

**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİNİTROCRESOL'ÜN (*Rat rattus norvegicus*) SIÇAN**  
**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

**OLCAY BAŞ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANA BİLİMDALI**

**BURSA 2006**

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİNİTROCRESOL'ÜN (*Rat rattus norvegicus*) SIÇAN  
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ

OLCAY BAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 30.10.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
(Danışman )

  
.....

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

  
.....

Doç. Dr. Engin ULUKAYA

  
.....

## ÖZET

Bu çalışmada tarımda pestisit olarak kullanılan ve toksik bir kimyasal olarak bilinen DNOC'un (4,6-dinitro-o-cresol), LD<sub>50</sub> dozu (2,8mgkg<sup>-1</sup>b.w.<sup>-1</sup>) *Rat rattus norvegicus* sıçanlarına intraperitoneal olarak uygulanarak 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 72 saat sonra hayvanların karaciğer, böbrek, beyin ve incebağırsak dokularındaki GST (Glutasyon S-Transferaz) enzim aktivitesine etkisi incelendi.

Erkek ve dişi sıçanların, karaciğer, beyin ve ince bağırsak dokuları GST aktivitesinde, genel olarak aktivasyon belirlendi. Deney grubu erkek sıçanların karaciğer dokusunda 16. saatte kontrol grubuna göre %20.22 olarak tespit edilen aktivasyon istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi (p<0.05). Erkek sıçanların beyin dokusunda ise 8. saatte kontrole göre deney grubunda %12.5'lük ve 72. saatte ise kontrole göre %21.7 oranında bir aktivasyon tespit edildi. GST enzim aktivitesinde görülen bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi (p<0.05). İnce bağırsak dokusu GST aktivitesinde ise erkek ve dişi sıçanlarda anlamlı aktivasyon saptanmadı. Erkek ve dişi böbrek dokusu GST aktivitesinde ise genel olarak inhibisyon olduğu ve dişi sıçanların böbrek dokusunda 0. saatte %42.6, 4. saatte %41.5, 8. saatte %18.4 olarak bulunan inhibisyon istatistiksel açıdan anlamlı (p<0.05) tespit edildi.

Sonuçlara göre DNOC'un, sıçanların karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki GST enzim aktivitesini etkilediği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** DNOC, GST, rat

**ABSTRACT**

In this study, LD<sub>50</sub> (2.8mgkg<sup>-1</sup>b.w.<sup>-1</sup>) of DNOC (4,6-dinitro-o-cresol)-known as toxic chemical commonly used in agriculture- was intraperitoneally administered to *Rat rattus norvegicus*. Its effects on GST (Glutathione S-transferase) enzyme on animals liver, kidney, brain and intestine tissues were examined at 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 72 hours later,.

The GST activation of male and female rats liver, brain and small intestine tissues, generally activation is determined.

Keywords: DNOC, GST, rat

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. DNOC.....	3
2.1.1. DNOC’ un Bazı Genel Özellikleri .....	3
2.1.2. Kullanım Alanı ve Etkileri.....	4
2.1.3. Kinetiği ve Metabolizması.....	7
2.1.4. Biyotransformasyonu.....	8
2.1.5. Eliminasyonu ve Vücuttan Atılması.....	10
2.1.6. Vücut Bileşenleri ile Reaksiyonu.....	10
2.1.7. Toksik Etki Metabolizması.....	11
2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimi.....	15
2.2.1. Tanım.....	15
2.2.2. GST Enziminin Görevleri.....	20
2.2.3. GST Enziminin Substrat Özgüllüğü.....	23
2.2.4. GST Enzim Metabolizması.....	28
2.2.5. GST Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	29
3. MATERYAL METOT.....	31
3. 1. MATERYEL.....	31
3. 1. 1. Kullanılan Deney Hayvanları.....	31

3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
3.2. YÖNTEM.....	31
3. 2. 1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi Tayini.....	32
3. 2. 2. Dokularda Protein Tayini.....	33
3. 2. 3. Spesifik Aktivite Tayini.....	33
3. 2. 4. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Karaciğer GST Aktivitesinin İncelenmesi.....	34
4.2. Böbrek GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi.....	35
4.3. Beyin GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi .....	37
4.4. İncebağırsak GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi.....	39
5. TARTIŞMA SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	58
TEŞEKKÜR.....	59

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

%	-Yüzde Orantı
ADP	-Adenozin Difosfat
ATP	-Adenozin Trifosfat
6-ANOC	-6-amino-4-nitro-o-cresol
4-ANOC	- 4-amino-6-nitro-o-cresol
3-ANSA	-3-amino-5-nitro-salisikası
6-AcANOC	-6-asetoamid-4-nitro-o-cresol
AOPs	-Advanced Oxidation Processes
b.w.	-body weight
CDNB	-1-chloro-2,4-dinitrobenzene
cytP450	-Sitokrom P450
cm <sup>3</sup>	-Santimetre Küp
DAcAOC	-4,6-diacetoamido-o-cresol
DNHMP	-4,6-hidroksimetilfenol
DNOC	-4,6-dinitro-ortho-cresol
DNP	-Dinitrofenol
DSF	-Disülfiram
DDTC	-Dietilditiyokarbomat
DHYAM	-Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi
DNA	-Deoksiribonükleik Asit
gr	-Gram
GSH	-Glutasyon
GST	-Glutasyon S-Transferaz

kg	-Kilogram
kDa	-Kilodalton
L	-Litre
LD <sub>50</sub>	-Canlıların %50'sini Öldüren Letal Doz
M	-Molar
m <sup>3</sup>	-Metreküp
mg	-Miligram
mmHg	-Milimetre Civa
mRNA	-Messenger Ribonükleik Asit
NH <sub>3</sub>	-Amonyak
ngm <sup>-3</sup>	-Nanogram/metreküp
µgL <sup>-1</sup>	-Mikrogram.litre
µgml <sup>-1</sup>	-Mikrogram.mililitre
µM	-Mikromolar
rpm	-Dakikadaki Devir Sayısı ( Revolution Per Minute)
SCE	-Sister Chromatid Exchange
SF	-Serum Fizyolojik
SPSS	-Statistical Package for the Social Sciences
°C	-Santigrat Derece
UDP	-Uridil Difosfat
U.S. EPA	-U.S. Environmental Protection Agency
WHO	-World Health Organization
α	-Alfa
γ	-Gama
β	-Beta
μ	-Mü



$\pi$	-Pi
U.V.	-Ultra Violet
LC-MS	-Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
MS-MS	-Çift Kütle Spektrometresi.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	DNOC'un Tavşan ve Sıçanlarda Biyotransformasyonu.....	9
Şekil 2	Sitosolik GST Enzimleri.....	17
Şekil 3	GST Enziminin Görevleri.....	22
Şekil 4	Okside Glutatyon.....	26
Şekil 5	DNOC'un Erkek Sıçanlarda Karaciğer Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi.....	34
Şekil 6	DNOC'un Dişi Sıçanlarda Karaciğer Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi.....	35
Şekil 7	DNOC'un Erkek Sıçanlarda Böbrek Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	36
Şekil 8	DNOC'un Dişi Sıçanlarda Böbrek Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	37
Şekil 9	DNOC'un Erkek Sıçanlarda Beyin Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	38
Şekil 10	DNOC'un Dişi Sıçanlarda Beyin Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	38
Şekil 11	DNOC'un Erkek Sıçanlarda İncebağırsak Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	39
Şekil 12	DNOC'un Dişi Sıçanlarda İncebağırsak Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Zamana Bağlı Değişimi .....	40

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 1. GST Enziminin Aminoasit Analizi (mol başına).....	18
Çizelge 2. Enzim Aktivite Tayini için Deney Karışımı.....	32
Çizelge 3. Serum Fizyolojik Kontrol ve DNOC'un Karaciğer ve Böbrek GST Enzimi Üzerine Etkisinin Zamana ve Cinsiyete Göre Değişimi.....	41
Çizelge 4. Serum Fizyolojik Kontrol ve DNOC'un Beyin ve İncebağırsak GST enzimi Üzerine Etkisinin Zamana ve Cinsiyete Göre Değişimi.....	42



# 1. GİRİŞ

Dinitrocresol, doğada kendiliğinden oluşmayan bir çeşit kimyasal maddedir. 18 farklı dinitrocresol vardır. Ticari önem taşıyan ise 4,6 dinitro-*ortho*-cresol (DNOC)'dür.

DNOC; insektisid, fungusid, herbisid gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Eskiden endüstride boya maddesi olarak da kullanılmıştır. 1930'lu yıllarda DNOC, zayıflama hapı olarak kullanılmış fakat bu şekilde kullanılması yasaklanmıştır. Önceleri tahıl bitkilerinde dormant formların yayılımını engellemek için kullanılmıştır. DNOC, ayrıca serbest radikal inhibitörü olarak kullanılır. Antionin, Detal ve Dinitrol isimleri altında ticari maksatlı satılmaktadır.

DNOC, havaya, toprağa ve suya geçebilmektedir. Havada, suda ve toprakta yavaşça mikroorganizmalar tarafından yıkılabilmektedir. Yıkım oranları çalışılmış ve ilk olarak toprağın DNOC tarafından etkilendiği gözlenmiştir. DNOC toprakta depo edilebilir ya da partiküllerle birleşerek toprak suyunun çok fazla derinliklere gitmesini engelleyebilir. Normal pestisit oranlarında uygulanıp toprakta serbest hale geçerse birkaç haftadan iki aya kadar kaybolmaktadır. Biyolojik yıkımı muhtemelen tarımsal topraklar işlenirken olmaktadır. DNOC, düşük konsantrasyonlarda bile toprak mikroflorasının CO<sub>2</sub> oranının artmasına neden olmaktadır.

4,6 dinitrol-*ortho*-cresol kökenli insektisidol spreyler muhtemelen kullanıldıkları yerlerde çevreyi büyük oranda etkilemektedir. Ayrıca kimyasal fabrikalar tarafından da atık sulara geçerek çevreyi etkilemektedir. Suda serbest olduklarında direkt fotolizise girmektedir. Peroksil radikallerinden dolayı fotooksidasyonda 58 günde yarı ömrünü tamamlamaktadır. DNOC fotolizis ile 290 nm'de yüksek absorpsiyon vermektedir. Sudaki hidrolizi, uçuculuğu, biyokimyasal konsantrasyonu ve sedimentlere adsorbe özelliğinden dolayı sucul ortamda da önemli etkide bulunmaktadır.

DNOC havaya kolay buharlaşmaktadır. Atmosferde  $1,05 \times 10^{-4}$  mmHg buhar basıncında 25°C'de ya buhar fazında ya da partiküllere adsorbe fazında bulunmaktadır. Buhar fazında hidroksil radikalleri hızlı bir şekilde reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Buhar fazında yarı ömrünün 8 saat olduğu tahmin edilmektedir.

Genelde popülasyonlar meyvelere ya da sulara geçmiş DNOC'u ağız yoluyla almaları ile etkilenir. Bununla beraber insanlar yiyecek maddelerine geçmeden de pestisit olarak, meyve ağaçlarına kullanma döneminde solunum yoluyla etkilenebilirler. Ayrıca DNOC yapıldığı ya da kullanıldığı çalışma yerlerinde deri ve solunum yoluyla insanları etkileyebilmektedir. Yine insanlar toprak ya da su kenarındaki DNOC ile kirlenmiş yerlerden dokunma sonucu, deri yoluyla etkilenebilmektedir (WHO, 2000).

Canlılarda pestisitlerin etkilerini, dokularda neden oldukları tahribatlar ve bu dokulardaki enzim aktivitelerinde gözlenen değişikliklerden anlayabiliriz. GST şeklinde sembolize edilen Glutatyon S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzimi, detoksifikasyon metabolik yolunda, suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek, homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. GST enzimi; memelilerde, böceklerde, balıklarda, bitkilerde, Crustacea'da, Planaria'da ve mikroorganizmalarda ve bu organizmaların bazı dokularında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, sıçanlara (*Rat rattus norvegicus*) DNOC uygulaması sonrasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alan ve faz II enzimlerinden biri olan GST aktivitesinin farklı dokulardaki değişimi incelenmiştir.

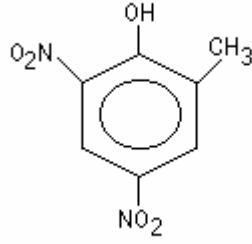
## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. DNOC

#### 2.1.1. DNOC' un Bazı Genel Özellikleri

DNOC (4,6 dinitro-ortho-cresol); doğada kendiliğinden oluşmayan sarı renkli, katı ve kristal yapıda bir kimyasaldır.

Molekül yapısı:



Kimyasal Formülü :	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Fiziksel Formu:	Sarı renkli kristal, katı
Mol kütlesi :	198,13gr/mol
Kaynama noktası :	312°C
Erime noktası :	88,2–89,8 °C
Sudaki çözünürlük :	6,94 gr/lt (20°C ve pH:7'de)
Buhar basıncı :	1,6 x10 <sup>-2</sup> Pa ( 25°C )
Buhar yoğunluğu :	6,84 (air=1)
Bağıl yoğunluk :	1,58 ( 20°C )
Doymuş buhar yoğunluğu:	0,56 – 1,0 mg/m <sup>3</sup> ( 20 – 25 °C )
Ayrırma sabiti :	4,48 ( 20°C )
PKa : 4,9 ve ph limitleri :	3-3,85
Yanabilirlik :	10 °C-400 °C
Fotolizis :	PT <sub>50</sub> > 253 saat (20°C)

### 2.1.2. Kullanım Alanı ve Etkileri

DNOC ilk defa 1892 yılında insektisid olarak, 1932 yılında da herbisit olarak kullanılmıştır (Gasiewicz, 1991). Pek çok ülkede meyve bahçelerinde, çeşitli böceklerin dormant formlarına karşı akarisit, larvasit ve ovisit olarak kullanılmıştır. DNOC, plastik endüstrisinde styrene ve vinil aromatik bileşiklerin polimerizasyon inhibitörü olarak da kullanılmaktadır (Hawley, 1981; US EPA 1988).

DNOC'un pestisit olarak kullanımı azaltılmış hatta bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Gelişmekte olan bazı ülkelerde önemli miktarlarda DNOC, halen stok edilmektedir. 57.6 ton DNOC, The German Agency For Technical Cooperation (GTZ) tarafından Birleşik Tanzania Cumhuriyetinde çimento fırınında yakılmıştır. 14 tondan fazla DNOC, halen Zambiya'da bulunmaktadır (GTZ,1997). Kanada'da yıllık DNOC tüketimi 100-1000 ton arasındadır (Environment Canada 2001). Diğer ülkelerdeki DNOC tüketimi yaklaşık aynı oranlarda olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2000)

Dinitrocresol'ün sağlık üzerine etkileri hakkında en çok bilgi DNOC'un zayıflama hapi olarak kullanıldığı dönemde yapılmıştır. Yüksek düzeyde alındığında kısa periyotta şuur kaybı ve ölüme neden olmaktadır. Düzeyi azaltıldığında metabolik faaliyetler artar, terleme ve kilo kaybı fazlalaşır, soluk alıp verme ve vücut sıcaklığında artış farkedilir. DNOC'un diğer etkileri ise soluk almada zorluk, baş ağrısı, halsizlik, baş dönmesi, deride sarılık, gözde beyazlama, mide, karaciğer ve böbrekte hafif hasarlar şeklindedir. Uzun periyotta ise katarakt ve deride kızarıklıklara neden olur.

Sağlık bölümü ve insan servisi, Kanser Araştırma Acentası ve EPA, DNOC'u bir kanserojen olarak sınıflandırmamıştır. DNOC'un kanserojenik etkisi üzerine, insan ve hayvanlarda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

DNOC'la karşı karşıya kalındığını, deri ve gözdeki sarı lekeler gösterir. Fakat bu belirtilere başka kimyasallarda neden olmuş olabilir. Kanda, idrarda ve dışkıda DNOC miktarını ölçen hazırda testler vardır. Uzun süreli etkileri için bu testler güvenli olmayabilir. Bu testler için özel aletler ve kullanabilme kabiliyeti gerekmektedir (WHO,2000).



DNOC dahil cresoller; atmosferde  $\text{ngm}^{-3}$  olarak bulunur. Atmosferde değişik fazlarda (yağmur, sis, kar)  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ 'ye kadar olabilir (Trempe ve ark. 1993).

Walter Schüssler ve Lutz Nitschke (2001); 1995 ve 1998 yılları arasında Bavaria (Almanya)'nın sekiz değişik bölgesinde yağışlardaki 4-nitrofenol, 2-metil-4-nitrofenol, 3-metil-4-nitrofenol, DNOC ve 2,4-dinotrofenol konsantrasyonlarını HPLC ile aylık olarak ölçmüşlerdir. Sıcaklığı  $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan ve değişik sensörlerle her saat elektronik olarak ölçülen yağmur suyu örnekleri bilgisayarla toplanmıştır. En yüksek nitrofenol konsantrasyonu; 4-nitrofenol için ölçülmüştür. Diğer nitrofenollerin ortalaması  $0.2 - 0.8 \mu\text{gL}^{-1}$  arasındadır.

Pestisitlerin hazırlanması, taşınması ve traktörlerle atılması esnasında pestisitler çevreye dağılabilmektedir. Solüsyonun doldurulurken taşması, traktörden akma ya da damlama biçiminde de çevre kirliliğine neden olmaktadır.

Danimarka'nın Storstrom ve Bornholm şehirlerinde yer altı suyundan (2-4mlik kısımdan) alınan örneklerde DNOC'ta dahil olmak üzere 23 ila 46 farklı pestisit ve metabolitleri bulunmuştur. Bütün yer altı suyu örneklerindeki pestisit miktarı Avrupa içme suyu standartı seviyesinin üstünde bulunmuştur ( $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Pestisitlerin hazırlanma ve taşınma bölgelerinde yapılan analizlerde en yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu bölgelerdeki ölçümlerde dichlorprop  $750 \mu\text{gL}^{-1}$  ve 2,4-D  $800 \mu\text{gL}^{-1}$  olarak saptanmıştır. Bentazone, mecoprop ve dinoseb gibi pestisidler yine yüksek konsantrasyonlarda ( $5-60 \mu\text{gL}^{-1}$ ) saptanmıştır. 0-10 cmlik toprak yüzeyinde yapılan ölçümlerde ise 24 farklı pestisit ve metabolitleri  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  civarında tespit edilmiştir (Arne Helweg ve ark. 2002).

DNOC'un yağmurda (Leuenberger ve ark.,1988; Alber ve ark.,1989) ve karda (Alber ve ark.,1989) bulunduğu gösterilmiştir. DNOC'un atmosfere girme yollarından biri, tarımsal alanda sprey şeklinde kullanılmasıdır. Yıl içerisinde yağan yağmur ve o yağmurdaki DNOC miktarı, sezon içerisinde ürünlere uygulanan DNOC miktarını göstermez. Bu incelemeler ve DNOC'un düşük buhar basıncı, atmosfere değişik mekanizmalarla girdiğini gösterir.

1997-2001 yılları arasında Flemish Çevre Ajansı (FEA), Belçika Flanders'ta yağmurdaki pestisitleri incelemek amaçlı bir izleme programı başlatmıştır. Yapılan

incelemeler sonucunda, pestisitler içinde yüksek oranda alfa ve beta endosülfan, endosülfan sülfat, gama-HCH(lindane), dichlorvos, atrazin, diuron, DNOC, AMPA ve isoproturan tespit edilmiştir.

DNOC'un topraktaki adsorpsiyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. DNOC, toprakta metabolize edilir. Toprağın pH'sına bağlı olarak parçalanma hızı değişir. *Arthrobacter* türü bir bakteri, nitrojen ve karbon kaynağı olarak kullanır. Ayrıca *Corynebacterium simplex* tarafından da hızlı bir şekilde toprakta inaktive edilir.

1966 yılında Tewfik ve Evans adlı araştırmacılar, topraktaki DNOC'u parçalayabilen *Pseudomonas* türü izole etmişlerdir. DNOC, *Rhizobium*'un 31 türü ve *Azotobacter*'in 5 türü tarafından parçalanır (Hamdi ve Tewfik, 1970). Mikrofloranın nitrojen fiksasyonu açısından önemlidir.

Şubat 1970'te Y.A. Hamdi ve arkadaşları DNOC'un *Rhizobium* ve *Azotobacter ssp.* tarafından degregasyonunu incelemişlerdir. DNOC'un parçalanma ürünü olarak başlıca 3-amino-5-nitro-o-cresol'ün oluştuğu, kromatografi yoluyla gösterilmiştir. Diğer iki ürün kültürde 3 gün sonra, diğer ikisinde kültürde 7 gün sonra ortaya çıkmıştır. Rf değerleri ve optik yoğunluk, bu bilinmeyen bileşenlerin olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre DNOC; *rhizoba* tarafından redüktif yolla parçalanır.

1995 yılında Bieber tarafından 3 değişik standart toprak içinde DNOC'un bozunmasını 20°C'de karanlıkta, toprağa 409 mg <sup>14</sup>C işaretli DNOC/kg (kuru ağırlık) uygulama hızında 88 gün boyunca vermiş ve inceleme çalışması yapmıştır. Bu, 5 kg DNOC/ha hızı alanına eşdeğerdir. Toprak çeşidine göre 1, 5, 7, 9. ve 12. günlerde DT<sub>50</sub> tespit edilmiştir. Aromatik halkanın asıl parçalanma ürünü olan karbondioksit, uygulanan radyoaktif dozun %39'unu gösterir. Asıl uçucu olmayan, metabolik olan 2-metil-4-nitrofenol, 10. ve 20. günler arasında uygulanan ve daha sonra azaltılan radyokarbonun %40'ını gösterir. Organik çözücülerle ekstraksiyondan sonra, topraktaki bağlanmış çökeltelerin miktarı bu çalışma süresince %37'ye yükselmiştir. Toprakta DNOC'un bozunma ürünü olarak 2-metil-4-nitrofenol'un varlığı Verheij ve Van Der Graaf (1995) tarafından sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi (LC-MS) bileşimi ve çift kütle spektrometresi (MS-MS) ile kanıtlanmıştır.

DNOC, pestisit olarak kullanılan Kaliforniya'da 5 yeraltı suyu örneğinde maksimum  $35\mu\text{gL}^{-1}$  konsantrasyonunda belirlenmiştir. Ayrıca Danimarka'da belirlenen bir alanda gölcükler, dereler ve yeraltı sularında 2 yılı aşan bir periyotta çalışma yapılmıştır. 38 yer altı suyu örneğinde biri hariç diğerlerinde  $0,05\mu\text{gL}^{-1}$ , 9 göl suyu örneğinde ikisi hariç diğerlerinde  $0.12-0.18\mu\text{gL}^{-1}$  (Mogensen ve Spliid, 1995) olarak bulunmuştur. Ayrıca Malezya'daki Klang ırmağında  $3,2$  ile  $78,8\mu\text{gL}^{-1}$  olarak bulunmuştur (Tan ve Chang, 1993).

### 2.1.3. Kinetiği ve Metabolizması

DNOC çok az miktarda deri yoluyla absorbe olabilir. Solunum yoluyla alınabilir. Deri yoluyla öncelikle tarım alanında çalışanlar etkilenirler. DNOC'un metabolik yolu pek çok geniş getirmeyen memelide incelenmiştir. Geviş getiren memelilerde kana absorbe olmadan önce rumendeki bakteriler tarafından metabolize edilir.

1970 yılında Froslie ve Karlong ve 1973 yılında Froslie geviş getiren hayvanlarda (sığırlarda) DNOC'un intra-ruminal uygulama ile methemoglobin anemiye neden olduğunu göstermişlerdir. Aminofenol ve diaminofenol olarak bilinen methemoglobin oluşturan bileşiklerin rumendeki mikroflora tarafından indirgendini belirtmişlerdir.

1993 yılında Fabrequettes, derisi tıraş edilen erkek ve dişi sıçanlarda tek doz DNOC uygulaması yapmış ve derideki absorpsiyonu incelemiştir. Su bazlı ve yağ bazlı olmak üzere iki formülasyon kullanmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki; su içinde çözünen DNOC, sıçan derisinde limit düzeyde absorbe olmuştur. Uygulanan doz, plazma konsantrasyonunda sadece %2.5'lük ( $14-17\mu\text{gml}^{-1}$  kanda) bir pik meydana getirmiştir. Plazmadaki bu yükselme dişilerde 24 saat ve erkek sıçanlarda 48 saatte meydana gelmiştir. Ortalama  $t_{1/2}$  absorpsiyon zamanı (uygulanan DNOC'un %50'sinin kana geçmesi için gerekli zaman) erkekler için 15 ve dişiler için 13 saattir. Ortalama  $t_{1/2}$  eliminasyon zamanı (kandaki DNOC konsantrasyonunun % 50'ye düşmesi için gerekli zaman) ise 24 saattir. 96 saat sonra %1'den daha az miktarda kalır. Yağda hazırlanan DNOC aynı şartlarda uygulandığında erkeklerde %5.0 ve dişilerde %5.8

(38–45 µgml<sup>-1</sup> kanda) oranında plazma konsantrasyonunda görülür. Plazmada erkeklerde 8 saat ve dişilerde 24 saat sonra ortaya çıkar. Ortalama t<sub>1/2</sub> absorpsiyon zamanı 2.8 saat ve ortalama t<sub>1/2</sub> eliminasyon zamanı 34 saattir. Sonuç olarak, DNOC yağ ile verildiğinde, suyla verilmesine oranla deriden daha çabuk absorbe olur ve plazma konsantrasyonunda daha hızlı yükselir.

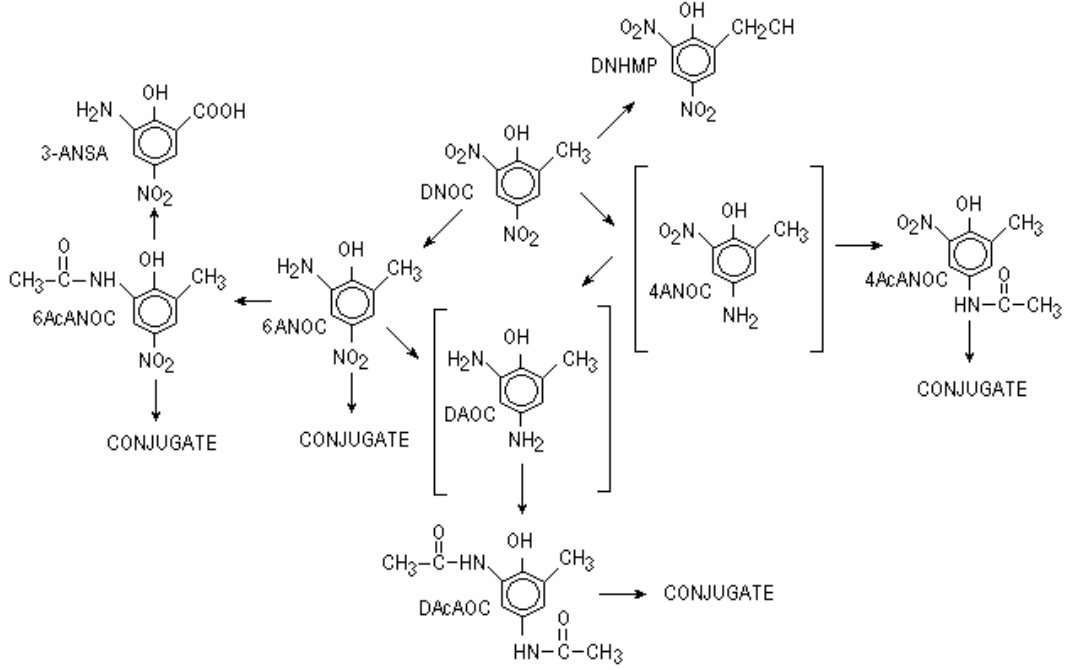
Deneysel çalışmalar göstermiştir ki DNOC; kanda diğer dokulara oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. 1951 yılında Parker ve ark., kanda bulunan DNOC'un %90'dan fazlasının plazmada olduğunu belirlemiştir. DNOC oral yolla verildiğinde laboratuvar hayvanlarının kanında, insana göre daha az bir artış gösterir. Bu hayvanların eliminasyon hızlarının yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir.

#### **2.1.4. Biyotransformasyonu**

DNOC ve Dinoseb, diğer serbest dinitrofenoller gibi indirgenme yolu ile metabolize olurlar ve böylece daha az toksik aminonitrofenoller oluşur.

Yapılan çalışmalara dayanarak; sıçan ve tavşanlarda DNOC'un aynı metabolik yolla metabolize edildiği söylenebilir. Tavşanlara tek oral doz DNOC uygulaması yapıldığında %1 oranında DNOC, 2 gün sonunda idrarla vücuttan atılır. Başlıca metabolik yolda DNOC; 6-amino-4-nitro-o-cresol'e (6-ANOC) indirgenir. 6-ANOC, DNOC'tan 20 kat daha az toksik etkili bir maddedir. Daha az miktarda 4-amino-6-nitro-o-cresol (4-ANOC) oluşur. 6-ANOC, üriner içerikte uygulanan dozun %11-12 'si kadar bulunur. Daha küçük miktarlarda diğer metabolitler 4-ANOC ve oksidatif yolla oluşan 3-amino-5-nitro-salisikasit (3-ANSA) üre ile dışarı atılır (Smith ve ark. 1953).

Leegwater ve ark. (1982); Van Der Greef ve Leegwater (1983) adlı araştırmacılar daha önce tanımlanan metabolitlere benzer 2 yeni metabolit daha bulmuşlardır. Sıçan ve tavşanlara tek oral doz uygulaması yapıldığında, idrarlarında 4,6-diacetamido-o-cresol (DAcAOC) ve 4,6-dinitro-2-hidroksimetilfenol (DNHMP) tespit edilmiştir.



Şekil I. DNOC'un Tavşan ve Sıçanlarda Biotransformasyonu (WHO 2000)

İn vitro yapılan çalışmalarda (Ingebritsen ve Froslie, 1980), DNOC sıçan kör bağırsak içeriği ile inkübe edildiğinde hızlı bir biçimde 6-ANOC'a indirgendiği tespit edilmiştir. 6-ANOC ise DAOC'ye dönüşür. 12 saat sonra DNOC'un başlangıç konsantrasyonunun % 90 'ı DAOC'ye metabolize edilir.

Geniş getiren hayvanlarda, intra-ruminal uygulamada DNOC, methemoglobin anemiye neden olmaktadır. Bu etki rumendeki mikroflora tarafından, methemoglobin oluşturan aminofenol ve diaminofenol bileşiklerinin azalması sonucu meydana gelmektedir (Harvey,1958; Froslie ve Karlog,1970; Froslie 1973).

Braunberk T. ve ark.'ı (1991) DNOC'un subletal etkisi ile yılan balıklarının (*Anguilla anguilla*) karaciğerlerinde biyotransformasyon oluşumu hakkında biyokimyasal bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda nükleik asitlerde değişim, tanecikli endoplazmik retikulum fonksiyonunda azalma, düz ER, mitokondri ve peroksizomda değişim, özellikle mitokondri membranında değişimler, peroksizom matriksinde kristallenme, total protein ve lipid miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mitokondriyal sitokrom-c-oksidad, peroksizomal katalaz, allantoinaz, urikaz ve mikrozomal esteraz enzimlerini stimüle etmektedir. NADPH-cyt-c redüktaz ve cytP<sub>450</sub> 'de artış olmaktadır.

### **2.1.5. Eliminasyonu ve Vücuttan Atılması**

DNOC idrarda serbest DNOC olarak ve asetillenmiş konjuge 6-ANOC, konjuge 6-asetoamid-4-nitro-o-cresol (6-AcANOC) halinde atılır (WHO, 1982). Sıçanlara tek doz oral yolla uygulandığında eliminasyon yarı ömrü 1-1.5 gün olarak saptanmıştır (Leegwater ve ark.,1982). Bu bilgiler King ve Harvey'in (1953) yaptıkları çalışmalarla uyusmaktadır. 9 gün boyunca tek oral doz DNOC verildiğinde yarılanma ömrü dişi sıçanlarda 26.8–28.5 saat olarak saptanmıştır. Dişi tavşanlarda yarılanma ömrü yaklaşık 6.5 saat olarak tespit edilmiştir. İnsanlarda tekrarlı doz uygulamalarından sonra kandaki DNOC seviyesindeki artış laboratuvar hayvanlarından daha fazladır. Çünkü insanlarda diğer hayvanlara göre vücuttan daha yavaş atılır. İnsanlarda yarılanma ömrü 96 saatten 148 saate ya da 153.6 saat olarak saptanmıştır. (Van Noort, 1960; Jastroch ve ark., 1978; Pollard ve Fillbe, 1951).

DNOC'un yarılanma hızı Lawford ve ark. (1954)'na göre:

Fare > tavşan > kobay > sıçan = maymun > insan 'dır.

### **2.1.6. Vücut Bileşenleri ile Reaksiyonu**

Erkek kobaylarda LD<sub>50</sub> dozunun üçte biri 30 gün boyunca haftada 6 kez intraperitoneal yolla verildiğinde karaciğer ve serumlarında amino şeker ve sialik asit

seviyelerinde önemli yükselmeler görülmüştür. Albümin ve  $\alpha_2$ -globülin fraksiyonlarında glikoprotein içeriğinde azalma, bununla beraber serum  $\alpha_1$  ve  $\gamma$ -globülin fraksiyonlarının glikoprotein içeriğinde bir artma gözlenmiştir. DNOC; glikolizis hızını arttırır, lizozomal membranların stabilitesini bozar ve glikoproteinlerin şeker biyosentez hızını arttırır (Kreczko ve ark. 1974).

1991 yılında Van den Berg ve ark. in vitroda DNOC'un plazma proteini olan transthyretin'in tiroksin bağlanma bölgesi ile yarış içinde olduğunu göstermiştir. Bu plazma proteini vitamin A ve T4 gibi bazı hormonları taşımaktadır. DNOC kan plazmasında tiroid hormonu seviyesini ve tiroid fonksiyonlarını etkilemektedir.

### **2.1.7. Toksik Etki Metabolizması**

Elektron transport sistemi ve fosforilasyon birbirine çok sıkı bir şekilde bağlıdır. DNOC, oksidasyonu solunumun fosforilasyon zincirinden ayırır (Judah, 1952; Ilivicky ve Casida, 1969; Moreland, 1980). ADP'nin ATP'ye fosforilasyonu engellendiğinde elektron transferi de engellenir. Çünkü enerji uzun süre ADP şeklinde zapt edilemez. ATP'ye döndürülmesi gerekir. Sonuç olarak kalp, kas gibi kritik organlardaki ATP eksikliği hayati fonksiyon kayıplarına neden olabilir. Oksijen tüketimi ve ısı şeklinde enerji oluşumu artar. DNOC'un farmakolojik ve toksikolojik etkisi, aşırı oksijen tüketimi ve enerjinin ısı şeklinde yayılmasıdır.

Katabolik süreçte, glikolizis, glikojenolizis ve yağ asidi metabolizmalarında DNOC'un kobaylarda in vivo doz çalışmaları yapılmıştır (Harvey, 1959). Oksijen tüketimindeki artış sadece memelilerde değil, kuş ve arıda da gözlenmiştir (Parker ve ark., 1951). Enerjinin ısı şeklinde dağılması vücut sıcaklığını arttırır, bunu takiben pek çok hipertemi meydana gelir. Kaslarda ATP noksanlığı yüzünden felçler oluşabilir. DNOC zehirlenmesi sonucu ölüm ve erken rigor motris görülür.

Roger F. Castillo ve ark.'larının (1997) yaptıkları bir çalışmada DNOC'un sıçan karaciğer mitokondrisinde oksidatif fosforilasyona bağlı olmaksızın, membran permeabilitesine olan etkisini araştırmışlardır. ADP'nin varlığında ya da yokluğunda

oksidatif fosforilasyona bağlı olmaksızın mitokondriyal solunumu arttırdığını ve transmembran potansiyelinde bir azalma yarattığını öne sürmüşlerdir.

DNOC'un farmakolojik etkisi, vücut ağırlığında azalma şeklinde incelenebilir. Normal ya da fazla besin tüketildiğinde yağ asitlerinin parçalanma hızı artar. Lipogenezis inhibe olur, glikolizis ve glikojenolizis artar (Gasiewicz, 1991).

1998 yılında Vicente JAF ve ark., DNOC'un patates yumru mitokondrisinde biyoenerjetik aktivite üzerine etkisini ve kimyasal benzeri olan DNP (dinitrofenol) ile toksik etkilerinin karşılaştırma çalışmalarını yapmışlardır. Düşük konsantrasyonda (<100µM) DNOC, bitki mitokondrisinde süksinat destekli solunumu stimüle etmektedir. DNP'den daha etkili bir biçimde trans membran elektrik potansiyelini bozmaktadır. DNOC, bitki mitokondri membranının protonlara karşı daha geçirgen hale gelmesine neden olmaktadır (protonophore). DNOC yüksek konsantrasyonlarda ise (>100µM) DNP'den daha etkili protonophore ve solunum inhibitörü olarak etki eder. DNOC'un etkisi azaldığında mitokondrial protein miktarı artar. Aynı etki hayvanlarda da görülmektedir. Sıçan karaciğer mitokondrisi, bitki mitokondrisinden daha fazla oranda DNOC'tan etkilenmektedir. DNOC'un sahip olduğu metil grubu ayırma ve inhibitör etkisini güçlendirmektedir.

Aralık 2004'te M. Nehez ve ark. fareler üzerinde in vivo olarak yaptıkları çalışmada, bir grup fareye bir yıl boyunca DNOC içeren herbisit uygulamış ve kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonlarının arttığını gözlemişlerdir. Kromozom aberasyon frekansı ölçülen bir sonraki jenerasyonda, bir grup erkek fareye çiftleşmeden önce DNOC uygulaması yapılmamıştır. Diğer gruba ise, kemik iliği hücrelerindeki kromozom aberasyonlarını kanıtlamak amacıyla DNOC uygulamasına bir yıl daha devam edilmiştir. Uygulamadan sonra erkek sıçanların sonraki jenerasyonunda embriyodaki kromozom aberasyonunun arttığı, uygulama kesildiği anda sonraki jenerasyonda ise kromozom aberasyonunun azaldığı görülmüştür.

Grilli S. ve ark.'ları (1991) sıçan hepatositlerinde, intraperitoneal yolla verilen amitraz, cyanazine, cyhexantin, DNOC ve fenarimol'ün in vivo da DNA'ya olan etkilerini incelemişlerdir. Fenarimol ve DNOC; DNA hasarlarına, kırıklarına neden



olmuştur. Amitraz, cyanazine ve cyhexantin DNA hasarlarına neden olmadığını gözlemişlerdir.

Patrizia Hrelia ve ark.'ları (1994) DNOC, Cyanazine, Cyhexatin ve dicamba'nın insandaki etkilerini periferik lenfosit hücrelerinde USD ve SCE ölçümü ile kromozom aberasyon analizini ise, sıçan kemik iliğinde DNA hasar aktivite ölçümü ile belirlemişlerdir. Cyanazine'nin genotoksik etkisinin olmadığı, cyhexatin'nin insan lenfosit hücrelerinde SCE analizi sonucu düşük pozitif etkiye sebep olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca DNOC; sıçan kemik iliği hücrelerinde doza bağlı önemli kromozom aberasyonlarına sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle dişi sıçanlarda yüksek dozda DNOC'un toksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Aralık 1989'da Quinto ve ark.'ları DNOC, Ferbam ve Imidan'ın testisler üzerindeki potansiyel toksik etkilerini farelerde incelemişlerdir. 5 gün boyunca farklı dozlarda uygulanmış ve 35 gün sonunda testislere olan toksik etki; testis ağırlığı, sperm sayısı ve anormal spermeler incelenerek değerlendirilmiştir. DNOC ve Imidan farelerde teratospermia'ya neden olduğu görülmüştür.

Kasım 2003'de Japonya'da Takahashi ve ark.'ları DNOC'un sertoli-germ hücreleri üzerine olan etkileri üzerine çalışmışlardır. DNOC yüksek konsantrasyonda uygulandığında, eşey ve sertoli hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Spermatozoidler fagositoz ile dejenere olmuşlardır. Bu çalışma ile DNOC'un testislerde toksik etkili olduğu in vitro olarak gösterilmiştir.

Takahashi ve ark. 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada DNOC'un erkek sıçanlarda sperm toksisitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Oral yolla 0, 10, 15 mgkg<sup>-1</sup> dozlarında 5 gün DNOC uygulamasının ardından caput, corpus ve cauda epididimisten toplanan spermeler sayılmış ve morfolojilerine faz-kontrat ve elektron mikroskopunda bakılmıştır. Anormal sperm sayısında artış en yüksek DNOC uygulamasında (15mgkg<sup>-1</sup>) görülmüştür. DNOC, erkek sıçanlarda spermatidlerin uzamasına, kısmi olarak mitokondri kınının kaybolmasına ve cauda epididimiste kuyruksuz sperm oluşumuna neden olmaktadır.

Mart 2004'te Japonya'da Takahashi ve ark. sıçanlarda dinitrofenolik bileşiklerin spermato/spermiyogenezise etkilerini incelemişlerdir. DNBP 7,5 mg/kgb.w., DNOC 15

mg/kgb.w. ve DNP 30 mg/kgb.w. uygulamalarında sırasıyla 1, 5 ve 0 ölüm görülmüştür. Bunun yanı sıra vücut ağırlıklarında azalma görülmüştür. DNOC 7.5 mg/kgb.w. doz uygulamasına kadar erkek sıçanların üreme organlarına ve spermlerine etki etmemiştir. Bununla birlikte 15 mg/kgb.w. uygulamasında cauda epididimiste sperm canlılığında önemli oranda azalma, kuyruksuz sperm sayısında artış ve 5-12 arasında erkek sıçanın öldüğü görülmüş. DNOC'un spermatotoksik etkili olduğu gösterilmiştir.

Ekim 1995'te Ghillebaert ve ark.'ları tarafından sazan embriyosunda (*Cyprinus carpio L.*) yapılan çalışmada DNOC'un 3 pH düzeyinde etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda DNOC'un büyüme ve gelişme döneminde bu konsantrasyonlarda çok fazla bir etkisi olmazken, erken larval dönemde büyük bir risk oluşturup çeşitli defektlere neden olacağı bulunmuştur.

Ocak 2001'de Nigel C. Cook ve arkadaşları tarafından elma sürgünlerinde tomurcuklanma sırasında içsel sitokinin dağılımına etkisi araştırılmıştır. Sonuçta DNOC uygulandıktan sonra tomurcuklanma sırasında sitokinin miktarında artış ve buna bağlı olarak yaprak düşme oranında da artış gözlenmiştir.

## 2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimi

### 2.2.1. Tanım

GST şeklinde sembolize edilen Glutasyon S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzimi, detoksifikasyon metabolik yolunda, suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek, homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. GST tarafından katalizlenen bu ilk basamakta, Glutasyon (GSH) ile endojen ve eksojen hidrofobik elektrofillerin bağlanması gerçekleşir. GSH, GST enziminin çalışabilmesi için tepkime ortamında mutlaka bulunmalıdır. GST enzimi, GSH bağımlı çalıştığı için, GSH'a kosubstratta denmektedir. GSH dışındaki diğer substratlar, oldukça geniş bir yayılım gösterdiklerinden dolayı, GST enzimi, kısmi substrat özgülüğü gösteren bir enzimdir.

GST enzimi; memelilerde, böceklerde, balıklarda, bitkilerde, Crustacea'da, Planaria'da ve mikroorganizmalarda ve bu organizmaların bazı dokularında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. GST'nin en sık rastlandığı dokular başta karaciğer olmak üzere böbrek, incebağırsak, kalınbağırsak, akciğer ve meme gibi organlardır. GST enzimi, bu organların sitosollerinin total protein içeriğinin %5'ini oluşturmaktadır. Bu organlarda yüksek oranda bulunmasının nedeni; sözü edilen organların dışarıdan alınan ksenobiyotikler ile doğrudan temas halinde bulunmalarındır.

GST izoenzimleri, hücredeki lokalizasyonlarına göre 4 gruba ayrılmaktadır.

Sitosolik alfa sınıfı izoenzimler (GST  $\alpha$ ): pI > 8,0 (alkali)

Sitosolik mü sınıfı izoenzimler (GST  $\mu$ ): pI = 7,0 (nötral)

Sitosolik pi sınıfı izoenzimler (GST  $\pi$ ): pI < 7,0 (asidik)

Mikrozomal izoenzimler (m GST) (Boyer 1989, Waxman 1990)

GST izoenzimleri ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve dokuların oksidatif zarardan korunması için önemlidir. Bu enzimler, kemoterapik ilaçlar, çevresel karsinojenler, endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş bir spektrumunu detoksifiye ederler. Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu III farklı fazda gerçekleşmektedir. Faz I ve II lipofilik değişimi içerir. Faz III'de daha fazla suda eriyebilen nonpolar ksenobiyotikler ve dolayısıyla daha az toksik olan metabolitler hücreler tarafından daha kolay elemine edilirler. Genel olarak Faz I, sitokrom P<sub>450</sub>

sistemi tarafından katalizlenir. Faz II enzimleri, aktif hale getirilen ksenobiyotiklerin indirgenmiş glutatyon, UDP-glukuronik asit veya glisin gibi endojen olarak suda eriyebilir substrata konjugasyonunu katalizler. Ayrıca transport ve organik anyonların yükseltgenmesi gibi biyosentetik role sahiptirler (Sheehan D. ve ark.,2001; Autrup H. 2000).

Mikrozomal GST, başta karaciğer olmak üzere, birçok dokuda membrana bağlı olarak ve yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Sıçan karaciğer endoplazmik retikulum ve dış mitokondri membranının toplam protein içeriğinin %3-5'ini oluşturmaktadır (Morgenstern ve ark. 1987).

Mikrozomal GST enziminin membranda yerleşmesinin başlıca 3 nedeni olabilir:

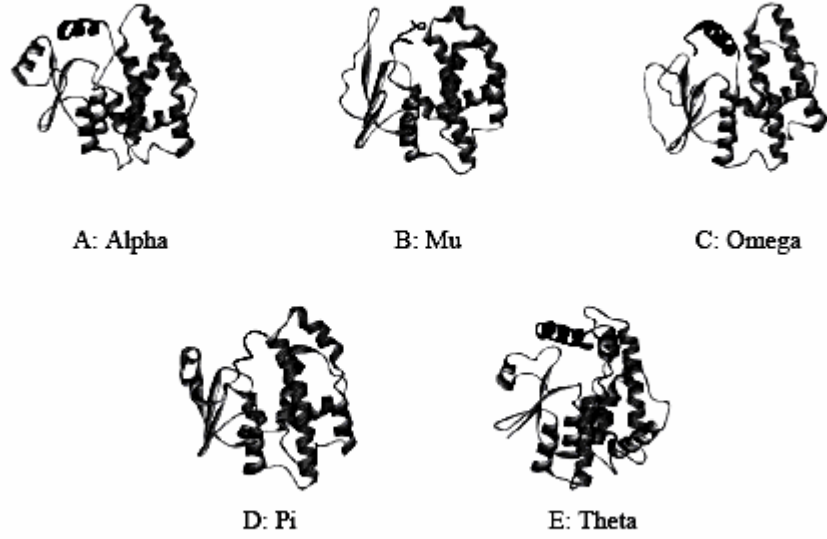
1. Çoğu ksenobiyotik, oldukça hidrofobiktir ve hücrenin belirli çözünebilir proteinlerin bağlanma yanları ve membranlarını içeren hidrofobik kısımlarda yerleşmişlerdir. Sıçan hepatositindeki endoplazmik retikulum, hücre membranını %50'sini oluşturmaktadır.

2. Sitokrom P<sub>450</sub> sistemi tarafından ksenobiyotik metabolizması esnasında oluşan, halen hidrofobik olabilen reaktif ara ürünlerin birçoğu, endoplazmik retikulum gibi hidrofobik kısımda yerleşmektedir. Mikrozomal GST, böyle elektrofilleri, sitosolik GST'den daha kolay etkileyebilmektedir.

3. Membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri arasındaki çift bağlar, oksidasyona çok duyarlıdır. (Morgenstern ve ark. 1987)

Sitosolik GST'ler pek çok endojen ve eksojen elektrofilik bileşenin glutatyon ile konjugasyonunu katalizleyen çok fonksiyonlu dimerik proteinleri içine alan bir ailedir. GST'ler ayrıca hidrofobik moleküller, demir, safra asitleri, bilirubin, polisiklik hidrokarbonların hücre içine bağlanması ve transportunda görev alırlar. Prostaglandin ve leukotriene biyosentezine katılırlar ve toksik hidroperoksitlerin eliminasyonunda anahtar rol oynarlar. Ayrıca GST hücrenin antikanser ilaçlara, herbisitlere ve pestisitlere karşı direncini sağlamaktadır. GST pek çok prokaryot ve bütün ökaryot hücrelerde bulunmaktadır. Sitosolik formları çok fazla olan GST'nin, şimdiye kadar 6 sınıfı karakterize edilmiştir. Alfa, pi, mü, teta, beta, sigma. Bütün sitosolik GST'lerin homodimer ya da heterodimer alt ünitelerinin moleküler ağırlıkları 23-27 kDa arasındadır. X-ışını kristolografisi analizlerine göre  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\beta$ ,  $\theta$  GST monomerleri

yapısal olarak benzer organizasyondadır İki domaini birbirine bağlayan kısa aminoasit artıklarından oluşur. Domain I (GSH bağlanma bölgesi) proteinin N terminal bölgesinde bulunur ve  $\alpha/\beta$  yapısındadır. Domain II ise (H bölgesi), pek çok hidrofobik yapının bağlandığı bölgedir (Bucciarelli ve ark.,1999).



Şekil 2. Sitosolik GST Enzimleri (Nilsson L. O.,2001)

Inoue N. ve ark. 1999 yılında erkek farelerde günlük 24 saatlik peryotta GST aktivitesini incelemişlerdir. CDNB'ye karşı en yüksek GST aktivitesi saat 13.00 ve 21.00'de tespit edilmiştir.

Enzimlerin yapısına katılan aminoasitlerin kompozisyonu oldukça önemlidir. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde, en fazla bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit ve lösindir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise, sıçanda çok düşük miktarlarda bulunurken, insanda hiç bulunmamaktadır.

Çizelge 1. GST Enziminin Aminoasit Analizi (mol başına) (Fleischner ve ark. 1976)

Aminoasit Adı	Sıçan	İnsan	Aminoasit Adı	Sıçan	İnsan
Alanin	25	27	Lösin	48	58
Arginin	22	23	Metionon	9	13
Aspartat	41	34	Prolin	21	21
Fenilalanin	19	18	Serin	19	20
Glisin	20	20	Sistein	5	--
Glutamat	44	52	Tirozin	18	18
Histidin	6	6	Treonin	12	6
İzolösin	20	28	Triptofan	8	--
Lizin	35	44	Valin	18	14

Her enzimin yapısında, özgül olduğu substratının bağlanabildiği bir veya birkaç katalitik bölge bulunmaktadır. GST enzimi birden fazla substratı tanıyabilme özelliğinden dolayı, kısmi özgüllük gösteren bir enzimdir. GST enzimi iki substrat bağlama bölgesine sahiptir.

**1. G Bölgesi:** GSH kosubstratına özel olan ve GSH'ın bağlandığı ceptir. GST'nin G bölgesi ile GSH interaksiyonunun öne sürülen modeline göre; GSH'ın yapısına katılan glutamat aminoasidinin amino ( $\text{NH}_3$ ) ve karboksil ( $\text{COOH}$ ) grupları ve glisin aminoasidinin karboksil grubu ile GST enziminin G bölgesindeki aminoasitler arasında meydana gelen hidrojen bağları ile bu bölgeye bağlanma gerçekleşmektedir. GSH'un tiyol grubu (SH), cebin açık olan kısmına dönük olarak yerleşmiştir. Çünkü diğer substratlara bağlanan grup, bu tiyol grubudur. GST enziminin GSH ile konjugasyonu

için tiyol grubunun pozisyonu çok önemlidir. Dolayısıyla L-sistein'in, D-sistein, L-homosistein ve L-penisilamin ile substitusyonu sonucu oluşan GSH analogları, GST için kosubstrat olarak GSH ile yer değiştirme kapasitesine sahip değildir. Bu analoglar GST tarafından kullanılmamaktadır. Çünkü GST'nin bağlayacağı substratın seçilmesinde tiyol grubu önemli rol oynamaktadır. Aktivitenin tam kaybına neden olan, GSH molekülünün tek grubu; tiyol grubudur (Anton ve ark. 1990).

**2. H Bölgesi:** Hidrofobik elektrofilik substratların, GST enziminin katalitik merkezinde bağladığı hidrofobik bölgedir. Nishihira ve ark.nın (1995 b), GSH ve CDNB substratına karşı olan katalitik aktiviteyi kompetatif şekilde inhibe eden bir GSH analogu olan S-[2-(2-floro-4-nitrofenoksi)etil]glutasyonu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, sıçan karaciğer GST $\pi$  enziminin elektrofilik substrat bağlanma bölgesini ortaya konmuştur. Çalışmalar GSH analogunun, G ve H bölgelerini içeren aktif bölgeye spesifik olarak bağlandığını göstermiştir. Analogun GST $\pi$  ile tepkimesinden sonra aminoasit dizi analizi yapıldığında, aktif bölgenin 122-128. aminoasitleri (Ala-Leu-Pro-Gly-Xaa-Leu-Lys) içerdiği gözlenmiştir. Yine GST $\pi$ 'nin H bölgesinde His 126 kalıntısının bulunduğu düşünülmektedir. Sıçan GST $\pi$  izoenziminin C terminal bölgesinin rolünü araştırmak için karboksipeptidaz A ve B ile delesyona uğratarak yapılan başka bir çalışmada, bu bölgenin 201. ve 209. aminoasit kalıntıları arasında olduğu ortaya konmuştur (Arg-Pro-Ile-Asn-Gly-Lys-Gln). Karboksipeptidaz aktivitesi ile bu yedi aminoasit çıkarıldığında, katalitik aktivite %5 oranında azalmıştır. Bu bölgedeki 9 aminoasit çıkarıldığında ise aktivite tamamen kaybolmuştur. Veriler C terminalinin, aktif bölge konformasyonunun stabilizasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bir başka çalışmada Tyr 108'in Phe ile yer değiştirmesinin  $K_{cat}$  değerini 14 kat azalttığı gözlenmiştir. Fakat H bölgesinin substrat affinitesi değişmemiştir. Tyr 108'in OH grubunun rolü, GSH'un elektrofilik substrat ile konjugasyonu gibi kimyasal bir basamak için transisyon durumunu korumak olabilir (Lo Bello 1997). Orozco ve ark. (1997), serbest enerji perturbasyon tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, Tyr 7'nin rolünün su molekülleri ile hidrojen bağı aracılığı ile hidratlaşarak, tiyolat anyonunu stabilize etmek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Böceklerdeki GST enzim ailesi, insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma sistemi olarak bilinir. Örneğin *Musca domestica*'da organofosfat grubu insektisitlere dirençli mutantların GST'nin yüksek seviyelerine sahip olduğu

bulunmuştur. (Zhau ve Syvanen, 1997). Plapp tarafından 1984'te *Musca domestica*'nın 2. kromozomunda lokalize olmuş olan genlerin organofosfatlı insektisitlere karşı direnç gösteren, GST'nin ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Kence, 1998).

Sandermann (1992), bitkilerin yabancı kimyasalları transformasyon, başlıca oksidasyon ve hidroliz (faz I), bunu takiben konjugasyon (faz II) olmak üzere 3 basamakta metabolize ettiğini ileri sürmüştür.

Suzuki ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada, çeşitli insan GST genleri ve pseudogenleri kodlayan genomik DNA'yı izole etmişlerdir. Buna göre bütün genler, sıçanlardaki  $\alpha$  sınıfı genlere benzer olarak eşit uzunluktaki 7 eksonun bağlanmasından oluşmuştur. GST A1 geni, yaklaşık 12kb. uzunlukta ve diğer  $\alpha$  gen dizisine yakındır. Pseudogenin ekson 7'si ve GST A1 geninin ekson 1'i arasındaki 17 kb.'lık intergenik bölgenin tüm dizisi belirlenmiştir. Karakterize edilmemiş bir GST  $\alpha$ 'yı kodlayan ilave bir gen belirlendi. Bu genden oluşan protein, GST A1 izoenzimine kıyasla 19 aminoasit substitusyonuna sahiptir. Ayrıca tek bazlı veya tüm ekzon delesyonlu pseudogenler belirlenmiştir.

Menegon ve ark. (1998), GST polimorfizmi ve Parkinson hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma yapmışlardır. Parkinson hastalığı, nörotoksin ve pestisitlerin neden olduğu bir hastalıktır. Pestisitleri de içine alan ksenobiyotikleri metabolize eden GST'nin Parkinson hastalığı patojenezisinde önemli rolü olabilir.

### 2.2.2. GST Enziminin Görevleri

GST enzimi, ksenobiyotikler ve belirli endojen bileşikler içeren elektrofillerin, GSH ile kovalent bağlanmasını sağlayarak detoksifikasyonuna yardımcı olur. Ayrıca besinlerle alınan toksik maddelerin, metabolik işlemleri sırasında, alınan besinlerin, besinsel değerlerini kaybettirmeksizin eliminasyonunu sağlamaktır. En önemli görevi; GSH'nin tiyol (-SH) gruplarına bağlanma şeklinde, ksenobiyotiklerdeki reaktif elektrofilik merkezlerin detoksifiye edildiği tepkimeleri katalizlemektir (Habig ve ark. 1974).



GST enziminin diğer önemli görevi; prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak, taşınmasına yardımcı olmaktır. GST, nonspesifik bir hidrofobik bir bağlanma bölgesine (H bölgesi) sahip olduğu için, nonpolar moleküller için intrasellüler bağlanma proteini olarakta rol oynamaktadır (Boyer 1989). GST'nin birçok formuna nonsubstrat ligandın bağlanması, genelde enzimatik aktivitenin kaybı ile sonuçlanmaktadır.

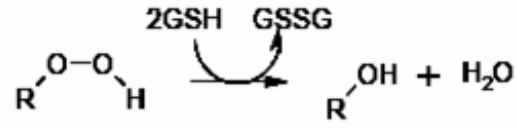
GST enzimi; klorambusil, melphalan, siklofosamid ve mitoksantren gibi çeşitli antikanser ilaçlar, hormonlar, hidrokarbonlar ve diüretik ilaç olan etakrinik asit gibi endojen metabolitleri GSH ile bağlayarak, suda daha kolay çözünür hale getirmekte, idrar ve safra yoluyla atılımını kolaylaştırmaktadır (Arias ve Jacoby 1976) .

Aynı zamanda reaktif elektrofilik bileşiklerin vücuda zarar vermesini, aynı tür bileşikleri birbirine kovalent bağlayarak da önleyebilmektedir. Ligandların birçoğu, karaciğerde GST enzimine bağlı olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla GST varlığında, bazı ligandların serbest halde bulunuşu engellenerek, steroid gibi toksik bileşiklerin karaciğere vereceği zararlar ortadan kaldırılmış olur (Puchalski ve Fahl 1990). GST, çok sayıda reseptör molekülüne, sülfür grubunu aktarabilir. Bu ksenobiyotik akseptörler içerisinde, nitrojenli, halojenli bileşikler, organofosfatlar (pestisitler dahil), polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bileşikler yer almaktadır. Ayrıca GST, oksijen varlığında lipid ve DNA'da meydana gelen zararlı uçları, DNA hidroperoksitlerin son metabolik ürünlerini, alkenol ve endojen elektrofil bileşikleri detoksifiye etmektedir (Arias ve Jakoby 1976).

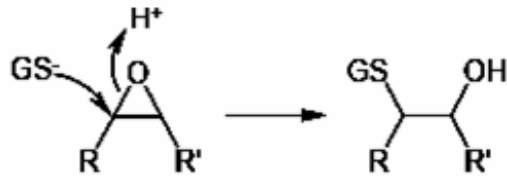
Di Ilio ve ark. (1995), florodifen, fenarimol, asiflorfen, 2,4-D, metilparation, paraquat ve pyrazophos'un  $\alpha$ ,  $\mu$  ve  $\pi$  sınıfı GST enzimleri tarafından bağlanmasını 2-p-toluidinilnaftalen-6-sülfonat (TNS) floresans inhibisyon tekniğini kullanarak, belirlemişlerdir. Her 3 enzim de pestisitleri bağlayabildiği halde,  $\mu$  sınıfı daha yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

GST enziminin etki seviyesi; organların toksik ajanlara karşı korunmasında oldukça önemlidir. Pek çok GST uyarıcısı fenoller, N-heterosiklik bileşikler, oltipraz gibi dithiothiones bileşikler birçok antikanser ilacında kullanılmaktadır. Bunların yol açtığı etki, hücreleri önemli ölçüde oksidatif strese maruz bırakabilir ve GST enzimi, hücreleri bu oksidatif strese karşı koruyabilir (Cho ve Kim 2000) .

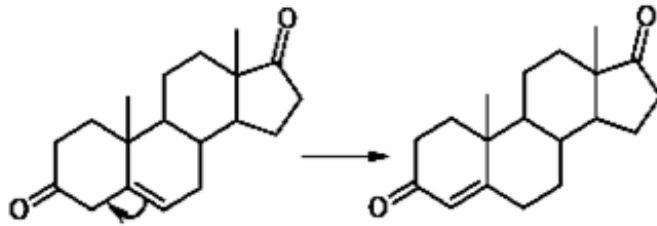
- Hidroperoksitlerin indirgenmesi



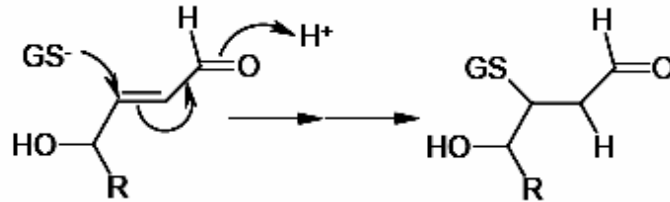
- Epoksitlerin indirgenmesi



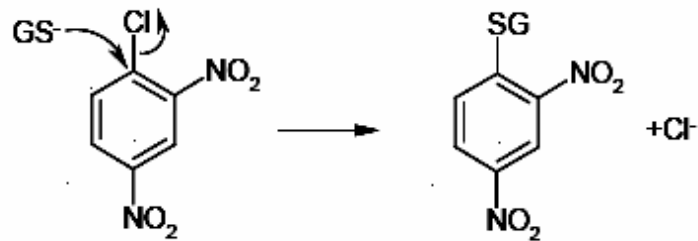
- Steroidlerin izomerizasyonu



- Başlangıç reaksiyonları



- Aromatik substitüsyon reaksiyonları



Şekil 3. GST Enziminin Görevleri (Nilsson L. O.,2001)

Aniya ve Daido (1993), sıçanda t-butil hidroperoksit, cumene hidroperoksit ve linoleik asit hidroperoksitin, karaciğer mikrozomal GST enzimi üzerine etkisini çalışmışlardır. Veriler, mikrozomal GST'in GSH'un varlığında veya yokluğunda, daha organik hidroperoksitler tarafından aktive edildiğini göstermiştir.

### 2.2.3. GST Enziminin Substrat Özgüllüğü

GST enzimi, oldukça geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir. Bir enzimin özgüllüğü, aktif bölgesinin, stereospesifik konfigürasyonundan ziyade, lipofilik bir bariyer veya bir uyarılma bariyeri tarafından korunmasına bağlıdır. Bu durum geniş substrat özgüllüğünü açıklar.

1-kloro 2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve p-nitrobenzilklorid, GST enzimi için iyi substrattır. GST enzimi bu 2 substrata karşı oldukça yüksek spesifik aktiviteye sahiptir.

GST enzimlerinin substratlarına, alifatik ve aromatik halojen nitrobileşiklerine karaciğer ekstratı düzeyinde rastlanır. GST enzimleri, bu bileşiklere karşı kalitatif ve kantitatif farklılıklar gösterirler.

GST enzimi, substratın yapısındaki moleküllerin yer değiştirmelerine de (substitusyon) duyarlıdır. Buna örnek olarak; GST'nin substitue Stirenoksit'lere karşı özgüllüğü verilebilir. Stirenoksit molekülünün değişimi, substrat aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bir nitro grubu veya halojen tarafından fenil halkasının monosubstitusyonu, aktivitede % 40–70 kayba neden olmuştur. Bu gruptaki en zayıf substrat, 4-fenil stirenoksit'tir. Oksiran halkasının 7. karbon atomundaki metil veya fenil substitusyonu, aktivitede tamamen azalmaya neden olmuştur. Cis durumu düşük aktiviteye sahipken, trans durumu yüksek aktiviteye sahiptir.

Wareing ve ark. (1993), yaptıkları çalışmalarda  $\alpha$  ve  $\pi$  sınıfı GST enzimlerinin 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'e (CDNB) karşı dirençli olduğunu, CDNB uygulaması ile GST aktivitesinin yaklaşık 1.5 kat arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, CDNB'ye dirençliliğin  $\alpha$  ve  $\pi$  sınıfı GST seviyelerindeki bir artış ile ilgili olduğunu,  $\alpha$  ve  $\pi$  sınıfı GST seviyesindeki artışın, gen amfilikasyonu veya artmış mRNA seviyelerinden değil,

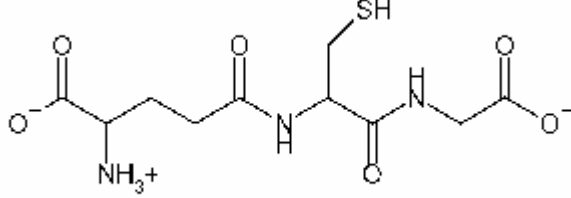
mRNA kullanımı veya protein stabilizasyonundaki değişimden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Sluis-Cremer ve ark. (1996), GST  $\pi$  üzerinde yaptıkları çalışmada, oksidatif inaktivasyondan sonra bu enzimin doğal konformasyonunu geri kazanabilme yeteneğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. GST  $\pi$ 'nin hidrojen peroksit aracılı oksidasyonun, disülfid bağlarının oluşumu ile sonuçlandığını, okside enzimin ditiyotritol veya GSH ile muamelesiyle, enzimatik yeteneğin tekrar geri kazanıldığını görmüşlerdir. Ditiyotritol uygulamasının, enzimin hidrodinamik hacmini geri kazandırdığını, protein molekülündeki sekonder ve tersiyer yapısal değişikliklerin ise halen mevcut olduğunu görmüşlerdir. Bu yüzden okside GST ve ditiyotritol uygulanmış okside GST'nin, doğal enzimden daha az termostabil olduğunu ileri sürmüşlerdir.

GST enzimi, aktif merkezinde 1'den fazla katalitik bölgeye sahiptir. (G bölgesi ve H bölgesi) ve geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir. G bölgesine bağlanan nükleofil, GSH molekülünün yapısındaki tiyol grubu; H bölgesine bağlanacak elektrofil substratın R grubu ile etkileşen ve substrat özgüllünde rol alan bir gruptur (Morgenstern ve ark. 1987).

**Glutatyon :**

Molekül yapısı



Kimyasal Formül:	$C_7H_{17}N_3O_6S$
Fiziksel Formu:	Beyaz, kristal katı
Moleküler Ağırlığı:	307,33
Erime Noktası:	192-195°C
Suda Çözünürlük:	Su, etanol, sıvı amonyak, dimetilformamitte kolay çözünür.
pH (10g/L; H <sub>2</sub> O; 20°C):	3

Glutatyon, GSH şeklinde sembolize edilen, kokoid içeren  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly dizili bir tripeptiddir. İlk defa 1921 yılında Hopkins tarafından bulunmuştur. 1935 yılında ise Harington ve Mead adlı bilim adamları tarafından  $\gamma$ -Glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir. GSH birçok hücrenin önemli bir tiyol bileşiğidir. Hücrelerdeki derişimi, 0,1-10mM arasındadır. GSH molekülündeki en önemli kimyasal aktif grup, tiyol (-SH) grubudur. GSH molekülü, 2 peptid bağı, 2 karboksilik asit grubu, 1 amino grubu ve 1 tiyol grubuna sahiptir. Yapıdaki sistein aminoasidi düşük çözünürlüğe sahiptir.  $\gamma$ -Glutamil bağlantısı, proteazların yıkımına dayanıklı molekül oluşturduğu için, GSH molekülü, birçok proteolitik aminoasidi yapıdan ayırabilir. GSH molekülünün fizikokimyasal özelliklerinden birisi, Pirie ve Pinhey adlı araştırmacılar tarafından belirlenen proton ayrılma sabitleridir. Yapıdaki önemli grupların pK değerleri şöyledir (Pirie ve Pinhey 1929)

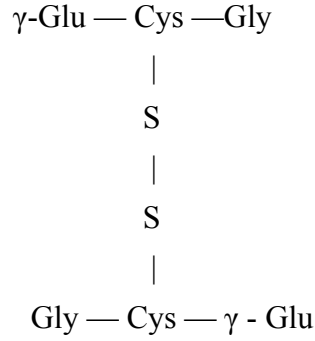
SH: 9,2

NH<sub>3</sub>: 8,6

COOH: 3,53

COOH: 2,12

GSH'nin katıldığı tepkimelerde, 2 GSH molekülü aralarında 1 disülfid bağı oluşturarak birleşmekte ve okside glutatyon (GS-SG) meydana gelmektedir. GSH'un uzunluğu 15 Å iken, GS-SG'un uzunluğu 23 Å 'dur. GS-SG, normalde bir hidrat olarak bulunan, beyaz kristal bir katıdır. Molekül ağırlığı 612,63 Da, erime noktası 178-182 °C'dir



Şekil 4. Okside Glutatyon (Nishino ve Ito 1989)

Oluşan GS-SG molekülü, pentozfosfat yolunda sentezlenen NADPH+H<sup>+</sup> ile redüklenerek, tekrar GSH molekülüne dönüştürülmektedir. Hücre toksik bir bileşik ile karşılaştığı zaman meydana gelen GSH'un, GS-SG'a dönüşümü olayı, toksik bileşiğin suda daha çözünür hale gelmesi ve son ürün olarak merkapturik asit türevlerinin oluşum tepkimeleri, GSH bağımlı enzimler tarafından katalizlenmektedir (Aniya ve Anders, 1989).

Nishihira ve ark. (1995 a), bir GSH analogu kullanarak, GST  $\pi$ 'nin elektrofilik substrat bağlama bölgesini incelemişlerdir. Bu GSH analogu, GSH ve CDNB'ye karşı kompetatif bir inhibisyonla katalitik aktiviteyi inhibe etmiştir. Bu analog, muhtemelen 122-128. aminoasitleri içeren G ve H bölgesinin yer aldığı aktif bölgeye kovalent olarak bağlanmıştır.

Zhang ve ark.na (1998) göre; detoksifikasyon sisteminin önemli komponentleri GSH, GSH bağımlı enzim ve GSH konjugatı pompasıdır. Bu sistemde bir GSH; antikanser ilaç ile daha az toksik ve suda daha kolay çözünen GSH konjugatları oluşturmak için birleşmektedir. GSH konjugatları, GSH konjugatı pompası (GS-X

pump) veya multidrug resistance proteini (MRP) tarafından hücre dışına atılmaktadır. Bu sistem ile antikanser ilaçların artmış detoksifikasyonu, ilaç dirençliliğini doğrulamaktadır.

GST, GSH'ın aktivitesiyle daha reaktif tiyolat anyonu (GS<sup>-</sup>) oluşturur. Herhangi bir nedenle çalışan bu mekanizma, organizmayı yüksek oranda korumaktadır. GSH bağlanma bölgesinde Tirozin artıkları bulunur. (Tyr<sup>8</sup>, Tyr<sup>6</sup> ve Tyr<sup>7</sup>  $\alpha$ -,  $\mu$ -,  $\pi$ -sınıflarında) (Patrick S. ve ark. 2001)

Inoue I ve ark.na (1999) göre; GSH seviyesi beslenmeden etkilenmektedir. Ayrıca besinlerdeki aminoasit içeriği de GSH seviyesini etkilemektedir.

Sheweita ve Mostafa (1996); N-nitrozaminlerin farklı kimyasal formlarının GSH, GSH redüktaz ve GST enzimi üzerine in vitro etkisini incelemişlerdir. GSH seviyesinin metilpropilnitrozamin ile %81 azalmış, dietilnitrozamin ile %50 artmış, etilmetil-nitrozaminden etkilenmemiş olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlar, nitrozo grubunun substitusyonu şeklinde kimyasal yapı değişikliklerinin GSH metabolizleme enzim seviyelerini değiştirdiğini göstermiştir.

Ploemen ve ark. (1996) tarafından alkol bağımlılarının tedavisinde kullanılan bir ilaç olan, disülfiram (DSF) ve onun redükte formu olan dietilditiyokarbomatın (DDTC), sıçan ve insan karaciğer GST ile etkileşiminin reversibl inhibisyonu ve zamana bağlı inaktivasyonu çalışılmıştır. En fazla duyarlılık, sistein içermeyen, insan GST  $\alpha$  2-2 izoenzimindedir. Sonuçlar 1 tiyol kalıntısının bu inaktivasyona katıldığını ve inaktif GST'nin GSH veya ditiyotreitol uygulaması ile geri çevrilebileceğini göstermiştir.

Aniya ve Daido (1993) sıçanda t-butil hidroperoksit, cumene hidroperoksit ve linoleik asit hidroperoksitin karaciğer mikrozomal GST enzimi üzerine etkisini çalışmışlardır. Veriler, mikrozomal GST'in GSH'un varlığında veya yokluğunda, daha organik hidroperoksitler tarafından aktive edildiğini gösterdi.

#### 2.2.4. GST Enzim Metabolizması

1875 yılından bu yana yapılan çalışmalar sonucunda, bazı ksenobiyotiklerin L-asetilsistein bileşikleri (merkapturik asitler) halinde safra ile atıldıkları kanıtlanmıştır. Bu bağlamda ilk tepkime, GST ile katalizlenmektedir. Oluşan GSH bileşiklerinden önce glutamat ve glisin aminoasidi ayrılmakta, sonra sistein kalıntısının serbest amino grubunun asetilasyonu ile merkapturik asitlere metabolize edilmektedir. Merkapturik asitler, suda çözünebilen, idrar ve safra yoluyla vücuttan atılmaya uygun son ürünlerdir. Mekanizmada tepkimeye katılan element, nükleofil olarak glutatyon tiyolattır ( $GS^-$ ).  $GS^-$ , birçok substrat için nükleofil olabilir. Tepkime, uygun bir tiyoeter oluşturmak üzere, yeteri kadar elektrofilik karbon atomuna  $GS^-$ 'in atağı ile sonuçlanmakta, bu şekilde aktifleşen substrat (kimyasal madde-SG), GST katalizörlüğünde meydana gelmektedir. Oluşan GSH türevleri, enzimatik olarak sistein türevlerine dönüştürülmektedir. Bu türevler asetillenerek, N-asetilsistein türevlerini meydana getirmektedir (Pabst ve ark. 1974).

Bir merkapturik asit türevi oluşturmayan organik tiyosiyanatlar durumunda,  $GS^-$ ;  $-C\equiv N$  ve  $RS-$  kısımlarının bağlı polariteleri tarafından belirlenen bir tarafa atak yapar. R gruplarının elektronik karakteristiği, atak bölgesine karar vermede rol oynar. Alkiltiyosiyanatlar ve benziltiyosiyanatlar için atak, ayrılan grup olarak siyanidli sülfür atomunadır. Nitrat esterleri durumunda ise, Glutatyon S-nitrat ile sonuçlanan  $GS^-$ 'in hedefi elektrofilik nitrojendir. Gözlenen ürünleri oluşturmak için  $GS^-$ 'in ara ürüne 2. atağı söz konusudur. Nitrogliserinin  $\beta$  pozisyonundaki nitrat yer değiştirir. Nitrit meydana gelir (Habig ve ark. 1974).

Sıçan ve insan homojen enzim preparatları ile yapılan çalışmalarda, onların her birinin benzer büyüklükte bir bağlanma proteini olduğu bulundu. Bu enzimler, çok yapışkan, bağlayıcı karakterdedir. Bağlanmayı etkileyen faktörler ligandın hidrofobik bölgelerine veya moleküllerin benzer veya farklı olmalarına bağlıdır.

GST enziminin bağladığı ligandlar, 3 gruba ayrılır:

- 1.) Proteinlerle reversibl bağlıdır ve substrat değildir. (Bilirubin gibi)
- 2.) Uygun bir reaktif merkezi taşıyan ve sıkı bağlı  $GS^-$  tarafından atak yapılan bileşikler (Substratlar)



3.) Uygun reaktifler. Enzime bir kere bağlanırlar ve protein ile kovalent bağ oluşumu ile tepkimeyi yürütürler. Örneğin; CDNB ile muameleden sonra oluşan ürün.

Enzimin ligandlar ile etkileşiminde, pasif rol oynadığı tartışılmaktadır. Bir görüşe göre, elektrofilik substratların bağlanma noktasına yakın GSH'ların aktivasyonu, diğer görüşe göre ise; GSH ve elektrofilik substratların yakınlaşması olarak önerilmiştir.

### 2.2.5. GST Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

**a) YAŞ:** Doğum sonrası GST seviyesindeki artış hızlı bir şekilde başlar ve 7 hafta sonra erişkin seviyesine ulaşır. Peters ve ark.(1995 b), insan lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada, GST-GSH sisteminin yaşlanma ile azaldığını tespit etmişlerdir. GST'nin farklı izoenzimlerinin yaş artışı ile artış hızı ve artış dönemleri birbirlerinden farklıdır. Temellini ve ark.(1995), yaptıkları bir çalışmada, karaciğer GST aktivitesi ve yaş arasında zayıf fakat negatif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak buna benzer bir durum kalınbağırsak, renal korteks ve akciğerde gözlenmemiştir.

**b) CİNSİYET:** GST aktivitesi erkek bireylerde daha yüksektir. Karaciğer ve böbrekteki GST'nin erkek/dişi oranları farklıdır. Kadında renal korteks ve akciğerde GSH ve CDNB konjugasyon hızı zayıf fakat önemli derecede erkekte daha yüksek oranda gözlenmiştir (Temellini ve ark. 1995).

**c) DOKU ÇEŞİDİ:** GST enzim aktivitesi ksenobiyotik bileşiklere en fazla maruz kalan karaciğer, bağırsak, böbrek gibi dokularda oldukça yüksektir.

**d) HORMONLAR:** Cinsiyet farklılığına bağlı olarak, hormon çeşidi ve miktarındaki farklılık GST aktivitesini etkiler. Carillo ve ark. (1995), insülin ve glukagonun sıçan hepatosit GST enzimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Sıçanda insülin+glukozun intravenöz uygulaması sonucu hepatik sitosolik GST aktivitesi 30 dakikada % 56 artarken, mikrozomal GST aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Glukagon enjeksiyonu, hepatik sitosolik GST aktivitesinde % 43 azalmaya sebep olurken, mikrozomal GST'yi etkilememiştir.

e) **BESLENME:** Açlık durumunda ve proteinden yoksun beslenme sonucu GST aktivitesi azalmaktadır. İnsanda glikosinolat içeren Crucifera tipi bitkilerin (Brüksel lahanası gibi) yüksek miktarda tüketiminin kanser riskini azalttığı öne sürülmektedir. Brüksel lahanası tüketiminin duodenal, rektal ve lenfotik GST ve GSH seviyelerine etkisi araştırılmış, sonuçta GST $\alpha$  ve  $\pi$  seviyelerinin arttığı saptanmıştır.

f) **PATOLOJİK DURUM:** Özellikle karaciğer dokusu hastalıklarında, GST aktivitesi değişmektedir. Kronik hepatit C'li hastalar üzerinde GST $\alpha$  izoenziminin klinik önemini belirtmek için, serum GST $\alpha$  seviyeleri incelenmiş ve hastaların %93'ünde GST $\alpha$  indüklenmiştir. Enzimin artış seviyeleri, bu lezyonlarda oluşan ilaç dirençlilik fenotipine katıldığını göstermektedir. Nelson ve ark.(1995) GST $\alpha$  ile lobüler ve safra kanalı lezyonları arasında ilişki olduğunu ve GST $\alpha$ 'nın serum aminotransferaz kadar diagnostik bir öneme sahip olduğunu göstermişlerdir.

g) **TÜR FARKLILIKLARI:** Ksenobiyotiklerin yarılanma süreleri, organizmanın türüne göre değişmektedir. Bu durum detoksifikasyon enzimlerinin farklı türlerde değişen miktarlarda bulunması ile açıklanabilir.

h) **KİMYASAL FAKTÖRLER:** GST enziminin etkilediği substrat, nonsubstrat ligandlar, enzimi aktive veya inhibe edebilir. Bunun dışında detoksifikasyon metabolik yolu son ürünlerinin ortamda birikmesi, ortamın pH'sı, ısı, radyasyon vb. faktörlerde etkilidir.

### **3. MATERYAL METOT:**

#### **3. 1. MATERYEL**

##### **3. 1. 1. Kullanılan Deney Hayvanları**

Deneylerde kullanılan erkek ve dişi beyaz sıçanlar (Swiss albino-*Rat rattus norvegicus*), Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi (DHYAM)'nde inbreed yöntemiyle (kardeşler arasında çiftleşmelerle soyların elde edilmesi) yetiştirilmiştir. Deneylerde aynı deney periyodunda eşit sayıda erkek ve dişi sıçanlar kullanıldı.

Bu çalışmada, her bir deneyde, kontrol grupları için 4, deney grupları için 8 olmak üzere toplam 96 adet sıçan deneye alındı.

##### **3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- DNOC ( 4,6-dinitro-*ortho*-cresol), Across Organics %98
- Potasyum Klorür, (Merck)
- Glutasyon (Merck)
- CDN (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) (Merck)
- Bidistile su

#### **3.2. YÖNTEM**

Deneylerimizde 250-300 gr ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Sıçanların deney grubuna DNOC (2.8mg/kg vücut ağırlığı), kontrol grubuna serum fizyolojik intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Enjeksiyondan önce sıçanlar yemek ve sudan kesilip, 24 saat aç bırakıldı. Enjeksiyondan hemen sonra kafeslerine geri konan sıçanlara su ve yemek verilerek, metabolizmanın hızla harekete geçirilmesi sağlandı. Enjeksiyon işleminden 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 72 saat sonra ise, servikal dislokasyon yolu ile öldürülen sıçanların karaciğer, böbrek, incebağırsak ve beyin dokuları çıkartılıp tamponda yıkandıktan sonra homojenat elde etmek için 1/3 ağırlık/hacim olacak şekilde

0,15 M soğuk KCl ile ayrı ayrı özütleyici tüpe alınarak homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar ultrasantrifüjde (RC-5 SuperSpeed Refrigerated Centrifuge) 48000 g.'de 30 dakika çevrildi ve elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı. Özütleme ve santrifüj işlemlerinin her zaman soğuk ortamda (0-4 °C) ve buzlar arasında yapılmasına özen gösterildi. (Referansı yaz)

### 3. 2. 1. Glutatyon S-transferaz Aktivitesi Tayini

#### Çözeltiler

- 1.) 10 mM. Potasyum fosfat tamponu ( pH:6,7; 25°C)
- 2.) 5 mM GSH (pH:6,7 olan 10mM potasyum fosfat tamponunda taze olarak hazırlandı).
- 3.) 0.25 mM CDNB (etil alkolde (%99) hazırlandı).
- 4.) Süpernatant

#### Yöntem

Çözeltiler kuvars deney küvetine konulup, karıştırıldı. GST enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği GSH ile CDNB arasında tiyoeter bağının oluşmasının CECIL 5000 spektrofotometrede 340 nm. dalgaboyunda izlenmesi ile tayin edilmiştir.

	Deney Karışımı
pH:6,7, 10 mM. Pot. Fos. Tamp.	1,67 ml
5 mM. GSH (tamponda taze)	0,20 ml
CDNB (%99 etil alkolde)	0,08 ml
Süpernatant (örnek)	0,05 ml

Çizelge 2. Enzim aktivite tayini için deney karışımı

Spektrofotometrede ilk okuma alındıktan sonra, 1'er dak. aralıklarla 4 okuma daha alındı. 4. okuma ile 1. okuma arasındaki farkın ortalaması,  $\Delta E/\Delta t$  (U/mg.) değerini verir (Çelik 1995, Öztop 1989).

### 3. 2. 2. Dokularda Protein Tayini

Bu çalışmamızda karaciğer, böbrek, bağırsak ve beyin dokularındaki protein tayini için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford M.M.,1976).

### 3. 2. 3. Spesifik Aktivite Tayini

Bradford yöntemi kullanılarak elde edilen  $C_{\text{protein}}$  değeri ve okumalarda elde edilen  $\Delta E/\Delta t$  değerleri, enzim aktivite tayini için aşağıdaki formülde kullanıldı.

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{V}{E.d.v.C.\text{protein}} \Delta E / \Delta t \text{ (U / mg)}$$

V: Son hacim

E: Molar Soğurma Katsayısı (  $10 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  )

d: Işık yolu (cm)

v: Kullanılan enzimin hacmi

$\Delta E/\Delta t$ : Birim zamanda (1 dk.) absorpsiyon farkı

$C_{\text{protein}}$ : Enzimin derişimi (mg/ml)

### 3.2.4 Verilerin Değerlendirilmesi

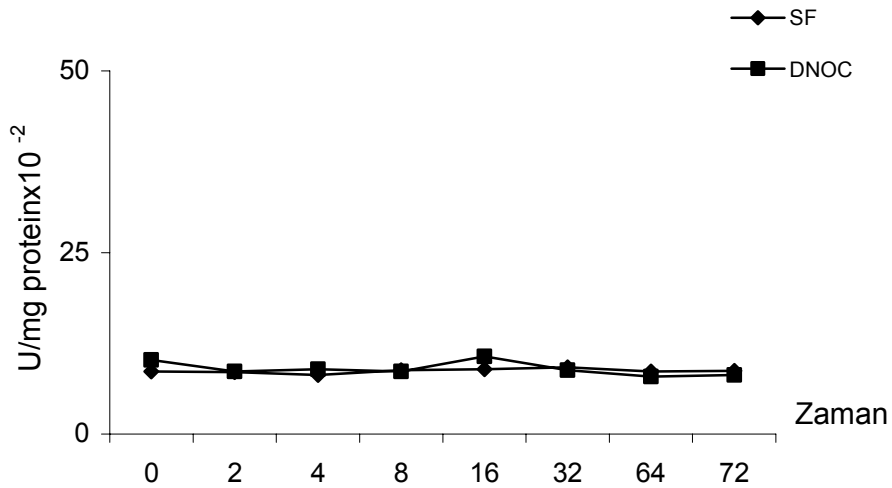
Verilerin değerlendirilmesinde, SPSS paket programı (11.0 versiyonu) kullanılarak, serum fizyolojik ve deney grupları karşılaştırmalarında bağımsız t testi yapıldı. Sonuçlarda ortalama ile standart hata ( $\text{Ort} \pm \text{SH}$ ) beraber verildi. Analizlerde  $\alpha$  0,05 olasılık değeri ile değerlendirme yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Karaciğer GST Aktivitesinin İncelenmesi

DNOC'un erkek sıçanlarda karaciğer GST aktivitesi üzerine etkisi şekil 5'de gösterilmiştir. Serum fizyolojik uygulanan kontrol grupları ile DNOC uygulanan deney gruplarının karaciğer GST enzim aktiviteleri zamana bağlı incelendiğinde, deney grubunda genel olarak GST enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

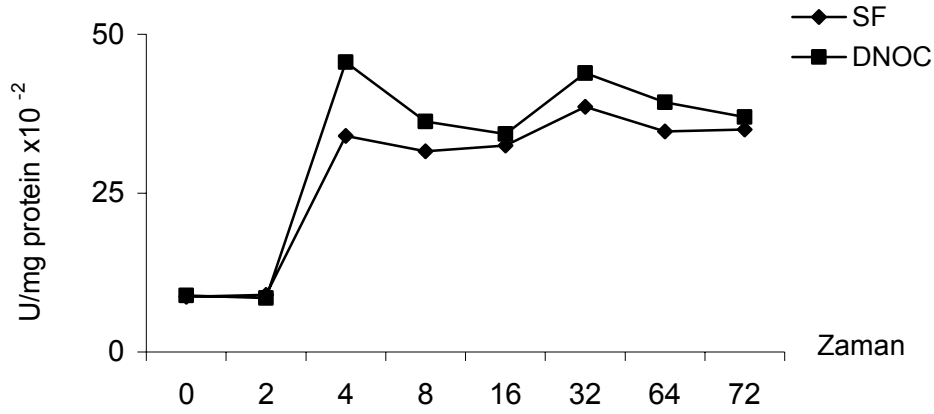
Deney grubu hayvanlarında 0. saatte istatistiksel açıdan anlamsız olarak değerlendirilen bir aktivite görülmüştür. Daha sonra 2. saatten 16. saate kadar enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). 16. saatte meydana gelen aktivasyon kontrol grubunun %20.22 si kadar olmuştur. GST enzim aktivitesindeki bu artış istatistiksel açıdan da anlamlıdır ( $p<0.05$ ) (çizelge 3).



Şekil 5. DNOC'un Erkek Sıçanlarda Karaciğer Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

DNOC'un dişi sıçanlarda karaciğer GST aktivitesi üzerine etkisi şekil 6'da verilmiştir. Dişi sıçanlarda kontrol ve deney gruplarında, karaciğer GST enzim

aktivitesi zamana bağılı incelendiğinde, genel olarak benzer bir grafik elde etmemize rağmen, deney grubunda GST enzim aktivitesinin kontrole göre arttığını görmekteyiz (çizelge 3).



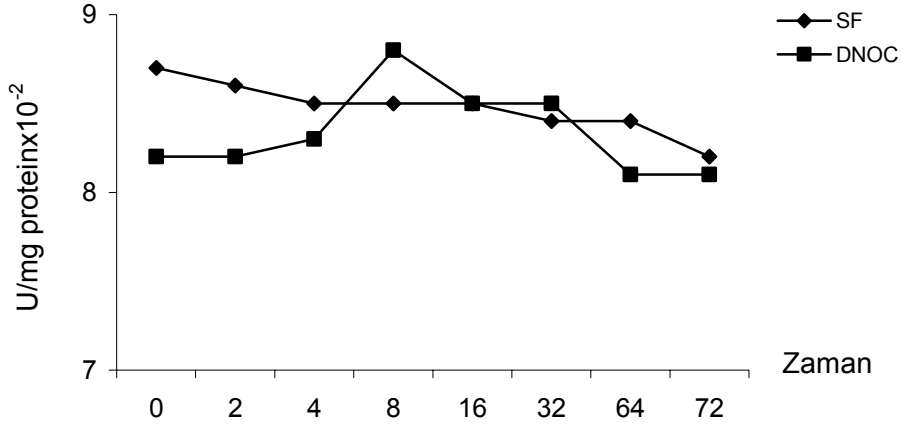
Şekil 6. DNOC'un Dişi Sıçanlarda Karaciğer Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

Dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer dokusu GST enzim aktivitesi kontrol grubu ile paralellik gösterdiği dikkati çekmektedir.

#### 4.2. Böbrek GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

DNOC'un erkek sıçanlarda böbrek GST aktivitesi üzerine etkisi şekil 7'de verilmiştir. Erkek sıçanlarda böbrek GST enzim aktivitesi kontrol grubunda 0. saatten 72. saate kadar düşüş göstermiştir. Ancak GST aktivitesindeki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamsız olarak değerlendirilmiştir ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda GST enzim aktivitesinin 0. saatte en yüksek ( $8,7\pm 0,77$ ) seviyede olduğu saptanmıştır.

Deney grubu GST enzim aktivitesinin ise 0. saatten 8. saate kadar arttığı belirlenmiştir. Deney grubunda GST enzim aktivitesindeki en yüksek değer 8. saatte ( $8,8\pm 0,24$ ) olduğu görülmüştür. Deney grubunda, 16. saatten 72. saate kadar GST enzim aktivitesinde düşüş saptanmıştır. 72. saatte anlamsız bir inhibisyon görülmekle beraber, kontrol grubu ile hemen hemen aynı değerlerde kalmıştır (çizelge 3).



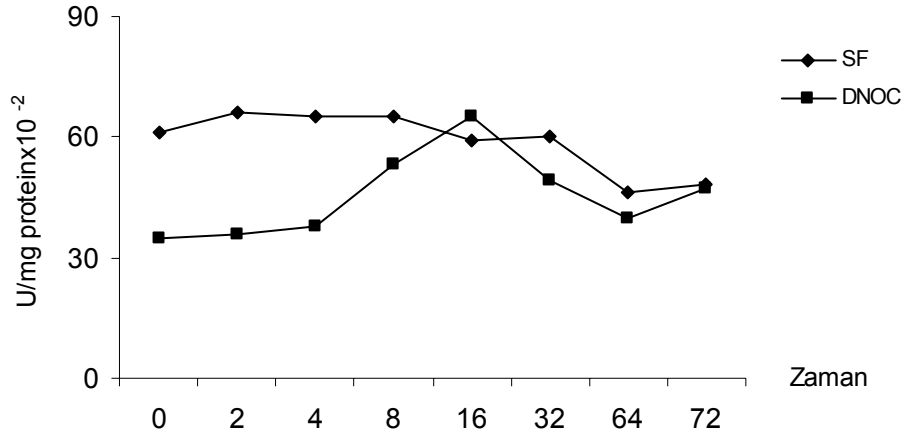
Şekil 7. DNOC'un Erkek Sıçanlarda Böbrek Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

DNOC'un dişi sıçanlarda böbrek GST aktivitesi üzerine etkisi şekil 8'da verilmiştir. Dişi sıçanlarda kontrol ve deney gruplarında böbrek GST enzim aktivitesi zamana bağlı incelendiğinde deney grubunda GST enzim aktivitesinin kontrole göre azaldığını görmekteyiz. Kontrol grubunda 0. saatten 8. saate kadar enzim aktivitesinde artma, 16. saatten 72. saate kadar ise enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Kontrol grubundaki en yüksek GST aktivitesi 2. saatte tespit edilmiştir ( $66 \pm 0.00$ ).

Deney grubunda ise 0. saatten 16. saate kadar aktivitede bir artış görülmekle beraber, değerler kontrol grubunun altında kalmıştır. 16. deney periyodunda az da olsa bir aktivasyon gözlenmiştir. 32. saatten 72. saate kadar meydana gelen inhibisyon istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur ( $p > 0,05$ ) (çizelge 3).

Deney grubu GST aktiviteleri kontrollere göre 0. saatte %42.6, 4. saatte %41.5, 8. saatte %18.4'lük bir azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 3).



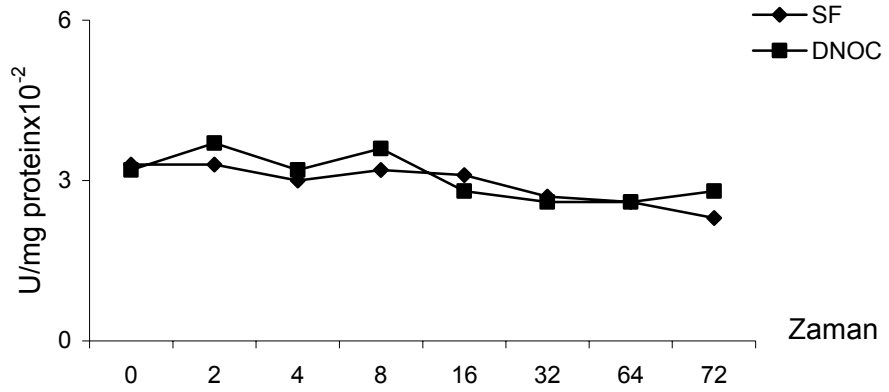


Şekil 8. DNOC'un Dişi Sıçanlarda Böbrek Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

Dişi ve erkek sıçanlarda böbrek dokusu GST enzim aktivitesinde, DNOC uygulaması sonucunda kontrol gruplarına göre inhibisyon belirlenmiştir. Enzim aktivitesinde görülen bu inhibisyon dişi bireylerde, erkeklere oranla daha fazla olmuştur.

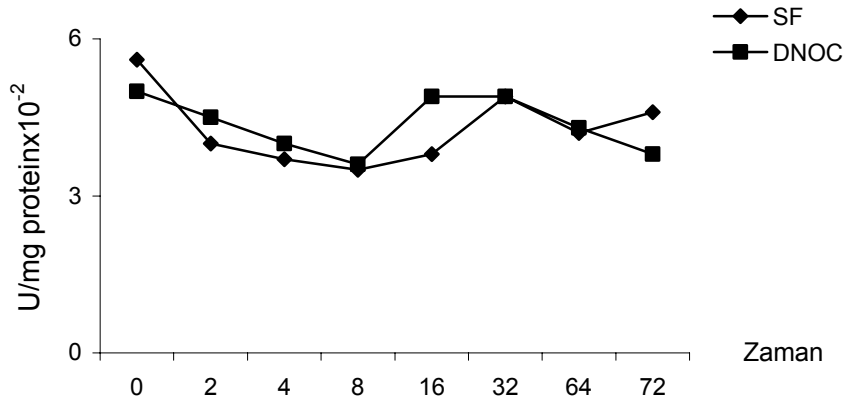
#### 4.3. Beyin GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

DNOC'un erkek sıçanlarda beyin GST enzim aktivitesi üzerine etkisi şekil 9'da verilmiştir. Erkek bireylerde kontrol grupları ile deney gruplarının beyin GST enzim aktiviteleri zamana bağlı incelendiğinde, benzer bir grafik görülmektedir. Kontrol grubunda 0. saatten 8. saate kadar enzim aktivitesinde bir artış, 16. saatten 72. saate kadar ise enzim aktivitesinde bir azalış belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Kontrol grubunda en yüksek GST enzim aktivitesi 2. saatte ( $3,3 \pm 0,04$ ) tespit edilmiştir. Deney grubunda 0. saatten 8. saate kadar enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir. Deney grubu 8. saatte kontrole göre %12.5'lük bir aktivasyon tespit edilmiştir. GST enzim aktivitesinde görülen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4). Deney grubunun 72. periyodunda GST enzim aktivitesinde kontrole göre %21.7 oranında bir artış belirlenmiştir. Bu artış istatistiksel açıdan da anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4).



Şekil 9. DNOC'un Erkek Sıçanlarda Beyin Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

DNOC'un dişi sıçanlarda beyin GST enzim aktivitesi üzerine etkisi şekil 10'da verilmiştir. Kontrol grupları ile deney gruplarının beyin GST enzim aktiviteleri zamana bağlı incelendiğinde, dişi bireylerde kontrol ve deney gruplarında benzer bir grafik görülmekle birlikte, deney grubunda genel olarak GST enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.



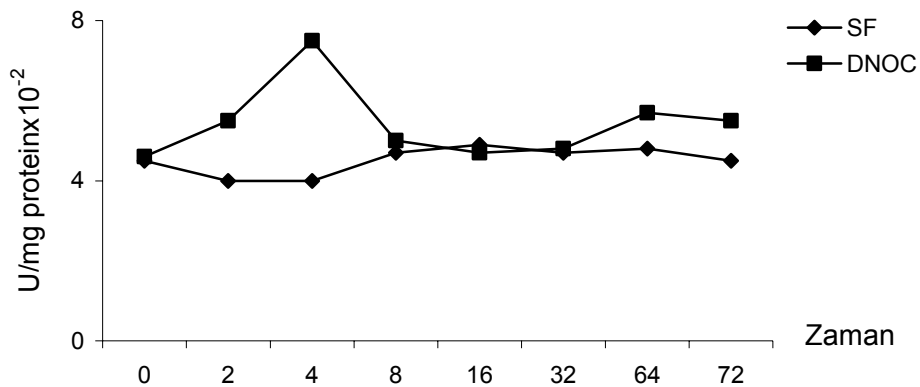
Şekil 10. DNOC'un Dişi Sıçanlarda Beyin Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

Kontrol grubu dişi sıçanlarda beyin GST enzim aktivitesinde 0. saatten 8. saate kadar düşüş belirlenmiştir. En yüksek ( $5,6\pm 1,33$ ) GST enzim aktivitesi 0. saatte görülmüştür. 16. saatten 72. saate kadar GST enzim aktivitesinde artış saptanmıştır. Deney grubu GST aktivitesinde ise kontrol grubuna benzer bir şekilde 0. saatten 8. saate kadar düşüş belirlenmiştir. Deney grubundaki en yüksek ( $5\pm 0,78$ ) GST enzim aktivitesi 0. saatte görülmüştür. Kontrol ve deney gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı sayılabilecek herhangi bir artış ya da azalış belirlenmemiştir.

Erkek ve dişi sıçanlarda beyin dokusu GST enzim aktivitesinde DNOC uygulaması sonucunda benzer iniş ve çıkışlar dikkati çekmektedir. Erkek sıçanlardaki enzim aktivitesinde anlamlı artışlar olduğu belirlenirken, dişi sıçanlarda GST enzim aktivitesinde önemli bir değişme tespit edilmemiştir.

#### 4.4. İncebağırsak GST Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

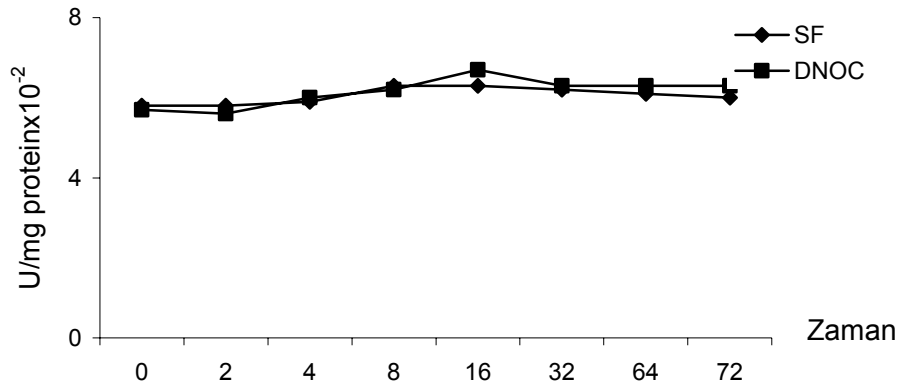
DNOC'un erkek sıçanlarda ince bağırsak GST enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 11'de verilmiştir. Kontrol grupları ile deney gruplarının ince bağırsak GST enzim aktiviteleri zamana bağlı incelendiğinde, erkek bireylerde kontrol ve deney gruplarında benzer bir grafik görülmekle birlikte, deney grubunda genel olarak GST enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda ince bağırsak GST enzim aktivitesinde 0. saatten 72. saate kadar artış gözlenmektedir. Kontrol grubundaki en yüksek enzim aktivitesi 16. saatte  $4,9\pm 0,98$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 11. DNOC'un Erkek Sıçanlarda İncebağırsak Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

Deney grubunda 0. saatten 4. saate kadar enzim aktivitesinde artış olmuştur. 4. saatte GST enzim aktivitesi en yüksek değerde ( $7.5 \pm 2.3$ ) olmasına rağmen bu artış kontrole göre istatistiksel açıdan anlamsız olarak değerlendirilmiştir ( $p > 0.05$ ) (çizelge 4).

DNOC'un dişi sıçanlarda ince bağırsak GST enzim aktivitesi üzerine etkisi şekil 12'de verilmiştir. Kontrol grupları ile deney gruplarının ince bağırsak GST enzim aktiviteleri zamana bağlı incelendiğinde, dişi bireylerde kontrol ve deney gruplarında benzer bir grafik görülmektedir. Kontrol grubunda 16. saate kadar enzim aktivitesinde artış gözlenirken, 32. saatten 72. saate kadar anlamsız bir azalma tespit edilmiştir. Kontrol grubunda en yüksek GST enzim aktivitesi 16. saatte ( $4.9 \pm 0.98$ ) belirlenmiştir.



Şekil 12. DNOC'un Dişi Sıçanlarda İncebağırsak Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

Deney grubunda kontrol grubuna benzer şekilde 16. saate kadar aktivasyon ve 32. saatten 72. saate kadar önemsiz bir inhibisyon belirlenmiştir. Deney grubundaki en yüksek enzim aktivitesi 16. saatte ( $6.7 \pm 0.51$ ) belirlenmiştir.

Erkek ve dişi sıçanlarda DNOC uygulamasıyla ince bağırsak GST enzim aktivitesinde görülen değişiklikler istatistiksel açıdan anlamsız değerlendirilmiştir ( $p > 0.05$ ) (çizelge 4).

Çizelge 3. Serum Fizyolojik Kontrol ve DNOC'un Karaciğer ve Böbrek GST enzimi Üzerine Etkisinin Zamana ve Cinsiyete Göre Değişimi

Dokular		Deney Periyodu <sup>r</sup>	0. Saat Ort±SH	2. Saat Ort±SH	4. Saat Ort±SH	8. Saat Ort±SH	16. Saat Ort±SH	32. Saat Ort±SH	64. Saat Ort±SH	72. Saat Ort±SH
Karaciğer	Erkek	SF	8.6±0.40	8.5±0.17	8.1±0.01	8.8±0.61	8.9±0.23	9.2±0.00	8.6±0.05	8.7±0.06
		DNOC	10.2±0.51	8.6±0.34	8.9±0.75	8.6±0.31	10.7±0.01*	8.8±0.39	7.9±0.18	8.1±0.23
	Dişi	SF	8.7±0.25	9±0.11	34±0.00	31.6±0.00	32.5±0.89	38.6±0.23	34.7±1.44	35±0.25
		DNOC	8.9±0.77	8.5±0.29	45.5±7.54	36.3±2.13	34.3±2.99	43.9±0.00	39.3±3.26	37±3.72
Böbrek	Erkek	SF	8,7±0,77	8,6±0,24	8,5±0,22	8,5±0,12	8,5±0,08	8,4±0,04	8,4±0,19	8,2±0,01
		DNOC	8,2±0,53	8,2±0,36	8,3±0,26	8,8±0,24	8,5±0,37	8,5±0,34	8,1±0,07	8,1±0,28
	Dişi	SF	61±1,14	66±0,00	65±0,00	65±1,31	59±0,00	60±3,31	46±0,00	48±6,13
		DNOC	35±3,19*	36±0,13	38±4,96*	53±4,62*	65±0,13	49±9,18	40±5,22	47±3,76

r: Tablodaki her veri,  $\times 10^{-2}$  şeklinde ve tekrarların ortalaması olup, GST enziminin spesifik aktivite değerlerini (U/mg) ifade etmektedir.

Ort: Ortalama

SH: Standart Hata

\* İstatistiksel Açıdan Anlamlı değer

Çizelge 4. Serum Fizyolojik Kontrol ve DNOC'un Beyin ve İncebağırsak GST enzimi Üzerine Etkisinin Zamana ve Cinsiyete Göre Değişimi

Dokular	Deney Periyodu <sup>r</sup>	0. Saat Ort±SH	2. Saat Ort±SH	4. Saat Ort±SH	8. Saat Ort±SH	16. Saat Ort±SH	32. Saat Ort±SH	64. Saat Ort±SH	72. Saat Ort±SH	
<b>Beyin</b>	Erkek	SF	3,2±0,08	3,3±0,04	3±0,02	3,2±0,002	3,1±0,005	2,7±0,04	2,6±0,06	2,3±0,15
		DNOC	3,2±0,27	3,7±0,27	3,2±0,18	3,6±0,15*	2,8±0,12	2,6±0,03	2,6±0,06	2,8±0,13*
	Dişi	SF	5,6±1,33	4±0,60	3,7±0,00	3,5±0,00	3,8±0,35	4,9±0,66	4,2±0,80	4,6±0,41
		DNOC	5±0,78	4,5±0,82	4±0,49	3,6±0,25	4,9±1,34	4,9±0,97	4,3±0,72	3,8±0,57
<b>İnce Bağırsak</b>	Erkek	SF	4.5±0.86	4±0.57	4±0.58	4.7±0.00	4.9±0.98	4.7±0.16	4.8±0.43	4.5±0.68
		DNOC	4.6±0.59	5.5±2.1	7.5±2.3	5±0.59	4.7±0.99	4.8±0.39	5.7±0.49	5.5±0.21
	Dişi	SF	5.8±0.12	5.8±0.02	5.9±0.97	6.3±0.05	6.3±0.98	6.2±0.23	6.1±0.00	6±0.61
		DNOC	5.7±0.10	5.6±0.10	6±1.72	6.2±1.01	6.7±0.51	6.3±1.28	6.3±0.12	6.3±0.22

r: Tablodaki her veri,  $\times 10^{-2}$  şeklinde ve tekrarların ortalaması olup, GST enziminin spesifik aktivite değerlerini (U/mg) ifade etmektedir.

Ort: Ortalama

SH: Standart Hata

\* İstatistiksel Açıdan Anlamlı değer

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yetiştirilen bitkisel ürünlerin kalitesini ve miktarını artırmak amaçlı kullanılan pestisitler, son yıllarda canlılar için bir tehdit haline gelmiştir. Ekosistemdeki her canlı direkt ya da indirekt olarak pestisitlerden etkilenmektedir. Özellikle, bilinçsizce yapılan aşırı pestisit kullanımları yüzünden, hayvanlarda ve insanlarda ölümlere varan ciddi sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Dinitrofenollerin sıcakkanlılara ve bazı spesifik türdeki arılara toksisiteleri yüksektir. Solunum, deri ve oral yolla toksisitelerini gösterirler. Dinitrofenol grubu herbisit olan DNOC, sanayide ve tarımsal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO,2000).

Canlılarda pestisitlerin etkilerini, dokularda neden oldukları tahribatlar ve bu dokulardaki enzim aktivitelerinde gözlenen değişikliklerden anlayabiliriz. Bu tez çalışmasında, DNOC uygulaması sonrasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonun da suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki birinci basamağı katalizleyen GST aktivitesinin farklı dokulardaki değişimi incelenmiştir.

Karaciğer dokusunda dişi sıçanlarda GST aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamakla birlikte, erkek sıçanlarda 16. saatte anlamlı bir aktivasyon tespit edilmiştir. Erkek sıçanlardaki bu aktivasyonun sebebi, hepatik GST aktivitesinin dişilerden daha fazla olması olabilir. Hayatama ve ark.(1986), Singhal ve ark. (1992), erkek farelerde hepatik GST aktivitesinin dişilerden daha yüksek olduğunu tespit etmişler ve cinsiyet hormonlarının hem beyin hem de karaciğerde GST enzim aktivitesinde, önemli rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. Halen zirai mücadelede yaygın olarak kullanılan DDT ve Kepone gibi kimyasalların, cinsiyet hormonlarının seviyesinde önemli değişikliklere yol açtıkları, GSH'ı ise etkilemedikleri Das, M. ve ark. (1982) tarafından ileri sürülmüştür.

DNOC'un karaciğer dokusunda, GST dışında değişik parametreleri de etkileyebildiği belirlenmiştir. Prost ve ark.'nın (1973), DNOC'la temas etmiş bir çiftçide yaptıkları incelemelerde, karaciğer bilirubin seviyesinin arttığını, ALT ile AST aktivitesi ve kolesterol seviyesinin azaldığını gözlemişlerdir. Ancak 2 ay içerisinde bütün değerlerin normale döndüğünü belirlemişlerdir. Bununla beraber,

Broadmeadow'un (1998), sıçanlara oral yolla DNOC uygulaması yaptığı çalışmasında, dişi sıçanlarda yüksek dozda kilo kaybı ve karaciğerde ALT aktivitesi ile kandaki üre seviyesinde önemli artışların olduğunu ileri sürmüştür. Bir başka araştırmada ise; Den Tonkelaor (1983), yüksek dozda DNOC uygulamasında, yalnızca bir dişi ve bir erkek sıçanda ALT aktivitesinde artış gözlemiştir. Her iki cinste glikoz ve üre seviyesinin arttığını, doza bağlı olarak piruvat, T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> seviyelerinde azalma olduğunu, kan laktat seviyesi ile organ ağırlıklarında değişme olmadığını gözlemiştir. Paulina CA ve ark (1996), DNOC'un kimyasal benzeri olan 2,4-D'nin, sıçanlarda akut, subkronik ve kronik toksisitesini araştırdıkları çalışmalarında ise, akut uygulamadan sonra, lokomotor aktivitelerde düşüş, kaslarda zayıflama, nefes darlığı ve sakinleşme belirlemiştir. Aynı araştırmacılar AST, ALT, LDH, AP ve amilaz aktiviteleri, hematokrit değerler ve kreatinin seviyesinde artış olduğunu, glukoz ve total protein seviyelerinde ise düşüş olduğunu tespit etmişlerdir.

DNOC gibi halen kullanılmakta olan diğer pestisitlerde, sıçan karaciğer GST aktivitesinde artışa sebep olmaktadır. Kaur M. ve ark. (2006), yaygın bir şekilde pestisit olarak kullanılmakta olan carbofuranın sıçan karaciğerinde akut ve kronik etkilerini, lipid peroksidasyonu, glutatyon seviyesi ve ilaç-metabolizması enzimlerinde incelemiştir. Akut ve kronik uygulamada, asetilkolinesteraz aktivitesinde ve lipid peroksidasyon seviyesinde inhibisyon, glutatyon seviyesinde ise artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Karaciğerde sitokrom P<sub>450</sub> enzim sisteminin indüklendiğini ve GST enzim aktivitesinde artış olduğunu gözlemiştir. Bammler TK ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* da methyl-parathion'un GST aktivitesine etkisini araştırmışlar, sıçan, fare ve 10 yetişkin insanın hepatik fraksiyonlarında, GST aktivitesinin en yüksek düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir.

Ksenobiyotik GST uyarıcılarının, sıçan karaciğer GST enzim aktivitesini arttırdığı, Bhagwat ve ark.nın (1998) phenobarbital ve benzanophthoflavone kullanarak yapmış oldukları çalışmada öne sürülmektedir. Diğer bir çalışmada Roger J. Price ve ark. (2004) thiabendazole'un (TB), sıçan karaciğer ksenobiyotik enzimleri üzerine etkisini incelemiştir. TB uygulamasının, faz I ve faz II ksenobiyotik enzim metabolizmalarında artışa sebep olduğunu belirlemiştir. TB uygulaması sonucu, GST aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bir başka çalışmada, sıçan karaciğerine motosiklet ekzosunun (ME) 4 haftalık inhalasyon, intratrakeal ve intraperitoneal uygulamasından



sonra, karaciğer GST aktivitesinde önemli artış gözlenmiştir. Sonuçlar, ME içeriğinde GST’i indükleyebilen maddelerin bulunabileceğini göstermiştir (Ueng ve ark. 1998). E. Casalino ve ark. (2004), doğada biriken ve canlılarda ağır metal zehirlenmelerine neden olan kadmiyum ve manganezin, sıçan karaciğer GST aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır.  $CdCl_2$  ( $2,5 \text{ mgkg}^{-1}$ ) ya da  $MnCl_2$  ( $2,0 \text{ mgkg}^{-1}$ ) intraperitoneal yolla tek doz uygulandığında, karaciğer sitosolik GST enzim aktivitesinin 24 saat sonra, %36 oranında arttığını tespit etmişlerdir.

Deney sonuçlarımızda 32. saatten 72. saate kadar deney grubu erkek sıçanlarda karaciğer GST aktivitesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir. GST aktivitesindeki bu düşüş, 16. saate kadar yoğun bir şekilde metabolize edilen DNOC’dan oluşan metabolitlerin daha az toksik etkili olmasından kaynaklanacağı düşünülmektedir. DNOC’un metabolitlerinden birisi, 6-amino-4-nitro-o-cresol’dür (6-ANOC). Smith ve ark. (1953) göre; 6-ANOC, DNOC’dan 20 kat daha az toksik etkili bir maddedir. Parker (1952), karaciğerde DNOC’un in vivo olarak indirgenmesi sonucu ortaya çıkan 4-amino-2-nitrofenol ve 2-amino-4-nitrofenol’ün daha az toksik etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda sıçanlarda DNOC’un eliminasyonu 1-1.5 günde tamamlanmaktadır (Leegwater ve ark.,1982). 32. saatten sonra fazla toksik etki yaratmayan DNOC ve metabolitleri, GST aktivitesinin normal seviyesine inmesine sebep olmuş olabilir.

Erkek ve dişi sıçanların böbrek dokusu GST aktivitesinde, kontrol ve deney gruplarında hemen hemen aynı grafikler elde edilmiştir (şekil 7-8). **Grafiklere bakıldığında (şekil 7-8) 0. saatlerde dişi ve erkek sıçanlardaki GST aktivitesinin kontrol ve deney gruplarında farklı değerleri aldığını görmekteyiz. Özellikle ilk saatlerdeki farklılığı hayvanların bireysel farklılıklarına ve 24 saat aç bırakıldıktan sonraki davranışlarının farklı olmasına bağlıyoruz. Deney ve kontrol grubu hayvanlarının 24 saatlik aç bırakılma periyodundan sonra tekrar beslenmeye almakla metabolizmalarını eşitlemeye çalıştık. Burada görülen aktivite farklılığı, bireysel farklılıklardan ve metabolizmalarının farklı şekilde çalışmasından ötürü olabilir.** Erkek sıçanlarda GST aktivitesinde önemli bir değişiklik olmazken, dişi sıçanlarda 0, 4. ve 8. saatlerde anlamlı düşüşler tespit edilmiştir. Böbrekte gözlenen inhibisyonların sebeplerinden birisi, DNOC’un hücresele seviyede gösterdiği etkiler olabilir. G. Pederson ve ark. (2002) in vitro da, fenolik bileşiklerin insan kolon epitel hücreleri üzerine etkisi ve

detoksifikasyondaki konjugasyon yolu ile yaptıkları çalışmada, Parasetamol, dinitrofenol ve fenolün ( $\geq 1,25\text{mM}$ ) kolon epitel hücrelerinin aktivitelerinin azalmasına neden olduğunu gözlemişlerdir. Fenolik bileşiklerin derişimlerinin artmasının, hücrelerin canlılıklarını yitirmesine sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir. Braunberk T. ve ark. (1991), DNOC'un hücrelerde ER, peroksizom, mitokondri gibi organelleri etkilediği ve mitokondriyal sitokrom-c-oksidad, peroksizomal katalaz, allantoinaz, urikaz ve mikrozomal esteraz enzimlerini uyardığını gözlemişlerdir. Bununla beraber, DNOC, enerji metabolizmasını etkileyen ve solunum zincirinde oksidasyonu fosforilasyondan ayıran bir kimyasal madde olduğu için, mitokondri zarının elektron geçirgenliğini bozarak, ADP'nin fosforilasyonunu da engeller. Dolayısıyla üretilmesi gereken enerji ısı şeklinde çevreye yayılır. DNOC'un sahip olduğu metil grubu ayırma ve inhibitör etkisini güçlendirmektedir. Roger F. Castillo ve ark.(1997), yapmış oldukları bir çalışmada, DNOC'un sıçan karaciğer mitokondrisinde oksidatif fosforilasyona bağlı olmaksızın, membran permeabilitesine olan etkisini araştırmışlardır. ADP'nin varlığında ya da yokluğunda oksidatif fosforilasyona bağlı olmaksızın, mitokondriyal solunumu arttırdığı, transmembran potansiyelinde ise azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. Hücrelerde enerji üretiminin azalması ve hücre içi dengelerin bozulmasının, GST aktivitesindeki azalmaya neden olabileceği düşünülebilir.

GST enzim aktivitesinin, çalışılan dokularda inhibisyonunun en önemli sebeplerinden birisi; GST enziminin sentezinden sorumlu olan genlerin etkilenmesi olabilir. M. Nehez ve ark. (2004), fareler üzerinde in vivo olarak yaptıkları çalışmada, bir grup fareye bir yıl boyunca DNOC içeren herbisit uygulamış ve kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonlarının arttığını gözlemişlerdir. Grilli S. ve ark. (1991) sıçan hepatositlerinde, intraperitoneal yolla amitraz, cyanazine, cyhexantin, DNOC ve fenarimolün in vivo da DNA'ya olan etkilerini incelemişler, fenarimol ve DNOC'un, DNA hasarlarına ve kırıklarına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Hücre içi dengeleri bozan DNOC, dolaylı yollarla GST aktivitesinde düşüşe neden olmuş olabilir.

B. Almlı ve ark. (2002), *Salmo trutta*'da, fungusit uygulamasının etkisini değerlendirmek için, GST aktivitesini biyomarker olarak kullanmışlardır. Fungusitleri; (propiconazole ve fenpropimorph) suya ayrı ayrı ve birlikte bir statik sistemle 5 gün

boyunca uygulamışlar ve kombine pestisit uygulaması sonucunda, solungaç GST aktivitesinde önemli azalmaların olduğunu belirlemişlerdir.

Beyin dokusu GST aktivitesi erkek ve dişi sıçanlarda, kontrol ve deney gruplarında hemen hemen benzer bir grafik vermektedir (şekil 9-10). Her iki çalışma grubunda aktivasyon tespit edilmiştir. Dişi sıçanlarda GST aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmezken, erkek sıçanlarda 8. ve 72. saatlerde aktivasyon belirlenmiştir. 8. saatteki bu aktivasyona, kan dolaşımı ile beyne gelen DNOC'un, 72. saatte gözlenen aktiviteye ise, DNOC'un metabolitlerinin neden olabileceği görüşündeyiz. Yapılan bir çalışmada, DNOC'un kanda, diğer dokulara oranla daha yüksek derişimlerde taşındığı belirlenmiştir (Parker ve ark., 1951). İntraperitoneal uygulama sonucunda, bağırsak duvarını geçmek zorunda kalmadan, hızla hepatik portal sisteme giren DNOC'un, kandaki derişiminin, hızlı bir biçimde artış gösterdiği belirlenmiştir (King ve Harvey, 1953). Parker ve ark. (1951), DNOC'un %90'ının plazmada taşındığını saptamışlardır. Fabrequettes'in (1993), DNOC'un sıçan dokularında birikimini incelediği çalışmasında, 24 saat sonra uygulanan dozun %15'inin kanda, %6,6'sının gastrointestinal kanalda, %5'inin karaciğerde, %0.08'sinin dalakta ve %0.94'ünün böbrekte bulunduğunu tespit etmiştir. İn vitro yapılan bir çalışmada DNOC'un, 6-ANOC'a indirgeniği, 6-ANOC'un ise 12 saat sonra DAOC'ye dönüşerek, DNOC'un başlangıç konsantrasyonunun %90'ının metabolize edildiği ileri sürülmüştür (Ingebritsen ve Froslic, 1980). Bu çalışmalar, 72 saat sonra az da olsa meydana gelen aktivasyonun nedeninin, metabolitlerden dolayı olabileceği görüşümüzü destekler görünümündedir.

Yapılan bir başka çalışmada ise, Fabrequettes (1993), DNOC'un sıçan derisinden absorblanmasını sağlamış ve uygulamadan 96 saat sonra, verilen dozun %1'inin kan plazmasında bulunduğunu tespit etmiştir. Sıçanların plazmasında 96 saate kadar toksik etkiye sahip olabilen DNOC ve metabolitlerinin, insanlarda eliminasyon hızlarının düşük olması sebebiyle daha uzun süreli ve toksik etki gösterebileceği görüşündeyiz.

DNOC'un GST aktivitesinde gösterdiği aktivasyonların sebeplerinden birisi de, DNOC'un, hücreleri oksidatif strese maruz bırakması olabilir. Dinitrofenol grubu olan azinphosmethyl, 2,4-D ve kombine pestisit uygulaması ile yapılan bir çalışmada, *Oreochromis niloticus* ve *Cyprinus carpio*'nun böbrek, beyin ve solungaçlardaki superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve GST enzim

aktivitelerinde görülen artışların, bu toksik maddelerin oluşturduğu oksidatif strese bağlı olarak meydana geldiği ileri sürülmüştür (Oruç ve ark. 2003). Cho ve Kim (2000), organların toksik ajanlara karşı korunmasında, GST enziminin önemli olduğunu, toksik ajanların hücreleri önemli ölçüde oksidatif strese maruz bırakabildiğini ve GST enziminin, hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu ileri sürmüşlerdir.

GST aktivitesindeki artış, protein sentezindeki artış ile olabileceği gibi enzimin kinetik özelliklerindeki değişikliklerden de kaynaklanabilir. Dolayısıyla DNOC'la GST enziminin kinetik özelliklerinin ( $K_m$  ve  $V_{max}$  gibi) nasıl etkilendiğinin araştırılması uygun olacaktır. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda, DNOC'un bugüne kadar saptanmış etkilerinin yanında, antioksidant enzim sisteminde görevli, GST aktivitesinde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Günümüzde insanların, yapay kimyasallara yoğun şekilde maruz kaldığı göz önüne alınırsa, bu değişikliklerin sağlık açısından sorunlara yol açabileceği düşünülebilir. DNOC, geniş tarımsal alanlara uygulandığı için kullanımının kontrol altına alınması ve kullanım esnasında gerekli önlemlerin alınması sağlanmalıdır.

## KAYNAKLAR:

ALBER M, BOEHM HB, BRODESSER J. 1989. Determination of Nitrophenols in Rain and Snow. *Fresenius J. Anal Chem*, 334,540-545.

ANTON, E.P., B. JOHANNES, G. ARNE VANDER, J.M. GERARD. 1990. The Glutathione-binding Site in Glutathione S-transferases. *Biochem*, 265:47-54.

ANIYA. Y., M.W. ANDERS. 1989. Regulation of Rat Liver Microsomal Glutathione S-transferase Activity by Thiol/Disulfide Exchange. *Archives of Biochem. And Biophysics*, 270(1):330-34

ANIYA, Y., A. DAIDO. 1993. Organic Hydroperoxide-Induced Activation of Liver Microsomal Glutathione S-Transferase of rats in Vitro. *J Pharmacol*.62(1):9-14

ARNE HELMEG, HENRIK BAY, HANS PETER BIRK HANSEN, METTE RABOLLE , ALEX SONNENBORG AND LARS STENVANG. 2002. Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(8-9):83-590.

ARIAS, I. M., JAKOBY W.B. 1976. Glutathione: Metabolism and Function. *Kroc. Found. Series*, 6:335.

AUTRUP H. 2000 Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Metabolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research*, 464:65-76

ALMLI B., EGAAS E., CHRISTIANSEN A., EKLO O. M., LODE O., KALLQVIST T.. 2002. Effects of three fungicides alone and in Combination on Glutathione S-transferase Activity (GST) and Cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the Liver and Gill of Brown Trout (*Salmo Trutta*). *Marine Environ. Research* 54:237-240.

BAMMLER TK, ABEL EL, EATON DL 2001. Metabolism Of Methyl Parathion By Glutathione S-Transferases In Vitro *Chem-Bio Interact* 133 (1-3): 231-233

BHAGWAT, S. V., MULLICK J., AVADHANI N.G., RAZA H., 1998. Differential Response of Cytosolic, Microsomal and mitochondrial GSTs to Xenobiotic inducers. *Int. J. Oncol.* 13:281-288

BRADFORD M M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilising the Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem.* 50:249-253.

BRAUNBERK T, VOLKL A. 1991 Induction of Biotransformation in the Liver of Eel (*Anguilla anguilla* L.) by Sublethal Exposure to dinitro-o-cresol: an Ultrastructural and Biochemical Study *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21(2):109-127

BROADMEADOW A. 1988. Technical DNOC: Preliminary toxicity study by dietary administration to F-344 rats for Six Weeks (Life Science Research Study no. 87/PTN 001/433).Eye, (Unpublished Report Prepared for Pennwalt Corporation Agrochemicals Division)

BIEBER WD 1995. Degradation and Metabolism of DNOC in Soil (SGS Natec Institut, Hamburg Germany 92:9633, (Unpublished Report Prepared for Elf Atochem Agrl SA)

BOYER, T.D. 1989. The Glutathione S-transferases: An Update *Hepatology*, 9(3):486–96.

BUCCIARELLI T., SACCHETTA P., PENNELLI A., CORNELIO L., ROMAGNOLI R., MELINO S., PETRUZZELLI R., DI ILIO C. 1999. Characterization of Toad liver Glutathione Transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1431: 189-198

CARRILLO, M. C., J.A. MONTI, C.FAVRE, C. E. CARNOVALE.1995.Acute Regulation of Hepatic Glutathione S-transferase by Insulin and Glukagon. *Toxicol. Lett.* 76(2):105-11

CASALINO, E., C. SBLANO, V. LANDRISCINA, G. CALZARETTI, C. LANDRISCINA. 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.* 200:29–38.

CELIK, V.K., 1995 Di amino zid Uygulanmış Civcivlerde İncebağırsak ve Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Enziminin Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniv.Tıp Fak. Biyokimya ABD.

CHAN, T. S., J.X. WILSON, P.J.O'BRIEN. 2004. Glycogenolysis is Directed Towards Ascorbate Synthesis by Glutathione Conjugation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317:149–156

CHO, M. K., KIM S.G. 2000. Induction of Class Alfa GST by 4-methylthiozale in rat Liver: Role of Oxidative Stres. *Toxicol Lett.* 115:107–115

DAS, M., AGARWAL, A.K., SETH, P.K. 1982. Regulation of Brain and Hepatic GST by Sex Hormones in Rats. *Biochem. Pharmacol.* 31(23):3927–3930

Den TONKELAAR E.M., van LEEUWEN FXR, KUIPER C., 1983 Semichoronic Toxicity of DNOC in the Rat.*Med Fac Landbouww Rijksuniv*, 48(4):1015-1022

DI ILIO, C., P. SACCHETTA, V. IANNARELLI, A. ACETO. 1995.Binding of Pesticides to Alpha, Mu, Pi Class Glutathione Transferase. *Toxicol. Lett.* 76(2):173–7

FABREQUETTES C. 1993. Pharmacokinetic Study After Single Cutaneous Applications in Rats.(Centre International de Toxicologie, 10530/PAR) (unpublished report prepared for ELF Atochem Agri SA)

FLEISCHN, G., K. KAMISAKA, I.M. ARIAS. 1976. Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function*. 229

FROSLIE A, KARLOG O. 1970. Ruminal Metabolism of DNOC and DNBP. *Acta Vet Scand*, 11:114-131

FROSLIE A 1973. Methaemoglobin Formation by Diamino Metabolites of DNOC and DNBP. *Acta Pharmacol Toxicol*, 32:257–265

GASIEWICZ T.A. 1991 Nitro Compounds and Related Phenolic Pesticides. In: Hayes WJ Jr, & Laws ER Jr ed. *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Pres 3:1191–1269

GHILLEBAERT F., CHAILLOU C., DESCHAMPS F., ROUBAUD P. 1995 Ecotoxicology and Environmental Safety Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. 32(1):19-28

GRILLI S, ANCORA G, RANI P, VALENTI AM, MAZZULLO M, COLACCI A 1991. Invivo Unwinding Fluorometric Assay as Evidence of the Damage Induced by Fenarimol and DNOC in rat-liver DNA. *J of Toxicol. and Environ. Health* 34(4):485–494

GTZ, German Agency for Technical Cooperation 1997 The Work of Other Agencies and Organizations Relating to Prevention and Disposal of Obsolete and Unwanted Pesticide Stocks. In: *Prevention and Disposal of Obsolete and Unwanted pesticide Stocks in Africa and the Near East. Second Consultation Meeting. FAO Pestic. Series*, 5:17–21

HABIG, H.W., J. M. PABST, W.B. JAKOBY. 1974. Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* 249(22):7130–39

HAMDY YA , TEWFIK MS. 1970. Degradation of 3,5-dinitro-o-cresol by Rhizobium and Azobakter spp. *Soil Biol Biochem*, 2:163–166

HARVEY DG 1959. The Quantitative Response of the Oxygen Consumption and Weight of Guinea pig to Some Metabolic Stimulants. *J Pharm Pharmacol*,11:681–688

HAYATAMA, I., SATOH, K., 1986 Developmental and Hormona Regulation of the Major Form of Hepatic Glutathione S-Transferase in Male Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140, 581–588

HAWLEY GG 1981. *The Condensed Chemical Dictionary*. 10th ed. New York, Von Nostrand Reinhold.

HRELIA P., VIGAGNI F., MAFFEI F., MOROTTI M., COLACCI A., PEROCCO P., GRILLI S., CANTELLI-FORTI G. 1994. Genetic Safety Evaluation of Pesticides in Different Short-term tests. 321(4):219–228

- HUNAITI. A., M. SOUD, A. KHALIL.1995. Lead Concentration and the Level of Glutathione , Glutathione S-Transferase. Reductase and Peroxidase in the Blood of some Occupational Workers from Irbid City, Jordan. *Sci. Total Environ.*170(1-2):95-100
- ILIVICKY J., CASIDA JE. 1969. Uncoupling action of 2,4-dinitrophenols, 2-trifluoromethylbenimidazols and Other Pesticide Chemicals Upon Mitochondria FROM Different Sources and its Relation to toxicity. *Biochem Pharmacol*, 18:1389–1401
- INGEBRIGTSEN K, FROSKIE A 1980. Intestinal Metabolism of DNOC and DNBP in the Rat. *Acta Pharmacol Toxicol*, 46:326–328
- INOUE N., IMAI K., AIMOTO T. 1999. Circadian Variation of Hepatic Glutathione S-transferase Activities in the Mouse. *Xenobiotica*, 29(1):43-51
- ISCAN, M., T. COBAN, B.C. EKE, M. ISCAN.1995. Differential responses of Hepatic Monooxygenases and Glutathione S-transferase of Mice to a Combination of Cadmium and Nickel. *Comp. Biochem. Physio. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*111 (1):61-8
- JASTROCH W, KNOLL W, LANGE B, RIEMER F, THIELE E 1978. Results of a Study on the Exposure of Agriculture Workers to DNOC. *Z Ges Hyg*, 24:340-343
- JUDAH JD. 1952. Mode of Action of the Nitrophenols. *Proc R Soc Med* 45:574
- KAUR, M., SANDHIR R. 2006. Comparative Effects of Acute and Chronic Carbofuran Exposure on Oxidative Stress and Drug-Metabolizing Enzymes in Liver. *Drug and Chemical Toxicol*, 29:415–421
- KENCE M. 1998. The Ecological Genetics of Malathione Resistance in Housefly *Musca Domestica*. PhD Thesis METU.
- KRAMER RE, WELLMAN SE, ZHU H, Et Al. 2002 A Comparison Of Cholinesterase Activity After Intravenous, Oral Or Dermal Administration Of Methyl Parathion *J Biomed Sci* 9 (2): 140–148
- KRECZKO S, ZWIERSZ K, JAROSZEWICZ K 1974. Glycoprotein Biosynthesis by the Guinea pig Liver in Chronic 4,6-dinitro-o-crocol Poisoning. *Acta Biol Acad Sci Hung*, 25(3):167–171
- LAWFORD DJ, KING E, HARVEY DG 1954. On the Metabolism of Some Metabolic Fate of DNOC. II. Biotransformation in Mammals. *Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent*, 47(1):401–408
- LEEGWATER DC, VAN DER GREEF J, BOS KD 1982. Integrated Studies on the Metabolic fate of DNOC. II. Biotransformation in Mammals. *Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent*, 47(1):401–408



LEUENBERGER C, CZUCZWA J, & TREMP J 1988 Nitrated Phenols in Rain: Atmospheric Occurrence of Phototoxic Pollutants. *Chemosphere*, 17:511–515

LO BELLO, M., A. J. OAKLEY, A. BATTISITONI, A. P. MAZZETTI, M. NUC CETELLI, G. MAZZARESE, J. ROSSJOHN, M. W. PARKER, G. RICCI. 1997. Multifunctional Role of Tyr 108 in the Catalytic Mechanism of Human Glutathione Transferase P1–1. Crystallographic and Kinetic Studies on the Y108F Mutant Enzyme. *Biochem. (U.S.)*, 36 (20), 6207–17

MENEGON, A., P.G. BOARD, A. C. BLACKBURN, G.D. MELLICK, D.G. LECOURTER. 1998. Parkinson's Disease, Pesticides, and Glutathione S-Transferase Polymorphisms. *Lancet*, 352 (9137):1344-6

MORGENSTERN, R., G. LUNDQVIST, V. HANCOCK, J. W. DEPIERRE. 1987. Studies on the Activity and Activation of Rat Liver Microsomal Glutathione Transferase, in Particular with a substrate Analogue Series. *J. Biol. Chem.* 263(14): 6671–75

MOGENSEN BB, SPLIID NH. 1995 Pesticides in Danish Water Courses: Occurrence and Effects. *Chemosphere*, 31(8):3977–3990

MORELAND DE 1980. Effects of Toxicants on Oxidative Phosphorylation. In: Hogdson E, Guthrie FE eds. *Introduction to Biochemical Toxicology*. Elsevier, 245–260

NEHEZ, M., A. SELYPES, E. MAZZAG, G. BERENCSI. 2004. Additional Data on the Mutagenic Effect of Dinitro-o-cresol-containing Herbicides. *Hungary. Ecotoxicol. and Environ. Safety* 8(1):75–79.

NELSON, D.R., H.L. LIM, D. OLIVER, K. P. QIAN, G.L. DAVIS, J. Y. LAU. 1995. Alpha- Glutathione S-Transferase as a Marker of Hepatocellular Damage in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 104(2), 193-8

NIGEL C. COOK, DIRK U BELLSTEDT and GERARD JACOBS 2001. *Scientia Horticulturae* Endogenous Cytokinin Distribution Patterns at Budburst in Granny Smith and Braeburn Apple Shoots in Relation to Bud Growth. 87(12)

NILSSON, L. O. 2001. Redesign of Alpha Class Glutathione Transferases to Study Their Catalytic Properties. *Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Sci. and Techn.* 672. 30

NISHIHARA, J., M. SAKAI, S. NISHI, Y. HATANAKA. 1995. Identification of the Electrophilic Substrate-Binding Site of Glutathione S-Transferase P by Photoaffinity Labelling. *Eur. J. Biochem.* 232(1), 106-10.(a)

NISHIHARA, J., HIBIYA, M. SAKAI, S. NISHI, T. KUMAZAKI, S. OHKI, W. SAKAMOTO. 1995. The C-terminal Residue, Arg 201-Gln 209, of Glutathione S-transferase P Contributes to Stability of the Active Site Conformation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1252(2):233-8 (b)

NISHINO, H., A. ITO. 1989. Increase in Glutathione Disulfide Level Regulates the Activity of microsomal Glutathione S-transferase in Rat Liver. *Biochem. Int.* 19(4):731-5

OROZCO, M., C. VEGA, A. PARRAGA, I. GARCIA-SAEZ, M. COLL, S. WALSH, T.J. MANTLE, F. JAVIER LUQUE. 1997. On the Reaction Mechanism of Class Pi Glutathione S-transferase. *Proteins*. 28 (4): 530-42

ORUÇ, E.Ö., ÜNER N. 2000. Combined Effects of 2,4-D and Azinphosmethyl on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127:291-296

ÖZTOP, H.N. 1989. Bazı Sigara Nitrozaminleri Ve Nitritin Sıçan (*Rattus norvegicus*) Karaciğeri Mikrozomlarına ve Glutatyon Düzeylerine Etkisi. Doktora Tezi

PABST, M.J., W. H. HABIG, W. JACOBY. 1974. Glutathione S-transferase S. A Novel Kinetic Mechanism in Which the Major Reaction Pathway Depends on Substrate Concentration. *Biological Chem.*, 249: 7140-49.

PARKER VH, BARNES JM, DENZ FA 1951. Some Observations on the Toxic Properties of 3,5-dinitro-o-cresol. *Br J Industr Med*, 8:226-235

PATRICK S., Y. WONG. 2001. Glutathione Inactivation by Reactive Nitrogen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 394(2):216-228

PAULINO, C.A., GUERRA, J.L., OLIVEIRA, G.H., PALERMO-NETO, J. 1996. Acute, Subchronic and Chronic 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Intoxication in Rats. *Veterinary and Human Toxicology* 38:348-352.

PETERS, M. M., T.W. JONES, T. J. MONKS, S.S.LAU. 1997. Cytotoxicity and Cell-Proliferation Induced by the Nephrocarcinogen Hydroquinone and Its Nephrotoxic Metabolite 2,3,5-(tris-glutathione-S-yl)hydroquinone. *Carcinogenesis* 18(12),2393-401. (a)

PEDERSON, G., BRYNSKOV J., SAERMAK T. 2002. Phenol Toxicity and Conjugation in Human Colonic Epithelial Cells. *Scand J. Gastroenterol.* 37:74-79

PIRIE, N.W., K.G. PINHEY. 1929. The Titration Curve Of Glutathione. *J. Biol. Chem.*, 84:321-23

PLAPP F. W. 1984. The Genetic Basis Of insecticide Resistance in the Housefly: Evidence that a single Locus Plays a Major Role in Metabolic Resistance to Insecticides. *Pesticides Biochem. and Physiology* 22:194

PLOEMEN, J. P., M. L. VAN IERSEL, L. W. WORMHOUDT, J.N. COMMANDEUR, N. P. VERMEULEN, P. J. VAN BLADEREN. 1996. In vitro Inhibition of Rat and Human Glutathione S-Transferase Isoenzymes by Disulfiram and Dietyldithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 52(2):197-204.

POLLARD AB , FILLBE JF 1951. Recovery After Poisoning with dinitro-ortho-cresol. *Lancet*, II:618-619

PUCHALSKI, R.P., E.E. FAHL. 1990. Expression of Recombinant Glutathione S-Transferases: II. Ya, or Yb1 Confers Resistance to Alkylating Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2443-47

QUINTO, E. DE MARINIS, M MALLARDO, ARCUCCI A., DELLA MORTE R. And STAIANO N. 1989 Effects of DNOC, Ferbam and Iamidian Exposure on Mouse Sperm Morphology *Mut. Research/Genetic Toxicol.* 224(4):405-408

ROGER F. CASTILLO, JOAQUIM AF VICENTE, ALICIA J. KOWALTOWSKI ANIBAL E. VERCESI. 1997. 4,6-Dinitro-o-cresol Uncouples Oxidative Phosphorylation and Induces Membrane Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria *The Int. J. of Biochem. & Cell Bio.* 29(7).

ROGER J. PRICE, M. P. SCOTT, D.G.WALTERS, R.H.STIERUM,J.P. GROTEN, C.MEREDITH, B.G.LAKE.2004.Effect of Thiabendazole on Some Rat Hepatic Xenobiotic Metabolising Enzymes. *Food and Chem. Toxicol.* 42:899-908.

RUCH RJ, BONNEY WJ, SIGLER K, Et Al.1994 Loss Of Gap-Junctions From Ddt-Treated Rat-Liver Epithelial-Cells *Carcinogenesis* 15 (2): 301-306

SALAH S. SHEWEITA 2004.Carcinogen-Metabolizing Enzymes and Insecticides. *Journal of Environ. Science and Health. Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 9(5-6):805-818.

SANDERMANN,H.Jr. 1992. Plant Metabolism of Xenobiotics. *Trends in Biochem. Sci.* 17 (2):82-84.

SHEEHAN D., MEADE G., FOLEY V.M. and DOWD C.A. 2001 Structure, Function and evolution of Glutathione Transferases: Implications for Classification of non-mammalian Members of an Ancient enzyme Superfamily. *Biochem J*,360:1-16

SHEWEITA, S.A., M. H. MOSTAFA. 1996. N-Nitrosamines and Their effects on the Level of glutathione, Glutathione Reductase and Glutathione S-Transferase activities in the Liver of Male Mice. *Cancer Lett.* 99(1),29-34

SINGHAL, S.S., SAXENA M., AHMAD H., AWASTHI C.Y. 1992. Glutathione S-Transferases of Mouse Liver. Sex-Related Differences in the Expression of Various Isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1116(2):137-146

SLUIS-CREMER, N., N. NAIDOO, H. DIRR.1996.Class-Pi Glutathione S-Transferase is Unable to Region Its Native Conformation after Oxidative Inactivation by Hydrogen Peroxide. *Eur. J. Biochem.* 242(2):301-7

State of the Science Report for a Screening Health Assessment. 4,6-Dinitro-o-cresol (DNOC) CAS No: 534-52-1

SUZUKI, T., P. N. JOHNSTON, P.G. BOARD. 1993. Structure and Organization of the Human Alfa Class Glutathione S-transferase Genes and Related Pseudogenes. *Genomics* 18(3):680-6

TAKAHASHI KEN L., HOJO H., AOYAMA H., TERAMOTO S. 2003 Effects of dinoseb, 4,6-dinitro-o-cresol, and 2,4-dinitrophenol on Rat Sertoli-germ co-cultures. *Reproductive Toxicol.* 17:247-252

TAKAHASHI KEN L., HOJO H., AOYAMA H., TERAMOTO S. 2004 Comparative Effects on the Spermatotoxic Effects of dinoseb and its Structurally Related Chemicals. *Reproductive Toxicol.* 18:581-588

TAKAHASHI KEN L., HOJO H., AOYAMA H., TERAMOTO S. 2006. Pathogenetic Transition in the Morphology of Abnormal Sperm in the Testes and the Caput, Corpus and Cauda Epididymis of Male Rats After Treatment with 4,6-dinitro-o-cresol. *Reproductive Toxicol.*

TAN GH, CHONG CL 1993. Trace Monitoring of Water-borne Phenolics in the Klang River Basin. *Environ Monit Asses*, 24:267-277

TEMELLINI. A., M. CASTIGLIONI, L. GIULIANI, A. MUSSI, P.C. GIULIANOTTI, A. PIETRABISSA, C. A. ANGELETTI, F. MOSCA, G. M. PACIFICI. 1995. Glutathione Conjugation with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB): Interindividual Variability in Human Liver, Lung, Kidney and Intestine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 33(9):495-503

TEWFIK MS, EVANS WC 1966. The metabolism of 3,5-dinitro-o-cresol (DNOC) by Soil Micro-organisms. *Biochem J*, 99:31-32

TREMP J, MATTREL P, & GIGER W 1993 Phenols and Nitrophenols as tropospheric Pollutants: Emissions from Automobile Exhausts and Phase Transfer in the Atmosphere. *Water, Air Soil Pollution*, 68:113-123.

UENG, T.H., W.P. HWANG, R.M. CHEN, H.W. WANG, M.L. KUO, S.S. PARK, F.P. GUENGERICH. 1998. Effects of Motorcycle Exhaust on Cytochrome P4450-dependent Monooxygenases and Glutathione S-Transferase in Rat Tissue. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54(7):509-27

US EPA 1988. Health and Environmental Effects Profile for Dinitrocresols. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency.

VAN DE BERG LJ, VAN RAAIJ JAGM, BRAGT PC, NOTTEN WRF 1991. Interactions of Halogenated Industrial Chemicals with Transthyretin and Effects on Thyroid Hormone Levels in vivo. *Arch Toxicol*, 65:15-19

VAN DER GREEF J, LEEGWATER DC 1983. Urine Profile Analysis by Field Desorption of Halogenated Industrial Chemicals with Transthyretin and Effects on Thyroid Hormone Levels in vivo. *Arch Toxicol*, 65:15-19

ZHOU H. A., SYVANEN M. 1997. A Complex Glutathione Transferase Gene Family in the Housefly *Musca Domestica*. *Mol Gen. Genet.* 256:187

VERHEIJ ER, VAN DER GREEF J 1995. The Identification of a DNOC Metabolite in Soil. Study no.274514, TNO Nutrition and Food Research, Zeist, (unpublished report prepared for Elf Atochem Agri bv.)

VAN NOORT HR 1960. (Dinitro-ortho-cresol intoxication in sprayers.) *tijdschrift voor geneeskunde* 104:676-684

VICENTE JAF, SANTOS SM, VERCESI AE, MADEIRA VMC 1998. Comparative Effects of the Herbicide Dinitro-o-cresol on Mitochondrial Bioenergetics. *Pestic. Sci.* 54:43-51

WALTER SCHUSSLER, LUTZ NITSCHKE 2001 Nitrophenols in Precipitation. *Chemosphere* 42:277-283

WAREING, C.J., S.M. BLAVK, J.D. HAYES, C.R. WOLF. 1993 Increased Levels of Alpha-class and Pi-class Glutathione S-Transferases in Cell Lines resistance to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Eur. J. Biochem.*, 217(2):671-6

WAXMAN, D.J. 1990. Glutathione S-transferases. Role in Alkylating Agent Resistance and Possible Target for Modulation. *Chemotherapy. A Cancer Res.* 50(20):6449-54.

WHO 1982 Recommended Health Limits in Occupational Exposure to Pesticides. Technical Report Series 677. Geneva, World Health Organization.

WHO 2000. Environmental Health Criteria Series 220. Dinitro-o-cresol. Geneva World Health Organization,.

ZHANG, K., P. MACK, K. P. WONG. 1998. Glutathione-related Mechanisms in Cellular Resistance to anticancer Drugs. *Int. J. Oncol.* 12(4):871-82

**ÖZGEÇMİŞ**

03.05.1980 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı. 2002 yılında yüksek öğrenimini tamamlayıp, Biyolog ünvanını aldı. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.

## TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmalarım esnasında her tÖrlÖ yardım, ilgi ve desteğini gÖrdÖğÖm, Öneri ve eleŐtirilerinden yararlandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

ÇalıŐmamız esnasında ekip ruhunu tam anlamıyla bilen ve emeklerini esirgemeyen arkadaşlarım, asistan Ferda ÖZDİKİCİOğLU ve Hakan TOSUNOğLU'na,

Ayrıca hayatımın anlamı olan sevgili ailem ve biricik eŐime, sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.