

ISSN 1015 - 3918



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

**JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY**

**Cilt / Vol : 32
Sayı / No : 1
Yıl / Year : 2003**



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

**JOURNAL OF FACULTY OF PHARMCY
OF
ANKARA UNIVERSITY**

**Cilt/Vol :32
Sayı/No :1
Yıl/Year: 2003**

Ankara • 2003

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ
(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

Sahibi: Prof. Dr. Seçkin ÖZDEN
Editör : Prof. Dr. Feyyaz ONUR

Danışma Kurulu:

Asuman KARAKAYA	(Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Peter J. HOUGHTON	(Kings College, Londra, İngiltere)
John S.DAVIES	(University of Wales, Swansea, İngiltere)
Diana ANDERSON	(University of Bradford, Bradford, İngiltere)
Peter Christian SCHMIDT	(Eberhard-Karls Universitaet, Tübingen, Almanya)
Henry R. BESCH	(Indiana University, Indianapolis, USA)
Muzaffer TUNCEL	(Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye)
Yusuf ÖZTÜRK	(Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye)
Ayşegül DEMİRHAN ERDEMİR	(Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye)
İhsan ÇALIŞ	(Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Toru OKUYAMA	(Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japonya)
Muhammad Iqbal CHOUDARY	(University of Karachi, Karachi, Pakistan)
Thomas J. SCHMIDT	(Universitaet Dusseldorf, Dusseldorf, Almanya)
Jack WOOLLEY	(Leicester University, Leicester, İngiltere)
Henk TIMMERMANN	(Vrije Universiteit, Amsterdam, Hollanda)
Sevil AŞICI	(Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye)
Meral TORUN	(Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Esin ŞENER	(Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Maksut COŞKUN	(Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Nurşin GÖNÜL	(Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye)
Nurten ALTANLAR	(Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye)

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi farmasötik bilimler alanındaki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildiriler için uluslararası bir yayın ortamıdır. Bu dergi yılda 4 sayı yayınlanır. Yayımlanan yazıların sorumluluğu yazar(lar)ına aittir. Dergiye gönderilen makalelerin daha önce tamamen veya kısmen başka bir yerde yayınlanmamış veya yayını için başka bir yere başvuruda bulunulmamış olması gereklidir. Makaleler derginin arka sayfalarında yer alan yazım kurallarına uymalıdır.

Bu dergi, Chemical Abstracts (CA), Excerpta Medica Database (EMBASE), Medicinal Aromatic Plants Abstracts (MAPA) ve Türk Tıp Dizini 'nde indekslenmektedir.

Web adresi: www.pharmacy.ankara.edu.tr/journal

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı,
06100 Tandoğan- Ankara, e-mail: onur@pharmacy.ankara.edu.tr
Tel: (0312) 212 68 05, Fax : (0312) 213 10 81

Editör Yardımcıları:

- Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY e-mail: gozcelik@pharmacy.ankara.edu.tr
- Doç. Dr. İlkey YILDIZ ÖREN e-mail: oren@pharmacy.ankara.edu.tr

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY
{J.Fac.Pharm. Ankara}

Published by : Prof. Dr. Seçkin ÖZDEN
Editör : Prof. Dr. Feyyaz ONUR

Editorial Board:

Asuman KARAKAYA	(Ankara University, Ankara, Turkey)
Peter J. HOUGHTON	(Kings College, Londra, U.K.)
John S.DAVIES	(University of Wales, Swansea, U.K.)
Diana ANDERSON	(University of Bradford, Bradford, U.K.)
Peter Christian SCHMIDT	(Eberhard-Karls Universitaet, Tübingen, Germany)
Henry R. BESCH	(Indiana University, Indianapolis, USA)
Muzaffer TUNCEL	(Anadolu University, Eskişehir, Turkey)
Yusuf ÖZTÜRK	(Anadolu University, Eskişehir, Turkey)
Ayşegül DEMİRHAN ERDEMİR	(Uludağ University, Bursa, Turkey)
İhsan ÇALIŞ	(Hacettepe University, Ankara, Turkey)
Toru OKUYAMA	(Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan)
Muhammad Iqbal CHOUDARY	(University of Karachi, Karachi, Pakistan)
Thomas J. SCHMIDT	(Universitaet Dusseldorf, Dusseldorf, Germany)
Jack WOOLLEY	(Leicester University, Leicester, U.K.)
Henk TIMMERMANN	(Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands)
Sevil AŞICI	(Ege University, İzmir, Turkey)
Meral TORUN	(Gazi University, Ankara, Turkey)
Esin ŞENER	(Ankara University, Ankara, Turkey)
Maksut COŞKUN	(Ankara University, Ankara, Turkey)
Nurşin GÖNÜL	(Ankara University, Ankara, Turkey)
Nurten ALTANLAR	(Ankara University, Ankara, Turkey)

Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University is an international medium for the publication of original research reports, reviews and short Communications on relevant developments in pharmaceutical sciences. This journal is published quarterly. All the articles appeared in this journal are published on the responsibility of the author(s). The manuscript submitted to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. The manuscripts should be prepared in accordance with the requirements specified at the end of the issue.

This journal is indexed in Chemical Abstracts (CA), Excerpta Medica Database (EMBASE), Medicinal Aromatic Plants Abstracts (MAPA) and Turkish Medical Index

Web address : www.pharmacy.ankara.edu.tr/journal

Editorial correspondence:

Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry,
06100 Tandoğan- Ankara, TURKEY, e-mail: onur@pharmacy.ankara.edu.tr
Tel: +90 312 212 68 05, Fax: + 90 312 213 10 81

Editorial assistants:

- Assoc. Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY e-mail: gozcelik@pharmacy.ankara.edu.tr
- Assoc. Prof. Dr. İlkay YILDIZ ÖREN e-mail: oren@pharmacy.ankara.edu.tr

İÇİNDEKİLER /CONTENTS

Sayfa

Orjinal Makaleler / Original Articles

- Benay CAN EKE • **Sıçan akciğeri ve böbreği mikrozomlarında ilaç metabolize eden enzimlerin aktiviteleri üzerine çalışmalar** * Studies on the activities of drug metabolizing enzymes in lung and kidney microsomes of rat. 1
- İkay ORHAN, Puntip WISESPONGPAND, Tahir ATICI, Bilge ŞENER- **Toxicity propensities of some marine and fresh-water algae as their chemical defense-** Kimyasal savunmaları olarak bazı deniz ve tatlı su alglerinin toksisite eğilimleri. 19
- Fatma TOSUN, Çiğdem AKYÜZ KIZILAY- **Anthraquinones and flavonoids from Rheum ribes-** Rheum rite'den antrakinon ve flavonoidler. 31

Derlemeler / Reviews

- Betül SEVER YILMAZ, Gülçin SALTAN ÇİTOĞLU - **Ballota (L) türlerinin kimyasal bileşikleri** Chemical constituents of *Ballota* (L) species. 37
- Belma KONUKLUGİL, Özlem BAHADIR - **Bitkisel kaynaklı anti - HIV bileşikler** - Plant originated anti - HIV bileşikler. 55

**SIÇAN AKCİĞERİ VE BÖBREĞİ MİKROZOMLARINDA İLAÇ
METABOLİZE EDEN ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

**STUDIES ON THE ACTIVITIES OF DRUG METABOLIZING ENZYMES IN
LUNG AND KIDNEY MICROSOMES OF RAT**

Benay CAN EKE

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,
06100 Tandoğan, Ankara

ÖZET

Bu çalışmada sıçan akciğer ve böbreği mikrozomal fraksiyonlarında sitokrom P450'ye bağımlı enzim sistemi üyelerinden 7-etoksiresorufin-O-etilaz (EROD), 7-pentoksiresorufin-O-etilaz (PROD), eritromisin-N-demetilaz (ERND), kumarin 7-hidroksilaz (Coh) ve p-nitrofenol hidroksilaz (PNP) enzim aktiviteleri için optimum pH, protein miktarı, substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi saptandı. Sıçan akciğer ve böbrek mikrozomlarında bu enzim aktiviteleri için farklı reaksiyon koşullarına gereksinim olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Sıçan, akciğer, böbrek, monooksijenaz, mikrozom

ABSTRACT

The optimum conditions (pH, protein amount, substrate concentration and incubation time) of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), 7-pentoxoresorufin-O-deethylase (PROD), erythromycin-N-demethylase (ERND), coumarin 7-hydroxylase (Coh) and p-nitrophenol (PNP) activities in the lung and kidney of rat were determined in microsomes. In this study, it was found out that, different reaction conditions are required for these enzyme activities in rat lung and kidney microsomes.

Key words: Rat, lung, kidney, monooxygenases, microsomes

GİRİŞ

Gelişen endüstrileşme ve kentleşme çevremizde havanın, suyun ve toprağın her geçen gün artan oranlarda kirlenmesine neden olmaktadır. Alınan önlemler bu kirlenmeyi bir ölçüde giderebilmekte ise de yeterli olmamaktadır. Dolayısıyla kirliliğe artan oranda maruz kalınmaktadır.

Son yıllarda bu çevre kirleticilerinin mikrozomal ilaç metabolizması enzimleri üzerinde in vivo ve in vitro etkileri farklı deney hayvanları ile çalışılmıştır(1-14). Bilindiği gibi karaciğer çevre kirleticilerinin hedef organlarından biridir. Son yıllarda çevre kirleticilerinin karaciğerde I. faz reaksiyonlardan oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen ve organizmaya giren birçok ksenobiyotiğin metabolizmasında önemli görev üstlenen sitokrom P450'ye bağımlı enzimler (diğer adları ile monooksijenazlar veya mikrozomal ilaç metabolize eden enzim sistemidir) tarafından metabolize edildiği gösterilmiştir. Gerek karaciğer ve gerekse karaciğer dışındaki pekçok dokuda bulunan sitokrom P450'ye bağımlı enzim sistemi, ilaç, pestisit, polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve organik çözücüler gibi birçok ksenobiyotiğin yanısıra steroid, yağ asitleri ve prostaglandinler gibi endojen maddelerin de metabolizmasında rol alırlar. Dolayısıyla bu enzim sistemi karsinojenik ve mutajenik etkili metabolitleri oluşumuna neden olabileceği gibi ilaçların etkinliğinde de belirleyici olmaktadır. Bu enzim sisteminin en önemli bileşeni olan sitokrom P450 nin çok sayıda izoenzimi olup her biri farklı gen tarafından kodlanıp sentezlenmektedir ve her P450 formu belirli kimyasal ve/veya kimyasallara seçicilik göstermektedir. Ayrıca akciğer ve böbreğinde ilaç ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzim sistemi üzerinde en az karaciğer kadar önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (15-18). Dolayısıyla bu çalışmada sıçan akciğer ve böbrek mikrozomlarında P450'ye bağımlı enzim aktivitelerinin araştırılması için optimum şartların saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Kimyasallar

Çalışmada kullanılan D-glukoz-6-monosodyum tuzu, D-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, nikotinamid dinükleotidin fosfat tuzu (NADP⁺), 7-etoksiresorufm, 7-pentoksiresorufin, resorufm, eritromisin, p-nitrofenol, kumarin (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri A.B.D.) firmasından satın alındı. Kristalize sığır albumini BDH (BDH Chemicals, Ltd., Poole, İngiltere) firmasından satın alındı. Kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik saflıktaydı.

Kullanılan hayvanlar

Bu çalışmalarda Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü serum çiftliğinden alınan erkek albino sıçanlar (200-250 g) kullanıldı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi hayvan evinde bakıma alınan hayvanlar Yem Sanayi Türk A.Ş. Ankara Yem Fabrikası tarafından imal edilen pelet sıçan yemi ile beslendiler. Deney hayvanları kullanılmadan önce

laboratuvar koşullarına bir hafta boyunca alıştırdı. Deney hayvanları dokuları çıkarılmadan önce son 24 saatte sadece su verilerek aç bırakıldılar.

Dokuların eldesi

Deney hayvanları, bayıldıktan sonra öldürüldüler. Akciğer ve böbrek dokuları zedelenmeden ayrıldı ve dokular saf soğuk su ile yıkanarak kanlarından olduğunca arındırıldı ve suları süzülerek emici bir kağıt üzerinde kurulandı. Ağırlıkları 0.1 grama kadar hassasiyetle ölçülerek kaydedildi.

Akciğer ve böbrek mikrozomal fraksiyonunun hazırlanması

Akciğer ve böbrek mikrozomları İşcan ve ark'larının (19) yöntemine göre hazırlandı.

Elde edilen mikrozomal fraksiyonunun bir kısmı protein tayini için kullanıldı. Geriye kalanlar enzim aktivitelerinin saptanması için -80 °C'de saklanarak kullanıldı.

Protein tayini

Hazırlanan mikrozomların protein miktarları Lowry ve ark'larının (20) yöntemine göre tayin edildi. Standart olarak kristalize sığır serumu albumini kullanıldı.

7-etoksiresorufin-O-deetilaz ve 7-pentoksiresorufin-O-deetilaz enzim aktivitelerinin tayini

7-etoksiresorufin-O-deetilaz ve 7-pentoksiresorufin-O-deetilaz enzimleri sırasıyla 7-etoksiresorufinin ve 7-pentoksiresorufinin resorufine dönüşümünü sağlayan enzimlerdir. Oluşan resorufin miktarı Burke ve ark'larının (21) tarif ettikleri spektrofotometrik yöntemle göre tayin edildi.

Maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar belirlendikten sonraki reaksiyon ortamı:

Akciğer ve böbrek dokusu

1.0 ml' lik reaksiyon ortamında, substrat olarak 10⁻⁶M 7-etoksiresorufin ve 2.5 uM pentoksiresorufin, 1.2 mg albumin, 0.75 mg mikrozomal protein, 45 mM 7.8 Tris HCl tamponu ve kofaktör* kullanıldı.

Standart

EROD ve PROD enzim aktivitelerinin ölçümünde standart olarak resorufin kullanıldı. Her deneyde 0.5 mM resorufin çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (31.25, 62.50, 125, 250 nmol) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen fluoresans değerleri farklı resorufin miktarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı. Resorufin standart eğrisi çalışılan bu koşullarda doğrusal bulundu.

İşlem

EROD ve PROD enzim aktivitelerinin ölçümünde yukarıda "reaksiyon ortamı" kısmında tarif edilen kofaktör hariç diğer inkübasyon maddelerini içeren tüplere kondu. Reaksiyon kofaktör ilavesiyle başlatılarak sallamalı su banyosunda 37 °C'de devam edildi. Reaksiyon 3 ml metanol ilavesiyle durduruldu ve tüpler buz banyosuna alındı.

Denatüre olmuş protein 10.000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözeltiden 3 ml alındı. Oluşan reaksiyonun sonucu Shimadzu marka spektrofloreometrede okundu (Ex.:538 nm ; Emiss.:587 nm).

Eritromisin-N-demetilaz enzim aktivitesinin tayini

Eritromisin-N-demetilaz enzimi aktivitesinin ölçümü formaldehit oluşumuna dayanır.Oluşan formaldehit miktarı Nash (22) ve Cochin ve Axelrod'un (23) tarif ettikleri spektrofotometrik yöntemle göre tayin edildi.

Maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar belirlendikten sonraki reaksiyon ortamı:

Akciğer ve böbrek dokusu

1.0 ml' lik reaksiyon ortamında, substrat olarak eritromisin(1.0 mM akciğer, 0.5 mM böbrek), 1 mg mikrozomal protein, 50 mM pH:7.4 potasyum fosfat tamponu ve kofaktör* kullanıldı.

Standart

Standart olarak formaldehit çözeltisi kullanıldı. Her deneyde 0.5 mM formaldehit çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (12.5, 25.0, 50.0, 75.0 nmol) inkübasyon ortamına ilave edildi. Elde edilen absorbans değerleri farklı formaldehit miktarlarına karşı standart çiziminde kullanıldı. Formaldehit standart eğrisi çalışılan bu koşullarda doğrusal bulundu.

İşlem

İnkübasyon ortamında tarif edilen kofaktör hariç diğer inkübasyon maddelerini içeren tüpler, 37 °C de bulunan su banyosuna konuldu. Reaksiyon kofaktör ilavesiyle başlatılarak reaksiyona tüplerin ağzı açık olarak sallamalı su banyosunda 37 °C'de devam edildi. Reaksiyon 1.0 ml 0.75 N perklorik asit ilavesiyle durduruldu ve tüpler buz banyosuna alındı.

Denatüre olmuş protein 10.000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözültiden 1 ml alındı. Üzerine 0.75 ml Nash reaktifi ilave edilerek 37 °C'de 30 dakika bekletilerek oluşan sarı rengin şiddeti 412 nm'de spektrofotometrede okundu.

Kumarin 7-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayini

Kumarin 7-hidroksilaz enzimi kumarinin 7-hidroksikumarine dönüşümünü sağlayan enzimdir. Oluşan 7-hidroksikumarin miktarı Aito'nun(24) tarif ettiği spektrofotometrik yöntemle göre tayin edildi.

Maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar belirlendikten sonraki reaksiyon ortamı:

Akciğer ve böbrek dokusu

0.5 ml' lik reaksiyon ortamında, substrat olarak 0.1 mM kumarin, mikrozomal protein(0.5 mg akciğer, 0.4 mg böbrek), 70 mM pH:7.6 potasyum fosfat tamponu ve kofaktör* kullanıldı.

Standart

Coh enzim aktivitesinin ölçümünde standart olarak 7-hidroksikumarin kullanıldı. Her deneyde 1mM 7-hidroksikumarin çözültisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (40, 80, 160, 320 nmol) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen fluoresans değerleri farklı 7-hidroksikumarin miktarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı. 7-hidroksikumarin standart eğrisi çalışılan bu koşullarda doğrusal bulundu.

İşlem

Coh enzim aktivitesinin ölçümünde yukarıda "reaksiyon ortamı" kısmında tarif edilen Kumarin hariç diğer inkübasyon maddelerini içeren tüplere kondu ve 2' preinkübasyona tabi tutuldu. Reaksiyona, kumarin ilavesiyle başlatılarak sallamalı su banyosunda 37 °C'de devam edildi. Reaksiyon 0.5 ml %6 TCA ilavesiyle durduruldu ve tüpler buz banyosuna alındı.

Denatüre olmuş protein 10.000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözültiden 0.5 ml alındı. Tüplere hemen okumadan önce 1.6 M pH:10.4 glisin tamponu ilave edildi. Oluşan reaksiyonun sonucu Shimadzu marka spektrofotometrede okundu (Ex.:365 nm; Emiss.454 nm).

p-nitrofenol enzim aktivitesinin tayini

p-nitrofenol hidroksilaz enzimi p-nitrofenolun p-nitrokateşole dönüşümünü sağlayan enzimdir.Oluşan p-nitrokateşol miktarı Reinke ve Moyer'in (25) tarif ettiği spektrofotometrik yöntemle göre tayin edildi.

Maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar belirlendikten sonraki reaksiyon ortamı:

Akciğer ve böbrek dokusu

1.0 ml' lik reaksiyon ortamında, substrat olarak p-nitrofenol (0.25 mM akciğer, 0.5 mM böbrek) , mikrozomal protein(1mg akciğer ve 1.5 mg böbrek), 200 mM pH: 7.4 Tris HCl tamponu ve kofaktör* kullanıldı.

İşlem

PNP enzim aktivitesinin ölçümünde yukarıda "reaksiyon ortamı" kısmında tarif edilen kofaktör hariç diğer inkübasyon maddelerini içeren tüplere kondu ve reaksiyon kofaktör ilavesiyle başlatılarak sallamalı su banyosunda 37 °C'de devam edildi. Reaksiyon 0.5 ml 0.6 N perklorik ilavesiyle durduruldu ve tüpler buz banyosuna alındı.

Denatüre olmuş protein 10.000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözültiden 1.0 ml alındı. Tüplere okumadan önce 0.1 ml 10 N NaOH ilave edilerek Shimadzu marka spektrofotometrede 546 nm'de okundu.

**Kofaktör olarak 2.5mM glukoz-6-fosfat, 0.25mM NADP⁺, 0.5 mM glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 2.5 mM MgCl₂, 28.8 mM pH: 7.8 potasyum tamponu kullanıldı. Kofaktör kullanılacağı gün hazırlandı.*

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçan akciğer ve böbrek dokuları üzerine EROD, PROD, ERND, Coh ve PNP enzimlerinin maksimum aktiviteleri için optimum koşullar mikrozomal fraksiyon kullanılarak araştırıldı. Enzim aktivitelerine pH'nın, protein miktarının, substrat konsantrasyonunun ve inkübasyon süresinin etkileri incelendi.

7-etoksiresorufin-O-etilaz enziminin maksimum aktivitesi için gerekli koşulların saptanması

Akciğer ve böbrekte pH'nın EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 37 °C'de pH değerleri 7.4 ile 8.0 arasında değişen 0.1 M Tris HCl tamponu kullanılarak incelendi. Akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyonu kullanılarak maksimum enzim aktivitesi için optimum pH 7.8 olarak bulundu (Tablo

Tablo 1. pH'nın EROD ve PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi **

PH	EROD (pmol/mg protein/dk)		PROD (pmol/mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek	Akciğer	Böbrek
7.4	3.2910.27	49.5613.35	61.0015.34	0.7710.05
7.6	6.8710.52	52.2014.56	64.5815.56	0.8010.05
7.8	9.1310.83	53.4013.95	81.2616.97	0.9910.08
8.0	9.0910.83	48.9015.01	80.5017.39	0.9410.07

Akciğer ve böbrekte protein miktarının EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine mikrozomal kullanılarak protein miktarının etkisi 1ml'lik reaksiyon ortamında 0.5-1.0 mg arasında protein olan ortamda incelendi. EROD enzim aktivitesinin akciğer ve böbrekte reaksiyon hızının 0.75 mg protein miktarında doygunluğa ulaştığı gözlemlendi. Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında her iki dokuda da 0.75 mg protein kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Protein miktarının EROD ve PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Protein(mg)	EROD (pmol/dk)		PROD (pmol/dk)	
	Akciğer	Böbrek	Akciğer	Böbrek
0.5	4.68±0.37	29.5311.96	39.3112.25	0.52910.03
0.75	6.8510.52	37.0512.30	60.9415.21	0.74610.05
1.0	5.4410.47	47.4113.51	-	-
1.5	-	-	64.1315.72	0.64610.04

Akciğer ve böbrekte substrat konsantrasyonunun EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

7-etoksiresorufin konsantrasyonunun akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyonu EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Akciğerde EROD enziminin denenen 0.5-2 uM konsantrasyonlarında 1uM'a kadar doğrusal olarak arttığı, böbrekte ise 1uM' da doygunluğa ulaştığı gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum substrat konsantrasyonu akciğer ve böbrek dokusunda 1 uM olarak alındı (Tablo 3).

Tablo 3. Substrat konsantrasyonunun EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Substrat konsantrasyonu	(uM)	EROD (pmol/mg protein/dk)	
		Akciğer	Böbrek
0.5		4.16+0.34	34.5112.96
1.0		9.13+0.72	49.4013.21
2.0		8.12+0.76	51.1013.98

Tablo 4. Substrat konsantrasyonunun PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Substrat konsantrasyonu (uM)	PROD (pmol/mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
2.50	81.2616.74	0.9910.08
5.00	130.90110.23	0.9710.06
6.00	131.5019.34	0.95±0.06

Akciğer ve böbrekte inkübasyon süresinin EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Akciğer mikrozomal EROD enzim aktivitesi ile inkübasyon süresinin 10 dk'ya böbrekte ise 15 dk'ya kadar doğru orantılı arttığı gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum süre akciğer için 5 dk ve böbrek için 10 dk olarak alındı. (Tablo 5).

7-pentoksiresorufin-O-etüaz enziminin maksimum aktivitesi için gerekli koşulların saptanması:

Akciğer ve böbrekte pH'nın PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 37 °C'de pH değerleri 7.4 ile 8.0 arasında değişen 0.1 M Tris HCl tamponu kullanılarak incelendi. Akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyon kullanılarak maksimum enzim aktivitesi her iki doku içinde optimum pH 7.8 olarak bulundu (Tablo 1).

Tablo 5.1 inkübasyon zamanının EROD ve PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Süre (dk)	EROD (pmol/mg protein)		PROD (pmol/mg protein)	
	Akciğer	Böbrek	Akciğer	Böbrek
2.5	17.56±1.56	-	-	-
5.0	45.6313.97	288.74119.20	477.79132.24	4.8510.36
10	56.5114.21	494.00137.16	812.61171.27	9.9610.06
15	-	674.50159.12	1169.89198.26	15.0611.24

Akciğer ve böbrekte protein miktarının PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine mikrozomal kullanılarak protein miktarının etkisi İmPlik reaksiyon ortamında 0.5-1.5 mg arasında protein olan ortamda incelendi. PROD enzim aktivitesinin reaksiyon hızının 0.75 mg protein miktarında doygunluğa ulaştığı gözlemlendi. Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında her iki dokuda da 0.75 mg protein kullanıldı (Tablo 2).

Akciğer ve böbrekte substrat konsantrasyonunun PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

7-pentoksiresorufin konsantrasyonunun akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyonu PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Akciğerde PROD enziminin denenen 1.25-6.0 uM konsantrasyonlarında 5.0 uM'a kadar arttığı daha sonra değişmediği, böbrekte ise PROD enziminin denenen 1.25-6.0 uM konsantrasyonlarında değişmediği gözlemlendi. Bu nedenle her iki dokuda da aktivite ölçümleri için optimum substrat konsantrasyonu 2.5 uM olarak alınmıştır (Tablo 4).

Akciğer ve böbrekte inkübasyon süresinin PROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Akciğer ve böbrekte mikrozomal fraksiyonu PROD enzim aktivitesi ile inkübasyon süresinin 15 dk'ya kadar doğrusal olarak arttığı gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum inkübasyon süresi her iki dokuda da 10 dakika olarak alındı (Tablo 5).

Eritromisin N- demetilaz enziminin maksimum aktivitesi için gerekli koşulların saptanması:

Akciğer ve böbrekte pH'nın ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 37 °C'de pH değerleri 7.2 ile 7.6 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyon kullanılarak maksimum enzim aktivitesi için optimum pH 7.4 olarak bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. pH' nın ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi **

pH	ERND (nmol/mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
7.2	4.21±0.35	1.35±0.25
7.4	4.64±0.41	1.41±0.07
7.6	4.50±0.32	1.40±0.06

Akciğer ve böbrekte protein miktarının ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine mikrozomal fraksiyon kullanılarak protein miktarının etkisi 1ml'lik reaksiyon ortamında 0.5-1.5 mg arasında protein olan ortamda incelendi. ERND enzim aktivitesinin reaksiyon hızının akciğerde 0.5-1.5 mg protein miktarı arasında, böbrekte ise 0.5-1.0 mg protein miktarı arasında doğru orantılı olarak arttığı saptandı. Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında akciğer ve böbrekte 1.0 mg protein kullanıldı (Tablo 7).

Tablo 7. Protein miktarının ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Protein (mg)	ERND (nmol/ dk)	
	Akciğer	Böbrek
0.5	0.1±10.01	0.85±0.06
1.0	0.31±0.02	1.41±0.07
1.5	0.56±0.02	1.60±0.07

Akciğer ve böbrekte substrat konsantrasyonunun ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi

Eritromisin konsantrasyonunun akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyonu ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. ERND enziminin akciğerde denenen 0.25-1.50 mM ve böbrekte denenen 0.25-1.00 mM konsantrasyonlarında değişmediği gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum substrat konsantrasyonu akciğer için 1.0 mM, böbrek için 0.5 mM olarak alınmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Substrat konsantrasyonunun ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Substrat konsantrasyonu (mM)	ERND (nmol/ mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
0.25	0.28±0.01	1.33±0.01
0.50	0.31±0.03	1.41±0.01
1.00	0.41±0.03	1.43±0.02
1.50	0.40±0.02	-

Akciğer ve böbrekte inkübasyon süresinin ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi

Akciğer ve böbrek mikrozomal fraksiyonu ERND enzim aktivitesi ile inkübasyon süresinin sırasıyla 25 ve 15 dakikaya kadar doğrusal arttığı gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için akciğerde 20 dk, böbrekte ise 15 dk optimum inkübasyon süresi olarak alındı (Tablo 9).

Tablo 9. İnkübasyon zamanının ERND enzim aktivitesi üzerine etkisi**

Süre (dk)	ERND (nmol/ ms protein)	
	Akciğer	Böbrek
10	2.53±0.19	14.34±1.27
15	4.64±0.24	21.10±1.78
25	8.43±0.67	23.21±1.65

Kumarın 7-hidroksilaz enziminin maksimum aktivitesi için gerekli koşulların saptanması:

Akciğer ve böbrekte pH'nın Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 37 °C'de pH değerleri 7.2 ile 7.6 arasında değişen 0.1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak incelendi. Akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyon kullanılarak maksimum enzim aktivitesi için optimum pH sırasıyla 7.6 ve 7.4 olarak bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. pH' nın Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi **

pH	Coh (nmol/mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
7.2	2.56±0.17	0.0210.00
7.4	3.06±0.20	4.06±0.35
7.6	3.80±0.15	7.47±0.43
7.8		7.30±0.41

Akciğer ve böbrekte protein miktarının Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine mikrozomal kullanılarak protein miktarının etkisi 0.5ml'lik reaksiyon ortamında akciğerde 0.25-0.75 mg, böbrekte 0.2-0.75 mg arasında protein olan ortamda incelendi. Coh enzim aktivitesinin reaksiyon hızının akciğerde 0.5 mg, böbrekte 0.4 mg protein miktarına kadar doğru orantılı olarak arttığı saptandı. Daha sonra doyumluğa ulaştığı gözlemlendi. Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında akciğerde ve böbrekte sırasıyla 0.5 mg ve 0.4 mg protein kullanıldı (Tablo 11).

Tablo 11. Protein miktarının Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Coh (nmol/dk)			
Protein (mg)	Akciğer	Protein (mg)	Böbrek
0.25	0.87±0.02	0.2	1.10±0.01
0.5	1.53±0.02	0.4	2.56±0.02
0.75	0.531±0.01	0.6	0.39±0.01

Akciğer ve böbrekte substrat konsantrasyonunun Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kumarin konsantrasyonunun akciğer dokusu mikrozomal fraksiyonu Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Coh enziminin denenen 0.05-0.2 mM konsantrasyonlarında akciğerde 0.1 mM'a kadar değişmediği daha sonra doyumluğa ulaştığı böbrekte 0.1 mM'da doyumluğa ulaştığı gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum substrat konsantrasyonu her iki dokuda da 0.1 mM olarak alındı (Tablo 12).

Akciğer ve böbrekte inkübasyon süresinin Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi

Akciğer ve böbrek mikrozomal Coh enzim aktivitesi ile inkübasyon süresi arasındaki ilişki incelendiğinde aktivite ölçümleri için optimum süre sırasıyla 5 ve 10 dk olarak alındı. (Tablo 13).

Tablo 12. Substrat konsantrasyonunun Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Substrat konsantrasyonu (mM)	Coh (nmol/ mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
0.05	2.50±0.01	1.03±0.01
0.10	3.06±0.02	4.06±0.0
0.20	2.39±0.01	3.50±0.02

Tablo 13. Inkübasyon zamanının Coh enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Süre (dk)	Coh (nmol/ mg protein)	
	Akciğer	Böbrek
2.5	16.45±1.30	-
5	28.94±1.76	17.76±0.98
10	30.63±1.56	40.59±2.01
15	29.74±1.80	84.00±3.56

p-nitrofenol enziminin maksimum aktivitesi için gerekli koşulların saptanması:

Akciğer ve böbrekte pH'nın PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 37 °C'de pH değerleri 7.2 ile 7.6 arasında değişen 0.4 M Tris HCl tamponu kullanılarak incelendi. Akciğer ve böbrek dokusu mikrozomal fraksiyon kullanılarak maksimum enzim aktivitesi için optimum pH akciğer ve böbrek için 7.4 olarak bulundu (Tablo 14).

Tablo 14. pH' nın PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi **

pH	PNP (nmol/mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
7.2	0.04±0.01	0.03±0.01
7.4	0.10±0.01	0.06±0.02
7.6	0.03±0.01	0.03±0.01

Akciğer ve böbrekte protein miktarının PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine mikrozomal protein kullanılarak protein miktarının etkisi 1ml'lik reaksiyon ortamında akciğerde 0.5-1.5 mg ve böbrekte 0.5-2.0 mg arasında protein olan ortamda incelendi. PNP enzim aktivitesinin reaksiyon hızının akciğerde 0.5-1.0 mg ve böbrekte 0.5-1.5 mg protein miktarı arasında doğru orantılı olarak arttığı saptandı. Daha sonra aktivitenin düştüğü gözlemlendi. Aktivite ölçümlerinde reaksiyon ortamında akciğer ve böbrekte sırasıyla 1.0 ve 1.5 mg protein kullanıldı (Tablo 15).

Tablo 15. Protein miktarının PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Protein (mg)	PNP (nmol/dk)		
	Akciğer	Protein (mg)	Böbrek
0.5	0.09±0.01	0.5	0.00+0.00
1.0	0.20±0.01	1.0	0.04±0.01
1.5	0.17±0.02	1.5	0.09+0.02
		2.0	0.06+0.01

Akciğer ve böbrekte substrat konsantrasyonunun PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi

p-nitrofenol konsantrasyonunun akciğer dokusu mikrozomal fraksiyonu PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. PNP enziminin akciğerde 0.125-0.5mM ve böbrekte 0.25-1.0 mM konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri için optimum substrat konsantrasyonu akciğer ve böbrekte sırasıyla 0.25 mM ve 0.5 mM olarak alındı (Tablo 16).

Tablo 16. Substrat konsantrasyonunun PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Substrat konsantrasyonu (mM)	PNP (nmol/ mg/dk)	
	Akciğer	Böbrek
0.125	0.02±0.00	-
0.250	0.10±0.01	0.06±0.01
0.500	0.07±0.02	0.33±0.01
1.000		0.34±0.01

Akciğer ve böbrekte inkübasyon süresinin PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi

Akciğer mikrozomal fraksiyonu PNP enzim aktivitesi ile inkübasyon süresinin inkübasyon zamanına bağlı olarak 10 dakikaya kadar doğrusal olarak arttığı; böbrekte ise 5 dk dan sonra değişmediği gözlemlendi. Aktivite ölçümleri için optimum inkübasyon süresi akciğer ve böbrekte sırasıyla 10 ve 5 dakika olarak alındı(Tablo 17).

Tablo 17. İnkübasyon zamanının PNP enzim aktivitesi üzerine etkisi **

Süre (dk)	PNP (nmol/ mg protein/dk)	
	Akciğer	Böbrek
5	0.50±0.03	0.53±0.02
10	1.00±0.01	0.60±0.02
15	1.10±0.01	0.33±0.01

**Her değer 2 ayrı deney sonucunun ortalamasını (+SS) göstermektedir.
Her deney kendi içinde çift olarak yapılmıştır.

Sonuç olarak, bu araştırmada sıçan akciğer ve böbrek mikrozomlarında sitokrom P450'ye bağımlı enzim sistemi üyelerinden 7-etoksiresorufin-O-etilaz (EROD), 7-pentoksiresorufin-O-etilaz (PROD), eritromisin-N-demetilaz (ERND), kumarin 7-hidroksilaz (Coh) ve p-nitrofenol hidroksilaz(PNP) aktivitelerinin ölçümünde farklı reaksiyon koşullarının sağlanması gerektiği saptanmıştır. pH, protein, substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gözönüne alınarak yapılan bu optimizasyon çalışmasında akciğer ve böbreğin bu parametrelere verdikleri farklı yanıtlar, bu iki dokuda enzim miktarlarının farklılığı ile açıklanabilir. Bu saptamalara dayanılarak yapılacak daha sonraki çalışmalarda sitokrom P-450 enzim sisteminin farklı izozimleri ile aktive olan ilaç, pestisit, polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve organik çözücüler gibi birçok ksenobiyotığın yanısıra steroid, yağ asitleri ve prostaglandinler gibi endojen maddelerin farklı dokularda ne boyutta etkili olduklarının irdelenmesi mümkün olacaktır.

(TÜBİTAK Proje No: SBAG 1515)

KAYNAKLAR

1. **Arms, E., İşcan, M.Y.** "Comparative studies of sheep liver and lung microsomal anilin 4-hydroxylase" . *Comp. Biochem. Physiol*, **74C**, 151-158 (1983).
2. **Hadley, W. M., Miya, T. S., Bousquet, W. F.** "Cadmium inhibition of hepatic drug metabolism in the rat" *Toxic. Appl. Pharmac*, **28**, 284-291 (1974).
3. **İşcan, M.** "Comparison of in vitro effects of cadmium and nickel on components of the liver microsomal drug metabolizing enzyme system of guinea-pig" *Comp. Biochem. Physiol*, **81C**, 155-158 (1985).
4. **Iscan, M.** "Comparative study of cadmium and nickel on liver microsomal drug metabolizing enzymas of guinea -pig" *Comp. Biochem. Physiol*, **79C**,429-433 (1985).
5. **İşcan, M., Karakaya, A.** "Cadmium sensitivity differences between liver microsomal drug metabolizing enzyme systems of guinea-pig and rat" *Comp. Biochem. Physiol*, **90C**, 101-105 (1988).
6. **İşcan, M., Karakaya, A.** "Comparison of in vivo effect of cadmium on guinea-pig and rat liver microsomal mixed function oxidases" *Turk. J. Biochem.*, **11**, 65 (1986).
7. **Maines, M. D., Kappas, A.** "Studies on the mechanism of induction of hemeoxygenase by cobalt and other metal ions" *Biochem. J.*, **154**, 125-131 (1976).
8. **Maines, M.D., Kappas, A.** "Nickel mediated alterations in the activity of the hepatic and renal enzymes of heme metabolism and heme dependent cellular activities" *In: S.S. Brown (Ed.), Clinical chemistry and Chemical Toxicology of Metals*, Elsevier, NewYork, pp. 75-81 (1977).
9. **Means, J. R., Carlson, G. P., Schnell, R. C.** "Studies on the mechanism of cadmium induced inhibition of the hepatic microsomal monooxygenase of the male rat" *Toxic. Appl. Pharmac*, **48**, 293-304 (1979).
10. **Schnell, R. C.** "Cadmium induced alteration of drug action" *Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol*, **37**, 28-34 (1978).
11. **Stebbins, R. C, Schnell, R. C.** "Effect of cadmium on phenobarbital and polycyclic hydrocarbon induced alteration in hepatic microsomal monooxygenase activity" *Toxic. Appl. Pharmac*, **56**, 274-285 (1980).

12. **Teane, F. W., Jasonsky, P., Renaud, L., Read, P. R.** " Acute effect of cadmium on hepatic on hepatic drug metabolizing enzymes in the rat" *Toxic. Appl. Pharmac*, 41, 57-65, (1977).
13. **Tsang, S., Furst, A.** "In vitro inhibition of aryl hydrocarbon hydroxylase by heavy metals" *Oncology*, 33, 201-204 (1976).
14. **Yoshida, T., Ito, Y., Suzuki, Y., Uchiyama, M.** "Inhibition of hepatic drug metabolizing enzyme by cadmium in mice" *Bull. Environ. Contain. Toxicol.*, 15, 402-405 (1976).
15. **Baron, J.** "Localization, distribution and induction of xenobiotic metabolizing enzymes and arylhydrocarbon hdyroxylase activity within lung" *Pharmac. Ther.*, 47, 419-445, (1990).
16. **Roth, R. A., Vinegar, A.** "Activation by the lungs on circulating xenobiotics agents with a case study of physiologically based pharmacokinetic modeling of benzo(a)pyrene disposition" *Pharmac. Ther.*, 48, 143-155 (1990).
17. **Karakaya, A. İşcan, M.,** "Effect of cadmium on pulmonary and renal microsomal drug metabolizing enzyme systems of guinea-pig " *Comp. Biochem. Physiol*, **90C**, 241-244 (1988).
18. **Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, Ando, M.,** "Changes in cytochrome P-450 enzymes by 1,1 dichloroethylene in rat liver and kidney" *Arch. Toxicol.*, 72,9-16, (1997).
19. **İşcan, M., Arınç, E. Vural, N., and İşcan, M.Y.** In vivo effects of 3-methylcholantrene, phenobarbital, pyrethrum and 2,4,5-T isooctylester on liver, lung and kidney microsomal mixed function oxidase system of guinea pig: a comparative study "*Comp. Biochem. Physiol*, **77C**, 177-190 (1984).
20. **Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr,A.L., Randall,R.F.** "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *J.Biol. Chem.*, 193,265-27'5 (1951).
21. **Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe C.R., Halpert, J., Haaparantha, T., Mayer, R.T.** "Ethoxy-, pentoxy- and benzolyphenoxazones and homologues: e series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450" *Biochem . Pharmacol*, 34, 3337-3345 (1985).

22. **Nash, T.** "The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction" *Biochem.*, 5, 55, 416-42 (1953).
23. **Cochin, J., Axelrod J.** "Biochemical and pharmacological changes in the rat following administrations of morphine, nalorphine and normorphine. *J.Pharmac. exp. Ther.*,125,105-110(1959).
24. **Aitio, A.** "Characteristic of a microsomal P-448 mediated reaction ethoxyresorufin O-deethylation. A simple and sensitive assay of 7-hydroxycoumarin deethylation" *Anal.Biochem.*, 85,488-491 (1978).
25. **Reinke, L.A., Moyer, M.J.** "p-nitrophenol hdyroxylation, A microsomal oxidation which highly inducible by ethanol" *Drug Met. Disp.*, **13(5)**, 548-552 (1985).

Başvuru Tarihi: 09.07.2002

Kabul Tarihi: 25.11.2002