünlerinin inaktive edilmek üzere kullanılıyor olmasına bağlanabilir. Ni uygulaması ile GSH düzeyinde hafif bir düşme görülmektedir. Bu da Ni ile oluşan reaktif radikallerin Cd ile oluşanlar kadar çok olmadığını ve bunların eliminasyonlarında GSH' dan çok GST' lerin görev aldığı izlenimi doğurmaktadır. Cd ve Ni birlikte uygulandığında GSH üzerinde sinerjik ya da antagonistik bir etki yapmamıştır.

EPNP GST dışında genel GST aktivitesinin göstergesi olan CDNB GST aktivitesi, metallerle GSH' ya benzer bir profil vermiştir (Şekil 14). CDNB GST ve DCNB GST enzim aktiviteleri, Ni' ye göre Cd' den daha çok etkilenmiştir (Şekil 14, 15). Bunun nedeni Cd' nin daha fazla aktif oksijen radikalleri üretmesine bağlı olarak LP düzeyinde gösterdiği artış olabilir. İki metal ayrı ayrı ve birlikte uygulandıklarında EAA GST, EPNP GST ve CHPx GST aktiviteleri üzerindeki etkileri nitel olarak benzer olmasına karşın nicel olarak farklılık göstermektedir (Şekil 16,17,18). Cd ve Ni' nin gerek ayrı ayrı

gerekse birlikte uygulandıklarında en çok EPNP GST aktivitesini etkiledikleri görülmüştür. Genelde metallerle oluşan lipid peroksidlerin ve organik peroksidlerin bertaraf edilmesinde CHPx GST aktivitesi ile belirlenen GSTA ve ENPP GST aktivitesi ile gösterilen Teta sınıfı GST' ler görev yapmaktadırlar. Testiste EPNP GST aktivitesindeki düşmenin CHPx GST aktivitesine göre fazla olması, oluşan peroksidlerin ve elektrofilik ürünlerin eliminasyonundan daha çok GSTT' nin sorumlu olduğu izlenimini vermektedir. Genelde metallerin birlikte uygulanması ile GST enzimleri üzerinde tek başlarına oluşturdukları deprese edici etkileri potansiyalize etmedikleri görülmüştür.

Ni ile Cd birlikte verildiğinde EROD aktivitesi ve LP düzeylerindeki normale doğru hafif fakat anlamlı olmayan yönelmeler Ni' nin Cd toksisitesini engellemeye başladığı izlenimini vermektedir. Nitekim, Ni' nin Cd' nin böbrekte ve karaciğerde oluşturduğu toksisiteye karşı koruyucu etkinliği belirlenmiştir (Tandon ve ark., 1984; Novelli ve ark., 1998). Ayrıca her iki metalin birlikte karaciğerde bazı CYP' lerin aktivitelerinde düzelmelere neden olduğu da saptanmıştır (İşcan ve ark., 1992b). İlaveten, testiste Ni' nin, Cd' nin neden olduğu patolojiyi düzelttiği de saptanmıştır (Ada ve ark., 2000). Benzeri bulgu plazma testosteron düzeyinde de gözlenmiştir (Ada ve ark., 2000). Bu olası antagonistik etkinin nedeni belirli değildir. Ancak Cd' nin Ni' nin depolanması ve transportu için önemli olan proteinlere yarışmalı olarak bağlanması sonucu toksisitesini azaltmış olabilir. Ayrıca Cd ve Ni tek başlarına metallothionein sentezini arttırabilmektedirler (Abel ve ark., 1991; Bracken ve Klaassen, 1987; Maitani ve Suzuki, 1983). Dolayısıyla Ni Cd ile birlikte uygulandığında metallothionein miktarını daha fazla arttırabilir ve sonuçta serbest olarak dolaşan Cd' yi bağlayarak toksisitesinin azalmasına neden olabilir. Dolayısıyla Ni' nin düzeltici etkisine ilk yanıtın CYP' den geldiği söylenebilir. Cd ve Ni birlikte uygulandığında GSH düzeyi ve GST aktivitelerinde kontrole yaklaşma eğiliminin olmaması bunların daha geç düzelmeye eğiliminde olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma testiste gerek Cd' nin ve gerekse Ni' nin aktivasyon ve detoksikasyon enzimlerini güçlü bir şekilde deprese ettiğini fakat Cd' nin genelde Ni' ye göre daha baskın olduğunu göstermektedir. Metallerin birlikte uygulanması durumunda ise Ni' nin, Cd' nin baskın etkisini bir ölçüde düzeltme eğilimi içinde olduğunu, EROD aktivitesi ile LP düzeylerindeki değişmelerle göstermektedir.



ÖZET

Kadmiyum ve Nikelin Birlikte Sıçan Testisi Ksenobiyotik Metabolize Eden Enzim Sistemleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Bilindiği gibi, kadmiyum (Cd) ve nikel (Ni), önemli çevre kirleticileri arasındadırlar. Testisin de bu çevre kirleticilerinin hedef organlarından biri olmasına karşın, Cd ve Ni'nin ayrı ayrı ve birlikte testis ksenobiyotik metabolize eden enzimler üzerindeki etkileri henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu sebeple, Cd ve Ni'nin birlikte uygulandıklarında testiste 7-etoksiresorufin-O-deetilaz (EROD) aktivitesi, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LP) düzeyleri ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), etakrinik asit (EAA), 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi)propan (EPNP) ve kümen hidroperoksit (CHPx) substratlarına karşı GST aktiviteleri belirlenerek Cd ve Ni'nin ayrı ayrı verilmesi ile oluşan etkilerle karşılaştırılmıştır. Numuneler üzerindeki ölçümlere geçilmeden önce, incelenen parametreler için optimum koşullar (pH, protein miktarı, substrat ve kofaktör konsantrasyonu) saptanmıştır. Erkek Wistar (225-275 g) sıçanlar, her grupta 5 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. İlk grup hayvanlara öldürülmeden 72 saat önce salin (2 ml/kg) içinde sadece Cd (3.58 mg CdCl₂.H₂O/kg, i.p.); ikinci grup hayvanlara öldürülmeden 16 saat önce salin (2 ml/kg) içinde sadece Ni (59.5 mg NiCl₂.6H₂O/kg, s.c.) verildi. Üçüncü grup hayvanlara Cd (3.58 mg CdCl₂.H₂O/kg, i.p.) verildikten 56 saat sonra Ni (59.5 mg NiCl₂.6H₂O/kg, s.c.) verildi ve Ni uygulamasından 16 saat sonra öldürüldüler. Dördüncü grup hayvanlar ise kontrol grubunu oluşturdu ve bu hayvanlara da 2 ml/kg olmak üzere salin enjekte edildi. Cd tek başına uygulandığında EROD aktivitesi ile CDNB, DCNB, EPNP, EAA, CHPx substratlarına karşı GST aktivitelerini kontrole göre anlamlı olarak düşürmüştür. Cd, aynı zamanda GSH seviyesini düşürürken, LP'yi arttırmaktadır. Tek başına Ni uygulaması ile EROD ve EPNP GST, EAA GST, CHPx GST aktiviteleri ve GSH seviyesini düşürmekte ancak LP'yi etkilememektedir. Cd, EROD aktivitesi ile CDNB GST, DCNB GST aktivitelerini, GSH ve LP seviyelerini Ni'den daha fazla etkilemektedir. İki metalin birlikte uygulanması ile EROD, CDNB GST, DCNB GST ve GSH düzeyi azalmış, LP düzeyi artmıştır. Ancak EROD aktivitesi ve LP düzeyi Cd ile karşılaştırıldığında normal seviyelerine dönme eğilimindedir. Sonuç olarak, Cd ve Ni'nin birlikte verilmesi EROD aktivitesi ve LP düzeyleri üzerinde düzeltici etkiye sahip olduğu görünümü vermekte ancak GSH düzeyi ve GST enzim aktivitelerini değiştirememektedir.

Anahtar Sözcükler: Kadmiyum, nikel, sıçan, testis, 7-etoksiresorufin O-deetilaz, indirgenmiş glutatyon, glutatyon S-transferaz.

SUMMARY

Investigation of the Combined Effects of Cadmium and Nickel on Rat Testicular Xenobiotic Metabolizing Enzymes

Cadmium (Cd) and Nickel (Ni) are well known environmental pollutants. Although testis is one of the target organs of these environmental pollutants, the effects of Cd and Ni alone or in combination on testicular xenobiotic metabolizing enzymes have not been clarified yet. Therefore the acute combined effects of Cd and Ni on testicular 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity, reduced glutathione (GSH) level, lipid peroxidation (LP), glutathione S-transferase (GST) activities toward several substrates (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB; 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, DCNB; etachrynic acid, EAA; 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane, ENPP and cumene hydroperoxide, CHPx) were determined and compared with those of Cd or Ni alone in rat. The optimum conditions (pH, protein amount, substrate concentration and cofactor concentration) for the parameters examined were determined before the measurements on samples. Male Wistar rats were (225-275g) administered either a single dose of Cd (3.58 mg CdCl₂.H₂O/kg, i.p.) 72 hr before sacrifice or a single dose of Ni (59.5 mg NiCl₂.6H₂O/kg, i.p.) 16 hr prior to sacrifice. For the combined treatment, the animals received the single dose of Ni 56 hr after the single dose of Cd and were killed 16 hr later. Cd treatment alone significantly decreased EROD and GST activities toward CDNB, DCNB, ENPP, EAA, CHPx. Cd also inhibited GSH level while increasing LP level. Ni treatment alone, decreased EROD and GST activities toward ENPP, EAA CHPx and GSH levels significantly whereas ineffective on LP level. However, Cd depressed EROD, CDNB GST, DCNB GST activities and GSH levels more than Ni. The combined treatment significantly decreased EROD, CDNB GST, DCNB GST activities and GSH level while increasing LP level. However, the EROD activity and LP level were tend to return to control levels than compared to those of Cd treatment alone. As a conclusion, the combination of Cd and Ni treatment seems to have an ameliorating effect on EROD activity and LP levels but not on GSH level and GST enzyme activities.

Key words: Cadmium, nickel, rat, testis, 7-ethoxyresorufine O-deethylase, reduced glutathione, glutathione S-transferase.

KAYNAKLAR

- ABEL, J., DE RUITER, N., KUHN-VELTEN, WN. (1991). Comparative study on metallothionein induction in whole testicular tissue and isolated Leydig cells. *Arch Toxicol.* **65**(3): 228-34.
- ADA, A.O., ÇOBAN, T., KAPUCUOĞLU, N., AYDIN, A., İŞİMER, A., İŞCAN, M. (2000). Combined effects of cadmium and nickel on rat testicular xenobiotic metabolizing enzymes (XME). 4th Xenobiotic Metabolism and Toxicity Workshop of Balkan Countries, April 12-16, Antalya, Turkey.
- AHMAD, S. (1993). Biochemical defences of pro-oxidant plant allochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.* **20**: 269-296.
- AHMAD, S., ZAMAN, K., MACGILL, R. S., BATCABE, P. J., PARDINI, R. S. (1995). Dichlorone induced oxidative stress a model of insect species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: 442-448.
- ANDERSEN, H.R., ANDERSEN, O. (1989). Effect of nickel chloride on hepatic lipid peroxidation and glutathione concentration in mice. *Biological Trace Element Research.* **21**: 255-61.
- BAER, R.L., RAMSEY, D.L., BIOND, E. (1973). The most common contact allergens. *Arch. Dermatol.* **108**: 74-78.
- BLACKBURN, A.C., WOOLLAT, E., SUTHERLAND, G.R., BOARD, P.G. (1998). Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet. Cell Genet.* **83**:1-2, 109-114.
- BRACKEN, W.M., KLAASSEN, C.D. (1987). Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction. *J Toxicol Environ Health.* **22**(2): 163-174.
- BURKE, M.D., MAYER, R.T. (1974). Ethoxyresorufin; direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methyl cholantrene. *Drug Metab. Dispos.* **2**: 583-588.
- CAMERON, E., FOSTER, C. L. (1963). Observation on the histological effects of sub-lethal doses of cadmium chloride in the rabbit. 1.The effect on the testis., *J. Anat.*, **97**: 269-280.
- CANTFORT, J.V., GIEGELEN, J. (1975). Organ specificity of aryl hydrocarbon hydroxylase induction by cigarette smoker in rats and mice. *Biol. Pharm.* **24**: 1253-1256.

- CARLSON, H.E. (1984). Inhibition of prolactin and growth hormone secretion by nickel. *Life Sci.* **35**: 1747-1754.
- CASSERETT, L.J., DOULL, J. (1991). *Toxicology, the Basic Science of Poisons*. Mc Millan Publish. Co., Inc. New York.
- CHASSEAND, L.F. (1979). The role of glutathione and glutathione-S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* **29**: 175-274.
- CHURCH, D.F., PRYOR, W.A. (1985). Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* **64**: 111-126
- CLAUDE, A. (1969). Microsomes, endoplasmic reticulum and interactions of cytoplasmic membranes. In: *Microsomes and drug oxidations*, Ed.: J.R. Gillette, A.H. Conney, G.J. Cosmides, R.W. Estabrook, J.R. Fouts, G.J. Mannering, Academia Press. New York, p.: 3-39.
- CLEGG, E.J., CARR, I. (1967). Changes in the blood vessels of the rat testis and epididymis produced by cadmium chloride. *J Pathol Bacteriol.* Oct; **94**(2): 317-22.
- CLEMONS, G.K., GARCIA, J.F. (1981). Neuroendocrine effects of acute nickel chloride administration in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **61**: 343-348.
- CHEN, C.L., LIU, Q., RELLING, M.V. (1996). Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmagenetics.* **6**(2): 187-191.
- CHUNG, AN-SIK, MAINES, M. D. (1987). Differential effect of cadmium on gsh-peroxidase activity in the leydig and the sertoli cells of rat testis. *Biochemical Pharmacology.* **36**(8): 1367-1372.
- COMPORTI, D. (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem. and Phys. of Lipids.* **45**: 143-169.
- COPIUS PEREBOOM-STEGEMAN, J.H.J., JONGSTRA-SPAAPEN, E.J. (1979). The effects of a single sublethal administration of cadmium chloride on the microcirculation in the uterus of the rat. *Toxicology.*, **13**:199-213.
- COOK, J.A., MARCONIC, E.A., DILUZIO, N.R.(1974). Lead, cadmium, endotoxin interaction: effect on mortality and hepatic function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**:292-302.
- ÇOBAN, T., BEDÜK, Y., İŞCAN, M. (1995). *in vitro* effects of cadmium and nickel on glutathione, lipid peroxidation and glutathione S-transferase in human kidney. *Toxicology in Vitro.* **10**: 241-45.

- ÇOBAN, T., İŞCAN, M. (1990). Influence of nickel on hepatic monooxygenases, lipid peroxidation, glutathione and glutathione S-transferase of mice *in vitro*. *Pharmacia-JTPE*. **30**(1): 5-12.
- DORMER, R.L., KERBEY, A.L., MC PHERSON, M., MANLEY, S., ASHCROFT, S.J.H., SCHOFIELD, J.G., RANDLE, P.J. (1973). The effect of nickel on secretory systems. *Biochem. J.* **140**: 135-142.
- DROPER. H. H. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. In: *Advances in Nutritional Research*, Vol: 9. Ed.: H. H. Droper, Plenum Press, p.: 119-145.
- DWIVEDI, C., SINGH, D.N., CRUMP, E.P., HARBISON, R.D. (1977). Reproductive toxicity of cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Abstracts 41,194.
- EKE, B.C., ÇOBAN, T., VURAL, N., İŞCAN, M. (1998a). Gender dependent effects of cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **5**: 29-34.
- EKE, B.C., İŞCAN, M., ÇOBAN, T. (1998b). Kadmiyum ve nikelin birlikte sıçan akciğeri ve böbreğinde ksenobiyotiklerin aktivasyonunda rol oynayan sitokrom P450 enzim sistemi üzerine etkilerinin araştırılması. Tübitak proje no: SBAG-1515.
- EKE, B.C., VURAL, N., İŞCAN, M. (1997). Age dependent differential effects of cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Arch. Toxicol.* **71**: 696-702.
- ELLMAN, G., LYSKO, H. (1979). A precise method for the determination of blood and plasma sulphhydryl groups. *Anal. Biochem.* **93**: 98-102.
- ERNSTER, L., ORRENIUS, S. (1975). Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed. Proc.* **24**: 1190-1199.
- FAHIM, M.S., KHARE, N.K. (1980). Effects of subtoxic levels of lead and cadmium on urogenital organs of male rats. *Arch. Androl.*, **4**:357-362.
- FAROOQUI, M.Y.H., DAY, W.W., ZAMORANO, D.M. (1987). Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**(1): 177-180.
- FLICK D.F., KRAYBILL, H.F., DIMITROFF, J.M. (1971). Toxic effects of cadmium: a review. *Environ. Res.* Apr; **4**(2): 71-85.
- FOWLER, A.J., SINGH, D.N., DWIVEDI, C. (1982). Effect of cadmium on meiosis. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **29**: 412-415.
- FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D. (1982). Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**: 412-426.

- FRIBERG, L., KJELLSTROM, T., NORDBERG, G., PISCATOR, M. (1979). Cadmium. In : Friberg L, Nordberg G, Vouk, VB (Eds) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North- Holland, p.: 355- 380.
- FRIBERG, L., PISCATOR, M., NORDBERG, G.F., KJELLSTROM, T.(1974). Cadmium in the Environment. Cleveland, OH: CRC Press.
- FRIDOVICH, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.
- GANDY, J., PRIMIANO, T., NOVAK, F., KELCE, W.R., YORK, J.L. (1996). Differential expression of glutathione S-transferase isoforms in compartments of the testis and segments of the epididymis of the rat. *Drug. Metab. Dispos.* **24**(7): 725-733.
- GILLHAM, B. (1973). The mechanism of reaction between glutathione and 1-menaphthyl sulphate catalysed by a glutathione S-transferase from rat liver. *Biochem. J.* **135**: 797-804.
- GONZALES, F.J. (1989). The molecular biology of cytochrome P450s. *The. Amer. Soc. Pharmacol. And Exp. Ther.* **40**(4): 244-288.
- GONZALES, F.J., NEBERT, D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily. *Trends in Gen.* **6**(6): 182-186.
- GOYER, R.A. (1996). Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D., Casarett, L.J., Amdur, M.O. (Eds) *Casarett & Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*. Fifth Edition. Mc Graw Hill Publications.
- GRYGLEWSKY, R., J., PALMER, R., M., J., MONCADA, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxation factor. *Nature.* **320**:: 454-456.
- GUT.J., GASSER. P.D., KRONBACH, J., CATIN, T., MEYER, U.A. (1984). Debrisoquine type polymorphism of drug oxidation: purification from human liver of a cytochrome P-450 isozyme with high activity for bufaralol hydroxylation. *FEBs.* **173**(2). 287-290.
- GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS.* **15**: 129-135.
- HABIG, W. H., PABST, M. J., JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. (1976). Glutathione S-transferases AA from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**: 710-716.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.

- HEATH, J.C., DANIEL, M.R. (1964). The production of malignant tumors by nickel in the rat. *Br. J. Cancer*. **18**: 261-264.
- HIRVONEN, A. (1999). Polimorfisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environmental Health Perspectives*. **107**(1):37-47.
- HOEY, M.J. (1966). The effects of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. *J. Reprod. Fert.* **12**: 461-471.
- HOGETVEIT, A.C., BARTON, R.T. (1977) . Monitoring nickel exposures in refinery workers. In: *Clinical chemistry and chemical toxicology of metals*. Ed.: E. Brown. Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- HORTON, A.A. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC. Cit. Rev. Toxicol.* **18**(1): 27-79.
- HUTCHINSON, R., MC LEOD, T.M., RAFFLE, E.J. (1975). Nickel hypersensitivity. Nickel binding to amino acids and lymphocytes. *Br. J. Dermatol.* **93**: 557-561
- IARC (1990). Chromium, nickel and welding. In: *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans*, Vol.49, Lyon.
- IARC (1994). Cadmium and cadmium compounds. IARC monographs, **58**: 119-237.
- IGARI, Y., SUGIYAMO, Y., AWAZU, S., HANANO, M. (1982). Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital and thiopental in the rat. *Pharmacokinetic. Biopharm.* **10**: 53-75.
- İŞCAN, M., KARAKAYA, A. (1988). Cadmium sensitivity differences between liver microsomal drug metabolizing enzyme systems of guinea-pig and rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**(1): 101-105.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T. (1989). Nickel effect on hepatic cytochrome P450 dependent monooxygenases in mice. In: *Cytochrome P450: Biochemistry an Biophysics*. Ed.: I. Schuster, , Taylor and Francis, London, p.: 787-789.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T., EKE, B.C. (1992a). Responses of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes of mouse, rat and guinea pig to nickel. *Pharmacology & Toxicology*. **71**: 434-442.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T., İŞCAN, M. (1992b). Combined effect of cadmium and nickel on rat hepatic monooxygenases: possible stimulation of certain cytochrome P-450 isozymes. *Toxicol. Lett.* **62**(2-3):191-199.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T., EKE, B.C., İŞCAN, M. (1993 a). The responses of hepatic monooxygenases of guinea pig to cadmium and nickel. *Biological Trace Element Research*. **38**: 129-137.

- İŞCAN, M., EKE, B.C., ÇOBAN, T. (1993 b). Combined effects of cadmium and nickel on hepatic glutathione S-transferases in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**: 453-456.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T., EKE, B.C. (1994). Differential combined effects of cadmium and nickel on hepatic and renal glutathione S-transferases of the guinea pig. *Environmental Health Perspectives.* **102**(Suppl 9): 69-72.
- İŞCAN, M., ÇOBAN, T., EKE, B.C., İŞCAN, M. (1995). Differential responses of hepatic monooxygenases and glutathione S-transferases of mice to a combination of cadmium and nickel. *Comp. Biochem. Physiol.* **111C**: 61-68.
- JACQUET, P., MAYENCE, A. (1982). Application of the *in vivo* culture to the study of the mutagenic effects of nickel in male germ cells. *Toxicol. Lett.*, **11**: 193-197
- JAKOBY, W.B. (1976). *The glutathione S-transferases: a triple-threat in detoxication in in vitro metabolic activation in mutagenesis testing.* Ed.: Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R., Philpot, R.M. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.: 207.
- JAKOBY, W.B. (1978). The glutathione-S-transferases, A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* **46**: 383-414.
- JAKOBY, W.B., HABIG, W.H., KEEN, J.H., KETLEY, J.N., PABST, M.J., (1976). *Glutathione S-Transferases: Catalytical aspects in glutathione: Metabolism and function.* Ed.: Arias, I.M. and Jakoby, W.B. Raven Press. New York, p.:189.
- JAKOBY, W.B., KETTERER, B., MANNERVİK, B. (1984). Glutathione Transferases: Nomenclature. *Biochem. Pharmacol.* **33**(16): 2539-2540.
- JENSSON, H., GUTHENBERG, C., ALIN, P., MANNERVİK, B. (1986). Rat glutathione transferases 8-8, on enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett.* **203**: 207-209.
- KAKELA, R., KAKELA, A., HYVARINEN, H. (1999). Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, **123**(1):27-37.
- KALOW, W. (1987). Genetic variation in the human hepatic cytochrome P-450 system. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **31**: 633-641.
- KAPPUS, H. (1986). Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.* **35**(1), 1-6.
- KAPPUS, H. (1987). A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chem.Phys. Lipids.* **45**: 105-115.
- KARAASLAN, Z. (1998). Kronik olarak düşük dozda kadmiyuma maruz kalan işçilerin idrar N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktivitelerinin olası

değişimlerinin incelenmesi. *A.Ü. Ecz. Fak. F. Toksikoloji A.B.D. Yüksek Lisans Tezi*. Danışman: Prof. Dr. Asuman Karakaya.

- KARAKAYA, A., İŞCAN, M. (1988). Effect of cadmium on pulmonary and renal microsomal drug metabolizing enzymes of the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**(1): 241-244.
- KARAKAYA A; YÜCESOY B; SARDAS OS. (1994). An immunological study on workers occupationally exposed to cadmium. *Hum Exp Toxicol.***13**(2):73-5
- KASPRZAK, K.S. (1987). *Advances in modern environmental toxicology*, Ed.: L. Fishbein, A. Furst, M.A. Mechlman, Vol IX, Princeton, NJ, p.: 145-183.
- KAZANTZIS, G. (1987). The mutagenic and carcinogenic effects of cadmium: an update. *Toxicological and Environmental Chemistry.* **15**: 83-100.
- KAZANTZIS, G. (1987). *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Ed.: L. Fishbein, A. Furst, M.A. Mechlman, Vol IX, Princeton, NJ, p.: 127-143.
- KETTERER. B., MULDER, G.J. (1990). *Glutathione conjugation. Conjugation Reactions in Drug Metabolism*. Mulder. G.J. Taylor and Francis, London, New York-Philadelphia, p.: 308-364
- KETTERER. B., ROSS. MANSELL. P., WHITEHEAD, J.K. (1967). The isolation of carcinogen binding protein from livers of rats given 4-dimethyl-aminobenzen. *Biochem. J.*, **103**: 316-324.
- KITADA, M., KAMATAKI, T., KITAGAVA, H. (1974). Effects of lipid peroxidation on the microsomal electron transport system and the rate of drug metabolism in rat liver. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **22**: 752-756.
- KITADA, M., IGARASHI, T., KAMATAKI, T., KITAGAVA, H. (1977). Cause of decrease of ethylmorphine N-demethylase activity by lipid peroxidation in microsomes from rat, guinea-pig and rabbit. *Jap. J. Pharmacol.* **27**: 265-275.
- LABELLA, F.S., DULAR, R., LEMON, P., VIVIAN, S., QUEEN, G. (1973). Prolactin secretion is specifically inhibited by nickel. *Nature.* **245**: 330-332.
- LANG. C.M., VESELL. E.S. (1976). Environmental and genetic factors affecting laboratory animals: Import on Biomedical Research, *Fed.Proc.* **35**:1123-1124.
- LAU, T.J., HACKETT, R.L., SUNDERMAN, F.W.JR. (1972). The carcinogenicity of intravenous nickel carbonyl in rats. *Cancer Res.* **32**: 2311-2321.
- LAWRENCE, R., BURK R. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **71**: 952-958.
- LEE, E.J.D., WONG, J.Y.Y., YEOH, P.N., GONG, N.H. (1995). Glutathione S-transferase-θ (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics.* **5**: 232-334.

- LEE, M.L., NOVOTNY, M.V., BARTLE, K.D. (1976). Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco and marijuana smoke condensates. *Anal. Chem.* **48**: 405-418.
- LEONARD, A., GERBER, G.B., JACQUET, P. (1981). Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of nickel. *Mutation Research.* **87**: 1-15.
- LEROUX, J.P., CRESTE, L.T., MARIE, S. (1989). Ontogeny and regulation of drug metabolism in humans. *Dev. Pharmacol. Ther.*, **13**: 63-69.
- LEVIN, W., LU, A.Y.H., JACOBSON, M., KUNTZMAN, J., ROYER, L., MACCAY, P.B. (1974). Lipid peroxidation and degradation of cytochrome P-450 heme. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**: 842-852.
- LEVINE, W.G. (1983). Glutathione and hepatic mixed function oxidase activity, *Drug Metab. Reviews.* **14**(5): 909-930.
- LISTOWSKY, I., ROWE, J.D., PATSKOVSKY, Y.V., TCHAIKOVSKAYA, T., SHINTANI, N., NOVIKOVA, E., NIEVES, E. (1998). Human testicular glutathione S-transferases: insights into tissue-specific expression of the diverse subunit classes. *Chemico-Biological Interactions.* **111-112**: 103-112.
- LORREY, D. (1984). Purification and Characterization of the Rat liver Microsomal Cytochrome P-450 Involved in the hydroxylation of debrisoquine, a prototype for genetic variation in oxidative drug metabolism. *Biochemistry.* **23**(12). 2787-2795.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- LU, A.Y.H., WEST, S.B. (1980). Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450. *Pharmacol. Reviews.* **31**(4): 277-295.
- LU, C.C., MATSUMOTO, N., TIJIMA, S. (1979). Teratogenic effects of nickel chloride on embryonic mice and its transfer to embryonic mice. *Teratology.* **19**: 137-142.
- MADHUKAR, B.V., MATSUMURA, F. (1978). Comparison of induction patterns of rat hepatic microsomal mixed function oxidases by pesticides and related chemicals. *Pest. Biochem, Physiol.* **11**: 301-308.
- MAINES, M.D. (1984). New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12**: 241-314
- MAINES, M.D., KAPPAS, A. (1976). Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem. J.* **154**: 125-131.

- MAITANI, T., SUZUKI, K.T. (1983). Dose-dependent induction of metallothionein in kidneys of mice injected with indium and nickel ions. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) **31**(3): 979-984.
- MANCA, D., RICARD, A.C., TROTTIER, B., CHEVALIER, G. (1991). Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*. **67**:303-23.
- MANERING, G.J. (1972). Microsomal enzyme systems which catalyse drug metabolism. In: *Fundamentals of drug metabolism*. Ed.: B.N.La. Du, H.G. Mandel, E.L. Way, Baltimore: Waverly press, p.: 206-252.
- MANIS, J., KIM, G. (1980). Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the intestine and liver. *Life Sci.*, **26**: 1431- 1439.
- MANNERVIK, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Rel. Areas. Mol. Biol.* **57**: 357-406.
- MANNERVIK, B., DANIELSON, U.H. (1988). Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **23**(3): 283-337.
- MANNERVIK, B., JENSSON, H. (1982). Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione-S-transferases in rat liver cytosol. *J.Biol. Chem.* **257**: 9909-9914.
- MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIR, M.K. WARHOLM, ALIN, P., (1984). Species and tissue differences in the occurrence of isoenzymes of glutathione transferase. *IUPHAR, Proceeding*. **3**: 225-230.
- MANTLE, I.J., PICKETT, C.B., HAYES, J.D. (1987). *Glutathione-S-transferases and carcinogenesis*. Taylor and Francis. London.
- MAS, A., HOLT, D., WEBB, M. (1985). The acute toxicity and teratogenicity of nickel in pregnant rats. *Toxicology*. **35**: 47-57.
- MIHARA, M., UCHIYAMA, M., FUKUZAWA, K. (1980). Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochemical Medicine*. **23**: 302-311.
- MOLDEUS, P., QUANGUAN, J. (1987). Importance of the glutathione cycle in drug metabolism. *Pharmacol Ther.* **33**. 37-40.
- MORELLI, F., DOUSSIÈRE, J., VIGNASIS P. V. (1991). The superoxide generating oxidase of phagocytic cells. physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* **201**: 523-546.
- MORSELT, A.F.W., COPIUS PEREBOOM-STEGEMAN, J.H.J., JONGSTRA-SPAAPEN, E.J., JAMES, J. (1983). Investigation of the mechanism of cadmium toxicity at cellular level. I. A light microscopical study. *Arch. Toxicol.*, **52**:91-97.

- MUELLER, G.C., MILLER, A.A. (1953). The metabolism of methylated aminoazodyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *S. Biol. Chem.*, **202**: 579-587.
- NEBERT, D.W., EISEN, H.J., NEGISHI, M., LANG, M.A., HJELMELAND, L.M. (1981). Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**:431-62.
- NEBERT, D.W., FELTON, J.S. (1976). Importance of genetic factors influencing the metabolism of foreign compound. *Fed. Proc.* **35**: 1133-1141.
- NEBERT, D.W., JENSEN, N.M. (1979). The Ah locus: genetic regulation of the metabolism of carcinogens, drugs and other environmental chemicals by cytochrome P-450 mediated monooxygenases. *CRS Crit. Rev. Biochem.* **6**: 401-437.
- NEBERT, D.W., NELSON, D.R., CONN, M.J., ESTABROOK, R.W. (1991). The P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology.* **10**(1): 1-14.
- NELSON, D.R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J.J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D.J., WATERMAN, M.R., GOTOH, O., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GUNSALUS, I.C., NEBERT, D.W. (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession and nomenclature. *Pharmacogenetics.* **6**: 1-42.
- NG, T.B., LIU, W.K. (1990). Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26**: 24-28.
- NOVELLI, E.L.B., HERNANDEZ, R.T., NOVELLI FILHO, J.L.V.B., BARBOSA, L.L. (1998). Differential/combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissues of rats. *Environmental Pollution.* **103**: 295-300.
- ONO, H., FUNAKOSHI, T., SHIMADA, H., KOJIMA, S. (1997). Comparative effects of disulfiram and diethyldithiocarbamate against testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* **50**:389-399.
- PABST, M.J., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. (1973). Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **52**: 1123-1128.
- PARIZEK, J., ZAHOR, A. (1956). Effects of cadmium salts on testicular tissue. *Nature.*, **177**:1036-1037.
- PEDERSON, E., ANDERSON, A., HOGETVEIT, A. (1973). A second study of the incidence and mortality of cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **8**: 503-510.

- PEKTOLA, V., HUHTANIEMI, I., METSA-KETELE, T., AHOTUPA, M. (1996). Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*. **137**(1): 105-112.
- PELKONEN, O., PUURUNEN, J. (1980). The effect of cimetidine on in vitro and in vivo microsomal drug metabolism in the rat. *Biochem, Pharmacol.* **29**: 3075-3080.
- REED, D.J. (1986). Regulation of reductive porocesses by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 7-13.
- REED, D.J. (1990). Glutathione: Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 603-631.
- REED, D. J., FARRIS, M. W. (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev.* **36**: 255-335.
- REMMER, H., HERKER, H. J. (1965). Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**: 79-97.
- RONDIA, D., (1979). Sources, models and level of human exposure to nickel and chromium. In: *Trace Metals, Exposure and Health Effects*. Ed.: E. Diferrante, Pergamon, Oxford, p.:117-134.
- SARTOR, F. A. , RONDIA, D. J. , CLAEYS, F. D. , STAESSEN, J. A., LAUWERYS, R.R., BERNARD, A.M., BUCHET, J.P., ROELS, H.A., BRUAUX, P.J., DUCOFFRE, G.M., LIJNEN, P.J., THUIS, L.B., AMERY, A.K. (1992). Impact of environmental cadmium pollution on cadmium exposure and body burden. *Archives of Environmental Health.*, **47**(5): 347-353.
- SATO, M., NAGAI, Y. (1986). Sex differences in NADPH dependent lipid peroxidation induced by cadmium. *Arch. Toxicol.* **59**: 156-159.
- SAYGI, Ş., DENIZ, G., KUTSAL, O., VURAL, N. (1991). Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis and fertility of male rats. *Biological Trace Element Research.*, **31**: 209-214.
- SCALCH, K. M., 1992. Metals and lipid peroxidation. Contemporary issues (review). *Lipids.* **27**: 209-218.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. (1968). Estimation of total protein-bound and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**: 192-205.
- SEVERSON, R. F., ARRENDALE, R. F., CHORTYK, O.T., SNOOK, M. E. (1978). A method for determining the transfer of lipids from tobacco to smoke. *Tab. Sci.* **22**: 130-133.
- SIES, H. (1991). *Oxidative stress, oxidant and antioxidants*. London: Academic Press.

- SIES, H., GROOT, H. (1991). Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol. Lett.*, **64/65**: 547-551.
- SNODGRASS, W.J. (1980). Distribution and behaviour of nickel in aquatic environment. In: *Nickel in the Environment*. Ed: J.O. Nriagu, New York: John Wiley & Sons, p.: 203-274.
- SNYDER, M.J., MADDISON, D.R. (1997). Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA Cell Biol.* **16**:11, 1373-1384.
- STACK, R.F., BURKETT, A.J., NIKLAS, G. (1976). Trace metals in teeth at birth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **16**: 764-766.
- STADTMAN, R. E. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of protein. Biochemical Mechanism and Biological Consequences. *Free Radical Biol. Med.* **9**: 315-325.
- STOHS, S.J., AL-TURK, W.A., ANGLE, J.R. (1982). GST and glutathione reductase activities in hepatic and extrahepatic tissues of female mice as a function of age. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 2113-2116.
- SUGAWARA, N., SUGAWARA, C. (1984). Selenium protection against testicular lipid peroxidation from cadmium. *Journal of Applied Biochemistry.* **6**: 199-204.
- SUNDERMAN, F.W. ., SUNDERMAN, F.W.JR. (1961). Nickel poisoning XI-implication of nickel as a pulmonary carcinogen in tobacco smoke. *Ann. J. Clin. Pathol.* **35**: 203-209.
- SUNDERMAN, F.W., DONNEL. Y. (1965). Studies of nickel carcinogenesis. metastazing pulmonary tumors in rats induced by the inhalation of nickel carbonyl. *Am. J. Pathol.* **46**: 1027-1041.
- SUNDERMAN, F.W., ESFAHANI, M. (1968). Nickel carbonyl inhibition of RNA polymerase activity in hepatic nuclei. *Cancer. Res.* **28** : 2565-2567
- SUNDERMAN, F.W.JR. (1976). A review of the carcinogenicities of nickel, chromium and arsenic compounds in man and animals. *Prev. Med.* **5**:279-294.
- SUNDERMAN, F.W.JR. (1978). Carcinogenic effect of metals. *Fed. Proc.* **37**: 40-46.
- SUNDERMAN, F.W.JR. (1981a). *Disorders of mineral metabolism*, Ed.: Bronner, F., Coburn, J.W. Vol I, New York, Academic Press. Inc., p.: 201-232.
- SUNDERMAN, F.W.JR. (1981b). Recent research on nickel carcinogenesis. *Environ. Health. Perspect.* **40**: 131-141
- SUNDERMAN, F.W.JR. (1986). Metals and lipid peroxidation. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **59**(7): 248-55.

- SUNDERMAN, F.W.JR., BIBEAU, L.M., REID, M.C. (1983). Synergistic induction of heme oxygenase activity in rat liver and kidney by diethyldithiocarbamate and nickel chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **71**: 436-444.
- SUNDERMAN, F.W.JR., MARZOUK, A., HOPFER, S.M., ZAHARIA, O., REID, M.C. (1985). Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **15**: 229-36.
- TANDON, S.K., KANDELWAL, S., MATHUR, A.K., ASHQUIN, M. (1984). Preventive effects of nickel on cadmium hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Anal. Clin. Lab. Sci.* **14**(5): 391-396.
- TRAKSHEL. G.M., MAINES, M.D. (1988). Characterization of glutathione-S-transferases in rat kidney. *Biochem J.* **252**: 127-136.
- VESELL, E.S., LANG. C.M., WHITE. W.J., PASSANATI, G.T., HILL. R.N., CLEMENS, T.L., LIU, D.K., JOHNSON. W.D. (1976). Environmental and genetic factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Fed. Proc.* **35**: 1125-1132.
- VOS, R.M.E., BLADEREN, P.J.V. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol. Interactions.* **76**: 241- 265.
- VURAL, N. (1996). *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73. s: 42-92.
- VURAL, N., GÜVENDİK, G. (1984). Blood lead and cadmium levels of the population living in Ankara. *Vet. Human. Toxicol.* **29**(Supplement): 127.
- WALKER, E.M.J., GALE, G.R., GREENE, W.B., VESELY, J., NICHOLSON, J.H., ATKINS, L.M., SMITH, A.B., JONES, M.M., HENNIGAR, G.R. (1984). Effects of substituted dithiocarbamates on the testicular toxicity of cadmium. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology.*, **46** (3): 449-467.
- WARHOLM, M., JENSSON, H., TAHİR, M.K., MANNERVİK, B. (1986). Purification and characterization of three distinct glutathione transferases from mouse liver. *Biochemistry.* **25**: 4119-4124.
- WARHOLM, M., RANE, A., ALEXANDRIE, A.K., MONAGHAN, G., RANNUG, A. (1995). Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics.* **5**: 252-254.
- YÜCESOY B; TURHAN A; URE M; İMİR T; KARAKAYA A. (1997). Effects of occupational lead and cadmium exposure on some immunoregulatory cytokine levels in man. *Toxicology.* **12**(1-2):143-7.
- ZAMAN, K., PARDINI, R. S. (1996). An overview of the relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. In: *Toxic Substance Mechanisms*. Taylor & Francis. **15**: 151-181.