T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYŞEHİR VE ÇAVUŞÇU GÖLLERİNDEKİ TOKSİK VE KARSİNOJENİK ORGANİK KİRLİLİĞİN BU GÖLLERDE YAŞAYAN SAZAN BALIĞI(*Cyprinus carpio L.,1758)* ÜZERİNE ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Hatice Banu KESKİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2015

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Hatice Banu KESKİNKAYA

Tarih: 15.07.2015

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEYŞEHİR VE ÇAVUŞÇU GÖLLERİNDEKİ TOKSİK VE KARSİNOJENİK ORGANİK KİRLİLİĞİN BU GÖLLERDE YAŞAYAN SAZAN BALIĞI(*Cyprinus carpio L.,1758)* ÜZERİNE ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Hatice Banu KESKİNKAYA

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ

2015, 79 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Doç. Dr. Leyla KALYONCU

Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzim sistemleri faz 1 ve faz 2 enzimleri olarak ilaç biyotranformasyonunda görev alan, PAH, PCB ve dioksinler gibi kimyasal maddeleri, insektisitleri, petrol ürünleri vb. maddeleri metabolize eden sistemlerdir. Balıklarda, karaciğer sitokrom P4502E1 ve buna bağımlı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, sitokrom P4503A4 ve buna bağımlı eritromisin N-demetilaz aktivitesinin PAH, PCB ve dioksinlerle indüklenmesi bu tip organik kirleticilerin varlığının belirlenmesinde erken uyarı sinyali görevi yaptığından, en hassas biyolojik gösterge olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada iki ayrı göl (Çavuşçu ve Beyşehir Gölleri) belirlenerek organik kirlilikle ilgili enzim aktivitesini değerlendirmek amacıyla insanların sık tükettikleri bir balık türü olan sazan balığı seçilmiştir. Ekim 2014 ve Şubat 2015 tarihleri arasında, belirlenen lokalitelerden alınan sazan balığı örneklerinde CYP450 enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Kirleticiler beslenme zinciriyle doğrudan planktonlarla ya da su ortamındaki diğer tüketici organizmalarla balıklara geçmektedir ve balıktan da tekrar insana geçmektedir. Belirlenen iki göldeki kirlilik enzim aktivite analizlerine göre yorumlanmıştır.

CYP2E1 bağımlı Anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri Çavuşçu ve Beyşehir Göllerindeki sazan balığı örneklerinde sırasıyla 101.5 ± 9.661 , 98.17 ± 1.124 (n=6) pmol/ dak/mg ; CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktiviteleri Çavuşçu ve Beyşehir Gölündeki sazan balığı örneklerinde sırasıyla 0,05548 ± 0,01009 , 0,04083 ± 0,003515 (n=6) nmol/ dak/mg olarak bulunmuştur. Her iki göldeki kirliliğin anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisinde anlamlı bir fark görülmemişken , eritromisin N-demetilaz enzim aktivitesi **p=0.0073 olup iki göl arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Çavuşçu Gölündeki eritromisin N-demetilaz aktivitesi Beyşehir Gölündeki aktiviteye göre 1.4 kat daha fazla bulunmuştur. Eritromisin N-demetilaz enzim aktivitesini etkileyen organik kirleticilerin Çavuşçu Gölünde daha fazla olduğu söylenebilmekte ve bu parametreler yönünden gölün ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : Sitokrom P450, anilin 4-hidroksilaz , eritromisin N-demetilaz, organik kirlilik.

ABSTRACT

MS THESIS

BIOCHEMICAL MONITORING OF THE EFFECT OF TOXIC AND CARCINOGENIC ORGANIC POLLUTIONS OF LAKE CARP (*Cyprinus carpio L.,1758)* LIVING IN BEYŞEHİR AND ÇAVUŞÇU LAKES

Hatice Banu KESKİNKAYA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Assoc. Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ

2015, 79 Pages

Jury
Assoc. Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Assoc. Doç. Dr. Leyla KALYONCU

Cytochrome P450 (CYP450) monooxygenase enzyme systems, phase 1 and phase 2 enzymes as drug biyotranformasyon involved in PAH, PCBs and dioxins, such as chemicals, insecticides, petroleum products and related products metabolize the system. Hepatic cytochrome CYP2E1-dependent aniline 4-hydroxylase activity and CYP3A4-dependent erythromycin N-demethylase activity of PAH, PCBs and dioxins induction with organic pollutants assets in determining early warning signal task, making it the most sensitive biological indicators were be used in fish. Identified in two different localities (Çavuşçu and Beyşehir Lakes) organic pollution related enzyme activity frequently consumed by humans for the purpose of assessment of fish species such as carp tested for the study that were be studied in this study. In October 2014 and February 2015 samples of carp were brought from the designated localities and their CYP450 enzyme activities are determined. Contaminants pass through the food chain to fish with plankton directly or other consumers aquatic organisms and pass through from fish to human again. Pollution in determining of two lakes was evaluated according to the enzyme activity assay.

Aniline 4-hydroxylase activity which dependent of CYP2E1 respectively was determined as 101.5 ± 9.661, 98.17 ± 1.124 (n = 6) pmol / mın / mg in Çavuşçu and Beyşehır lake carp samples. Erythromycin N-demethylase activity which dependent of CYP3A4 respectively was determined as 0,055 ± 0,010 , 0,040 ± 0,0035 (n=6) in Çavuşçu and Beyşehir lake carp samples. Both the pollutıon ın the lake, the effect of aniline 4-hydroxylase enzyme activity, there was no significant difference but erythromycin N-demethylase enzyme activity was determined as ** p = 0.0073 and was found to be a significant difference between the two lakes. Erythromycin N-demethylase activity ın Çavuşçu Lake, compared to activity in Beysehir Lake is more than 1.4 times. It is thought that, both heavy metals and organic pollutants are lead to varıous of immune system disease in man and ıt is known this pollutants are carcinogen. It can be said to be more of organic pollutants in the Çavuşçu Lake which affect enzyme activity of eritromisin N-demetilaz and the lake must be examined in detail in terms of these parameters.

Keywords: Cytochrome P450, aniline 4-hydroxylase, erythromycin N-demethylase, organic pollution.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ yönetiminde hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans tezi olarak sunulmuştur.

Bilimsel hayata esas anlamda adım atmamı sağlayan ve o günden bu yana bilgisini, tecrübelerini, yardımlarını benden esirgemeyen ve bundan sonra da fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmam sırasında deneyimlerini, bilgisini, fikirlerini benimle paylaşmasının yanı sıra her aşamada bana destek olan, bilimsel çalışmanın zevkli yanlarını da keşfetmeme yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Arş.Gör.Dr. Serdar KARAKURT'a, araştırmalarım sırasında yardımları için AR-GE çalışanlarına, tez çalışmam esnasında çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım değerli çalışma arkadaşım Sevilay ÇETİNGÜNEY ve Esma Kübra KAĞAN'a, yardımlarını esirgemeyen can dostum Ümran GÜNTER 'e ve en önemlisi sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, tecrübelerini, sabırlarını, desteklerini ve ellerinden gelen tüm imkanları benden esirgemeyen ve yaşantımdaki her aşamada payları yadsınamayacak kadar büyük olan babam Selami KESKİNKAYA'ya, annem Hülya KESKİNKAYA'ya ve canım kardeşim Arda Emrah KESKİNKAYA'ya gönülden teşekkürü bir borç bilirim.

Hatice Banu KESKİNKAYA
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Sitokrom P450 (CYP450)Monooksijenaz Enzim Sistemleri 2
1.1.1. Sitokrom P450 : Nomenklatür, Sınıflandırma ve Katıldığı Reaksiyonlar 2
1.1.2 Sitokrom P450 Ailesi 6
1.1.3. CYP450 Enzim Sistemlerinin İndüksiyonu 7
1.1.4. CYP450 Enzim Sistemlerinin İnhibitörleri 9
1.1.5. CYP450 Enzim Sistemlerinin Fizyolojik Fonksiyonları 10
1.2 Detoksifikasyon Enzim Sistemleri 11
1.2.1. Faz 1 Detoksifikasyon / Aktivasyon Sistemleri 13
1.2.2. Balıkta CYP450 MFO Enzim Sistemleri ve Düzenlenmesi 13
1.2.3. CYP2 ailesi 20
1.2.3.1. Sitokrom P4502E1 Hakkında Genel Bilgiler İnhibitör ve İndükleyicileri 21
1.2.4. CYP3 ailesi 23
1.2.4.1. Sitokrom P4503A4 Hakkında Genel Bilgiler İnhibitör ve İndükleyicileri 24
1.3. Göllerdeki Kimyasal Kirleticiler 25
1.3.1. Kontaminasyonun Sağlık Açısından Değerlendirilmesi 27

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **29**

2.1. Literatür Özetleri 29
2.2. Çalışmanın Amacı 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM **33**

3.1. Beyşehir Gölü Coğrafi Konumu ve Gölün Özellikleri 33
3.2. Çavuşçu Gölü Coğrafi Konumu ve Gölün Özellikleri 34
3.3. Kimyasallar 36
3.4. Örneklerin Toplanması 36
3.4.1. Balık Karaciğer Dokularının Mikrozomal ve Sitozolik Fraksiyonu 36
3.5. Dokuların Protein Konsantrasyonu Hesaplaması 38
3.5.1. BCA Tekniği 40
3.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi 41
3.6.1. Örneklerin Hazırlanışı 42
3.6.2. Jelin hazırlanışı 42
3.6.3. Yürütme ve örneklerin boyanması 43
3.7. Balık Karaciğer Mikrozomlarında Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Tayini (CYP2E1) 43
3.8. Balık Karaciğer Mikrozomlarında Eritromisin N-demetilaz Enzim Aktivitesi Tayini (CYP3A4) 46
3.9. İstatiksel Analizler 47

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 48
4.1. Araştırma Sonuçları 48
4.1.1. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı (Cyprinus carpio) örneklerinin Protein Konsantrasyonu 48
4.1.2. Balık Mikrozomlarındaki Protein Profillerinin SDS-PAGE Analizi İle Belirlenmesi 50
4.1.3. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı Dokularında Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesi 50
4.1.4. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı Dokularında Eritromisin N-demetilaz Enzim Aktivitesi 52
4.2. Tartışma 53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 57
5.1. Sonuçlar 57
5.2. Öneriler 58
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

°C	:	Santigrat derece
Cm	:	Santimetre
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
mM	:	Milimolar
µM	:	Mikromolar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
nm	:	Nanometre
nmol	:	Nanomol
pmol	:	Pikomol
ppb	:	Milyarda bir kısım

KISALTMALAR

Ɛ-ACA	Ɛ -Amino kaproik asit
BSA	Bovin serum albümin
CO	Karbon monooksit
CO_2	Karbondioksit
CYP	Sitokrom P450
DDT	Dikloro difenil trikloroethan
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononfikleotit
HEPES	N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2, etan sülfonik asit
KCl	Potasyum klorid
MFO	Karma fonksiyonlu oksijenazlar
$MgCl_2$	Magnezyum klorür

Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit indirgenmiş form
$NADP^+$	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat yükseltgenmiş form
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat indirgenmiş form
NDMA	N-nitrozodimetilamin
PAH	Poliaromatik hidrokarbon
PCB	Poliklorlu bifenil
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SKKY	Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği
TCA	Trikloroasetik asit
TRIS	Tris (hidroksimetil) aminometan
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilen diamin

1. GİRİŞ

Suda meydana gelen kirliliğin büyük bir çoğunluğu organik kirlenme ile meydana gelmektedir. Sucul ortamlarda yaşayan organizmalar çevresel atık/kimyasallar gibi çeşitli moleküllere maruz kalırlar. Bunlar PAH, PCB ve dioksinleri içeren karmaşık yapılı kalıcı organik kimyasallardır. PCB (Poli Klorlu Bifeniller) daha önceki yıllarda yoğun kullanımlarından ve doğada uzun sürede yıkıma uğradıklarından dolayı günümüzde halen insan ve hayvan sağlığı açısından tehdit oluşturmaya devam etmektedir. Kimyasal kararlılıkları ve lipofilik özellikleri nedeniyle doğada ve canlı organizmada birikme eğilimi gösterirler. Bugüne kadar PCB'lerin toksik, kanserojenik, immun baskılayıcı, teratojenik ve endokrin bozucu olmak üzere birçok olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Seyran ve Erişir, 2008) .

Gerek endüstriyel üretim kirlilikleri, gerekse tarımsal aktivitelerde kullanılan mücadele ilaçları çeşitli yollardan göllere ulaşır ve birikirler. Büyük göllerde 1000'den fazla kimyasal madde tespit edilmiştir. Çevrelerinde tarımsal faaliyet yapılan tüm göllerde toksik etkiye sahip olan PCB ve DDT'nin ana kimyasal kirleticiler olduğu belirlenmiştir (Telefoncu ve Zihnioğlu, 1992).

Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzim sistemleri faz 1 ve faz 2 enzimleri olarak ilaç biyotranformasyonunda görev alan, PAH, PCB ve dioksinler gibi kimyasal maddeleri, insektisitleri, petrol ürünleri vb. maddeleri metabolize eden sistemdir (Boyuneğmez, 2004).

Kimyasal kirlenmeye bağlı olarak organizmada ortaya çıkan biyolojik değişimlerin en önemlilerinden birisi enzim aktivitelerinde gözlenen farklılıklardır. Biyotransformasyon enzimlerinin belirli kirleticiler yolu ile indüksiyonu gibi moleküler etkilerinin çalışılması, bizlere kirletici düzeyleri, bu kirleticilerin sinerjistik veya antagonistik etkileri ve organizmanın savunma tepkileri hakkında önemli bilgiler verebilir. Bu tip araştırmalar çalışılan alanın su kalitesinin belirlenmesinde çok büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Göksoyr and Förlin, 1992).

Karaciğer sitokrom CYP2E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi ile CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktivitesinin PAH, PCB ve dioksinlerle indüklenmesi organik kirleticilerin varlığının belirlenmesinde erken uyarı sinyali görevi yaparak, en hassas biyolojik gösterge olarak kullanılmıştır.

1.1. Sitokrom P450 (CYP450)Monooksijenaz Enzim Sistemleri

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi, steroidler, yağ asiti, prostaglandinler, lökotreinler ve daha birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinojenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif mekanizmasına katılan ‘’hemtiyolat’’ yapısından protein enzimlerden oluşur (Lu ve Lewin, 1974; Nebert ve Gonzalez, 1987).

Sucul ve karasal hayvanlar ağırlıklı olarak karaciğerde lokalize çeşitli enzimler tarafından katalize edilen oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjügasyon reaksiyonları ile yabancı bileşikleri metabolize ederler. Bu enzimler karaciğer dışında diğer dokularda da düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Ksenobiyotikler böylece biotransforme edilir daha az toksik ve daha polar hale getiririlir ve daha sonra karaciğer, böbrek veya solungaçlarla atılır (Buhler ve Williams, 1988).

Sitokrom P450(CYP450) monoksijenaz enzim sistemleri olgun eritrosit,ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunan hem-protein ailesidir. Bu enzimler yapısal olarak farklı çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu kataliz ederler. Endojen sentezlenen birçok bileşik CYP450 enzimlerinin subsratı olarak görev yapar. Bu bileşikler; lökotreinler ve prostaglandinler dahil yağ asitleri streoidler, yiyecek katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinlerle, enjeksiyonla havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir. Bu sistem inhibisyon ve indüksiyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir (Özerol, 1996).

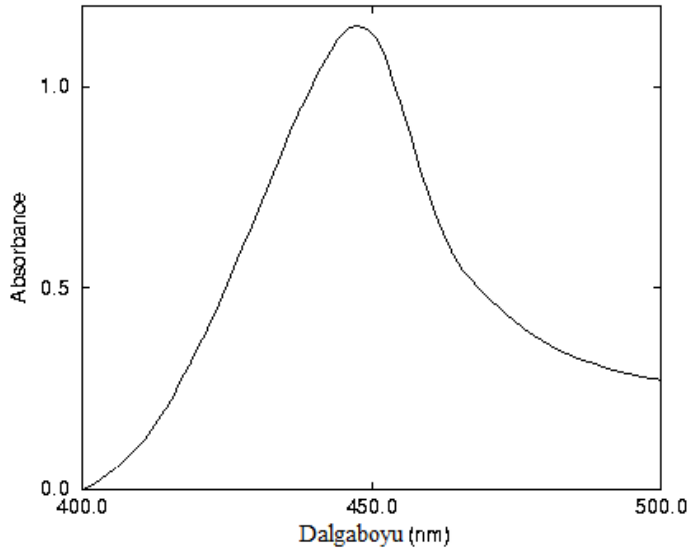
CYP450 enzimleri 400-530 aminoasitten yapılı proteinlerdir. Baz dizilimi benzerliklerine göre 40 farklı aile içinde sınıflandırılır (Özerol, 1996).

1.1.1. Sitokrom P450 : Nomenklatür, Sınıflandırma ve Katıldığı Reaksiyonlar

CYP450 monooksijenaz enzim sistemi; genellikle, mulitikomponentli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılırlar (NC-IUB, 1991).

CYP450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorbans spektrumu vardır. Genellikle mikrozomal olarak adlandırılan endoplazmik retikulum

veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan CO_2 gazı geçirildikten sonra sodyum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorbans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO_2 bağlanır ve 450 nm'de pik yapan absorbans spektrumu elde edilir (Şekil 1.1.1). Bu pigmentlere P450 adı 450 nm'de absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik CYP450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans veren dalga boylarına sahiptir (Hanukoğlu, 1995).



Şekil 1.1.1. Karbonmonoksit bağlı sitokrom P450'nin absorbans spektrumu

Karaciğerde birçok CYP450 enzimleri bulunmakta ve CYP450 enzimleri baz dizilimi benzerlikleri, kontrol eden gen ailelerine ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 1.1.1.) (Özerol, 1996). Bu nomenklatür evrensel olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 1.1.1. Sitokrom P450 sisteminin genel özellikleri

Aile	Alt grup	Adlandırma	Gen lokalizasyonu	İnsandaki fonksiyonu	Faredeki fonksiyonu	Klinik
1	Alt aile 1A	CYP1A1	15q22-q24	Dioksin indüksiyonu	Aromatik bileşiklerin indüksiyonu	Fenasetin metabolizması farklı
		CYP1A2	Bilinmiyor		Aromatik bileşiklerin indüksiyonu	
	Alt aile 1B	CYP1B1	2			
2	Alt aile 2A	CYP2A1	19q13.2	Fenobarbitol indüksiyonu		
	Alt aile 2A3	CYP2A3	Bilinmiyor			
		CYP2A5			15-alfa-hidroksilaz	

		CYP2A6	Bilinmiyor			Kumarin direnci
	Alt aile 2B	CYP2B	19q13.2	Fenobarbitol indüksiyonu		
		CYP2B9			Fenobarbitol indüksiyonu,tip a	
		CYP2B10			Fenobarbitol indüksiyonu, tip b	
		CYP2B13			Fenobarbitol indüksiyonu, tip c	
	Alt aile 2C	CYP2C	10q24.1-q24.3		Fenobarbitol indüksiyonu	Hidantoin toksisitesi
		CYP2C8	10q24.1			
		CYP2C9	10q24.1			
		CYP2C10	10q24.1			
		CYP2C18	Bilinmiyor			
		CYP2C19	Bilinmiyor			
	Alt aile 2D	CYP2D9				Hidantoin toksisitesi
					Testosterone16-alfa-hidroksilaz	Debrizokin hidroksilas-yonu spartein ve nortriptilin oksidasyonu
	Alt aile 2E	CYP2E	10q24.3-qter	Etanol indüksiyonu	Etanol indüksiyonu	
	Alt aile 2F	CYP2F1	19q13.2	Etoksikumarin metabolizasyon		
	Alt aile 2F	CYP2F2			Naftalin hidroksilasyonu	
3	Alt aile 3A	CYP3A4	7q22-qter	Glukortikoid indüksiyonu		
	Alt aile 3A	CYP3A11			steroid indüklenen	
	Alt aile 3A	CYP3A13			steroid inducible	
4	Alt aile 4A	CYP4A10			laurik asit-omega-hidroksilaz	
	Alt aile 4A	CYP4A11	1			
	Alt aile 4B	CYP4B1	1p34-p12			
	Alt aile 4D	CYP4D_PEN	Bilinmiyor			
5	Alt aile 5	CYP5				Tromboksan sentetaz eksikliği

11	Alt aile 11A	CYP11A	15q23-q24	Kolesterolde yan zincir kırılması	Kolesterol yan zincir klevaj enzimi	
	Alt aile 11B	CYP11B1	8q21-q22		Steroid-11-beta-hidrokslaz	Adrenal hiperplasi IV
	Alt aile 11B	CYP11B2	8q21-q22		Steroid-11-beta-hidrokslaz	Hipoaldosteronism
17	Alt aile 17	CYP17	10q24.3		Testosteron biyosentezi	Adrenal hiperplasi V
19	Alt aile 19	CYP19	15q21		Aromataz	Familya jinekomasti
21	Alt aile 21	CYP21A1			Steroid-21-hidroksilaz	Adrenal hiperplasi III

CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki şekilde gösterilir:

$$NADPH + H+ + O_2 + SH \rightarrow NADP+ + H_2O+ S\text{-}OH \quad (1.1)$$

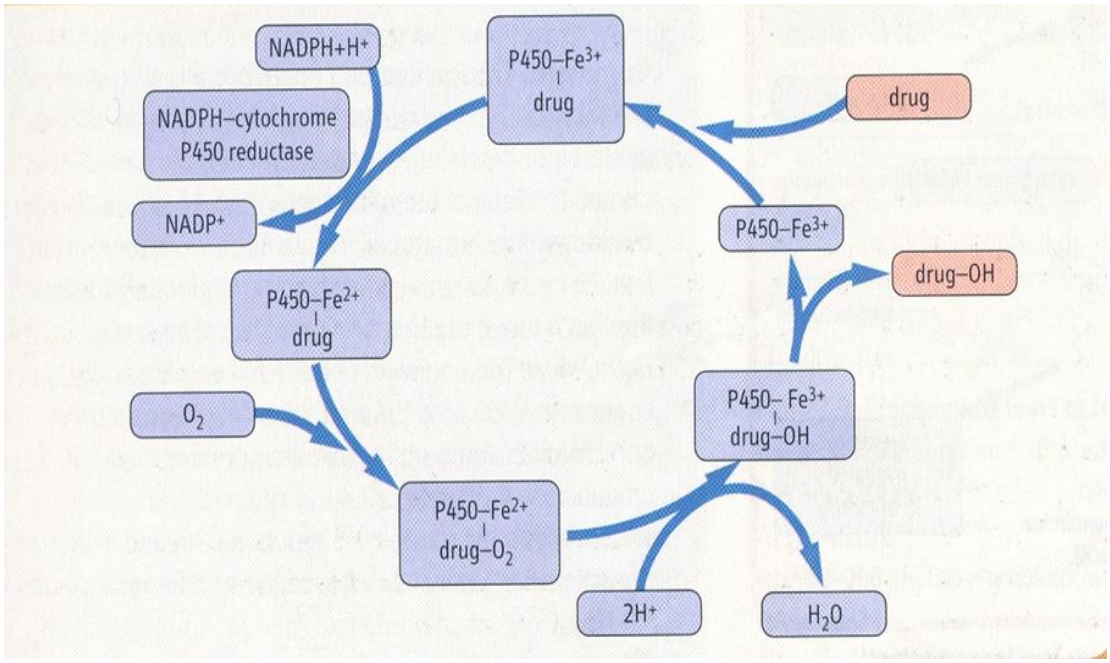
Buradaki substrat (S), bir streoid, yağ asidi, ilaç veya oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 enzimleri adı verilmektedir (Özerol, 1996).

Bu enzimler iki grupta sınıflandırılmaktadır: bakteriyel veya mitokondriyel enzimler tip I, mikrozomal olanlar ise tip II olarak sınıflandırılır. Diğer yandan P450 içeren monooksijenaz sistemlerindeki temel proteinler kullanılarak da sınıflandırma yapılmaktadır (Hanukoğlu, 1995).

Sitokrom P450 enzim sistemlerinin çalışması için bir elektron transfer zinciri gerekir. Endoplazmik retikulumda ya da iç mitokondri membranında bu kaynak NAPH sitokrom P450 redüktazdır. CYP450 enzimleri, terminal elektron alıcısı ve monooksijenazlar olarak fonksiyon görür. Bu gruptaki enzimlerin benzersiz bir absorbans spektrumu vardır (Nuyan, 2008).

Sitokrom P450 reaksiyon dizini aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil.1.1.2) (Anonim, 2015). Mitokondriyal ve birçok bakteriyel P450 sistemlerinde 3 komponent vardır: flavin adenin dinükleotid (FAD) kapsayan bir flavoprotein (nikotinamid-adenin dinükleotid'in mikrozomal indirgenmiş formu [NADH]'na veya nikotinamid-adenin dinükteotid [NADH]'a bağlı redüktaz), demir-sülfürlü bir protein ve P450. Ökaryotik P450 sistemlerinde ise 2 komponent bulunmaktadır: hem FAD hem de flavin

mononükleotid (FMN) içeren bir flavoprotein olan NADPH : P450 redüktaz (CPR) ve P450. Günümüze kadar tanımlanan tüm P450 ihtiva eden flavin adenin dinükleotid (FAD), ferredoksin : $NADP^+$ redüktaz (FNR), flavin mononükleotid (FMN), adrenodoksin, glutatyon redüktaz (GR), NADPH : P450 redüktaz, flavodoksin, Fe-S proteinleri, sitokrom *b5* ve diğer monooksijenaz enzim sitemleri ortak yapı göstermektedir. (Djordjevic ve ark., 1995).



Şekil 1.1.2. SitokromP450 reaksiyon dizini

1.1.2 Sitokrom P450 Ailesi

Sitokrom P450 ailesi, çeşitli sistemlerdeki en değişken aileyi oluşturmaktadır. P450 ailesinin evrimi sonunda bir çok tipi ortaya çıkmıştır (Nelson ve ark., 1993). CYP 450 enzimlerinin yeryüzündeki her canlı türünde mevcut olduğu bulunmuştur. 29 Şubat 2008 tarihi itibariyle çeşitli organizmalardan toplam 8128-sitokrom P450 dizileri tanımlanmıştır. 2872 hayvan , 2867 bitki, 1238 mantar, 912 bakteri, 238 diğer ökaryotik CYP enzimleri olduğu tespit edilmiştir (Nuyan,2008). Bunların her biri başka bir tip maddeyi hedef edinir. Oksijenaz olarak sınıflandırılan diğer proteinlerden hiçbiri, CYP450 ailesinin üyelerindeki kadar esneklik göstermez. Son 10 yılda CYP450'nin baz dizilimi ve yapısı tespit edilmiş, CYP450 regülasyon ve evrimini anlamamızı sağlayan

bilgiler çığ gibi artmıştır (Degtyarenko ve Archakov, 1993). Sitokrom P450 enzim sistemi üç ayrı grupta incelenebilir:

1.Grup: Bu grupta 5'den 52'ye kadar olan sitokrom P450 enzim aileleri yer alır. Endojen substratlara karşı oldukça güçlü bir ilgi gösteren en korunmuş enzim aileleridir.

2.Grup: 1'den 3'e kadar olan enzim aileleri bu grupta bulunur. Bu gruptaki enzimler kendi substratlarına karşı düşük afinite gösteren enzimlerdir. Daha çok zenobiyotiklerin ve ilaçların metabolizasyonundan sorumludurlar .

3.Grup: 52'den55'e kadar olan enzim aileleri bu grupta bulunur. Bu gruptaki enzimler yağ asitleri ve bunlarla ilişkili substratları ve bazı ksenobiyotikleri metabolize ederler (Zamani ve Yıldırım, 2014).

Biyomonitorizasyonda polimorfizmleri değerlendirilen enzimler daha çok 2. grupta yer alan enzimlerdir. Bu gruptaki enzimler faz I metabolizmasının %70-80'inden sorumludur (Ingelman-Sundberg, 2004).

Bununla birlikte P450 ailesinin filogenetik olarak akraba olmadığı ve *CYP1A1, 1A2, 2E1, 7, 11A1,11B1, 17, 19, 21A1, 27* ve *51* gibi çeşitli gen gruplarından oluştuğu anlaşılmıştır. Memelilerdeki *CYP1A1* ve *CYP1A2*, ratlardaki *CYP2D* demeti, ev sineklerindeki *CYP6A* ve *CYP6C* gen demetlerinin gen duplikasyonu ile ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Cohen ve ark., 1995).

CYP2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 4A, ve *52A* gibi P450 gen ailelerinde sayısız türe spesifik gen duplikasyonları ve konversiyon olayları ortaya çıkmaktadır. Bu şekildeki evrim türlere farklılaşma ile ilgili olabilir (Özerol, 1996).

Toksik kimyasalların biyotransformasyonundan ve özellikle prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonundan sorumlu olan ikinci grupta yer alan enzimlerdir. Bu enzimlerin başlıcaları CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP1E1, CYP1A6, CYP1A4, CYP2E1 ve CYP3A4 enzimleridir.

1.1.3. CYP450 Enzim Sistemlerinin İndüksiyonu

İndüksiyon, çeşitli ilaçlar veya endüstri atıklarında bulunan PAH, PCB gibi çevresel atıklarla ilgili olarak enzim sentezinin artmasıdır. İndükleyici ajanlar genellikle belirli sitokrom P450 ailesine spesifiktir (Çizelge 1.1.2.) (Benet ve ark., 1996).

Hem endojen hem de eksojen bileşikler tarafından CYP450'lerin indüklendiği 1960 yıllarından beri bilinmektedir. CYP450 indüksiyon mekanizması hem

transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel seviyede belirlenmiştir. Örneğin ; etanol ve asetonun her ikisi de farklı mekanizmalarla, iki farklı CYP450 alt gen ailesini indükleyebilir (Zima ve ark., 1993).

Kompkles bir indüksiyon etanol, aseton, pirol gibi indükleyici ajanların ön tedavisi veya açlık gibi durumlarda CYP2E1 ile ortaya çıkar. Küçük organik bileşiklerin verilmesi mRNA seviyesini etkilemeden sitokrom P450 2E1 protein miktarında büyük artışlara neden olur (Zima ve ark., 1993). Bazı ilaç metabolize eden enzimler de CYP450 enzimlerini indüklemektedir (Gonzalez, 1989).

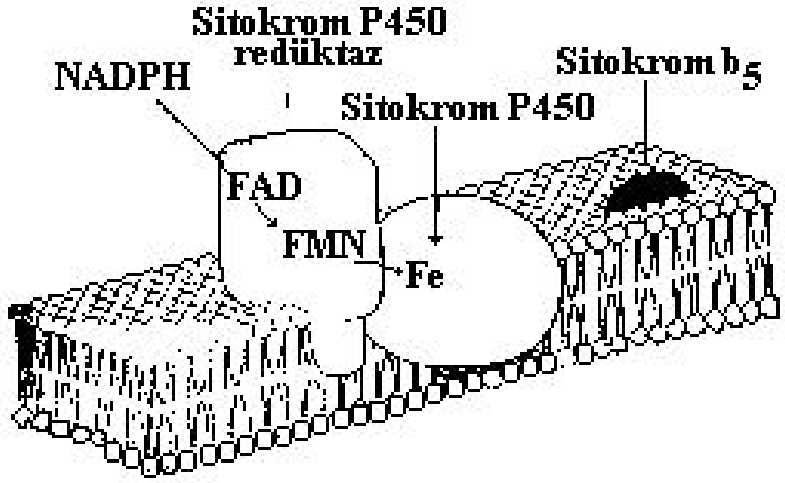
Çizelge 1.1.2. Başlıca insan karaciğer sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri (Özerol, 1996)

Enzim	**Subsratları**	**İndükyecileri**	**İnhibitörleri**
CYP1A2	Asetominofen, teofilin,kafein,fenasetin,trikarboksilik asitin demetilasyon yolu	Sigara içme, kızartma yiyecekler, omeprazol,	Siprofoksasin, Enoksasin, Norfloksasin Fluvoksamin
CYP2C	Dapson,diyazepam, warfarin,tolbutamid,fenitoin	deksametazon fenobarbital	Amiodaron Simetidin Sertralin
CYP2D6	Beta blokerlar,debrizokin,omeprazol, Dekstrometorfan,trisiklik antidepresanlar	Bilinmiyor	Klomipramin Desipiramin Fluoksetin Paroksetin Kinisdin Sertralin Tiyoridazin
CYP2E1	Asetominofen,etanol	Etanol,izoniazid	Disülfiram
CYP3A4	Sisaprid, kortikostreoidler, siklosporin Dapson, dekstrometorfan, diyazepam Diltiyazem, enalapril, itrakonazol Ketokonazol, lovastatin, makrolitler Midazolam,nifedipin,kinidin,gonadal hormonlar, takrolimus(FK506), terfanadin, teyofilin, triazolam, verapamil, warfarin.	Karbamapezin Glukokortikoidler Fenobarbital Fenitoin Rifampin	Simetidin İtrakonazol Ketokonazol makrolitler Nifedipin Verapamil Sertralin fluoksetin

1.1.4. CYP450 Enzim Sistemlerinin İnhibitörleri

Birçok CYP450 formu olduğu için bu enzimlerin fonksiyon yaptıkları organlardaki rollerinin bilinmesi gerekir. Böbrek üstü bezinde ve üreme organlarında CYP450 'nin bazı metabolik yollara katıldığını göstermek için inhibitör ajanlardan yararlanılır. Daha önceden bahsedildiği gibi birçok dokuda CYP450, karbondioksit spektrumu ile tespit edilmektedir. Karbon monoksit, oksijen yerine, daha çok bağlanma afinitesi gösterdiği hem demirine bağlanır ve böylece hem demirinin fonksiyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder. Metabolik yollarda bir subsratın katalizinde terminal oksijenaz olarak CYP450'nin tanımlanması indirgenmiş CO'in maksimum absorbsiyon verdiği 450 nm'de CO inhibisyonunu geriye döndürür. Bu olay ilk kez böbrek üstü mitokondrilerindeki CYP450 enzimlerinin subsratı olarak streoidlerde gösterilmiş ve daha sonra karaciğer mikrozomlarında metabolize edilen ilaçlarla da meydana geldiği anlaşılmıştır (Eisen, 1986).

Son yıllarda çalışmalar spesifik P450 'lerin substrat veya substratlarına güçlü yapısal benzerliği olan inhibitörlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak katalitik turnover sırasında enzimin prostetik grubu veya proteinleri ile geri dönüşümsüz inhibisyon ürünleri oluşmaktadır. Bu inhibitörler, enzimler için subsratlarına yapısal benzerlikleri nedeniyle belirli P450 formları için oldukça spesifiktir (Eisen, 1986).



Şekil 1.1.3. Endoplazmik retikulum (mikrozomal) sitokrom P450 sistem komponentleri (Özerol, 1996).

1.1.5. CYP450 Enzim Sistemlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

CYP450 enzim sistemi endojen veya eksojen orijinli çeşitli lipofilik bileşikleri metabolize eden enzim ailesinden oluşur (Özerol, 1996). CYP450 sistemi, metil grubundaki karbon atomunun basit hidroksilasyonlarını katalize edebilir, bir alkandaki metillenmiş karbon içine OH grubunu yerleştirebilir, bir fenol oluşturmak üzere aromatik halkaları hidroksile edebilir veya bir epoksid oluşturmak üzere karbon-karbon çifti arasına oksijen atomunu ekleyebilir. CYP450 ile katalize edilen reaksiyonlar bazen çok kompleks olabilir. Bu enzimler karbon-karbon bağlarını parçalar veya alkolleri aldehitlere oksitleyebilir (Lindros ve ark., 1995).

Metabolize edilen kimyasal maddelerden bazıları aşağıdaki çizelgede görülmektedir (Çizelge 1.1.3) (Özerol, 1996). Bu reaksiyonların çoğu primer olarak karaciğerde meydana gelmektedir (Benet ve ark., 1996). Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimlerden bazıları da aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 1.1.4) (Özerol, 1996).

Çizelge 1.1.3. Sitokrom P450 enzimlerinin metabolize ettiği kimyasal karsinojenler

Reaksiyon	**Örnekler**
Alifatik hidroksilasyon	Valproik asit, pentobarbital
Aromatik hidroksilasyon	Debrizokin, asetanilid
Epoksidayon	Benzen, benzen[α] piren
Dealkilasyon	Aminopirin, fenasetin, 6-metiltiyopürin
Oksidatif deaminasyon	Amfetamin
N veya S oksidasyonu	2-asetilaminofloren klorpromazin
Dehalojenasyon	Halotan
Alkol oksidasyonu	Etanol

Çizelge 1.1.4. Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler

Reaksiyon Tipi	Enzimler	Subsratları
Oksidasyon	Sitokrom P450 Alkoldehidrojenaz	Toluen Etil alkol
Redüksiyon	Flavinli monooksijenaz	Dimetilanid
Hidrasyon	Keton redüktaz Epoksid hidrolaz	Metirapon Benzo[α] piren-7,8-epoksid
Hidroliz		Prokain

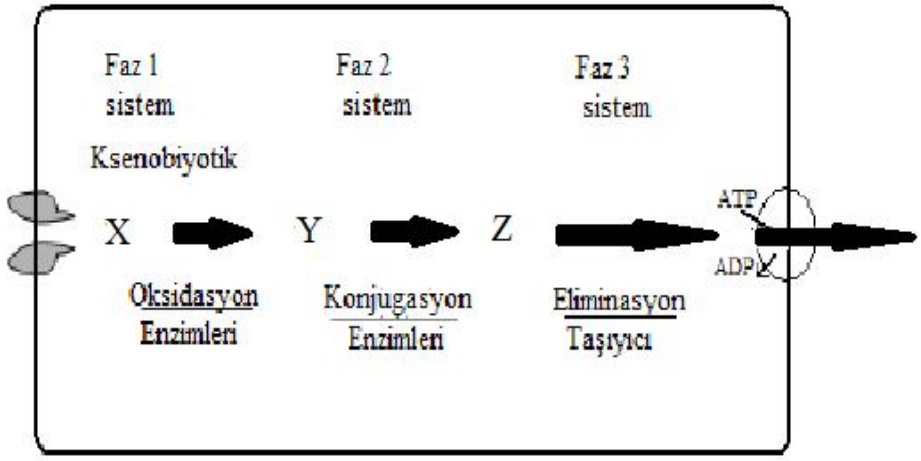
1.2. Detoksifikasyon Enzim Sistemleri

Günümüzde insanlar ve hayvanlar, yabancı kimyasallarla gitgide daha fazla karşılaşmaktadırlar. Bu kimyasal saldırıyla nasıl başa çıkılacağının öğrenilmesinde zenobiyotiklerin hücre düzeyinde nasıl işlendiğinin anlaşılması büyük önem taşır ki bu da metabolizmayı anlamakla olur. Metabolizma ve biyotransformasyon sözcükleri genellikle eş anlamlı olarak kullanılsa da aslında metabolizma, ksenobiyotiğin emilim, dağılım, biyotransformasyon ve ekskresyon aşamalarının tümünü içerir (Kato ve ark. 1989).

Yıllar boyunca, insanlar farmasotik bileşikler veya gıda katkı maddelerinden bazı çeşitli ksenobiyotikleri alıyor olabilir. Bu kimyasallar, mutasyona, kanserlere ve doğum kusurlarına yol açabilmektedir. Karsinojen kimyasallar hücresel makromoleküller ile tepkime vermesi için metabolik aktivite gerektirmektedir. (Karakurt, 2008).

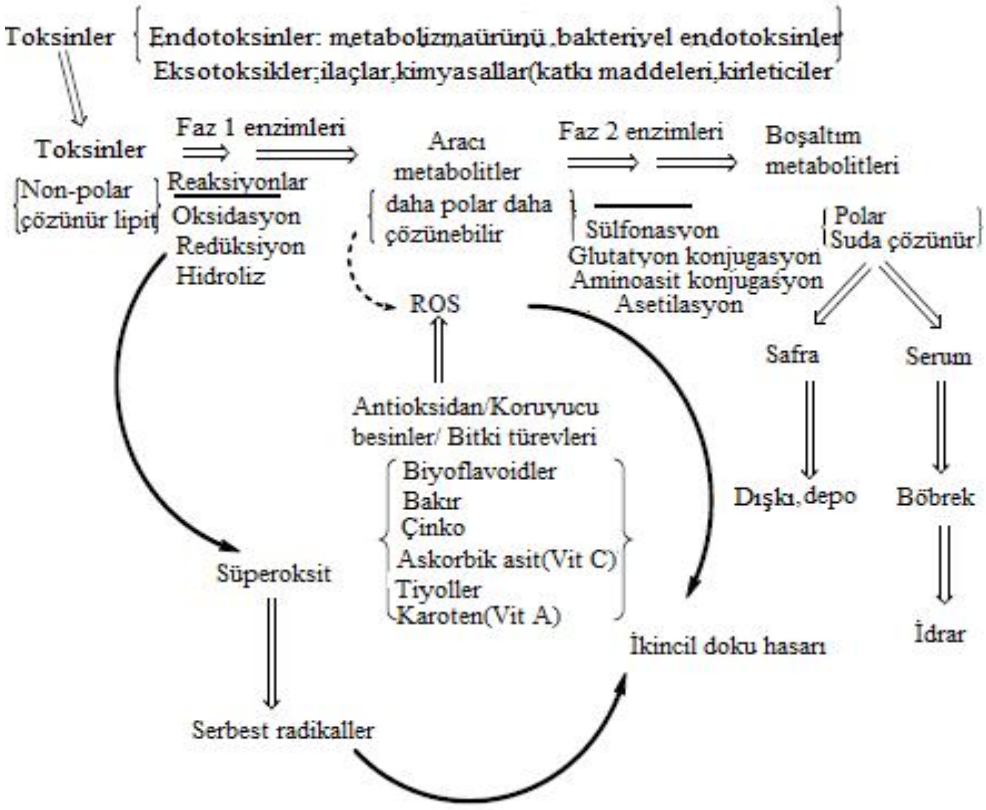
Ksenobiyotiklerin metabolizması iki aşama içerir; birincisi reaktif alan oluşturmak için oksijenin kullanıldığı ve faz 1 metabolizması olarak bilinen fonksiyonel aşama, ikincisi reaktif alana suda çözülebilir grupların eklenmesiyle sonuçlanan ve faz 2 metabolizması olarak bilinen konjugasyon aşamasıdır (Şekil 1.2.1.) (Karakurt, 2008).

Vücut ksenobiyotiklerin yüksek dozuna maruz kaldığında faz 1 ve faz 2 enzimleri bu bileşikleri detoksifiye etmek amacıyla indüklenir. İndükleyiciler tek veya çok fonksiyonlu olabilir (Park, 1996). Tek fonksiyonlu indükleyiciler sadece bir enzimi veya detoksifikasyon sisteminin bir fazını etkiler. Çok fonksiyonlu indükleyiciler ise birçok enzimi ve aktivitelerini etkiler (Kall, 1995).



Şekil 1.2.1. Faz 1, faz 2 ve faz 3 detoksifikasyon sistemlerinin gösterilmesi

Vücudumuz bu çevresel toksikantları Şekil 1.2.2'de gösterildiği gibi detoksifikasyonla yönetme yeteğine sahiptir. Bu görev için vücut bir sistem geliştirir. Karaciğer, ksenobiyotik metabolizmasında rol alan başlıca organdır. Sitokrom P450 enzimleri bağırsak, böbrek ve akciğerde genellikle daha düşük miktarlarda bulunmuştur (Arınç ve Philpot, 1976; Arınç, 1993). Lipofilik bileşikler biyotransformasyon yoluyla suda çözünebilen bileşiklere dönüştürülür ve idrarla atılır (Şekil 1.2.2.)(Karakurt, 2008).



Şekil 1.2.2. Karaciğer detoksifikasyon yolları ve destekleyici besinler

1.2.1. Faz 1 Detoksifikasyon / Aktivasyon Sistemleri

Faz I detoksifikasyon sistemi P450 enzimleri, flavin içeren Monooksijenazlar (FMO) ve epoksit hidrolazları içermesine karşın, bu sistemin ana bileşeni çok büyük enzim grupları içeren ve P450 süper gen ailesi tarafından kodlanan sitokrom P450 sistemidir (Omura ve Sato, 1964).

CYP450 enzimleri membrana bağlı proteinlerdir ve yaklaşık 50 kDa molekül ağırlığa sahip bir ''heme''parçası içerir. Diğer MFO ların aksine CYP enzimleri başlıca karaciğerde endoplazmik retikulumda bulunurlar. Karaciğerin toplam CYP450 içeriği 0.06 ila 0.46 nmol / mg mikrozomal protein arasında değişmektedir (Iyer ve Sinz, 1999). NADPH ve O_2, P450 kullanarak oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonlarıyla, enzimler modifiye edilir veya moleküle yeni fonksiyonel gruplar eklenir (Vermeulen, 1996; Iyer ve Sinz, 1999; Guengerich, 2003). Lu ve Coon (1968), ilk defa karaciğer mikrozomal sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz sisteminin üç bileşeni olduğunu göstermişlerdir: sitokrom P450, FAD ve NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz ve lipit içeren FMN (Karakurt, 2008).

1.2.2. Balıkta CYP450 MFO Enzim Sistemleri ve Düzenlenmesi

Sitokrom P450 enzimleri balıkta hem endojen hem de eksojen kaynaklı metabolitlerin oksidatif metabolizmasını kapsayan başlıca enzimlerdir (Buhler ve Wiiliams, 1989; Göksoyr ve Förlin, 1992). Enzim aktiviteleri genellikle memelilerdekinden daha düşüktür ve balık CYP450 enzimlerinin yaklaşık 25°C optimum sıcaklıkları vardır. Daha sonraları sitokrom P450 formları memelilerde görüldüğü gibi balıklarda da keşfedilmiştir ve birkaç laboratuvarda cok sayıda deniz ve tatlı su balığından saflaştırma ve sitokrom P450 enzimlerinin karakterizasyonunda başarılı olunmuştur (Buhler ve Wiiliams, 1989; Göksoyr ve Förlin, 1992; Stegeman, 1989).

Yoğun olarak son 20 yılda balık CYP genlerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bütün balık türlerinde P450 kodlayan 137 gen tespit edilmiştir. Bu genler 18 CYP ailesi olarak sınıflandırılmıştır bunlar; CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 ve CYP51'dir. Balıkta CYP450 enzim çalışmaları su kirliliğini

içeren çevresel stresler tarafından P450 genlerinin düzenlenmesine katkı sağlamıştır. 1980'lerin sonlarında, gökkuşağı alabalığı ve diğer balıkların karaciğerlerinde CYP varlığı gösterilmiştir (Heilmann ve ark.,1988 ; Melancon ve ark., 1981 ; Stegeman, 1989 ; Winkelhake ve ark., 1983; Winston ve ark., 1988). Sucul sistemlerde gökkuşağı alabalığının kanserojen mekanizmaları çalışmak için önemli bir test tür olduğu kanıtlanmıştır (Bailey ve ark, 1984).

MFO sistem in *vitro* olarak bir tatlısu balığında tanımlanmış (Buhler ve Rasmusson, 1968) ve birkaç araştırmacı hem tatlı su hem deniz balığında in *vivo* metabolize olduğunu göstermişlerdir (Lee ve ark., 1972). Buhler ve Rasmusson gökkuşağı alabalığı karaciğerinde ve diğer balık türlerinde de sitokrom P450 enzimlerinin varlığını göstermişlerdir. Türlerarası büyük varyasyon oranları ise Adamson (1967) tarafından kaydedilmiştir.

Balık karaciğeri mikrozomal MFO sisteminin ayrımı ilk kez Arınç ve arkadaşlarının 1976'daki çalışmasıyla tanımlanmıştır. Küçük Çemçe balığı karaciğer mikrozomal MFO sistemi üç bileşenden oluşur: sitokrom P450, NADPH sitokrom P450 redüktaz ve lipit (Arınç ve ark., 1976). Bu yüzden balıktaki MFO sistem memelilerde mikrozomal sitokrom P450 bağımlı elektron taşıma sistemine benzer çok bileşenli sistemler gibi görünür. Brodi ve Mackel (1962), yaptıkları çalışmada balığın ksenobiyotiklerin metabolizması için gerekli enzimlerinden yoksun olduğunu ileri sürselerde günümüzde artık balıkta iyi bir MFO sistemi kurulduğu bilinmektedir. Doğal balık popülasyonlarında biyotik ve abiyotik faktörlerin ikisinin birlikte P450 seviyelerinde ve aktivitelerinde arka plan varyasyonlara neden olduğu bilinmektedir (Çizelge 1.2.1). Çevresel kirleticilerin biyokimyasal izlenmesinde böyle biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi dikkate alınmalıdır. Bu P450 sistemlerini etkileyen mekanizmaların anlaşılmasıyla ve bu değişikliklerin büyüklüğü ve zamanlaması karakterize edilerek başarılabilir (Göksoyr ve Förlin, 1992).

Çizelge 1.2.1. Balıkta sitokrom P450 sistemlerinietkileyen faktörler

Türler	Üreme aşaması	Diyet faktörleri
Aile-soy	Sıcaklık	Uyaran maddeler
Cinsiyet	Yaş	Antagonistik ajanlar

Sitokrom P450 sistemleri yapısal ve fonksiyonelce ilgili hemoproteinlerin süper ailesine aittir. P450 izoenzimleri demir-protoporfirin IX ve gevşek hidrofobik güçleri, elektrostatik ve kovalent bağlarla tek bir polipeptit zincirinden oluşur. Bu izozimlerin molekül ağırlıkları 45,000 ila 60,000 aralığındadır. Önceleri sitokrom P450 enzimleri endoplazmik retikulum içerisine yerleşmiş olarak incelenmiş fakat son kanıtlar, P-450 proteinlerinin bir yada iki peptit segmentleriyle stoplazmada aktif ayrılarak sadece fosfolipit membranla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Brown ve Black, 1989).

Balıkta sucul kirleticiler olarak bilinen CYP450 aktivitelerinin pek çok indükleyicisi büyük ölçüde balık P450 sistemini araştırmaya teşvik etmiştir. Sucul ortamdaki kirleticiler; poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu dibenzo-p-dioksinler ve dibenzofuranslar (PCDD/PCDF), polihalojenlenmiş bifeniller (PCB, PBB) ve pestisit, herbisit gibi diğer halojenlenmiş bileşiklerdir. Bu bileşiklerden bazıları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 1.2.2) (Goksoyr ve Förlin, 1992).

Çizelge 1.2.2. Balık sitokrom P450 sistemini indükleyici özellikleri olan bazı bileşikler

Benzo(a)piren	7,12-dimetilbenz (a) antirasen	tert-bütil hidroksi kinon
3-metilkolantren	2,3,7,8-tetraklorodi-benzo-p-dioksin	Etoksikuin
β -naftoflavon	Poliaromatik hidrokarbonlar	Siklo propenoid yağ asitleri
Piren	Bütilatlı mono klorodifenil ve diğerleri	İzosafrol
Krizen	Bütilatlı hidroksi anizol	Endosülfan
Hekzabromobenzen	Bütilatlı hidroksi toluen	

Toksik kimyasalların korkutucu sayısı sucul ortamlardaki organizmaları tüketen insanın yanısıra bu organizmaların sağlığı için de başlıca tehdittir (Dave, 1990; Payne ve ark., 1987). Akuatik ortamlardaki kimyasalların etkilerinden dolayı, kirliliğin boyutlarını ve deniz türleri üzerindeki etkisini izlemek daha önemli hale gelmiştir (Boyuneğmez,2004). Organizmada biriken kirleticiler ilk olarak moleküler ve hücresel seviyede değişikliklere yol açarlar. Bu organizmada olumsuz etkilere neden olabilir popülasyonda değikliklere yol açabilir (Arınç ve ark., 2000).

Sitokrom P450-kaynaklı enzim aktiviteleri erken balık gelişim evrelerinde embriyoları PCB ya da suda çözünür ham petrol fraksiyonuna maruz bırakılarak indüklenmiştir (Binder ve Stegeman, 1983). Sitokrom P450'lerin birçok formu

memelilerdeki gibi CYP1A CYP2B, CYP2E, CYP2M, CYP2N, CYP2K, CYP3A, CYP11A, CYP17, Cyp19, CYP26, CYP46, CYP51 ailelerine mensuptur ve balık türlerinde bulunduğu belirlenmiştir. Yakın zamanlarda yaptığı çalışmada Nelson (2003) kirpi balığında sadece bir P450 ailesi CYP39'un bu balık türünde eksik olduğunu bildirmiştir.

Balık karaciğer mikrozomal P450 MFO sistemleri yapısal benzerliklerinin yanısıra, katalitik fonksiyonları da memelilerdekine benzerlik gösterir. PAH, PCB ve dioksinler türü toksik çevre kirleticiler gibi eksojen bileşiklerin yanı sıra, testosteron, estrodiol, progesteron gibi endojen bileşikler ve araşidonik asit balık karaciğer MFO sistemiyle metabolize olurlar. Bu subsratlar balık sitokrom P450 MFO sisteminin farklı izoformları tarafından epoksidasyon, hidroksilasyon, dealkilasyon, ve oksitleme reaksiyonları ile metabolize edilirler. Örneğin CYP1A1 benzo(a)pirenin epoksidasyonu ile CYP2K1, ω-1 pozisyonunda, laurik asit hidroksilasyonu ile katalize olur (Arınç ve ark., 1976). Balıklarda CYP1A tepkisi, eksojen indükleyici izoformlar örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve diğer aril hidrokarbon reseptör agonistleri(dioksinler, bazı PCB konjenerleri) oldukça yoğun çalışılmıştır (Goksøyr ve Förlin, 1992; White ve ark., 2000). Balık türlerinde bulunan CYP450 izoformları aşağıdaki çizelgede görülmektedir (Çizelge 1.2.3.) (Uno ve ark., 2012 modifiye edilmiştir).

Çizelge 1.2.3. Balık türlerinde sitokrom P450 izoformları

Gen familyası	Gen sembolü	Türler
CYP1 Ksenobiyotik	**CYP1A**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*) Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchys mykiss*) Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Avrupa levreği(*Dicentrarchus labrax*) Atlantik somon (*Salmo salar*) Medaka (*Oryzias latipes*) Sarı yayın balığı (*Pelteobagrus fulvidraco*) Havuz balığı *(hybridized Prussian carp*) Mangrov killi balık (*Rivulus marmoratus*)
	CYP1B	Scup *(Stenotomus chrysops)* Avrupa yaldızlı pisi balığı(*Pleuronectes platessa*) Deniz yassı balığı (*Pleuronectes platessa*) Aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes)* Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Zebra balığı (*Danio rerio*)

	CYP1C	Scup (*Stenotomus chrysops*) Aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes)* Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP1D	Üç ışın yüzgeçli stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) Medaka (*Oryzias latipes*) Zebra balığı (*Danio rerio*) Mummichog (*Fundulus heteroclitus*)
CYP2 Ksenobiyotik	**CYP2K**	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchys mykiss*) Zebra balığı(*Danio reio*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes)*
	CYP2M	Gökkuşağı alabalığı(*Oncorhynchys mykiss)*
	CYP2N	Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Çipura balığı (*Micropterus salmoides*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP2P	Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Çipura balığı (*Micropterus salmoides*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP2R	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP2U	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı(*Danio rerio*)
	CYP2X	Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes)* Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP2Z	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*
	CYP2Y, 2U1	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP2AA,2AD, 2AE	Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP3	**CYP3A**	Japon kirpi balığı(*Takifugu rubripes*)
	CYP3A27	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)
	CYP3A30	Mummichog (*Fundulus heteroclitus*)
	CYP3A38, 40	Medaka (*Oryzias latipes*)

	CYP3A45	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)
	CYP3A47, 3A48, 3A49, 3A50	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
	CYP3A56	Mummichog (*Fundulus heteroclitus*)
	CYP3A65	Zebra balığı (*Danio rerio*)
	CYP3A79	Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*)
	CYP3A126	Golyan balığı (*Pimephales promelas*)
	CYP3B1, 3B2	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes)*
	CYP3C1, 3C2, 3C3	Zebra balığı(*Danio rerio*)
CYP4	**CYP4F28**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
Ksenobiyotik	**CYP4F43**	Zebra balığı (*Danio rerio*)
Yağ asiti metabolizması	**CYP4T1**	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)
	CYP4T2	Avrupa levreği(*Dicentrarchus labrax*)
	CYP4T11	Küçük golyan balığı (*Gobiocypris rarus*)
	CYP4T5	Japon kirpi balığı(*Takifugu rubripes*)
	CYP4T8	Zebra balığı(*Danio rerio*)
	CYP4V5	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
	CYP4V7,8	Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP5 Eikanozoid metabolizması	**CYP5A**	Zebra balığı (*Danio rerio*) Japon kirpi balığı(*Takifugu rubripes*
CYP7	**CYP7A1, 7C1**	
Kolesterol 7-alfa hidroksilaz	**CYP7B1**	Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP8 Steroid 12-alfa hidroksilaz	**CYP8**	Japon balığı(*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP11 Kolesterol yan	**CYP11A**	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Güney vatozu (*Dasyatis americana*) Japon yılan balığı(*Anguilla japonica*) Zebra balığı (*Danio rerio*)

zincir ayrılması		Tatlısu vatozu*(Potamotrygon motoro*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
Enzim Steroid 11-beta-hidroksilaz	**CYP11B**	Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Avrupa deniz levreği (*Dicentrachus labrax*) Japon yılan balığı (*A.japonica*) Japon kirpi balığı(*Takifugu rubripes*)
CYP11C1		Zebra balığı(*Danio rerio*)
CYP17 Steroid 17-alfa hidroksilaz	**CYP17**	Gökkuşağı alabalığı(*Oncorhynchus mykiss)* Dikenli köpekbalığı (*Squalus acanthias* Zebra balığı (*Danio rerio*)
17,20 liyaz		Golyan balığı (*Pimephales promelas*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
CYP19 Aromataz	**CYP19**	Nil tilapia (*Oreochromis niloticus*) Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) Zebra balığı (*Danio rerio*) Pirinç yılan balığı (*Monopterus albus*) Sazan balığı (*Cyprinus carpio*) Mavi gurami (*Trichogaster trichopterus*) sarı kuyruklu palyaço balığı (*Amphiprion clarkia*) yayın balığı (*Clarias gariepinus*) küçük golyan balığı (*Gobiocyprisrarus*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*
CYP20	**CYP20**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP21 Steroid 21-hidroksilaz	**CYP21**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP24	**CYP24**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
CYP26 Retinoik asit hidroksilaz	**CYP26**	Zebra balığı (*Danio rerio*) Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)
CYP27 Steroid 27-hidroksilaz	**CYP27**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP39 Steroid 7-alfa hidroksilaz	**CYP39**	Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP46 Steroid 24S hidroksilaz	**CYP46**	Japon kirpi balığı(*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)
CYP51 Lanosterol 14-demetilaz	**CYP51**	Japon kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) Zebra balığı (*Danio rerio*)

1.2.3. CYP2 ailesi

cDNAları kodlayan enzimlerin CYP2 ailesi ; CYP2K, CYP2M, CYP2N, CYP2P ve CYP2X çeşitli balık türlerinden izole edilmiştir. Japon kirpi balığında, CYP2K, CYP2N, CYP2P, CYP2R, CYP2U, CYP2X, CYP2Y ve CYP2 enzimlerini kodlayan genler rapor edilmiştir. CYP süper ailesinin içinde, CYP2 ailesi türler arasında en büyük farklılaşma derecesini gösterir. Sadece iki CYP2 altfamilyası CYP2R1 ve CYP2U1, evrimsel olarak muhafaza edilmiş görünmektedir (Nelson, 2003). Memelilerde CYP2R1 ve CYP2U1 sırasıyla endojen bileşikleri, vitamin D'yi, araşidonik asiti metabolize eder (Cheng ve ark.,2004; Chuang ve ark., 2004). CYP2K kodlayan cDNA'lar gökkuşağı alabalığından ve zebra balığından izole edilmiştir (Buhler ve ark., 1994; Uno ve ark., 2011).

CYP2K1'in benzfetamin N-demetilaz ve steroid hidroksilaz faaliyetleri vardır ve hem 2K1 hem 2K6, omega-1 pozisyonundaki laurik asitin oksidasyonunu ve aflaotoxin B1 in ekzo-8,9-epoksite dönüşümünü katalizler (Yang ve ark., 2000).

Gökkuşağı alabalığı karaciğerinden izole edilen CYP2M1 laurik asit (omega-6) hidroksilasyon aktivitesini gösterir (Yang ve ark., 1998). CYP2P kodlayan üç gen, bir mummichogdan(F.heteroclitus) klonlanmıştır ve CYP2P3 benzfetamin N-demetilasyonunu ve araşidonik asit oksidasyonunu katalize etmek için gösterilmiştir (Oleksiak ve ark., 2003).

CYP2N1 mRNA karaciğer ve bağırsakta, CYP2N2 mRNA ise kalp ve beyinde bol miktarda bulunur. Hem CYP2N1 hem CYP2N2 araşidonik asiti epoksi eikosatrienoik asite metabolize eder ve benzfetamin, N-demetilasyon aktivitesine sahiptir (Oleksiak ve ark., 2000). P4502X1 kanal yayın balığından (Ictalurus punctatus) izole edilmiştir ve aminopirin ve benzfetamin demetiaz aktivitesini katalizler (Mosadeghi ve ark., 2007; Schlenk ve ark., 2002).

Memelilerde, CYP2B genleri fenobarbital ve çok sayıda yapısal olarak çeşitli ksenobiyotikler tarafından indüklenir. Balıkta ise CYP2 ailesi mRNA ların ekspresyonu, fenobarbital tipi indükleyiciler tarafından uyarılmaz (Sadar ve ark., 1996). Balıklarda CYP2 ailesi yabancı maddeleri ve endojen bileşikleri katalizler ancak gen düzenleme sistemi memelilerin olanlardan farklı olabilir (Uno ve ark., 2011).

1.2.3.1. Sitokrom P4502E1 Hakkında Genel Bilgiler İnhibitör ve İndükleyicileri

Sitokrom P4502E1(CYP2E1) birçok kanserojen, prokarsinojenler ve toksik maddelerin kimyasal aktivasyonunu kapsayan ksenobiyotikleri metabolize eden en iyi korunmuş ve bir hayli önemli olan, sitokrom P450 enzimlerinden biridir. İlk olarak tavşanlarda belirlenen CYP2E1 sitokrom P450 enzimlerinin etanol ile uyarılabilir formudur. Karaciğer yanında, CYP2E1 akciğer, böbrek, kalp ve sıkı kemik gibi ekstrahepatik dokularda bulunur. CYP1 izoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra posttranskripsiyonel olarak da kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. Bu izoformun açlık gibi bazı patofizyolojik durumlarda indüklendiği bilinmektedir (Arınç ve ark., 2005,2007; Hong ve ark., 1987). CYP2E1 özellikle 100 kDa' dan daha düşük, kimyasal katkı maddesi veya karbon, tetraklorür, kloroform gibi endüstriyel çözücü tipi çok sayıda düşük ağırlıklı bileşiği metabolize eder (Raucy, 1993). CYP2E1 nitrozaminler, piridin, benzen ve diğer toksik ajanlar gibi çok sayıda düşük molekül ağırlıklı karsinojenlerin metabolik aktivasyonunda kritik bir öneme sahiptir (Şen ve Arınç, 2000 ; Stegeman ve Kloepper-Sams, 1987). CYP2E1 en üst düzeyde karaciğer asinüs ve sentrilobüler bölgesinde bulunmuştur (Ingelman-Sundberg ve ark., 1988). Buna ek olarak akciğer,böbrek,beyin, kalp gibi ekstrahepatik dokularda, büyük kandamarlarının endotellerinde, sıkı kemikte ve nazofarengeal dokularda önemli miktarlarda bulunmuştur (Ding ve ark., 1986; Ingelman-Sundberg ve ark., 1993). Bu nedenle bu tür CYP2E1 substratları olan etanol, asetaminofen, nitrozaminler, ve karbon tetraklorid gibi toksinler tercihen karaciğerin sentrilobüler bölgesinde yıkıma uğrar. Karaciğerde, CYP2E1 esas olarak hepatositlerle ifade edilir ancak önemli miktarda da Kupffer hücrelerinde bulunurlar; hem hepatosithem de kupffer hücreleri CYP2E1 enzimleri etanolle indüklenebilir (Karakurt, 2008).

CYP2E1 etkinliğini izlemek için, NDMA N-demetilasyon ve p-nitrofenolün 4-nitroketakol hidroksilasyonu en çok etkili olarak kullanılır. Bunların yanısıra, anilin hidroksilasyonu ve klorzokaszon 6-hidroksilasyon yine CYP2E1 etkinliklerini izlemede kullanılırlar (Lieber, 1997; Arınç ve ark., 2000 A, B;. Arınç ve ark., 2005, 2007).

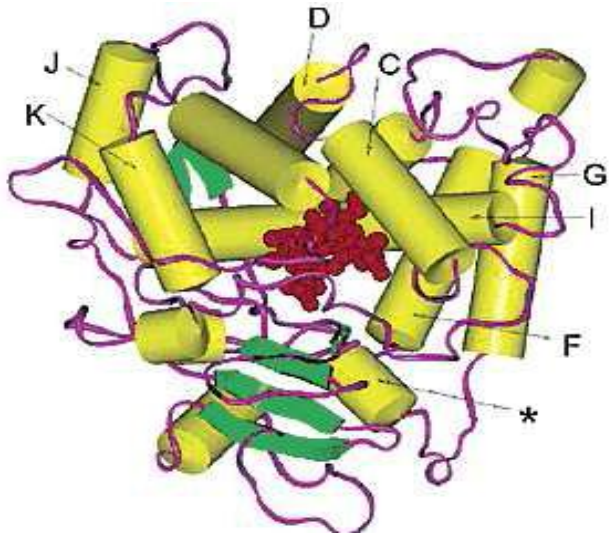
CYP2E1'e ait substratların çoğu endüstriyel çözücüler, protoksinler ve prekarsinojenler gibi ekzojen kaynaklıdır. Küçük molekül ağırlıklı örneğin benzen ve stiren gibi hidrokarbonlar; NDMA ve azoksimetan gibi nitrozaminler; piridin gibi

heterosiklik bileşikler; butadien, kloroform, akrilonitril, akrilamid, vinil klorür gibi halojenlenmiş ve halojenlenmemiş alkan ve alkenler; asetaminofen gibi aromatik bileşikler, anilin çeşitli ekzojen CYP2E1 subsratları arasındadır (Yang ve Hong, 1993; Lieber, 1997; Sumner ve ark., 1999). CYP2E1 endojen ve eksojen substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 1.2.4) (Nuyan, 2008' den uyarlanmıştır.)

Çizelge 1.2.4. CYP2E1 substratları, indükleyici ve inhibitörleri

<table>
<tr><th colspan="2">Substratlar</th><th>İndükleyiciler</th></tr>
<tr><td colspan="2">Endojen substratlar</td><td rowspan="2">Etanol
İsopropanol
Aseton ketonlar
Oruç diyabet
Açlık
Benzen
Eter
Pirozol
İzoniazid
Diyet piridin
Lipitler
Oksijen maruziyeti</td></tr>
<tr><td colspan="2">Etanol
Aseton
Asetonasetat
Asetalaldehit
Gliserol
Yağ asitleri(araşidonik asit, laurik asit)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Ekzojen substratlar</td><td>İnhibitörler</td></tr>
<tr><td>İlaçlar ve uçucu anestetikler</td><td>Diğer kimyasal ve çözücüler</td><td rowspan="2">Disülfiram
Diallilsülfid
Diallil sülfoksid
Diallilsülfon
Klormetiazol
Dietilditiokarbamat
Malotilat
İzotiokyanat
4-metil-pirazol</td></tr>
<tr><td>Asetominofen
Fenasetin
Klorzoksanon
İzoniazid
Halotan
Enfluran
İzofluran
Sevofluran</td><td>Benzen, Piridin, Pirazol
Akrilonitril, Metakrilonitril
Akrilamid, Etanol, Fenol
Asetaldehit, Stiren, Dietileter
Aseton, Kloroform
Vinil klorid, Vinil bromid
Nitrozaminler,
Karbontetraklorid, Hekzan
Bütadien, 1,1,1-trikloroetan
1,2-diklorpropan,
Metilklorid</td></tr>
</table>

Balık karaciğerindeki CYP2E1 formu yapısal benzerliği yanında katalitik özelliği de memelilerdeki formuyla benzerlik gösterir (Degtyarenko, 1995). Anilin hidroksilasyonu CYP2E1 ile ilişkilendirilmiştir. Nötral ve nispeten hidrofilik molekül olan CYP2E1' in aktif bölgesi aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil 1.2.3.) (Karakurt, 2008).



Şekil 1.2.3. CYP2E1'in aktif bölgelerinin modellenmesi. Heliksler sarı silindirlerle, β- yapraklar yeşil kurdelelerle ve bobinler mor kurdele şeklinde temsil edilmiştir. Heme kırmızı bölgeyle gösterilmiştir.

1.2.4. CYP3 ailesi

CYP3A enzimlerinin katalitik özgüllükleri vardır. Bu grup enzimlerinin doku ekspresyon modellemeleri farklıdır mesela CYP3A4 esas olarak karaciğerde, CYP3A5 ekstrahepatik dokularda ve CYP3A7 fetal karaciğerde eksprese olur (Thummel ve Wilkinson 1998). CYP3A4 ve CYP3A7'nin ekspresyonu PXR (pregnan x reseptör) tarafından düzenlenmesine karşılık, CYP3A5 glukokortikoid reseptörler tarafından kontrol edilir (Hukkanen, 2001).

Balıkta CYP3 ailesi CYP3A, CYP3B ve CYP3C alt ailelerinden oluşur (Yan ve Cai, 2010). CYP3A27 geni gökkuşağı alabalığı klonlanmıştır ve bağırsak ve kalbe ek olarak karaciğer ve genital bezlerde dağılmış durumdadır (Lee ve ark., 2001). CYP3A45' in dizileri 27 aminoasit yönünden CYP3A27'den farklılık gösterir ve gökkuşağı alabalığı bağırsaklarında çok olarak bulunduğu ifade edilmiştir. CYP3A27 testesteron ve progesteronun 6-beta hidroksilasyonunu kataliz ederken, CYP3A45 sadece testesteron 6-beta hidroksilasyon aktivitesi gösterir (Lee and Buhler, 2003)

CYP3A48 ve CYP3A40'ı kodlayan genler Japon tatlı su balığından(medaka) kolnlanmıştır. CYP3A38 testosteron'un 6-beta- and 16-beta-hidroksilasyon aktivitesini, CYP3A40 ise 2-alfa ve 6-beta hidroksilasyon aktivitesini kataliz eder. CYP3A40 mRNA ekspresyonu, sentetik polisilik miskler tarafından indüklenemez (Yamauchi ve ark., 2008).

% 98 amino asit sekans özdeşliği paylaşan CYP3A30 ve CYP3A56 mummichog (*Fundulus heteroclitus*)'dan izole edilmiş, CYP3A30 ve CYP3A56 proteini ve mRNA yüksek oranda karaciğer ve bağırsakta ifade edilmiştir. Bulunduğu diğer yerler azalan sırayla solungaçlar, dalak, böbrek ve beyindir. CYP3A protein ifadesi erkeklerde dişilere göre 2.5 kat daha fazladır. (Hegelund ve Celander, 2003).

CYP3A47, CYP3A48 ve CYP3A49 genom analizi ile Japon kirpi balığında ifade edildiği gösterilmiştir (Nelson, 2003). Son zamanlarda ise CYP3A126 cDNA sı golyan balığından (*Pimephales promelas*)'dan klonlanmıştır (Christen ve ark., 2010).

CYP3B1 ve CP3B2 mRNA ları Japon kirpi balığında ifade edilmekle beraber,bunların sitokrom P450 enzimleriyle özdeşliği onaylanmamıştır (Nelson, 2003) Balık için eşsiz olan CYP3C1 geni ise zebra balığından izole edilmiştir. CYP3C1 mRNA sı ergin zebra balığı karaciğer, bağırsak ve ovaryumunda ifade edilmiştir. CYP3C1 mRNA sı bütün zebra balığı embriyosunda dağılmış bulunmaktadır fakat larva aşamasında özellikle beyinde konsantre olmuştur. CYP3C1, bir holoenzim olarak maya içinde ifade edilmiştir (Corley-Smith ve ark., 2006).

Memelilerde CYP3A 'nın indüklenmesi dekzametazon ve rifampisin ile olur. Zebra balığında CYP3A ifadesinin kontrolünde Ah reseptörü / ARNT yolunun aracılık ettiği düşünülmekteyken, Atlantik somon balığında pregnan x reseptörü (PXR) CYP3A ifadesini aktive etmek için önerilmektedir (Finn, 2007).

1.2.4.1. Sitokrom P4503A4 Hakkında Genel Bilgiler İnhibitör ve İndükleyicileri

İnsan sitokrom P4503A4 (CYP3A4) enzimi ilaçların yaklaşık % 50 metabolize eden en bol bulunan hepatik ve intestinal faz 1 enzimidir. CYP3A4 ve CYP3A5 karaciğer ve sindirim sisteminde en çok eksprese edilen CYP izozimleridir (Sırasıyla toplam P450 içeriğinin % 40 ve % 80'i) (Cupp ve Tracy, 1998; Nebert ve Russel, 2002; Lamba ve ark., 2002; Xie ve ark., 2004).

CYP3A4 ve CYP3A5 120'den fazla reçete edilen ilaçların ve steroidler ve safra asitleri gibi endojen bileşiklerin metabolizmasına katılırlar. Midazolam ve eritromisin CYP3A4 aktivitesi için in *vivo* incelemelerde kullanılmıştır (Thummel ve Wilkinson 1998). Eritromisin N-demetilaz aktivitesi CYP3A4 ile ilişkilendirilmiştir. CYP3A4 insan hepatositlerinde rifampisin, deksametazon ve fenobarbital ile indüklenir (Hukkanen, 2001). CYP3A4 ailesinin çeşitli substratları, inhibitörleri ve indükleyicileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 1.2.5.) (Nuyan, 2008'den uyarlanmıştır).

Çizelge 1.2.5. CYP3A4 substratları, indükleyici ve inhibitörleri

Subsratlar	**İndükleyiciler**	**İnhibitörler**
Midazolam	Sülfinpirazon	Ketakonozol
Triazolam	Fenitoin	Troleandomisin
Alfentanil	Karbamazepin	Eritromisin
Testosteron	Deksametazon	Klaritromisin
Kortizol	Fenobarbital	Flukonazol
Takrolimüs	Rifampisin	1-aminobenzotriazol
Alprazolam	Primidon	Verapamil
Kinidin	Glukokortikoidler	Paroksetin
Eritromisin		Mikonazol
Vinkristin		Nevirapin

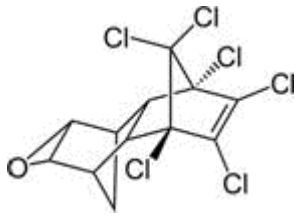
CYP3A4 enzimleri sadece ilaç-ilaç etkileşimlerinde rol almaz ayrıca testosteron, progesteron gibi endojen streoid yapılı bileşiklerin metabolizmasına katılır (Wang ve ark., 2000; Yamazaki ve Shimada, 1997). CYP3A4 geni için üç varyant alel tespit edilmiştir. A5'-flanking alel varyantı insanda prostat kanseri ve lösemi ile ilişkilendirilmiştir (Felix ve ark., 1991).

1.3. Göllerdeki Kimyasal Kirleticiler

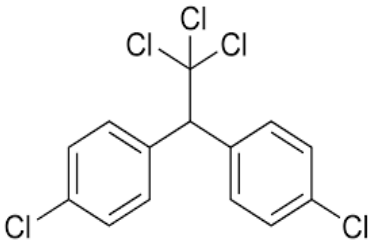
Göller, tabii güzellik, rekreasyon ve ekonomik açıdan önemli bir rol oynarlar. Gerek endüstriyel üretim kirlilikleri, gerekse tarımsal aktivitelerde kullanılan mücadele ilaçları çeşitli yollardan göllere ulaşır ve birikirler. Büyük göllerde 1000'den fazla kimyasal madde tespit edilmiştir (Telefoncu ve Zihnioğlu, 1992). Bunlardan bazıları

memeli hayvanlar için toksik etkiye sahiptirler. Yakınındaki endüstriden kaynaklanan kirlenme dışında, genel olarak çevrelerinde tarımsal faaliyet yapılan bütün göllerde PCB ve DDT'nin ana kimyasal kirleticiler olduğu belirlenmiştir. Akuatik çevredeki kirleticiler ile insan arasında bağlantıyı özellikle balıklar sağlar. İnsanlar ekosistemin bir parçası olan balığı tüketen çevredeki kirlilikler için son nokta reseptörleridirler (Humphrey, 1987).

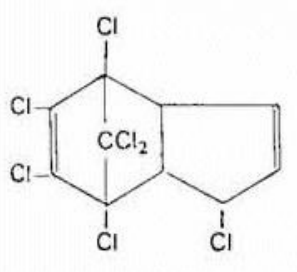
Lipofilik kirleticilerin oluşturacağı risk insanlar tarafından tüketilen su ürünleri miktarı ile orantılı olarak artacaktır. PCB ve DDT, dieldrin, toxafen, kloardan gibi organik maddeler ile kontamine balıkların yenmesinin karsinojenik riski; kloroform, 1,1-dikloroetilen gibi halojenlenmiş küçük moleküllü organik bileşikler ile kontamine kaynak sularının içilmesi durumuna kıyasla 10-100 kat daha fazladır. Organik kirleticilerden bazıları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.3.1.)



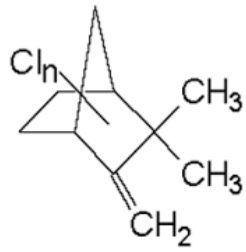
Dieldrin



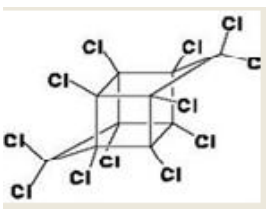
DDT



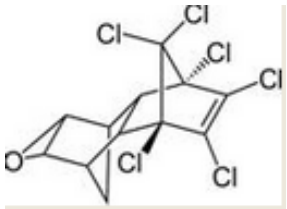
Heptaklorepoksit



Tokzafen (HCB)



Mirex



Klordan

Şekil 1.3.1. Bazı organik kirleticiler

Tüketim hızının fazla olması ve yüksek oranda kontamine olmuş türlerin tüketilmesi riskin daha fazla artmasına neden olmaktadır (Connor, 1984; Humphrey, 1988). Büyük göllerde yüzlerce kimyasal maddenin tespit edilmesine rağmen, bir çoğunun çiğ balıkta çok az miktarda bulunduğu ve sadece birkaçının pişmiş balıkta doz sınırını aştığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda PCB'nin, sık sık rastlanan diğer altı kontaminanta oranla daha etkin olduğu belirlenmiştir. PCB; insana çeşitli yollarda ulaşan ve her yerde bulunan bir kirlilik faktörüdür (Kreiss, 1985).

PCB'nin bitkilerde de yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir. Ancak bu miktarların insana ulaşabilmesi güçtür, çünkü lipofilik bileşiklerin bitki dokularından emilebilmeleri ve bitkide dağılmaları mümkün değildir. Normal besin hazırlama ve yıkama prosedürleri vasıtasıyla, kolayca uzaklaştırılabilecekleri kök ve yaprak yüzeyi üzerinde absorblanırlar. Buna karşılık; balık ve hayvan ürünlerindeki PCB, yıkama ile uzaklaştırılamaz; ancak pişirme teknikleriyle kısmen uzaklaştırılabilir. Kontamine olmuş balıkları tüketen kişilerde neredeyse hepsinde PCB'ler tespit edilmiştir (Humphrey, 1988).

1.3.1. Kontaminasyonun Sağlık Açısından Değerlendirilmesi

PCB ile kontamine olmuş gıda maddelerini kullanan insanların, sonuçta ne gibi hastalıklara sahip olacağı kesin olarak belirlenememiştir. Ancak yapılan bir çalışmada kontamine olmuş bir diyet uygulanan grupla, aynı topluluktan olan normal vakalar karşılaştırılarak, medikal tarihçe açısından dikkate değer bir hastalık farklanması ile karşılaşılmamıştır (Çizelge 1.3.1.) (Telefoncu ve Zihnioğlu, 1992). Ancak bu toksik bileşiklerin vücutta birikmesi ile hastalığın hedef organı yıpranacak ve hastalığın yerleşmesini kolaylaştıracaktır. Besin maddeleri ve diğer yollardan alınan kontaminantların kanserojen potansiyelleri tümör indüktörü olan PCB tarafından artırılmaktadır. Bu durum; akuatik ekosistemdeki tüm kontaminantlar için insanın son biyolojik reseptörler olduğunu göstermektedir (Humphrey, 1987).

Çizelge 1.3.1. Kontamine balık yiyen bir grubun medikal değerlendirmeleri (%).

Semptomlar	Balık yiyenler	Karşılaştırma
Diyabet	4,6	5,9
Kalp krizi	6,8	3,9
Hipertansiyon	21,1	18,4
Böbrek problemleri	2,2	1,2
Kanser	5,5	4,7
Karaciğer problemleri	2,4	2,0
Diğer durumlar	11,5	14,3

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Literatür Özetleri

Son 30 yıl içinde giderek artan bir şekilde çevresel ajanlara maruziyetin ve ilaç etkileşimlerinin takibi için kullanılan biyomarkır temelli biyomonitorizasyon yöntemleri giderek daha fazla önem kazanmaya başladı. Çevresel toksik ajanların biyomonitorizasyonu her biyomarkırın biyolojik olarak ortaya çıkış şeklininin anlaşılması ve biyomarkırlar arasındaki etkileşimleri anlamak açısından oldukça önemlidir. Bu şekilde toksik ajanların hastalığa yol açan ne gibi biyolojik değişikler yaptığını saptamak mümkündür. Çevresel toksik ajanların etkisini değerlendirmek için; maruziyet etkisini gösteren biyomarkırlar, kritik hedeflerdeki (organ) etkileri gösteren biyomarkırlar ve yatkınlık biyomarkırları (gen) kullanılır (Zamani ve Yıldırım, 2014).

Endüstrileşmenin gelişmesiyle her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ilave olarak teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte Bunun sonucu olarak dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar (Zamani ve Yıldırım, 2014).

Hem endojen hem de eksojen bileşikler tarafından çeşitli sitokrom P450'lerin indüklendiği 1960'lı yıllardan beri bilinmektedir. Bazı hastalık durumlarında detoksifikasyon aktiviteleri indüklenirken, diğer bazı koşullarda bu aktiviteler inhibe olmaktadır. İnhibisyon iki veya daha fazla bileşkenin aynı detoksifikasyon enzimi için yarışmasından olabilir. Bazı bileşenler sadece bir detoksifikasyon enzimini seçici olarak inhibe ederken bazıları tüm sitokrom P450 faz I enziminin aktivitesini inhibe etmek için sitokrom P450'nin reaktif bölgesi olan hem demirine direkt olarak bağlanırlar. Bazı faz II enzimlerinin genel inhibisyon mekanizması ise gerekli kofaktörlerin eksikliğine dayanmaktadır (Liska, 1998).

İnsanlar PCB'lerle bulaşık gıdaların ve suların ağız yolu ile alınması veya bulaşık havanın solunması ile maruz kalmaktadır. Sucul canlılar PCB'lere karşı çok duyarlıdır. Turna balıklarında 20-50 ppb, alabalıklarda 8 ppb, karideslerde 1 ppb PCB ölümlere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 10-25 ppb gibi son derece düşük miktarlardaki PCB'nin sulardaki bitkisel planktonlar ve kabukluların ölümüne sebep olduğunu dolayısıyla ekosistemi tümüyle etkilediği belirlenmiştir. Kirliliğe maruz kalan bölgelerdeki salmon balıklarında bağışıklık sistemlerinde ve büyüme parametrelerinde

önemli derecede anormallikler belirlenmiştir. Kimyasal kirlenmenin sonucunda memelilerde ve balıklarda bağışıklık sisteminin bozulması subletal bir etki olarak ifade edilmiştir (Atamanalp ve ark., 2013).

Balıkların erken gelişim evrelerinde yaşam döngüsünün karsinojenisite testlerinde büyük bir değer olan toksik maddeler için en hassas aşamalarından biri olduğu gösterilmiştir. Gökkuşağı alabalığı embriyoları aflatoksin B1 ve dimetilnitrozamin gibi birçok bileşiği, sitokrom P450 enzimleri sayesinde DNA'ya bağlanan ve hepatoselüler karsinom üreten ara reaktiflere dönüştürebilir (Hendricks ve ark., 1980).

Sucul ortamda artan sayıdaki toksik organik kimyasallar popülasyonlar üzerinde sağlığa zararlı etki gösterebilmektedir. Bu sebeple daha yüksek organizasyon seviyelerinde herhangi bir zararlı etkisi gerçekleşmeden önce kirlilik seviyesi ile onların biyolojik etkileri arasındaki ilişkiyi belirlemek son derece önemlidir. Bu bağlamda, sucul organizmalarda organizma açısından kimyasal toksik etkilerin değerlendirilmesi sürecinde sitokrom P450 enzimlerinin çalışmaları önemli bir rol oynar (Boyuneğmez, 2004).

Sitokrom P450 ; oksidatif, peroksidatif ve steroidler, safra asitleri, yağ asitleri, prostaglandinler ve lökotrienler gibi endobiyotiklerin, ayrıca çevresel toksikantların ve terapotik ilaçların birçoğunu içeren ksenobiyotiklerin indirgeyici metabolizmasında çok önemli bir enzim ailesini oluşturur (Nelson ve ark., 1996).

Tannik asitin, *p*-nitrofenol hidroksilaz, aniline 4-hidroksilaz, NDMA N-demetilaz, glutation S-transferaz ve NAD(P)H:kinon oksidoreduktaz:1 aktivitelerini önemli ölçüde inhibe ettiği göstermistir. Tannik asidin glutation S-transferaz aktivitesinde en kuvvetli inhibitör (IC50 = 0.33 μM) olduğu ve mikrozomal anilin 4-hidroksilaz (IC50=60.26 μM) aktivitesinde ise en az etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Karakurt, 2008).

Erkmen ve birlikte çalıştığı arkadaşları Meriç Deltası'ndaki çevresel kirliliğin sazan balıklarında çeşitli enzimatik biyobelirteçler kullanılarak değerlendirmiş sazan balığı örnekleri 5 farklı istasyondan mevsimsel olarak alınmış ve 167 sazan balığı üzerinde hepatik glutatyon S-transferaz (GST), karboksil esteraz (CaE),laktat dehidrogenaz(LDH), aspartat aminotransferaz (AST) ve asit fosfataz(ACP) enzim aktiviteleri incelenmiştir. Analizler sonucunda, karaciğer GST,CaE, LDH, ve AST

aktivitelerinin farklı mevsimlerde ve istasyonlar arasında önemli düzeyde farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Buna karşın karaciğer ACP aktivitesinde ise istatistiksel olarak önemli bir varyasyon gözlenmemiştir. Enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, özellikle GST ve CaE enzim aktiviteleri gibi değerlerin dönemsel değişimleri yansıttığı ve istasyonlar arasındaki farkın belirlenmesi açısından daha duyarlı biyobelirteçler olduğu ifade edilebilir (Erkmen ve ark., 2008).

Nuyan, karsinojen akrilamidin tavsan karaciğer, böbrek ve akciğerinde sitokrom p450 ve faz 2 enzimleri ile in *vivo* etkilerini araştırmış akrilamidin, CYP2E1'e bağlı tavşan karaciğer (1.80-3.0 kez) ve bobrek (1.60 kez) *p*-Nitrofenol hidroksilaz, NDMA N-demetilaz ve anilin 4-hidroksilaz aktivitelerini anlamlı arttırdığı bulmuştur. Ayrıca akrilamid, tavsan karaciğer ve böbrek CYP2E1 protein düzeylerinin yaklaşık 2-kez anlamlı arttığını ifade etmiştir. Resveratrolun akrilamid nedenli artmış tavsan karaciğer CYP2E1'e bağlı enzim aktivitelerini (1.5-1.80 kat) ve CYP2E1 protein düzeylerini (1.5-1.70 kat) anlamlı düşürdüğünü belirtmiştir. Bu calısma, *in vivo* akrilamidin CYP2E1'e bağlı tavsan karaciğer ve böbrek enzim aktivitelerini ve CYP2E1 protein düzeylerini artırdığını gösteren ilk calışma olmuştur (Nuyan, 2008).

Balık türlerinin insanlar tarafından besin olarak tüketilmesi ve balık yan ürünlerinin yemlerde sıkça kullanılması yoluyla sonuçta bu zararlı maddelerin insanlara ulaşması neticesinde bir alkilfenol türevi olan nonilfenolün meme kanserine, kadmiyumun kemiklerin kolay kırılabilir hal almasına yol açan Itai Itai hastalığına ve immunolojik bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (İşcan ve ark., 2001).

220 µg/L nonilfenole bir hafta maruz kalan balıklarda GST(glutatyon s-transferaz) enzim aktivitesi, yükselmektedir. Bu yükselme Tukey'in HSD istatistik yöntemine göre anlamlıdır ($p<0.05$). Aynı konsantrasyona iki ve üç hafta kalan balıkların karaciğerinde ise GST enzim aktivitesi düşmektedir. GST aktivitesindeki bu düşmede, istatistiksel olarak anlamlıdır. Kontrol ve 66 µg/L nonilfenol maruz bırakılan balıklarda, ikinci haftadan sonra GST enzim aktivitesinde bir artma meydana gelmektedir. Kontrol grubunda meydana gelen yükselme istatisksel olarak anlamlı değildir. Fakat, 66 µg/L nonilfenol grubundaki balıkların karaciğerinde, GST enzim aktivitesinde meydana gelen yükselme istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$) (İşcan ve ark., 2001).

Karakurt, tannik asidin faz II ve sitokrom P450 bağımlı enzimler üzerinde etkilerini araştırmış ve 0.5 µM ile 150 µM arasında değisen tannik asit

konsantrasyonlarında tavsan karaciğer ve böbreğinde P450 bağımlı anilin 4-hidroksilaz, N-nitrosodimethylamine N-demetilaz, ve *p*-nitrofenol hidroksilaz aktiviteleri ile faz 2 enzimlerden glutation S-transferaz (GST), ve NAD(P)H:kinon oksidoreduktaz:1 (NQO1) enzimlerinin değişimini incelenmistir. Tannik asitin, *p*-nitrofenol hidroksilaz, anilin 4-hidroksilaz, NDMA N-demetilaz, glutation S-transferaz ve NAD(P)H:kinon oksidoreduktaz:1 aktivitelerini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Tannik asidin glutation S-transferaz aktivitesinde en kuvvetli inhibitör (IC50 = 0.33 μM) olduğu ve mikrozomal anilin 4- hidroksilaz (IC50=60.26 μM) aktivitesinde ise en az etkiye sahip olduğu bulmuştur (Karakurt,2008).

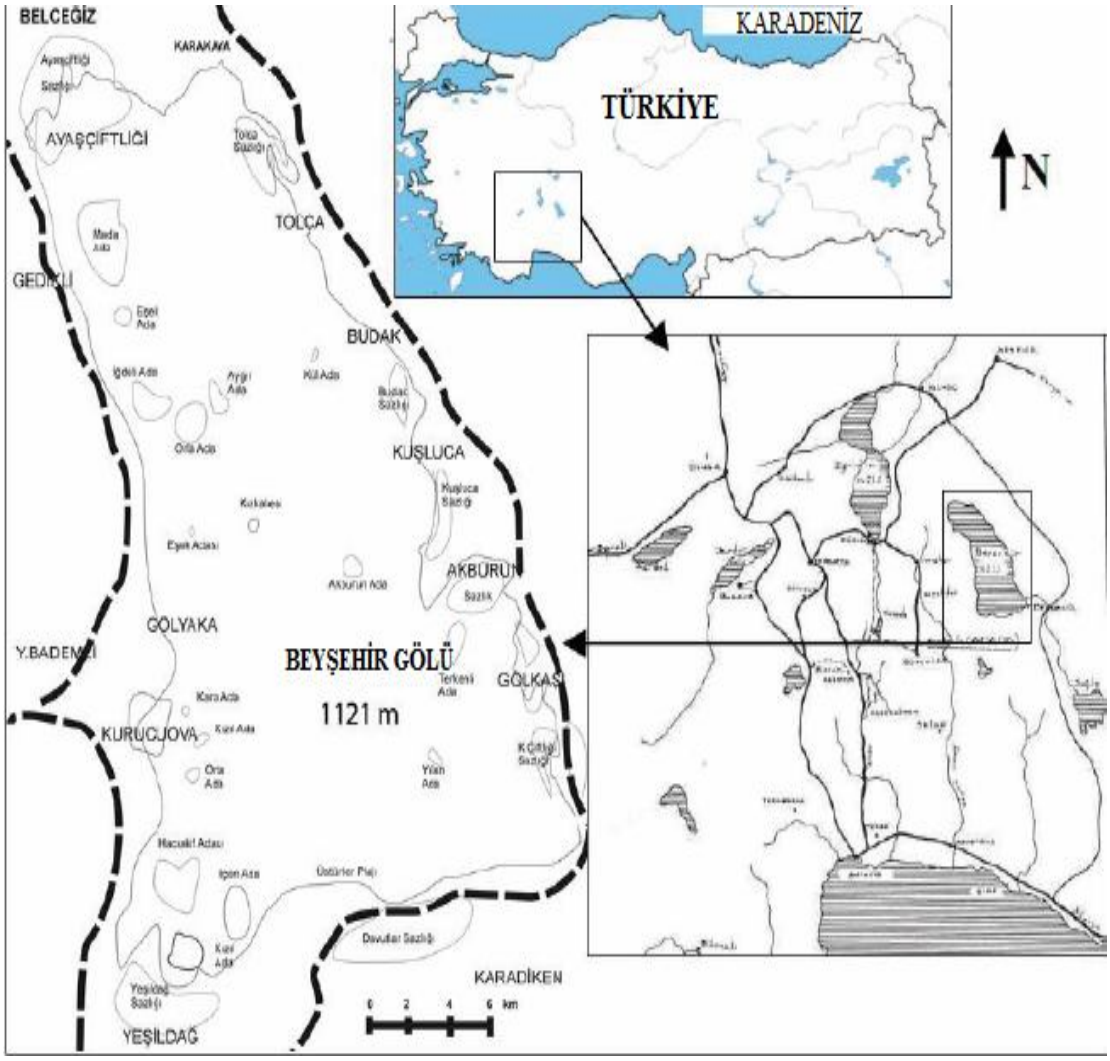
2.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma çevresel toksikantların, mutajen ve karsinojenleri içeren çevresel ajanların detoksifikasyonu ve metabolik aktivasyonunu gerçekleştiren sitokrom P4502E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz ve P4503A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktiviteleri üzerine olası etkilerinin aydınlatılması için yapılmıştır. Balık karaciğer sitokrom P4502E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi ile P4503A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktivitesinin sucul ortamdaki PAH, PCB ve dioksinler gibi bileşiklerle indüklenmesi organik kirleticilerin varlığının belirlenmesinde erken uyarı sinyali görevi yaparak, biyolojik gösterge olarak kullanılmıştır. Ayrıca iki farklı kirlilik düzeyindeki göllerin karşılaştırılmaları ve balık karaciğerindeki muhtemel CYP450 enzim aktivitelerindeki farklılığı değerlendirmek amaçlanmıştır. Kirleticilerin beslenme zinciri ile, doğrudan planktonlarla ya da su ortamındaki diğer tüketici organizmalarla balıklara geçtiği bilinmekle beraber, balıktan insana geçmesi muhtemel olan PAH, PCB ve dioksinler gibi organik kimyasalların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin de değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Beyşehir Gölü Coğrafi Konumu ve Gölün Özellikleri

Çalışma alanı olarak seçtiğimiz Beyşehir Gölü Orta Toroslar'ın kuzey kesiminde yer alan ve bölgedeki dağlar arası havzaların en büyüğü ve en önemlisidir. Kuzeyden Konya Ovası'na, yeraltından Manavgat Nehri'ne (Akdeniz) bağlı olan ya da olabileceği sanılan bir iç havzadır. Beysehir Gölü, Beysehir ilçesinin batısında, Sarkikaraağaç ilçesinin güneyinde, Sultan Dağları ve Anamas Dağları arasındaki tektonik çukurlukta yer alan ülkemizin en büyük tatlısu gölüdür (Şekil 3.1.1) (Tekin- Özan, 2005).



Şekil 3.1.1. Beyşehir gölü ve Türkiye'deki yeri

Beysehir Gölü'nün 523 km_2'si Konya ili sınırlarında, 130 km2'si Isparta ili sınırları içinde yer alıp; bölgenin önemli bir su kaynağını olusturmaktadır. Uzunlugu 50 km genisliği 15-20 km ve çevresi 120 km olan gölün alanı 65300 hektardır. Su hacmi ise 5 milyar m_3'tür. Drenaj alanı 4053 km_2'dir. Gölün 1120 m ortalama yükseltisine karsılık gelen yüzey alanı, 700 km^2 olup bu yükseltideki hacmi 3420x106 m3'tür (Oğuzkurt, 2001)

Gölün en derin yeri 11 m'yi bulmakla beraber ortalama su derinliği 6 m civarındadır. Gölün ihtiva ettiği suyun hacmi bu yüzden, su seviyesinde bir değişiklik olur olmaz büyük ölçüde değişebilmektedir (Mercan, 2006). Gölün kuzeyindeki Şarkikaraağaç Ovası ile güneyindeki Beyşehir Ovası kıyıları sığdır. Tabanında oldukça kalın sayılabilecek geçirimsiz killer ve marnlar bulunmaktadır (Hoşafçıoğlu, 2007). Göl, Orta Anadolu'ya sulama ve içme suyu temininde çok önemli rol oynar. Beyşehir Gölü su toplama alanı kuzeyden güneye doğru karasal iklimden Akdeniz iklimine geçiş özelliği göstermektedir. Bu nedenle karasal iklimin hâkim olduğu havzanın büyük bir kısmında yazları sıcak ve kurak, kışlar soğuk ve yağışlıdır (Ak, 2006). Beysehir Gölü hidrofitik ve mezofitik flora elemanlarına sahiptir. Bu nedenle daha çok sulak, nemli ortamlara uyum göstermis az sayıda ve çogunlukla kozmopolit bitkilerin hakim oldugu bir flora bulunmaktadır (Mutlu ve Erik, 1998).

Beysehir Gölü, su ürünleri açısından büyük potansiyele sahip olan bir göldür. 1978-79 yıllarına kadar gökçe balığı (*Alburnus akili*), sazan (*Cyprinus carpio*), Tatlısu kefali (*Leuciscus lepidus*), kababurun (*Chondrostoma regium*), yağca balığı(*Acanthorutilus anatolicus*), siraz (*Capoeta pestai*), kaya balığı (*Gobio gobio*), taş balığı (*Cobitis bilseli*) ve kerevit (*Astacus leptodactylus*) gölde bulunmaktaydı. 1978-79 yıllarında göle aşılanan sudak balığı (*Stizostedion lucioperca*), yılda yaklaşık olarak 250-300 ton çıkarılan gökçe balığı (*Alburnus akili*)'nın azalmasına neden olmuştur (Oğuzkurt, 2001; Tekin- Özan, 2005).

3.2. Çavuşçu Gölü Coğrafi Konumu ve Gölün Özellikleri

Çavuşçu Gölü, Konya'nın Ilgın ilçesinin 6 km kuzeyinde yer almaktadır. Göl 27 km² alana sahip, etrafı sazlık ve bataklıklarla kaplı tektonik bir tatlı su gölüdür. Gölü besleyen su kaynakları Doğanhisar Çayı, Çiğil Deresi ve Bulcuk Çayı' dır. Deniz seviyesinden yüksekliği 1019 m'dir. Araştırma alanı olarak seçilen bu göl Sultan

Dağlarının doğusundadır ve otlaklar ve bataklık ile çevrilidir. Batısında Açık Ilıca adı verilen sıcak su kaynağı vardır. Yüz ölçümü 1.200 hektar olan Çavuşçu gölü iki parçadan oluşan tatlı suya sahip sığ bir göldür. Gölün, Kuzeyinde kalan kısım Kuru Göl olarak adlandırılır. İki göl arasında suların çekildiği zaman ortaya çıkan kara parçası üstüne sedde yapılmıştır. Güneyden giren Bolasan Çayı Gölü besler, ancak düzenleme yapılarak suyu doğuya çevrilmiştir. Göl, tabandaki karstik kanallar ile suyunu kaybettiği düşünülmektedir. Suyun tatlı olması da bu kanıyı kuvvetlendirir (Leblebici ve Seçmen, 2008). Gölün uydu görüntüsü aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 3.2.1) (Akköz ve ark., 2014)



Şekil 3.2.1. Çavuşçu Gölü uydu görüntüsü

Doğusunda kalan Yorazlar çeşmesi, halk tarafından şifâlı su olarak bilinir. Kışın kar ve yağmur suları ile dolan göl alanı, yaz mevsiminde Atlantı ve Ilgın ovalarını suladığından çekilir. Sığ bir göl olan Çavuşçu gölü 1992 tarihinde I.Derecede Doğal Sit Alanı ilan edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda ötrofik karakterli bir göl olduğu tespit edilmiş ancak daha sonra ayrıntılı bir floristik inceleme ve kimyasal çalışma yapılmamıştır (Akköz ve ark.,2014).

3.3. Kimyasallar

Çalışma boyunca kullanılan bütün kimyasallar analitik ölçüdedir ve mevcut olan en yüksek saflık derecesinde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

ε- ACA 0.25 mM(ε -amino kaproik asit), Sodyum potasyum tartar %2, Triton-x % 0.1, BHT 0.15 mM, Asetik asit 99µl, Asetil aseton 100 µl, bütanol, Amonyum asetat 98 µl, Anilin 10 mM, $CaCl_2$ 0.5 ml, EDTA 100 mM, Eritromisin 95 µl, Glukoz 6-PO_4 2.5 mM (Glukoz 6-fosfat) , Glukoz 6-PO_4 dehidrojenaz 0.5 U, Gliserol 10 % , %10 HCl, %10 β-merkaptoetanol, bromofenol blue, HEPES tampon çözeltisi pH 7.8, KCl %1.15 (Potasyum klorür), MgCl2 2.5mM (Magnezyum klorür), $NADP^+$ 0.5Mm, NADPH 96µl, NaOH 0.1 N, Perklorik asit 97 µl, fenol 0.5 ml, PMSF(fenilmetan sülfonil florid) 0.1mM, TCA %20, %10 SDS(sodyum dodesil sülfat), TEMED(N,N,N',N'- Tetrametiletilen diamin), %10 APS(Amonyum persülfat).

3.4. Örneklerin Toplanması

Ekim 2014 ve Şubat 2015 tarihleri arasında belirlenen iki lokaliteye 3 kez arazi çalışması yapıldı (Çavuşçu ve Beyşehir gölleri mevki). Yapılan ilk araziden avlanan sazanlarla analizlerle sonuç elde edilemedi. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) örnekleri balıkçılar yardımıyla avlandı ve laboratuvara getirildi. Boy ve ağırlık ölçümleri yapıldı. Çavuşçu Gölü'nden getirilen 6 adet örneğin boyları sırasıyla, 33 cm, 24 cm, 23.3 cm, 26.7 cm, 29 cm, 24 cm ve ağırlıkları sırasıyla 980 g, 958 g, 957 g, 966 g, 978 g, 959 g olarak belirlendi. Beyşehir Gölü'nden getirilen 5 adet örneğin boyları sırasıyla 52 cm, 51 cm, 50 cm, 44 cm, 49 cm ve ağırlıkları 1.6 kg, 1.5 kg, 1.5 kg, 1.3 kg, 1.4 kg olarak belirlendi. Balık örneklerinin karaciğer dokuları çıkarılarak falkon tüplere konuldu ve analizlere kadar -80°C de saklandı.

3.4.1. Balık Karaciğer Dokularının Mikrozomal ve Sitozolik Fraksiyonu

-80°C'de saklanan balık karaciğer dokuları çıkartılıp buz üstüne alındı. Filtre kağıdı üzerinde kurulandıktan sonra dokular hızla tartıldı. Bundan sonraki bütün işlemler 0-4 °C arasında veya buz üzerinde gerçekleştirildi. Dokular makas ile küçük parçalara ayrıldı. Kıyılan dokulara 3 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,3 mM ε-ACA, 0,15

mM BHT, %0,1 Triton X-100 ve %7 gliserin içeren 50 mM'lık Tris-HCl pH 7,50 çözeltisi (homojenizasyon çözeltisi) (Çizelge 3.4.1) eklenerek buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem cam-teflon homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan dokunun 3 katı kadar homojenizasyon çözeltisi eklendi. Teflon tokmak cam tüp içinde 15 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4.1. Doku homojenizasyon solüsyonun hazırlanışı

Kimyasallar	**Stok konsantrasyon**	**Son konsantrasyon**	**Alınan hacim**
EDTA pH 7.2	100 mM	3 mM	3 ml
PMSF	100 mM	0.5 mM	0.5 ml
ε–ACA	100 mM	0.3 mM	0.3 ml
Triton -x	----	% 0.1	0.1 ml
Gliserin	----	%7	7 ml
Tris-HCl	50 mM		100 ml'ye tamamla.
Toplam Hacim			100 ml

Homojenat, daha sonra post mitokondriyal fraksiyon elde etmek için Sigma 3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj kullanılarak 1500 x *g*'de 12 dakika santrifüj edildi. Supernatanttan bir miktar alınarak -80°C'ye kaldırıldı. Kalan süpernatant 12000 x *g*'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çift katlı steril salgı bezinden süzülerek çökelekten ayrıştırıldı ve süpernatanta supernatant hacminin 0,25 katı kadar 0,16 mM $CaCl_2$ eklenerek 30000 x *g* de 25 dakika santrifüj edildi. Sıvı sitozol kısmı tüplerden alınıp, eppendorf tüplere eşit hacimlerde konuldu ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Çökelek kısmına ise homojenizasyon solüsyonu ve $CaCl_2$ ile yıkama yapıldı (25 ml homojenizasyon solüsyonu + 5 ml 0,16 mM $CaCl_2$). ve tekrar 30000 x *g* de 25 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökeleğe doku ağırlığının 1 katı kadar süspansiyon tamponu eklendi (0,1 M EDTA içeren %10'luk gliserin

çözeltisi) (Çizelge 3.4.2) ve elle homojenize edilip eppendorf tüplere konup -80°C'ye kaldırıldı.

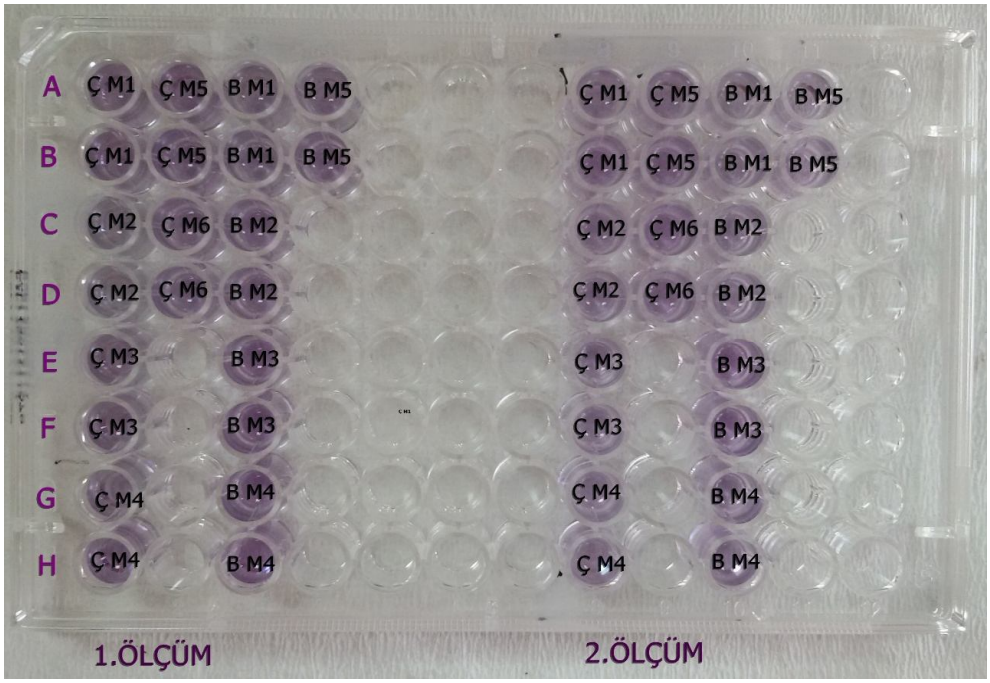
Çizelge 3.4.2. Süspansiyon solüsyonunun hazırlanışı

Kimyasallar	Stok konsantrasyon	Son konsantrasyon	Alınan hacim
EDTA pH 7.4	100 mM	2.5 mM	0.5 ml
Gliserol	----	%10	2.5 ml
Distile su	----	----	25 ml'ye tamamla.
Toplam Hacim			25 ml

3.5. Dokuların Protein Konsantrasyonu Hesaplaması

Mikrozomal proteinlerin konsantrasyonları BCA (bisinkonikoninik asit) tekniğine göre hesaplandı. Öncelikle Protein kitinin (Thermo Scientific ™ Pierce ™ BCA Protein kit) içerisindeki A ve B reaktiflerinden 50:1 oranında karıştırılarak gerekli miktarda çalışma solüsyonu hazırlandı. Balık karaciğer mikrozomları 1/100 oranında seyreltilerek 10 µl mikrozom + 990 µl distile su şeklinde 1 ml ependorflara hazırlandı. Hem seyreltilmiş albümin standartları (Çizelge 3.5.1) hem de mikrozomlardan 25 µl alınarak ve 96'lık steril plakalara konuldu ve 200 µl çalışma solüsyonu ile karıştırıldı. Spektrofotometrede 562 nm'de absorbansı okutuldu ve proteinlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak mor renkli kompkles oluşumu gözlendi (Şekil 3.5.1). Oluşan standart eğriden proteinlerin miktarı aşağıdaki formüldeki gibi hesaplandı (3.1)

$$\text{Protein Konsantrasyonu(mg/ml)} = \frac{OD_{562\ nm}}{\text{Standartların eğimi}} \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$



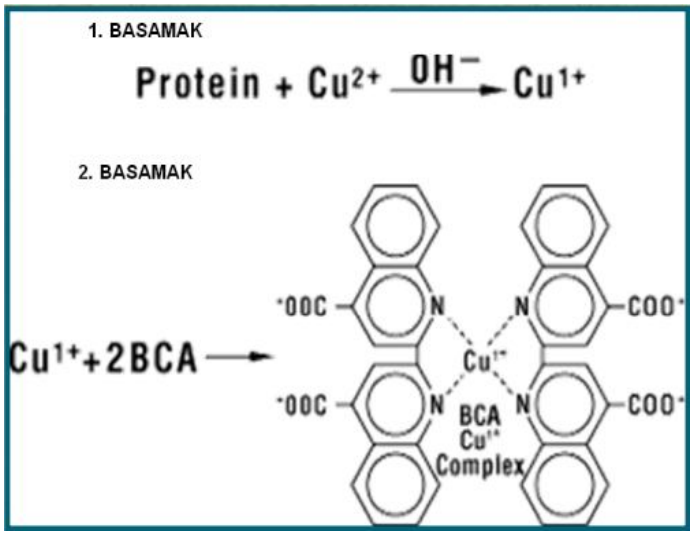
Şekil 3.5.1. BSA ile balık mikrozomal proteinlerinin tayini
(562nm'de spektrofotometrik iki tekrarlı ölçüm.)

Çizelge 3.5.1. Seyreltilmiş Albumin (BSA) Standartların Hazırlanması (Çalışma Aralığı =20-2000 µg/ml)

Şişe	Seyreltme hacmi (µl)	BSA kaynağı ve hacmi (µl)	Son BSA konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	300 (stok)	**2000**
B	125	375 (stok)	**1500**
C	325	325 (stok)	**1000**
D	175	175 (stok)	**750**
E	325	325 (şişe C'den seyreltildi)	**500**
F	325	325 (şişe E'den seyreltildi)	**250**
G	325	325 (şişe F'den seyreltildi)	**125**
H	400	100 (şişe F'den seyreltildi)	**25**
I	400	0	**0**

3.5.1. BCA Tekniği

Bu yöntemde reaktif olarak bisinkoninik asit (BCA) kullanılır ve alkali çözeltideki proteinlerin Biüre reaktifi ile Cu^{+2} den Cu^{+1} e indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} in BCA ile verdiği mor renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Renk yeşilden koyu mora dönüşür. Yöntemin duyarlılığı yaklaşık olarak 20–100 µg/ml dir. Mikro ölçüm işlemi ile duyarlılığın daha da arttırılması mümkündür. Protein BCA tekniği kalorimetrik algılama ve toplam protein konsantrasyonunu ölçmeyi temel alan bir formülasyondur. Bu prosedür mikrotiter plaka yöntemlere göre çok daha geçerlidir. BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan az etkilenir ve girişim etkisi gösteren çok fazla bileşik yoktur. İndirgen ndirgen şekerler ekerler ve bakır şelatlayıcı maddeler bu yöntemde girişim etkisi gösterir. Cu^{+2} iyonları ile şelat oluşturan EDTA gibi maddeler de girişime yol açar. BCA yönteminde girişim etkilerini engellemek için Gates tarafından bir teknik bulunmuştur. Bu teknikte pH 8.5 da pozitif yüklü naylon bir membran protein bağlanır. Girişim yapan maddeler yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra BCA reaktifi ile reaksiyona sokulur (Anonim, 2015).



Şekil 3.5.2. Cu+2'nin Cu+1'e indirgenmesi ve Cu+1'in BCA ile kompkles oluşturması

Standart Deney :

Reaktifler :

1.Reaktif A : 1 gr sodyum bisinkoninik asit (BCA), 2 gr sodyum karbonat,0.16 gr sodyum tartar, 0.4 gr NaOH ve 0.95 gr sodyum bikarbonat damıtılmış su ile 100 ml'ye tamamlanır. 10 mM NaOH ile pH'sı 11.25 'e ayarlanır.
2.Reaktif B : 10 ml damıtılmış su,0.4 gr bakır sülfat (5x hidrat)
3.Standart çalışma çözeltisi (SWR) : 2 hacim reaktif B ile 100 hacim reaktif A karıştırılır.
4.Stok çözeltileri stabildir. Çalışma çözeltisi 1 hafta kararlıdır ve yeşil renktedir.

3.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşığıdından peptitlerde yüksek oranda '(-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Anonim, 2015).

Öncelikle balık mikrozomlarının konsantrasyonuna göre seyreltme işlemi yapılarak proteinlerin denatüre edilmesi için 95°C de 5-10 inkübasyon işlemi yapıldı. Böylece elektriksel ortamda proteinlerin hepsi hızla, büyüklüklerine bakılmaksızın pozitif kutba doğru hareket etmeleri sağlandı. Birbirinden belirli uzaklıkta (0,5-2,0 mm) tutulan iki cam tabaka arasına önce %10 sıkıştırma jeli (0,375 M Tris,Ph 8.8) hazırlandı. Jel polimerleşince üzerine %4 yükleme jeli (0.125 M Tris,Ph:6.8) döküldü ve plastik tarak yerleştirildi. Polimerizasyondan sonra oluşan kuyucuklar polimerize olmayan akrilamidi yok etmek için bütanolle yıkandı. Kuyucuklardan birine 4 µl yürütme tamponu(leader), diğer kuyucuklara 20 µl denatüre edilen örneklerden yüklendi ve düzenek oluşturuldu 20 amperde elektrik akımı geçirilerek proteinler yürütüldü. Elektroforez bitiminde son olarak jel spesifik floresan boyayla (Brillant mavisi) boyanarak proteinler tespit edildi.

3.6.1. Örneklerin Hazırlanışı

Balık doku proteinlerini denatüre etmek amacıyla 95°C de 5-10 inkübasyon işlemi yapıldı ve 2 mg/ml balık doku proteinleri 1 ml yükleme çözeltisi ile karıştırılarak, kaynar su banyosunda 2 dakika inkübe edildi ve ve jele uygulandı.

Örnekler hazırlanırken, ortama disülfit köprülerini redükleyen bir ajan olan ditiyotiretiyol (DDT) eklendiğinde, polipeptit zincirleri üzerinde bulunan disülfit köprüleri açılarak, moleküller düz zincir haline geçerler. Böylelikle üç boyutlu yapı tamamen ortadan kalkar ve tüm protein molekülleri benzer primer yapı halinde hareket ederler. DDT eklenmesi sonucunda polipeptitlerin elektroforetik mobilitelerinde bir miktar azalma gerçekleşir. Bu azalma molekül ağırlığındaki artışdan değil, açılan zincirlerin daha geniş yer tutmasından ileri gelir (Anonim, 2015).

3.6.2. Jelin hazırlanışı

Düzeneğin camları %70'lik alkol ve saf su ile temizlendikten sonra poliakrilamid jel iki cam tabaka arasına (slab) dökülerek hazırlanır. İnce uzun tüplerde hazırlanışına göre az madde harcanması, pratik oluşu ve örneklerin yan yana karşılastırılabilmeleri açısından daha avantajlıdır. İki cam tabaka arasına önce toplam jelin ¾'ünü oluşturan elektroforez sırasında seperasyonu sağlayan %10 sıkıştırma jeli (0,375 M Tris, pH 8.8) döküldü ve jel polimerleşince üzerine %4 yükleme jeli (0.125 M Tris, pH:6.8) dökülerek plastik tarak yerleştirildi, örnek kuyucukları oluşturuldu. Polimerleşme başladıktan sonra ilk 15 dakika içinde %75'e erişir. Polimerizasyondan sonra oluşan kuyucuklar polimerize olmayan akrilamidi yok etmek için bütanolle yıkandı. (0,375 M Tris, pH 8.8) Jel icerisindeki hava kabarcıkları oluşumunu engellemek için jele TEMED eklenmeden önce havası alındı. 20 µl denatüre protein örnekleri ve 4 µl yükleme tamponu kuyucuklara pipet yardımıyla yerlestirildi. Poliakrilamid jelin hazırlanması Çizelge 3.6.1'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.6.1. SDS Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Kimyasallar	Sıkıştırma Jeli (%10) (0,375 M TRIS , pH:8.8)	Yükleme Jeli (%4) (0,125 M TRIS , pH:6.8)
Jel solüsyonu (ml)	10	1.3
Distile su (ml)	12.04	6.1
Sıkıştırma jeli (ml)	7.5	-
Yükleme jeli (ml)	-	2.5
10 % SDS (ml)	0.3	0.1
10 %APS (ml)	0.15	0.05
TEMED (ml)	0.015	0.01
Toplam Hacim (ml)	30	10

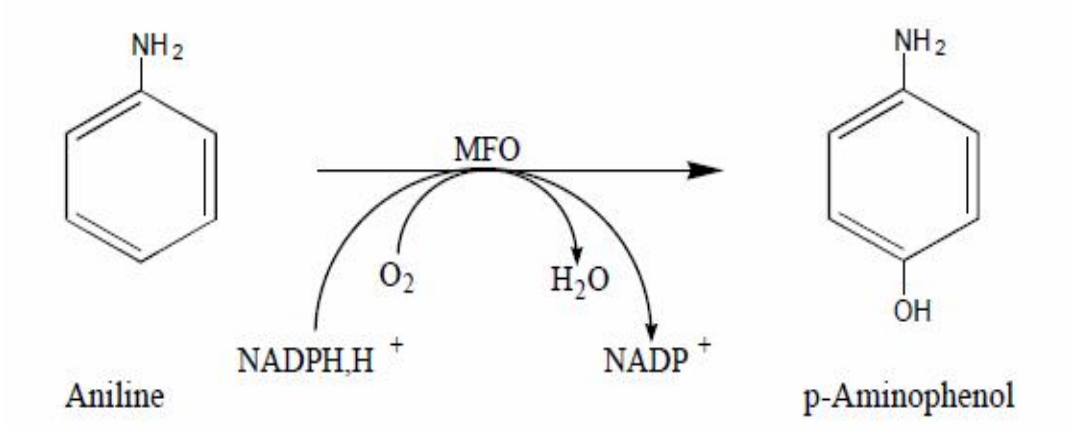
3.6.3. Yürütme ve örneklerin boyanması

Elektroforez, jelin boyuna göre yaklaşık 2-4 saatte, işaret boya jel bitimine ½ cm kalana dek sürer. 20 amperde sabit akım verilerek proteinlerin yürütülmesi sağlandı. Elektroforez bittikten sonra proteinler spesifik bir floresan boyayla Coomasie mavisi ile boyandı. Brillant mavisi asidik ortamda proteinlerin serbest amino gruplarına bağlanır.(lizin, histidin, arjininin amino grubuna). Boya maddesinin sülfonik asit grubu 49 yüklü amino grubuyla birleşir (Anonim, 2015). Boyanarak tespit edilen proteinlerin büyüklükleri her bir standart ilerleme yolu yükleme boyasının gittiği yolun uzunluğuna bölünerek hesaplandı.

3.7. Balık Karaciğer Mikrozomlarında Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Tayini (CYP2E1)

Anilin hidroksilasyonu esas olarak sitokrom P450 enzim ailesinin CYP2E1 izozimi ile ilişkilidir. CYP2E1 tarafından katalizlenen Anilin 4-hidroksilasyonu

reaksiyonu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.7.1.) Sazan balığı karaciğer mikrozomlarında Anilin-4 hidroksilaz aktivitesi aktivitesi p –aminofenol(PAP) miktarı ölçülerek Imai ve ark (1966) yöntemine göre belirlendi.



Şekil 3.7.1. CYP2E1 tarafından katalizlenen Anilin 4-hidroksilaz enzim reaksiyonu

Deney karışımı 10 mM anilin,100 mM HEPES tampon çözeltisi p.H 7.6, 0.5 mM NADPH üretici sistem ve 3 mg mikrozomal protein ihtiva edecek şekilde son hacmi 1ml olarak hazırlandı. (Çizelge 3.7.1.) (Arınç ve İşcan ,1983). Bu yöntemde kofaktör olarak NADPH üretici sistem kullanıldı. NADPH üretici sistemin hazırlanışı ise aşağıdaki çizelgede belirtildiği gibidir (Çizelge 3.7.2.) (Boyuneğmez, 2004).

Hazırlanan deney karışımlarına ve kontrol tüplerine 0.5 ml NADPH üretici sistemin eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. NADPH üretici sistemin ilavesi her deney tüpü için 20 saniye aralıklarla yapıldı ve tüpler çalkalama banyosunda 25 °C de 25 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ilk önce koyduğumuz tüpten başlayarak sırayla bütün tüplere 0.5 ml %20 TCA (Trikloroasetik asit) eklendi böylece reaksiyon durudulmuş oldu. Denatüre olan proteinler 2 ml'lik ependorflara aktarıldı ve +4 °C de 16000 x g'de 25 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın 1 ml'lik p-aminofenol içeren kısmı alındı ve 0.5 ml 20 % Na_2CO_3 ile karıştırıldı vortekslendi ve karışımın üzerine 0.4 N NaOH- %4 fenol karışımı ilave edildi ve deney karışımı çalkalama banyosunda 37 °C de 30 dakika boyunca inkübe edildi. 96'lık steril plakalara 200 µl deney tüplerinde oluşan mavi renkli karışımdan konulup spektrofotometrede 630 nm dalgaboyunda mavi rengin yoğunluğu ölçüldü. p–aminofenol (PAP)'ün standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve Anilin 4-Hidroksilaz enzim aktivitesi pmol/dak/mg olarak hesaplandı.

Çizelge 3.7.1. Balık karaciğer mikrozomlarında Anilin 4-Hidroksilaz aktivitesi ölçümü için inkübasyon karışımının kimyasalları

[a] NADPH üretici sistem Çizelge 3.7.2'de tanımlandığı gibi hazırlanır.

Kimyasallar	Stok solüsyonu	Alınan hacim (ml)	Son konsantrasyon (1 ml karışım içinde)
Balık karaciğer mikrozomları	---	Mikrozomların protein konsantrasyonuna bağlı	3 mg mikrozomal protein (1 ml içinde)
HEPES tamponu, pH: 7.6	400 mM	0.250	100 mM
Anilin	100 mM	0.1	10 mM
NADPH üretici sistem[a]		0.150	0.5 mM
Distile su(H_2O)		1 ml'ye tamamla	

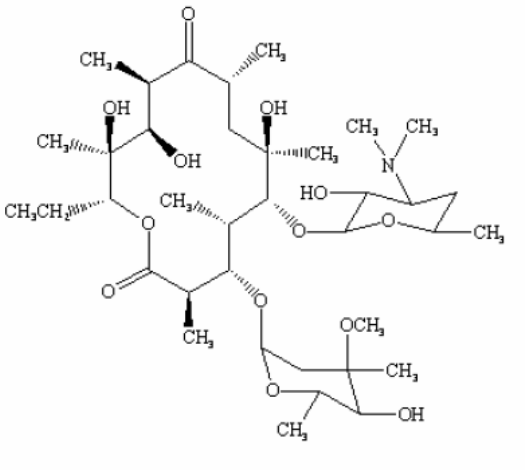
Çizelge 3.7.2. NADPH üretici sistemin hazırlanışı

Kimyasallar	Stok solüsyonu	Alınan hacim (ml)	Son konsantrasyon (0.5 ml hacim içinde)
Glukoz 6-fosfat	100 mM	0.0125	2.5 mM
$MgCl_2$	100 mM	0.0125	2.5 mM
HEPES, pH: 7.8	200 mM	0.0375	14.6 mM
$NADP^+$	20 mM	0.0125	0.5 mM
Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz	700 U/ml	0.00071	0.5 U
Distile su(H_2O)		0.075'e tamamla.	

3.8. Balık Karaciğer Mikrozomlarında Eritromisin N-demetilaz Enzim Aktivitesi Tayini (CYP3A4)

Eritromisin demetilasyonu sitokrom P450 enzim ailesinin CYP3A4 izozimi ile ilgilidir. Eritromisin demetilasyonu moleküler oksijen ve formaldehit varlığında P450 karma işlevli oksidazlar tarafından gercekleştirilir. Eritromisinin yapısı aşağıdaki verilmiştir (Şekil 3.8.1) (Nuyan, 2008).

Balık karaciğer mikrozomlarında eritromisin N- demetilaz enzim aktivitesi Nash (1953) yöntemine göre oluşturulan ve Cochin ve Axelrod (1959) tarafından modifiye edilmiş olan kalorimetrik formaldehit miktarı ölçülerek belirlendi.



Şekil 3.8.1. Eritromisin yapısı

Deney karışımı 100 mM HEPES tamponu pH 7.8, 1.0 mM eritromisin, 0.5 mM NADPH üretici sistem ve 3 mg mikrozomal protein ihtiva edecek şekilde son hacmi 0.5 ml olarak hazırlandı (Çizelge 3.8.1) (Nuyan, 2008'den uyarlanmıştır). Bu yöntemde kofaktör olarak NADPH üretici sistem kullanıldı.

Hazırlanan deney karışımlarına ve kontrol tüplerine 0.075 ml NADPH üretici sistemin eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. NADPH üretici sistemin ilavesi her deney tüpü için 20 saniye aralıklarla yapıldı ve tüpler çalkalama banyosunda 37 °C de 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ilk önce koyduğumuz tüpten başlayarak sırayla bütün tüplere 0.5 ml 0.75 N perklorik asit eklendi böylece reaksiyon durudulmuş oldu. Denatüre olan proteinler 2 ml'lik ependorflara aktarıldı ve +4 °C de 16000xg'de 25 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın 0.5 ml'lik kısmı alındı ve 0.375 ml Nash reaktifi ile karıştırıldı (3.08 g amonyum asetat ve 0.06 ml asetik asit içeren 10 ml'lik solüsyona son olarak 0.04 ml asetil aseton

eklenmesiyle hazırlandı) ve vortekslendi ve deney karışımı çalkalama banyosunda 50°C de 10 dakika boyunca inkübe edildi.

Çizelge 3.8.1. Balık karaciğer mikrozomlarında Eritromisin N-demetilaz aktivitesi ölçümü için inkübasyon karışımının kimyasalları.

Kimyasallar	Stok solüsyon	Alınan hacim	Son konsantrasyon(0.5 ml karışım içinde)
HEPES pH 7.8	400 mM	0.0125	100 mM
Eritromisin *	7.5 mM	0.010	1 mM
Mikrozom	----		3 mg
NADPH üretici sistem			
Glukoz 6-fosfat	100 mM	0.0125	2.5 mM
MgCl2	100 mM	0.0125	2.5 mM
HEPES pH 7.8	200 mM	0.036	14.6 mM
NADP *	20 mM	0.0125	0.5 mM
Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz	1980 U	0.00025	0.5 U
Distile su		0.5 ml'ye tamamla.	

*Eritromisin %50 etanol içinde 73.4 mg çözülerek hazırlanır.

96'lık steril plakalara 200 µl deney tüplerinde oluşan sarı renkli karışımdan konulup spektrofotometrede 412 nm dalgaboyunda sarı rengin yoğunluğu ölçüldü. Formaldehitin standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve eritromisin N-demetilaz enzim aktivitesi nmol cinsinden nmol/dak/mg olarak hesaplandı.

3.9. İstatiksel Analizler

Sazan balığı karaciğer mikrozomlarında protein konsantrasyonlarının hesaplanmasında, protein konsantrasyonu- absorbans grafiklerinin hazırlanmasında ve CYP2E1 ve CYP3A4 enzim aktivitelerinin absorbans grafiklerinin çizilmesinde, istatiksel tüm analizlerde Two-tail students t-test analizi yapıldı, GraphPad Prism 5.0 Software kullanıldı. Önem derecesi $P<0.05$ şeklinde kullanıldı.

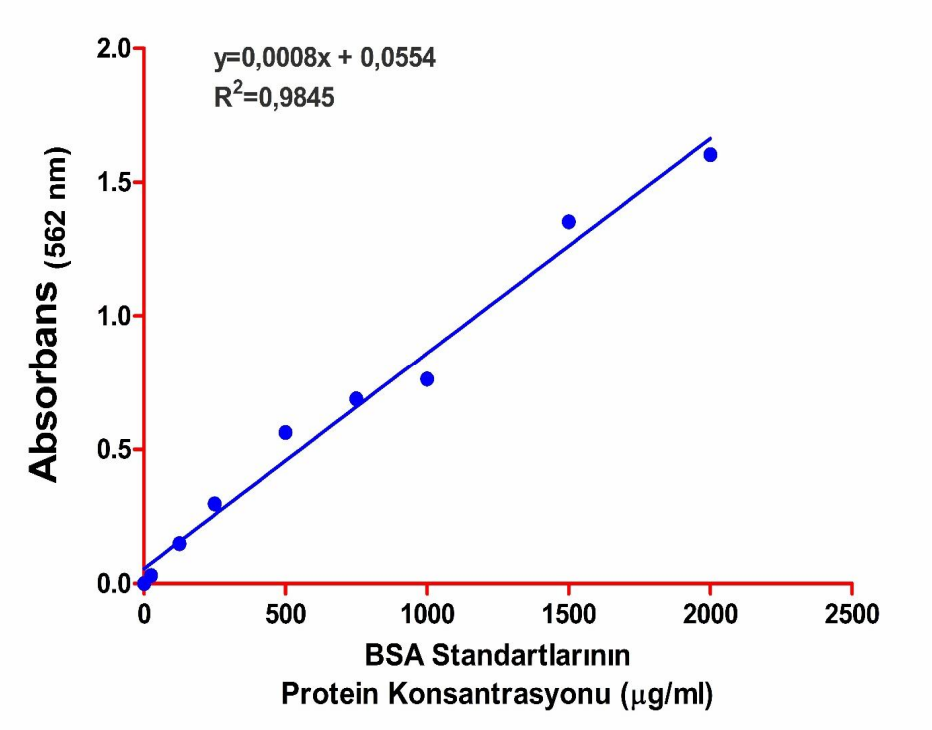
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

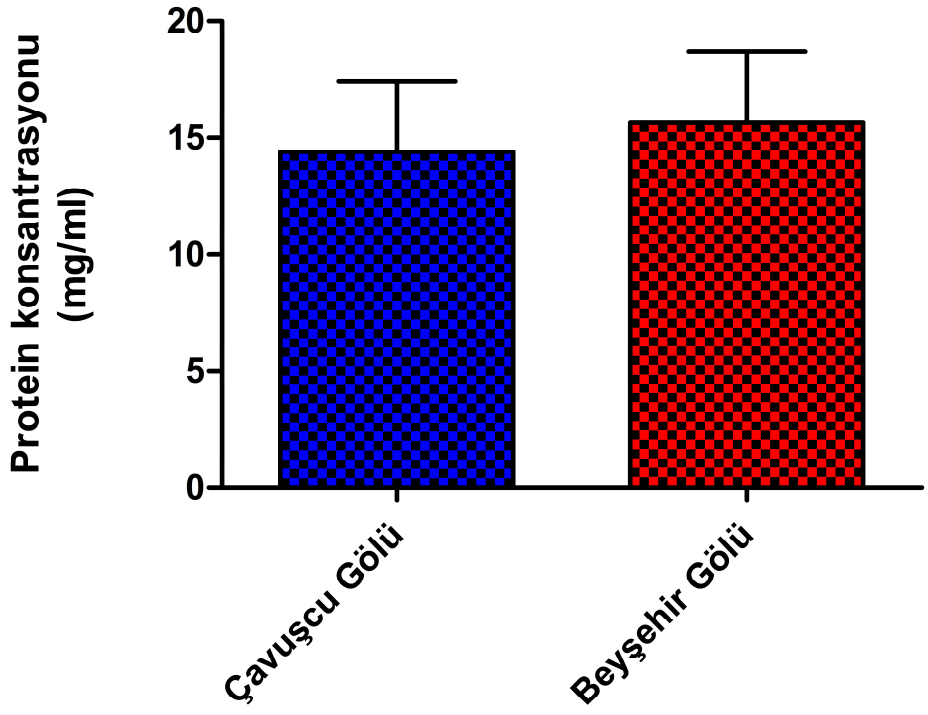
Bu çalışmada Çavuşçu ve Beyşehir göllerindeki sazan balığı karaciğerinden mikrozomlar elde edildi, mikrozomların BCA yöntemiyle protein konsantrasyonları hesaplandı ve SDS-PAGE analiz yöntemiyle mikrozomal proteinler görüntülendi. CYP2E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz ve CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. İki göl arasında gözlenen enzim aktivitesi farklılıkları yorumlandı.

4.1.1. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) örneklerinin Protein Konsantrasyonu

Mikrozomal proteinlerin konsantrasyonları BCA (bisinkonikoninik asit, Smith) tekniğine göre hesaplandı. Her iki gölün balık karaciğer mikrozomları spektrofotometrede 562 nm'de absorbansı okutuldu ve mikrozom proteinlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak mor renkli kompkles oluşumu gözlendi. Oluşan standart eğrinin eğiminden proteinlerin miktarı hesaplandı. Çavuçu gölündeki 6 sazan mikrozomal proteinleri yapılan iki tekrarlı ölçüm sonrası sırasıyla (n=6); 18,8 mg/ml, 12,2 mg/ml, 11,04 mg/ml, 12,2 mg/ml, 16,8 mg/ml, 15,3 mg/ml; Beyşehir gölündeki sazanlarda ise sırayla (n=5); 13 mg/ml, 18,3 mg/ml, 19,4 mg/ml, 14,2 mg/ml, 13,1 mg/ml, olarak bulundu. BSA standartlarının konsantrasyonu aşağıdaki şekilde verildiği gibidir (Şekil 4.1.1). Çavuşçu ve Beyşehir göllerindeki balık mikrozomlarının ortalama protein konsantrasyonu Şekil 4.1.2'de verildiği gibidir.



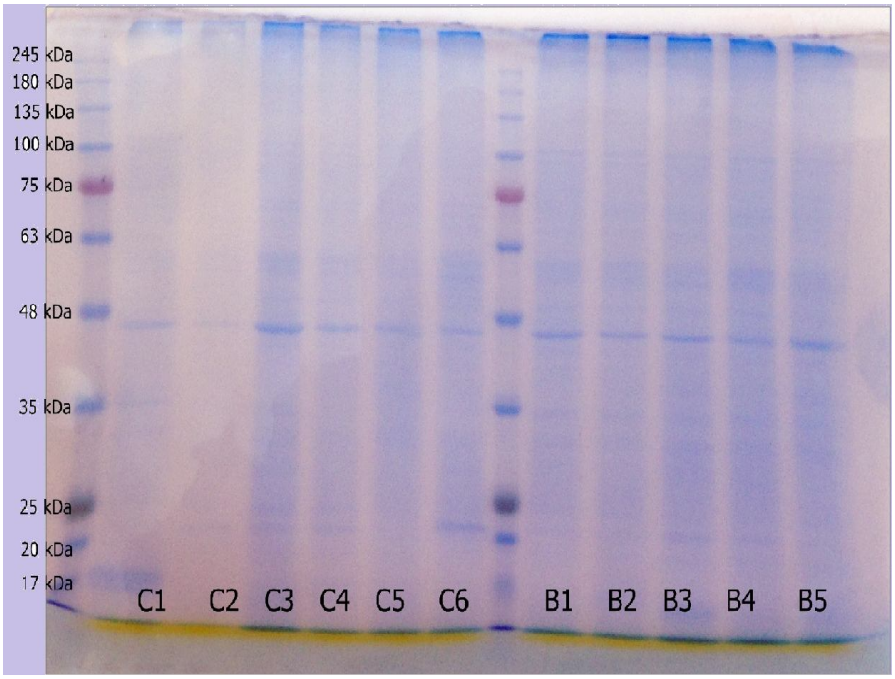
Şekil 4.1.1. BSA standartlarının protein konsantrasyonu (µg/ml)



Şekil 4.1.2. Çavuşçu ve Beyşehir göllerindeki balık mikrozomlarının ortalama protein konsantrasyonu(mg/ml)*(Ortalama ± SEM Çavuşçu gölü 14.39 ± 1.235 N=6 , Ortalama ± SEM Beyşehir gölü 15.64 ± 1.366 N=5.*

4.1.2. Balık Mikrozomlarındaki Protein Profillerinin SDS-PAGE Analizi İle Belirlenmesi

Balık mikrozomlarındaki proteinlerin varlığı SDS-PAGE analizi yapılarak tespit edildi. Çavuşçu ve Beyşehir gölünden alınan 11 farklı balık mikromal proteinleri, moleküler ağırlıklarına göre SDS-PAGE analizi yapılarak görüntülendi. Bu sonuçlar Şekil 4.1.3'de gösterilmiştir. Proteinler 48 kDa'a karşılık gelen yerde görülmektedir.

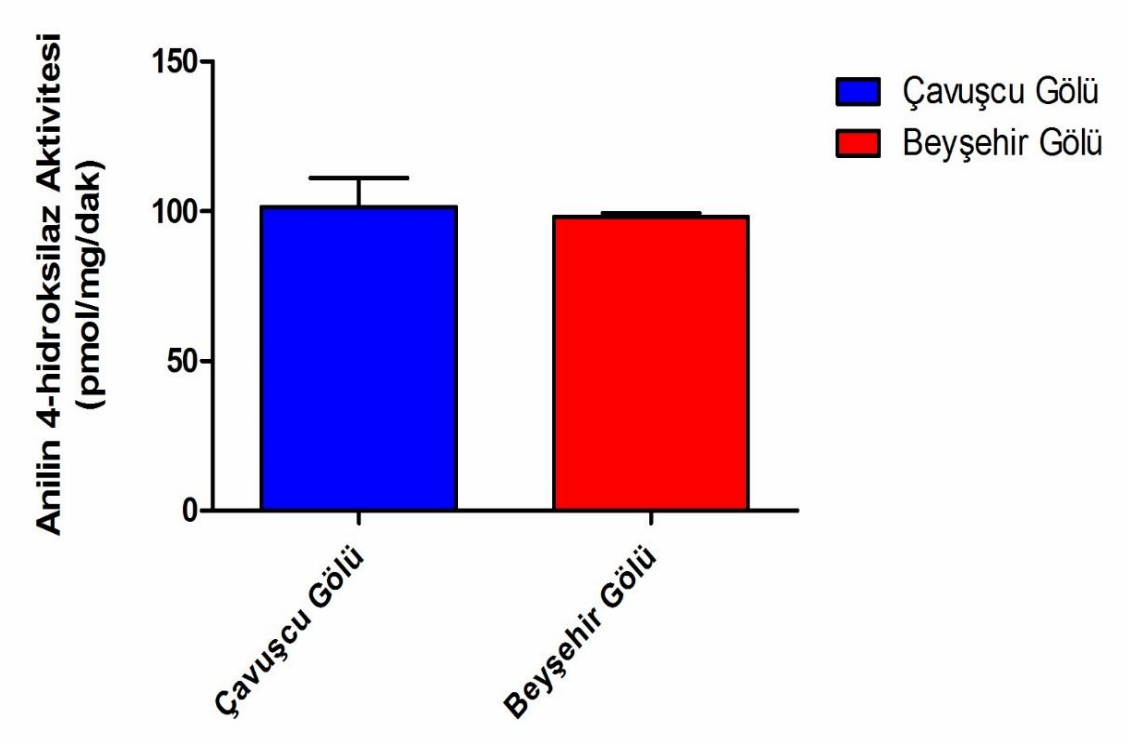


Şekil 4.1.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (C=Çavuşçu gölü,B=Beyşehir gölü)

4.1.3. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı Dokularında Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesi

CYP2E1 aktivitesini tayin ve takip etmek için kullanılan en özgün ve hassas metod anilin 4-hidroksilaz aktivitesidir. Anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri Çavuşçu ve Beyşehir Gölündeki sazan balığı örneklerinde sırasıyla 95,5 pmol/ dak/mg, 117,1 pmol/ dak/mg, 93,6 pmol/ dak/mg, 92,6 pmol/ dak/mg, 101,3 pmol/ dak/mg, 108,4 pmol/ dak/mg olarak bulundu. Beyşehir Gölündeki sazan örneklerinde ise sırasıyla 99,4 pmol/ dak/mg, 96,2 pmol/ dak/mg, 98,7 pmol/ dak/mg, 97,8 pmol/ dak/mg, 98,7 pmol/ dak/mg olarak bulundu. Çavuşçu ve Beyşehir Gölündeki Sazan balığı örneklerinde enzim aktiviteleri ortalama değer olarak sırasıyla 101,5 ± 9,6 pmol/ dak/mg (n=6) ,

98,17 ± 1,1 pmol/ dak/mg (n=5) bulundu. Enzim aktivitesi grafiği Şekil 4.1.4'de verildiği gibidir. Çavuşçu ve Beyşehir Göllerindeki kirliliğin anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri benzer oranda bulunup, aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Bu sonuçlar bize CYP2E1 enzim aktivitesini indükleyici ajanların her iki gölde de benzer miktarlarda bulunabileceği ve bu sebeple iki ayrı göldeki enzim aktivite ölçüm sonuçlarının birbirine son derece yakın olduğunu göstermiştir. Çünkü sitokrom P450 gen ailesinin her bir enzim grubu farklı uyaranlarla indüklenmekte ve aktive olmaktadır ve katalitik etkinlikleri için kullanılan substratlar farklıdır.



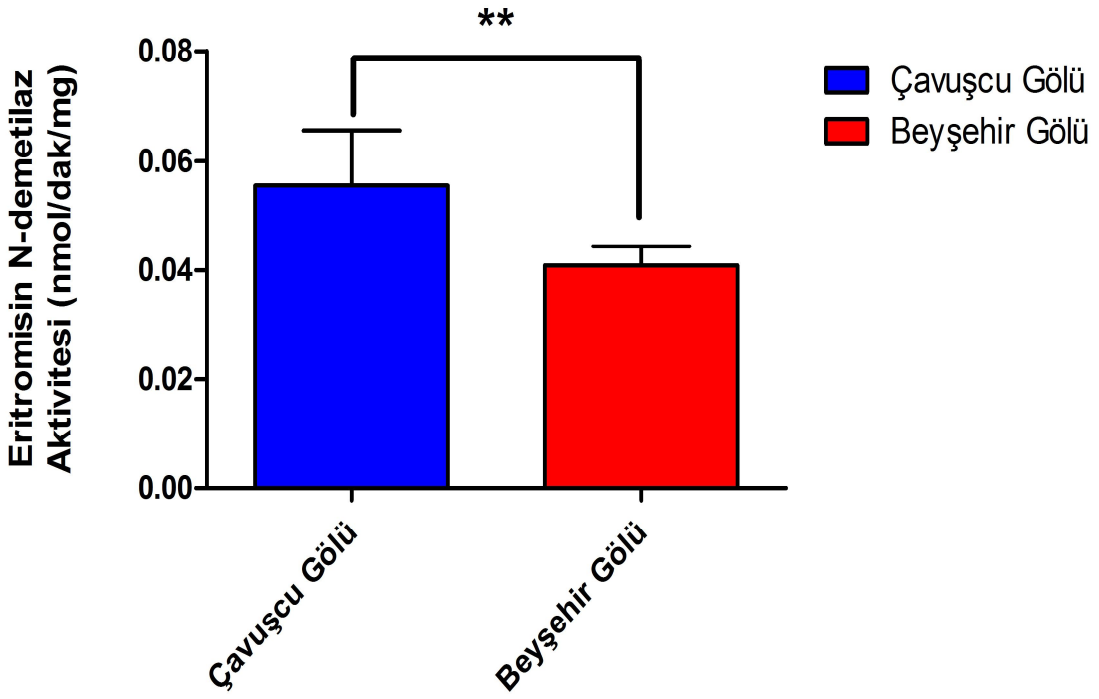
Şekil 4.1.4. Balık karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi.

Çizelge 4.1.1. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivite sonuçları

Anilin 4-Hidroksilaz aktivitesi (pmol/dak/mg)							
Sazan örnekleri							
	1	2	3	4	5	6	Ortalama (Mean± SEM)
Çavuşçu Gölü	95.55	117.11	93.66	92.66	101.33	108.44	101,5 ± 9,661 (N=6)
Beyşehir Gölü	99.44	96.22	98.77	97.88	98.77	97.88	98,17 ± 1,124 (N=6)

4.1.4. Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Sazan Balığı Dokularında Eritromisin N-demetilaz Enzim Aktivitesi

CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktiviteleri Çavuşçu gölündeki sazan örneklerinde sırasıyla 0,04 nmol/dak/mg, 0,06 nmol/dak/mg, 0,06 nmol/dak/ml 0,06 nmol/dak/mg, 0,05 nmol/dak/mg, 0,04 nmol/dak/mg olarak bulundu. Beyşehir gölündeki örneklerde ise sırasıyla 0,04 nmol/dak/mg, 0,04 nmol/dak/mg, 0,03 nmol/dak/mg, 0,04 nmol/dak/mg, 0,04 nmol/dak/mg, 0,04 nmol/dak/mg olarak bulundu. Çavuşçu ve Beyşehir gölündeki Sazan balığı örneklerinde enzim aktiviteleri ortalama değeri sırasıyla 0,055 ± 0,01, 0,040 ± 0,003 nmol/dak/mg (n=5) bulundu. **p=0,0073 olup iki göl arasında anlamli bir fark olduğu bulundu. (Şekil 4.1.5) Çavuşçu gölündeki sazan balığı karaciğer mikrozomlarında enzim aktivitesi Beyşehir gölündeki sazan balıklarındaki enzim aktivitesine göre 1.4 kat daha fazla bulundu. CYP3A4 enzim aktivitesinin Çavuşçu gölü sazan balıklarında 1.4 kat daha yüksek bulunması CYP3A4 enzimini indükleyen ajanların, çevresel toksikantların bu gölde daha yüksek miktarlarda olduğunu ve her kimyasalın farklı konsantrasyonlarda farklı enzimlere farklı şekillerde etki edeceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.1.5. Balık karaciğer mikrozomlarının eritromisin N-demetilaz enzim aktivitesi **p=0,0073 (p<0.05) Two-tail students t-test

Çizelge 4.1.2. Eritromisin N-demetilaz enzim aktivite sonuçları

Eritromisin N-demetilaz aktivitesi (nmol/dak/mg)							
Sazan örnekleri							
	1	2	3	4	5	6	Ortalama (Mean± SEM)
Çavuşçu Gölü	0,040	0,060	0,066	0,063	0,052	0,048	0,055 ± 0,01 (N=6)
Beyşehir Gölü	0,045	0,044	0,035	0,040	0.040	0,040	0,040 ± 0,003 (N=6)

4.2. Tartışma

Yapılan çalışmada Çavuşu ve Beyşehir Göllerindeki toplam 11 sazan balığı karaciğer dokularında CYP2E1 ve CYP3A4 enzim aktiviteleri spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre iki gölde de; endüstriyel çözücüler, protoksinler ve prekarsinojenler gibi ekzojen kaynaklı bileşikleri metabolize eden bir sitokrom P450 izozimi olan CYP2E1 enzim aktivitesinde istatiksel olarak önemli bir varyasyon gözlenmemiştir. Elde edilen bulgularla yapılan yorumlara göre CYP2E1 aktivitesini indükleyici ajanların her iki gölde de benzer miktarlarda bulunabileceği ve bu sebeple iki ayrı göldeki enzim aktivite ölçüm sonuçlarının birbirine son derece yakın olduğu düşünülmektedir. Çünkü sitokrom P450 gen ailesinin her bir enzim grubu farklı uyaranlarla indüklenmekte ve aktive olmaktadır. Eritromisin N- demetilaz bağımlı CYP3A4 enzim aktivitesinin ise Çavuşçu Gölündeki sazanlarda Beyşehir Gölündeki sazanlardan 1.4 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. CYP3A4 enzimini indükleyen ajanların, çevresel toksikantların bu gölde daha yüksek miktarlarda olduğunu ve her kimyasalın farklı konsantrasyonlarda farklı enzimlere farklı şekillerde etki edeceğini bize göstermiştir. İnsanda çevresel toksikantları ve çeşitli kimyasalları içeren organik kirliliğin klinik toksisiteyi artırabileceği düşünülmekte ve karsinojen olduğu bilinmektedir. Bu çalısmada elde edilen sonuçların genel olarak bahsedilen literatürlerin sonuçlarıyla paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Nuyan, karsinojen akrilamidin tavsan karaciğer, böbrek ve akciğerinde sitokrom P450 ve faz 2 enzimleri ile in *vivo* etkilerini araştırmış akrilamidin, CYP2E1'e bağlı

tavsan karaciğer (1.80-3.0 kez) ve böbrek (1.60 kez) *p*-Nitrofenol hidroksilaz, NDMA N-demetilaz ve anilin 4-hidroksilaz aktivitelerini anlamlı arttırdığını bulmuştur. Ayrıca akrilamid, tavsan karaciğer ve böbrek CYP2E1 protein duzeylerinin yaklaşık 2-kez anlamlı arttığını ifade etmiştir. Resveratrolun akrilamid nedenli artmıs tavsan karaciğer CYP2E1'e bağlı enzim aktivitelerini (1.5-1.80 kat) ve CYP2E1 protein düzeylerini (1.5-1.70 kat) anlamlı düşürdüğünü belirtmiştir. Bu calısma, *in vivo* akrilamidin CYP2E1'e bağlı tavsan karaciğer ve böbrek enzim aktivitelerini ve CYP2E1 protein düzeylerini arttırdığını gösteren ilk çalışma olmuştur (Nuyan, 2008).

Kimyasal kirlenmeye bağlı olarak organizmada ortaya çıkan biyolojik değişimlerin en önemlilerinden birisi de, enzim aktivitelerinde gözlenen farklılıklardır. Biyotransformasyon enzimlerinin belirli kirleticiler yolu ile indüksiyonu gibi moleküler etkilerin çalışılması, bizlere kirletici düzeyleri, bu kirleticilerin sinerjistik veya antagonistik etkileri ve organizmanın savunma tepkileri hakkında önemli bilgiler verebilir. Bu tip araştırmalar çalışılan alanın su kalitesinin belirlenmesinde çok büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Göksoyr ve Förlin, 1992). Tekin Özan, 2005 yılında yaptığı çalışmada Beysehir Gölü suyunun pH değeri 7.18-9.06 arasında, sedimentinin pH degerini ise 7.21-7.95 arasında ölçmüştür. Beysehir Gölü'nün su örneğinde yapılan ağır metal analizinde Cu, Fe, Zn ve Mn farklı mevsimlerde belirlenirken Cr, Pb ve Cd AAS'nin analiz limitinin (<0.028) altında çıkmıstır. Araştırmanın yapıldığı Beysehir Gölü çevresinde son zamanlarda nüfus sayısının artışına paralel olarak zirai ve endüstriyel gelismelerde artmıştır. Çevredeki tarlaların atık suları karışmaktadır. Bu atık sular ağır metal, siyanür, amonyak ve pestisit içerebilirler. Bu kirleticiler gölde bulunan balıklarda birikerek bağısıklık sistemini ya direk ya da dolaylı olarak etkileyebilirler. Beysehir Gölü'nün suyunda tespit edilen agır metal miktarları Dünya Saglık Örgütü (Anonim, 1993)'nün, TSE (Anonim, 1997)'nin ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (Anonim, 2002)'nın verdigi sucul ortamda agır metallerin kabul edilebilir değerlerine göre Fe'in Yaz-2004'deki miktarı dısında herhangi bir tehlikenin olmadığı görülmektedir. Bu çalısmada metallerin en fazla biriktigi organın karaciğer olduğu, görülmektedir. Sazan balığının karaciğerinde Cu, Fe ve Zn'ya rastlanılmıştır. Karaciğerde en az biriken metalin Cu oldugu tespit edilmistir. Fe ve Zn'nun mevsimlere bağlı olarak degişiklik göstermekle birlikte karaciğerde yüksek oranlarda biriktigi belirlenmistir. Fe ve Zn her mevsimde bütün dokularda tespit edilmistir. Cu sazanda Kış-2003, Sonbahar-2004 ve Kış-2004 dışındaki mevsimlerde sadece karaciğerde

belirlenmiştir. Metallerin karaciğerde yüksek oranlarda birikmesi metabolik olarak aktif bir organ olmasından kaynaklanmaktadır (Tekin-Özan, 2005).

Altındağ ve arkadaşları 2004 yılında Beyşehir Gölü'nde yaptıkları çalışmada sazan balığ kas dokusunda en yüksek konsantrasyonda Cd (0.543 lg/g),en düşük konsantrasyonda Hg (0.022 lg/g) bulmuşlardır. Pb ve Cr konsantrasyonunu ise sırasıyla 0.303 and 0.308 lg/g olarak elde etmişlerdir. Solungaç dokusunda birikimi ise Cd > Pb > Cr > Hg olarak bulmuşlardır.

Çavuşçu gölü'nün su kalite özellikleri üzerine araştırma yapan Aşıkkutlu ve arkadaşları gölün bazı sezonlarda (yaz ayları) ötrofik yapı göstermekte, ancak littoral bölgedeki bitki formasyonunun azlığı yönünden bu karakteri yansıtmamakta olduğunu saptamışlardır. Morfometrik olarak ötrof karakterde olan göl bir bütün olarak ele alındığında mezotrof olarak kabul edilebilir. Kirlilik yönünden bakıldığında tarımsal kirleticiler ve otokton kaynaklı kirleticiler dikkat çekmektedir. Göl çevresinde evsel deşarj tespit edilmemiştir. Sulama amaçlı su çıkışları yapılırsa göl hızla ötrofikasyon başlayacaktır. Çavuşçu Gölü fosfat yönünden SKKY (2004)'ye göre 2. sınıf kalitede olduğu belirlenmiştir. Ötrifikasyon sınır değerleri için ise, göllerde rekreasyon ve doğal koruma amacı için fosforun sınır değerinin 0.005 mg/L ve çeşitli kullanımlar içinse 0.1 mg/L olması istenmektedir. Çavuşçu Gölü'nde ortalama toplam fosfat değeri 0.1326 mg/L olarak ölçülmüştür ve sınır değerlerin üzerinde olduğu görülmektedir (Aşıkkutlu ve ark., 2014). Akköz ve arkadaşları 2014 yılında Çavuşçu gölü'ndeki su kalitesinin bulanık mantık yöntemiyle değerlendirilmesi çalışmasında aylık inceleme sonuçları, klasik sınıflandırmaya göre 5 parametre açısından (Al, Zn, Fe, Cd, Pb) 1.sınıf ,2 parametre açısından (Cr, Mn) 2.sınıf,,3 parametre açısından (Cu, Co, Ni) 3.sınıf olarak belirlenmiştir. Bu göldeki ağır metal kirliliğiyle çalışmamızdaki enzim katalitik ölçümleri paralellik göstermektedir.

Erkmen ve birlikte çalıştığı arkadaşları Meriç Deltası'ndaki çevresel kirliliğin sazan balıklarında çeşitli enzimatik biyobelirteçler kullanılarak değerlendirmiş sazan balığı örnekleri 5 farklı istasyondan mevsimsel olarak alınmış ve 167 sazan balığı üzerinde hepatik glutatyon S-transferaz (GST), karboksil esteraz (CaE), laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST) ve asit fosfataz (ACP) enzim aktiviteleri incelenmiştir. Analizler sonucunda, karaciğer GST, CaE, LDH, ve AST aktivitelerinin farklı mevsimlerde ve istasyonlar arasında önemli düzeyde farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Buna karşın karaciğer ACP aktivitesinde ise istatistiksel olarak

önemli bir varyasyon gözlenmemiştir. Enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, özellikle GST ve CaE enzim aktiviteleri gibi değerlerin dönemsel değişimleri yansıttığı ve istasyonlar arasındaki farkın belirlenmesi açısından daha duyarlı biyobelirteçler olduğu ifade edilebilir (Erkmen ve ark., 2008).

İnsanlar PCB'lerle bulaşık gıdaların ve suların ağız yolu ile alınması veya bulaşık havanın solunması ile maruz kalmaktadır. Sucul canlılar PCB'lere karşı çok duyarlıdır. Turna balıklarında 20-50 ppb, alabalıklarda 8 ppb, karideslerde 1 ppb PCB ölümlere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 10-25 ppb gibi son derece düşük miktarlardaki PCB'nin sulardaki bitkisel planktonlar ve kabukluların ölümüne sebep olduğunu dolayısıyla ekosistemi tümüyle etkilediği belirlenmiştir (Göksoyr ve Förlin, 1991) Balıklarda karaciğer, metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yeri olduğundan Cd, Cu ve Zn gibi ağır metalleri yüksek düzeyde biriktirmektedir (Cicik ve Erdem, 1992).

İnsan populasyonu, akuatik ekosistem besin zincirinde son bağlantıyı oluşturmaktadır. Bu durumun ciddiyeti bilindiğinden bu toksik etkilerin risklerinin ve olası zararlarının tartışılması gerekmektedir. Büyük göllerdeki akuatik ekosistemde bulunan kontaminantlar ile temas halinde olan insan üzerinde yapılacak olan araştırmalar bilgilerin geliştirilmesi açısından yararlı olacaktır. Böyle bir çalışma biyokimya, toksikoloji, epidemioloji ve halk sağlığı birimleri ile ortak geliştirilmelidir (Telefoncu ve Zihnioğlu, 1992). Çevre kirliliğinin bir göstergesi olarak canlılarda ölçülen metalik kirleticiler özellikle su ürünlerinde sıklıkla yüksek seviyelere ulaşabilir. Bu şekilde besinlerle birlikte düşük düzeylerde ama sürekli olarak alınan civa, kadmiyum ve kurşun gibi metal kalıntıları çevre ve insan sağlığını önemli derecede etkilemektedir (Kayhan, F.E, ve ark., 2009).

Bu çalışma sonuclarına dayanarak, kirliliğin yarattığı toksisitede koruyucu etkisi olabilen birtakım antioksidan kimyasal maddeler önerilmeli ve antioksidan enzim sistemleri üzerine *in vivo* etkisini tanımlamak için ileri çalışmalar yapılmalıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Karaciğer sitokrom CYP2E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi ile CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz aktivitesinin PAH, PCB ve dioksinlerle indüklenmesi , organik kirleticilerin varlığının belirlenmesinde erken uyarı sinyali görevi yaparak, en hassas biyolojik gösterge olarak kullanıldı. Belirlenen mikrozomal protein konsantrasyonlarıyla CYP450 enzim aktiviteleri arasında doğru orantı olduğu saptandı. Çavuşçu ve Beyşehir göllerindeki organik kirlilik bakımından mevcut olan belirgin fark, iki CYP bağımlı floresan subsrat kullanılarak hepatik mikrozomların katalitik etkinlikleri ölçülerek belirlendi. Anilin 4-hidroksilaz bağımlı CYP2E1 enzim aktivitesi Sazan balığı örneklerinde sırasıyla 101,5 ± 9,6 , 98,17 ± 1,1 (n=6) pmol/ dak/mg bulundu. Her iki göldeki kirliliğin anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisinde istatiksel olarak anlamli bir fark görülmezken CYP3A4 bağımlı eritromisin N-demetilaz enzim aktivitesi ise sırasıyla 0,055 ± 0,01, 0,040 ± 0,003 (n=5) nmol/ dak/mg bulundu. Two-tail students t-test analiziyle **p=0,0073 bulundu ve iki göl arasında istatiksel olarak anlamli bir fark olduğu gözlendi. İncelenen eritromisin N-demetilaz aktivitesi bakımından Çavuşçu gölündeki sazanlardaki aktivitenin Beyşehir gölündeki sazanlardaki aktiviteye göre 1.4 kat daha fazla olduğu saptandı.

Bu sonuçlar bize CYP2E1 enzim aktivitesini indükleyici ajanların her iki gölde de benzer miktarlarda bulunabileceği ve bu sebeple iki ayrı göldeki enzim aktivite ölçüm sonuçlarının birbirine son derece yakın olduğunu göstermiştir. Çünkü sitokrom P450 gen ailesinin her bir enzim grubu farklı uyaranlarla indüklenmekte ve aktive olmaktadır ve katalitik etkinlikleri için kullanılan substratlar farklıdır.

CYP3A4 enzim aktivitesinin Çavuşçu gölü sazan balıklarında 1.4 kat daha yüksek bulunması ise CYP3A4 enzimini indükleyen ajanların, çevresel toksikantların bu gölde daha yüksek miktarlarda olduğunu ve her kimyasalın farklı konsantrasyonlarda farklı enzimlere farklı şekillerde etki edeceğini bize göstermiştir. Yani Çavuşçu gölündeki organik kirlilik CYP3A4 enzim aktivitesiyle izlendiğinde Beyşehir Gölündeki organik kirlilikten daha fazla görülmektedir. CYP3A4 enzim aktivitesi artışı hücrelerde bu enzimin substratı olan çeşitli toksik ajanların etkilerini arttırarak değişik patofizyolojik durumlara sebebiyet verir dolayısıyla hepatoksisite ve kanser riskini

artırdığı düşünülmektedir. Artan CYP2E1 enzim aktivitesi ve protein düzeylerinin CYP2E1 tarafından metabolize edilen diğer toksik ve önkarsinojen maddelerin metabolizmasını arttırarak yine karaciğer toksisitesine sebep olabileceği ve toksik bileşiklerin vücutta birikerek hastalığın hedef organını yıpratacağı ve hastalığın yerleşmesini kolaylaştırıcağı düşünülmektedir. Bu durum; akuatik ekosistemdeki tüm kontaminantlar için insanın son biyolojik reseptörler olduğunu bize göstermektedir.

5.2. Öneriler

Çevresel toksikantları içeren organik kirliliğin ve bu kimyasallara maruz kalmanın klinik toksisite ve ilaç metabolizmasında bozuklukların görülme olasılığını artırabileceği düşünülmekte ve karsinojen olduğu bilinmektedir. Bu çalışma sonuçlarına dayanarak, kirliliğin yarattığı toksisitede koruyucu etkisi olabilen birtakım antioksidan kimyasal maddeler, fenolik bileşikler önerilmeli ve antioksidan enzim sistemleri uzerine *in vivo* etkisini tanımlamak icin ileri calısmalar yapılmalıdır. Ayrıca kirliliğin hangi konsantrasyonlarda sucul organizmalar ve insan için tehlike oluşturduğunun da araştırılması gereken diğer bir önemli konu önceliği taşıdığını düşünmekte ve ilerleyen çalışmalarımızda bu konuya daha çok eğilerek sularımızdaki organik kirliliğinin tespiti ve hangi konsantrasyonlarda zararlı etkilerinin bulunduğu incelenecektir.

KAYNAKLAR

Adamson, R.H. 1967, Drug metabolism in marine vertebrate. Fed.Proc.26:1047.

Ak, A., 2006, Beyşehir Gölü (Konya)'nde Yaşayan Kadife Balığı (*Tinca tinca* L.,1758)'nın Büyüme Özelliklerinin İncelenmesi. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 37s, Niğde.

Akköz,C.,Yılmaz Öztürk,B., Aşıkkutlu,B., Gümüş N.E., 2014,Evaluation of Heavy Metal Contamination at Çavuşçu Lake by Fuzzy Logic,*Journal of Selçuk University,*3(3) ,92-102.

Altındağ,A ve Yiğit,S. 2005, Assessment of heavy metal concentrations in the food web of lake Beysehir, Turkey. *Chemosphere 60.* 552–556

Anonim, 1993, Guidelines for Drinking Water Quality. Recommendations, vol. 1, *2nd ed. World Health Organization*, Geneva.

Anonim, 1997, Türk Standartları Enstitüsü. Yıllık Gelisim Raporu.

Anonim, 2002, Su Ürünleri Kanunu ve Su Ürünleri Yönetmeligi. Tarım ve Köy İşleriBakanlıgı. 63-78. Ankara.

Arınç, E. and Philpot, R. M., 1976, Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *J. Biol. Chem*. 251, 3213-3220.

Arınç, E., İşcan, M. 1983, Comparative studies of sheep liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74C, 151-158.

Arınç, E., 1993, Extrahepatic Microsomal Forms: Lung Microsomal Cytochrome P450 Isozymes. In: Schenkman, J.B., Greim, H. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 105. pp. 373-386. Springer,* Heidelberg.

Arınc, E, Adalı, O, Ozkan-Gencler, AM., 2000A, Induction of N-Nitrosodimethylamine metabolism in liver and lung by in vivo pyridine treatment of rabbits. *Arch Toxicol* 74: 329-334.

Arınc, E., Adalı, O., Özkan-Gencler, AM. 2000B, Stimulation of aniline, pnitrophenol and N-Nitrosodimethylamine metabolism in kidney by pyridine pretreatments of rabbits. *Arch Toxicol* 74: 527-532.

Arınç, E., Şen, A., Bozcaarmutlu, A., 2000, Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure Appl. Chem*. 72, 985-994.

Arinç E., Arslan S., Adalı O.,2005, Differential effects of diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 proteins and associated drug metabolizing enzyme activities in rabbit liver. *Archieves of Toxicology,* 79, 427-433.

Arinç E., Arslan, S., Bozcaarmutlu,A. and Adalı ,O. (2007) Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food and Chemical Toxicology* 45*,* 107-118 , 2007.

Aşıkkutlu, B., Akköz, C., Yılmaz-Öztürk, B.,2014, Çavuşçu Gölü'nün (Konya/Ilgın) Bazı Su Kalite Özellikleri. *SUFEFD* , 39: 1-9.

Atamanalp, M., Uçar,A, Alak, G.,*Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 6(1): 124-127,2013.

Bailey GS, Hendricks JD, Nixon JE, Pawlowski NE.,1984, Kanserojenlere Gökkuşağı Alabalığı ve Diğer Balık Duyarlılığı. *İlaç Metab.Rev* 15: 725-750.

Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB.,1996 Biotransformation of drugs, in Hardman JG, Limbird LL, Molinoff PB, et al (eds): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *9th ed. New York, McGraw-Hill,* 3-28.

Binder, R.L. and J.J. Stegeman, 1983. Basal levels and induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activity during the embryonic period of development in brook trout. Biochem. Pharmacol. 32, 1324 1328.

Brodie, BB., Maickel,RP., 1962, İlaç Metabolizmasının Karşılaştırılmalı Biyokimyası. *Proc 1. Int Farmakoloji Toplantısı, Macmillan, New York*, s 299-324

Brown, C.A. and S. Black, 1989, Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. 15, 4442-4449.

Boyuneğmez, T., 2004, Toksik Ve Karsinojenik Organik Kirliliğin Büyük Kanal Projesi'nden Sonra İzmir Körfezi Boyunca Biyokimyasal Olarak İzlenmesi Ve Sağlığa Olabilecek Etkileri. Yüksek lisasns tezi. *Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Ankara*,* 151s.

Buhler DR, Rasmusson ME 1968, Balıklar Tarafından İlaçların Oksidasyonu. *Biochem Physiol* 25: 223-239

Buhler, DR., Williams,DE., 1989, Balıklar Ve Diğer Su Hayvanları İle PAH Metabolizmasında Rol Enzimler. In: sucul ortamda polinükleer aromatik hidrokarbonların Varanasi, *U (ed) Metabolizma, CRC Press, Inc., New York,* s 151-184.

Buhler, D.R., Yang, Y.H., Dreher, T.W., Miranda, C.L., Wang, J.L., 1994, Cloning and sequencing of the major rainbow trout constitutive cytochrome P450 (CYP2K1): identification of a new cytochrome P450 gene subfamily and its expression in mature rainbow trout liver and trunk kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 312 (1), 45–51.

Cicik, B., Erdem, C., 1992, Effect of Copper on the quantitative protein changes in liver and muscle tissues of Tilapia nilotica.*Biyokimya Dergisi,* 17(1) :54- 64.

Cheng, J.B., Levine, M.A., Bell, N.H., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W., 2004, Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101* (20), 7711–7715.

Chuang, S.S., Helvig, C., Taimi, M., Ramshaw, H.A., Collop, A.H., Amad, M., White, J.A., Petkovich, M., Jones, G., Korczak, B., 2004, CYP2U1, a novel human thymus-and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279 (8), 6305–6314.

Christen, V., Caminada, D., Arand, M., Fent, K., 2010, Identification of a CYP3A form (CYP3A126) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and characterisation of putative CYP3A enzyme activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2), 585–595.

Cohen MB, Feyereisen R., 1995, A cluster of cytochrome P450 genes of the *CYP6* family in the house fly. *DNA Cell Biol*,14: 73-82.

Connor, M.S., 1984, Comparison of the Carcnogenic Risks From Fish vs Groundwater Contamination by Organic Compounds, Environ. Sci. Technol. 18, 628-631.

Corley-Smith, G.E., Su, H.T., Wang-Buhler, J.L., Tseng, H.P., Hu, C.H., Hoang, T., Chung, W.G., Buhler, D.R., 2006, CYP3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio). Bi ochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (4), 1039–1046.

Cupp, M.J., Tracy, T. 1998, Cytochrome P450: New nomenclature and clinical applications. *Clin Pharmacol* 57: 107-116.

Dawe, C.J., 1990, Implications of aquatic animaI health for human health. *Environ. Health Res.* 86, 245-255.

DeAnn J. L., 1998, The Detoxification Enzyme Systems. *Alternative Medicine Review,* Vol. 3 (3), pp. 187–198.

Degtyarenko KN., Archakov AI., 1993, Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett,* 332; 1-8.

Degtyarenko KN., 1995, Structural domains of P450-containing monooxygenase systems Protein Engineering, 8(8): 737-47.

Ding, X., Koop, D.R., Crumb, B.L., Coon, M.J., 1986, Immunochemical identification of cytochrome P450 isozyme 3a (p450ALC) in rabbit nasal and kidney microsomes and evidence for differential induction by alcohol. *Molpharmacol* 30: 370-378.

Djordjevic S, Roberts DL, Wang M., 1995, Crystallization and preliminary x-ray studies of NADPH-cytochrome P450reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(8): 3214-8.

Eisen HJ., 1986, Induction of hepatic P-450 isozymes. In: Ortiz de Montellano PR (ed.). Cytochrome P-450. Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York: Plenum,315s.

Erkmen,B.,Güngördü, A , Kolankaya, D., Özmen,M., 2008, Meriç Deltası'ndaki Çevresel Kirliliğin Sazan Balıklarında Çeşitli Enzimatik Biyobelirteçler Kullanılarak Değerlendirilmesi, *19.Ulusal Biyoloji Kongresi*, Trabzon.

Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NV, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA & Rebbeck TR., 1998, Association of *CYP3A4* genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13176-13181.

Finn, R.N., 2007, The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquat. Toxicol.*81 (4), 337–354.

Goksoyr A., Förlin L., 1992, The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology,* 22, 287-312.

Gonzalez FJ, 1989, The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacological Rev, 40*: 243-8.

Guengerich F.P., 2003, Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol. Intervent*., Vol. 3, pp. 194-204.

Hanukoglu I., 1995, Electron transfer proteins of cytochrome P450 systems. *Adv Mol Cell Biol* in press.

Hegelund, T., Celander, M.C., 2003, Hepatic versus extrahepatic expression of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 64 (3), 277–291.

Heilmann, L.J., Sheen, Y.Y., Bigelow, S.W., Nebert, D.W., 1988. Trout P450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. DNA 7 (6), 379–387.

Hendricks, J.D., J.H. Wales, R.O. Sinnhuber, J.E. Nixon. P.M. Loveland and R.A., 1980, Rainbow trout embryos: a sensitive model for cxpcrimental carcinogenesis. *Fed. Proc.* 39, 3222-3229.

Hong J.Y., Pan J.M., Gonzalez F.J., 1987, The induction of a specific form of cytochrome P450 (P-450j) by fasting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* Vol. 142(3), pp. 1077-1083.

Hoşafcıoğlu, S., 2007, Beyşehir Gölü Havzası'nda Noktasal ve Noktasal Olmayan Kirletici Kaynakların Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya,118s.

Hukkanen, J., 2001, Xenobıotıc-Metabolızıng Cytochrome P450 Enzymes In Human Lung. *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu,*20-22.

Humphrey, H.E.B 1987, The Human Population-An Ultimde Receptor for Aquatic Contaminants. Hydrobiol. 149s, 75-80.

Humphrey, E.B., 1988, Chem.Cont. in the GreatLakes; The Human Health Aspect. Adv. *Environ. Sci. Technol.* 21 (Tox. Comtom. Ecosyst. Health, Great Lakes Fokus). 153-65.

Ingelman-Sundberg M., Johansson I., Penttila K.E., 1988, Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.157 (1), pp.55-60.

Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Yin, H., Terelius, Y., Eliasson, E., Clot, P., Albano, E., 1993, Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 10: 447-52.

Ingelman-Sundberg, M., 2004, Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 25, 193−200.

İşcan, M., Togan, İ., Tabak, İ., Uğuz, C., Ergüven A., Eroğlu, Y., Zengin, M., 2001, Deniz ve akarsulardaki kirliliğin karadeniz'deki ekonomik değeri yüksek balıkların stok ve üremesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi projesi. *Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü ,Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü.*,5.

Kall M.A. and Clausen J., 1995, Dietary effect on mixed function P450 1A2 activity assayed by estimation of caffeine metabolism in man. *Hum. Exp.Toxicol*., Vol. 14, pp. 801-807.

Karakurt, S., 2008, Fenolik bileşik tannik asitin tavşan karaciğer ve böbreğinde faz II ve sitokrom P450 bağımlı enzimler üzerindeki etkileri.Yüksek lisans tezi. *Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,* 129s.

Kato R, Estabrook RW, Cayen MN., 1989, Xenobiotic Metabolism and Disposition. Taylor and Francis, London.

Kayhan, F.E, Muşlu, M.E., Koç,N.D., 2009, Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar *Journal of FisheriesSciences*. 3(2): 153-162.

Kreiss, K., 1985, Studies on Populations Exposed to Polychlorinated Biphenyls. Environ. Health. Perspect. 60, 193- 199.

Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G., Thummel, K.E., 2002, Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1271–1294.

Leblebici E., Seçmen Ö., 2008, Türkiye Sulak Alan Bitkileri ve Bitki Örtüsü (2. Baskı). *Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi* Yayın No:158, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.

Lee, R.F., Sauerheber, R. ve Dobbs, G.H., 1972, Uptake, metabolism and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. Mar.Biol.17:201.

Lee, S.J., Hedstrom, O.R., Fischer, K., Wang-Buhler, J.L., Sen, A., Cok, I., Buhler, D.R., 2001, Immunohistochemical localizationand differential expression of cytochrome P450 3A27 in the gastrointestinal tract of rainbow trout. Toxicol. Appl. Pharmacol. 177 (2), 94–102.

Lee, S.J., Buhler, D.R., 2003, Cloning, tissue distribution, and functional studies of a new cytochrome P450 3A subfamilymember, CYP3A45, from rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca. Arch. Biochem. Biophys. 412 (1), 77–89.

Lieber, C.S., 1997, Cytochrome P-4502E1: Its physiological and Pathological Role. *Biological Reviews* 77 (2): 517-544.

Lindros KO, Badger T, Ronis M, et al., 1995, Phenethyl isothiocyanate, a new dietary liver aldehyde dehydrogenase inhibitor. J Pharmacol Exp Ther, 275(1): 79-83.

Liska, D.J.1998. The detokxification enzyme systems. Aİtern. Med. Rey.,3(3): 18 198. LoaPachin, R.M. 2002. The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon Neurorotoxicology,23,253-257.

Lu A.Y.H, Coon M.J.,1968, Role of hemoprotein P450 in fatty acid whydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes, *J. Biol.Chem.,* Vol. 243, pp. 1331-1332.

Lu, A. Y. H., and Levin, W., 1974, The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochim. Biophys. Acta*. 344, 205-240.

Melancon, M.J., Elcombe, C.R., Vodicnik, M.J., Lech, J.J., 1981, Induction of cytochromes P450 and mixed-function oxidase activity by polychlorinated biphenyls and beta-naphthoflavone in carp (*Cyprinus carpio*). Comp. Biochem Physiol. C 69 (2), 219–226.

Mercan, D.E., 2006, Beyşehir Gölü'nün Hidrodinamik Modellemesi, Doktora tezi, *İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, 137s, İstanbul.

Mosadeghi, S., Furnes, B., Matsuo, A.Y., Schlenk, D., 2007, Expression and characterization of cytochrome P450 2X1 in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Biochim. Biophys. Acta 1770 (7), 1045–1052.

Mutlu, B., Erik, S., 1998, Kızıldag (Isparta) ve Çevresindeki Alanların Floristik Analizi., *XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi,* 7-10 Eylül 1998. Samsun.

Nash, T.,1953,The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal* 55, 416-421.

Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J., 1987, P-450 genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Ann. Rev. Biochem*. 56, 945-993.

Nebert, D.W., Russel, D.W., 2002, Clinical imporatance of cytochromes P450,*Lancet* 360: 1155-1162.

Nelson, D.R., 2003, Comparison of P450s from human and *fugu*:420 million years of vertebrate P450 evolution. Arch. Biochem. Biophys. 409 (1), 18–24.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.W., 1993, The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accesion numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51.

Nelson,D. R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC & Nebert DW 1996, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1- 42.

NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry 1991, Nomenclature of electrontransfer proteins. Recommendations. *Eur J Biochem*. 1989;200:599-611.

Nuyan, M., 2008, Karsinojen akrilamidin tavşan karaciğer,böbrek ve akciğerinde sitokromP450 ve faz II enzimleri ile *in vivo* etkileşimi, Yüksek lisans tezi, *Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* 157 s, Ankara.

Oğuzkurt, D., 2001, Beyşehir Gölü Limnolojisi, Doktora *Tezi Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* 206s. Ankara.

Oleksiak, M.F., Wu, S., Parker, C., Karchner, S.I., Stegeman, J.J., Zeldin, D.C., 2000, Identification, functional characterization, and regulation of a new cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ns. J. Biol. Chem. 275 (4), 2312–2321.

Oleksiak, M.F., Wu, S., Parker, C., Qu, W., Cox, R., Zeldin, D.C.,Stegeman, J.J., 2003, Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys*. 411 (2), 223–234.

Omura T., Sato R., 1964, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I.Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.,*Vol. 239, pp. 2370-2378.

Ortiz de Monteliano PR. (ed.). Cytochrome P450. Structure,Mechanism, and Biochemistry. New York: Plenum, 505-523.

Özerol, E., 1996, Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* .3(3):257-275.

Payne, J.F., L.L. Fancey, A.D. Rahimtula and E.L. Porter, 1987, Review and perspective on the use of mixed-function oxygeatase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. 86C, 233-245.

Sadar, M.D., Ash, R., Sundqvist, J., Olsson, P.E., Andersson, T.B., 1996, Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Biol. Chem*. 271 (30), 17635–17643.

Seyran, A., Erişir, M., "Poli Klorlu Bifeniller ve Sağlık Üzerine Etkileri" Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 22 (1), 33-40, 2008

Schlenk, D., Furnes, B., Zhou, X., Debusk, B.C., 2002, Cloning andsequencing of cytochrome P450 2X1 from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mar. Environ. Res. 54 (3-5), 391–394.

Stegeman, J. J., and Kloepper-Sams, P. J., 1987, Cytochrome P450 ispzymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Persp*. 71, 87-95.

Stegeman, J.J., 1989, Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. Xenobiotica 19 (10),1093–1110.

Sumner, S.C.J., Fennel, T.R., Moore, T.A., Chanas, B., Gonzales, F., Ghanayem, B.I., 1999, Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol* 12: 1116-1120.

Sen, A., Arinc, E. 2000, Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver *(Liza saliens)* microsomes.Comparative Biochemistry and Physiology C. *Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126C(3): 235-244.

Tekin Özan..,, 2005, Beysehir Gölü'nde Yasayan Sazan (*Cyprınus Carpıo* L.,1758) ve Kadife Balıgı (*Tınca Tınca* L., 1758)'ındaki parazitlerin ve ağır metallerin birikimlerinin araştırılması,Doktora tezi, 20-22)

Telefoncu, A.,Zihnioğlu, F., 1992, Göllerdeki kimyasal kirlilik ve insan sağlığına etkisi. Çevre Dergisi.

Thummel, KE., Wilkinson, GR., 1998, In vitro and in vivo drug interactions involving humanCYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 389-430.

Uno, Y., Uehara, S., Murayama, N., Yamazaki, H., 2011, CYP1D1, pseudogenized in human, is expressed and encodes a functional drug-metabolizing enzyme in cynomolgus monkey. *Biochem. Pharmacol*. 81 (3), 442–450.

Vermeulen N.P.E., 1996, Ioannides, C.,Role of metabolism in chemical toxicity, Cytcochromes P450. *Metabolic and Toxicological Aspects,* pp. 29-53.

Wang, H., Napoli, K.L., Strobel, H.W., 2000, Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones. *Mol Cell and Biochem* 213: 127-135.

White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A.,Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.P., Jones, G., Petkovich, M., 2000, Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97* (12), 6403–6408.

Winkelhake, J.L., Vodicnik, M.J., Taylor, J.L., 1983, Induction in rainbow trout of an acute phase (C-reactive) protein by chemicals of environmental concern. *Comp. Biochem. Physiol.* 74 (1), 55–58.

Winston, G.W., Shane, B.S., Henry, C.B., 1988, Hepatic monooxygenase induction and promutagen activation in channel catfish from a contaminated river basin. Ecotoxicol. Environ. Saf. 16 (3), 258–271.

Xie, H.G., Wood, A.J., Kim, R.B., Stein, C.M., Wilkinson, G.R., 2004, Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 5: 243–272.

Yamauchi, R., Ishibashi, H., Hirano, M., Mori, T., Kim, J.W.,Arizono, K., 2008, Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome *P450 3A gene expression in the livers of male medaka (Oryzias latipes). Aquat*. Toxicol. 90 (4), 261–268.

Yamazaki, H., Shimada T., 1997, Progesterone and testesterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 1C9, and 3A4 in human liver microsomes. Arch Biochem Biphys 346: 161-169.

Yan, J., Cai, Z., 2010, Molecular evolution and functional divergence of the cytochrome P450 3 (CYP3) Family in *Actinopterygii* (ray-finned fish). *PLoS One 5* (12), e14276.

Yang, C.S., Hong, J.Y., 1993, Molecular aspects of cytochrome P4502E1 and its roles in chemical toxicology. In *Molecular Aspects of Oxidative drug Metabolizing Enzymes*, ed. Arınc, E., Schenkman, J. B., Hodson, E., 181-192. NATO ASI Series.

Yang, Y.H., Wang, J.L., Miranda, C.L., Buhler, D.R., 1998, CYP2M1: cloning, sequencing, and expression of a new cytochrome P450 from rainbow trout liver with fatty acid (omega-6)-hydroxylation activity. *Arch. Biochem. Biophys*. 352 (2), 271–280.

Yang, Y.H., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Wang-Buhler, J.L., Buhler, D.R., 2000, Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BV CYP2K1) as lauric acid (omega-1)-hydroxylase and aflatoxin B1 exo-epoxidase. *Drug Metab. Dispos*. 28 (11), 1279–1283.

Zamani, A.G., Yıldırım, A., 2014, Biyomarker Olarak Sitokrom P450 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi;* 2014: 12(1):37-42.

Zima T., 1992, Ethanol metabolism and pathobiochemistry of organ damage, I. Metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase, cytochrome P450IIE1 and catalase Sb Lek 1993; 94(4): 281-7.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hatice Banu KESKİNKAYA
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Altındağ/ANKARA – 23.05.1990
Telefon : 0507.711.88.90
Faks : -
e-mail : banu_biondo01@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise :	Yahya Kemal Beyatlı Anadolu Lisesi	2008
Üniversite :	S.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Yüksek Lisans :	S.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D	-
Doktora :		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2010	Konsept Etüt Merkezi	Fen Bilgisi Öğretmeni
2011	Özdeha Etüt Merkezi	Fen Bilgisi Öğretmeni / Rehberlik

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER : İngilize (iyi)

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

1. Hatice Banu KESKİNKAYA, Cengiz AKKÖZ, Numan Emre Gümüş, Serdar KARAKURT, ‘‘Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Toksik ve Karsinojenik Organik Kirliliğin Bu Göllerde Yaşayan Sazan Balığı(*Cyprinus Carpio L.,1758)* Üzerine Etkilerinin Biyokimyasal Olarak İncelenmesi’’, II.Balıklandırma ve Rezervuar Sempozyumu, **Poster Sunum,** 20.05-22.05.2015, Isparta.(Yüksek lisans tezinden yapılmıştır.)