

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİARİLMETAN BOYALARIN REDOKS SİSTEMİ ENZİMLERİ
İLE ETKİLEŞİMLERİ

Uzm. Ecz. Eda TOPALOĞLU

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2005

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİARİLMETAN BOYALARIN REDOKS SİSTEMİ ENZİMLERİ İLE
ETKİLEŞİMLERİ

Uzm. Ecz. Eda TOPALOĞLU

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Gülberk UÇAR

ANKARA

2005

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. Gülberk Uçar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevecen kişiliği ve ilgisiyle her zaman hatırlayacağım.

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bize aktaran, tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen bölüm başkanımız Prof. Dr. İnci Özer'e ve Prof. Dr. Hamdi Ögüş'e teşekkür ederim.

Tüm öğrenimim boyunca desteğini benden esirgemeyen Prof. Dr. Nilgün Sümer'e teşekkür ederim. Çok sevgili arkadaşım Özden Tacal'a iyi ve kötü günümde yanımda olduğu, Samiye Yabanoğlu'na kısa sürede çok şeyler paylaşarak bana destek verdiği için teşekkür ederim. Bölüm hocalarım ve arkadaşlarıma güzel günlerimiz için teşekkür ederim.

Canım annem aramızda olmasa da her zaman içimde. Babam, kardeşlerim ve sevdiklerim, biricik eşim Serdar'a sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Topaloğlu (Baltacıoğlu), E., Triarilmetan boyaların redoks sistemi enzimleri ile etkileşimi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2005.

Bu çalışmada, triarilmetan (TAM⁺) boyaların katalaz ve glutatyon S-transferaz (GST) ile etkileşimleri incelendi. Malakit yeşili (MG) ve kristal viyole (CV)'nin insan eritrosit kaynaklı katalazı nonkompetitif ve tersinir olarak sırasıyla 18.68 ± 0.28 ve 60.67 ± 1.02 μM K_i değerleriyle inhibe ettikleri gözlemlendi. MG ve CV'nin enzimin aktif merkezi dışındaki olası bağımsız bağlanma bölgeleriyle etkileşerek katalazı inhibe edebilecekleri öne sürüldü. Lökomalakit yeşili (LMG)'nin eritrosit kaynaklı katalazı tersinir olarak ve doğrusal karışık tipte 135.24 ± 15.10 μM K_i değeriyle inhibe etmesi, inhibisyon sisteminin kısmi kompetitif ve saf nonkompetitif inhibisyon tiplerinin bir karışımı olabileceğini gösterdi. MG, sığır karaciğer kaynaklı katalazı 27.17 ± 2.88 μM K_i değeriyle tersinir ve saf nonkompetitif olarak inhibe etti. LMG ve CV'nin enzimi inhibe ettiği saptandı, ancak kinetik veriler bu boyaların enzimin en az iki bağlama bölgesiyle etkileştikleri fikrini verdiği için gözlenen K_i değerleri hesaplanamadı. Boyaların at karaciğer kaynaklı GST ile ilişkisi değişken GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substrat derişimlerinde incelendi. MG ve LMG'nin karaciğer kaynaklı GST'yi nonkompetitif olarak inhibe ettiği gözlenirken, CDNB varlığında MG ve LMG ile inhibisyona ait K_i değerleri sırasıyla 23.07 ± 7.26 ve 30.72 ± 2.60 μM olarak hesaplandı. GSH varlığında, MG ve LMG'nin karaciğer kaynaklı GST'yi sırasıyla 210.00 ± 15.23 ve 59.56 ± 3.70 K_i değerleriyle doğrusal karışık tipte inhibe ettiği görüldü. Bu inhibitörlerin enzim üzerinde substrat bağlama bölgelerinden farklı üçüncü bir bağlama bölgesine bağlanarak üç boyutlu yapı değişimine ve enzim inaktivasyonuna yol açtığı fikrine varıldı. CV'nin karaciğer kaynaklı GST'yi inhibe etmediği saptandı. Bu sonuçlar MG, LMG ve CV'nin katalaz ve GST'nin etkin inhibitörleri olduğunu ve insanlarda serbest radikal üretimine, lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarına neden olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, glutatyon S-transferaz, triarilmetan boyalar, boya-enzim ilişkileri

ABSTRACT

Topaloğlu (Baltacioğlu), E., Interaction of Triarylmethane Dyes with Redox System Enzymes, Hacettepe University Institute of Health Sciences, PhD Thesis in Biochemistry, Ankara 2005.

In the present study, the interactions of triarylmethane (TAM⁺) dyes with catalase and glutathione S-transferase (GST) were investigated. Malachite green (MG) and crystal violet (CV) appeared to inhibit the catalase of human erythrocytes noncompetitively and reversibly with the apparent K_i values of 18.68 ± 0.28 and 60.67 ± 1.02 μM , respectively. It is suggested that both MG and CV may inhibit the human erythrocyte catalase possibly by interacting with the independent binding sites on the enzyme outside of the active center. Leucomalachite green (LMG) inhibited erythrocyte catalase reversibly in a linear mixed type manner with the apparent K_i value of 135.24 ± 15.10 μM suggesting that the system may be a mixture of partial competitive and pure noncompetitive inhibition. MG also inhibited bovine liver catalase reversibly in a pure noncompetitive manner with the apparent K_i value of 27.17 ± 2.88 . Although LMG and CV appeared to inhibit the enzyme, the apparent K_i values couldn't be calculated since the data suggested that these dyes seem to interact with the enzyme through at least two binding sites. Interaction of the corresponding dyes with equine liver GST was investigated using various concentrations of CDNB and GSH as substrates. MG and LMG were found to inhibit the enzyme noncompetitively with the apparent K_i values of 23.07 ± 7.26 and 30.72 ± 2.60 μM , respectively, with respect of CDNB as substrate. MG and LMG appeared to inhibit liver GST in a linear mixed type manner with the apparent K_i values of 210.00 ± 15.23 and 59.56 ± 3.70 μM , respectively, when GSH was used as substrate. It was concluded that these dyes may bind to an independent binding side besides the substrate binding site on the enzyme and may cause some conformational changes on the enzyme molecule which may further lead the enzyme inactivation. CV had no inhibitory activity on liver GST. These results revealed that MG, LMG and CV appeared as potent inhibitors of catalase and GST which may be resulted in a significant increase in free radical production, lipid peroxidation and cell damage in humans.

Key Words: Catalase, glutathione S-transferase, triarylmethane dyes, enzyme-dye interactions

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TAM ⁺ Boyaların Özellikleri ve Sınıflandırılmaları	3
2.1.1. TAM ⁺ Boyaların Işıktan Bağımsız Tepkimeleri	4
2.1.2. TAM ⁺ Boyaların Işığa Bağımlı Değişimleri	5
2.1.3. TAM ⁺ Boyaların Fotodinamik Etkileri	6
2.1.4. Boya-Protein İlişkileri	7
2.1.5. TAM ⁺ Boyaların Kullanım Alanları	8
2.1.6. TAM ⁺ Boyaların Toksik Etkileri	8
2.2. Reaktif Oksijen Türü	10
2.3. Katalaz	12
2.3.1. Katalazın Moleküler Özellikleri	12
2.3.2. Genel Bilgiler	13
2.3.3. Hem'in aktif yapısı	16
2.3.4. Katalazın etki mekanizması	16
2.3.5. Tipik Katalazlarda NADPH-Bağlanması	17
2.3.6. Katalaz inhibitörleri	18
2.3.7. Katalazın TAM ⁺ Boyalar ile Etkileşimi	18
2.4. Glutasyon S-Transferaz	19

2.4.1. Genel Bilgiler	19
2.4.2. GST İzozimleri ve Özellikleri	19
2.4.3. GST'nin Bağlama Bölgeleri	23
2.4.4. GST İzozimlerinin Ligandin Özelliği	24
2.4.5. GST İzozimlerin Biyolojik Sistemlerdeki Önemi	25
2.4.6. GST'nin İnhibitörleri	26
2.4.7. GST ile TAM ⁺ Boyaların Etkileşimi	27
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	28
3.1. Gereç	28
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması	28
3.2.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	28
3.2.3. Katalaz - İnhibitör Etkileşiminin İncelenmesi	29
3.2.4. GST'nin Aktivite Tayini	30
3.2.5. GST'nin Kinetik Davranışı ve GST–İnhibitör Etkileşiminin İncelenmesi	31
3.2.6. Protein Tayini	31
3.2.7. Kinetik Verilerin Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	
4.1. İnsan Eritrosit ve Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalazların Kinetik Davranışı	33
4.2. Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile TAM ⁺ Boyaların Etkileşimi	36
4.2.1. MG'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	37
4.2.2. LMG'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	40
4.2.3. CV'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	43
4.2.4. MG'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	46
4.2.5. LMG'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	49
4.2.6. CV'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi	52

4.3 At Karaciğeri Kaynaklı GST'nin Kinetik Özellikleri	56
4.4. TAM ⁺ Boyaların At Karaciğeri Kaynaklı GST ile Etkileşimi	59
4.4.1. MG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi	59
4.4.2. LMG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi	65
4.4.3. CV'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi	70
5. TARTIŞMA	71
6. KAYNAKLAR	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Sığır Serum Albumini
BVC	Sığır Karaciğeri
CALI	Chromophore Assisted Laser Inactivation
CDNB	1- kloro- 2,4- dinitrobenzen
CV	Kristal Viyole
DNA	Deoksi Ribo Nükleik asit
EV	Etilen Viyole
FDA	Food and Drug Administration
Fe ⁺⁴ =OP [']	Okso-Ferril Parfirin kompleksi
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GST	Glutatyon S- Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HEC	İnsan Eritrositi
Kat	Katalaz
KP	Fosfat Tamponu
KT	Karışık Tip İnhibisyon
LMG	Lökomalakit Yeşili
MG	Malakit Yeşili
MLC	Micrococcus lysodeikticus
Mn	Manganez
MY	Metanil Sarı
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NK	Nonkompetitif İnhibisyon

NO	Nitrik oksit
NO ₂	Nitrat
O ₂ '	Singlet Oksijen
O ₂ ^{•-}	Superoksit
O ₃	Ozon
OH'	Hidroksil Radikali
PEG	Poli Etilen Glikol
PMC	Proteus mirabilis
Prx	Peroksiredoksin
PVC	Penicillum Vitale
ROT	Reaktif Oksijen Türü
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Süperoksit Redüktaz
T ₄	Tiroksin
TAM	Triarilmetan
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
Zn-SOD	Çinko Süper Oksit Dismutaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. MG, LMG ve CV'nin kimyasal yapıları	3
Şekil 2.2. TAM ⁺ boyaların basit nükleofillerle eklenti ürünü oluşturması	4
Şekil 2.3. MG'nin fototransformasyon ve deaktivasyonu	6
Şekil 2.4. MG'nin ve LMG'nin oksidatif metabolizmasından türeyen ek metabolitler	9
Şekil 2.5. GSH ve türevlerinin biyolojik sistemlerde önemi	12
Şekil 2.6. İnsan eritrosit katalazının (1.11.1.6) kristal yapısı	13
Şekil 2.7. İnsan eritrosit katalazının ikincil yapısı	15
Şekil 2.8. İnsan eritrosit katalazının tetramer yapısı	15
Şekil 2.9. <i>Saccharomyces cerevisia</i> 'nın katalaz A yapısı	16
Şekil 2.10. İnsan GST A4-4, fare GST A4-4 ve insan GST A1-1'in ikincil yapısı, aminoasit dizisi ve fonksiyonel kısımların karşılaştırılması	20
Şekil 2.11. cGSTM1-1, rGSTM3-3, rGSTM1-1 ve hGSTM2-2'nin aminoasit dizi karşılaştırılması	21
Şekil 2.12. İnsan GST A4-4 izoziminin dimer etkileşimi ve katlanması	22
Şekil 2.13. GST μ 1'in altbiriminin ikincil yapısı	22
Şekil 2.14. GST A4-4'ün S-(2-iyodobenzil)-glutatyon için bağlanma bölgesi	24
Şekil 2.15. İnsan GST A1-1 izoziminin bir altbiriminin ligandlı ve ligandsız olarak kristalize edilmiş yapıları	25
Şekil 4.1. Hidrojen peroksitin eritrosit kaynaklı katalaz ile bozunumu	33
Şekil 4.2. Eritrosit kaynaklı katalaza ait Lineweaver-Burk grafiği	34
Şekil 4.3. Hidrojen peroksitin sığır karaciğer kaynaklı katalaz ile bozunumu	35
Şekil 4.4. Sığır karaciğeri kaynaklı katalaza ait Lineweaver-Burk grafiği	36
Şekil 4.5. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri	37
Şekil 4.6a. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonununun ait ikincil grafik	38

Şekil 4.6b. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	38
Şekil 4.7. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	39
Şekil 4.8. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	40
Şekil 4.9a. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	41
Şekil 4.9b. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	41
Şekil 4.10. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	42
Şekil 4.11. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	43
Şekil 4.12a. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	44
Şekil 4.12b. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	44
Şekil 4.13. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	45
Şekil 4.14. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri	46
Şekil 4.15a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ilişkin ikincil grafik	47
Şekil 4.15b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ilişkin ikincil grafik	47
Şekil 4.16. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	48
Şekil 4.17. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	49
Şekil 4.18a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	50

Şekil 4.18b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	50
Şekil 4.19. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	51
Şekil 4.20. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver-burk grafikleri	52
Şekil 4.21a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	53
Şekil 4.21b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	53
Şekil 4.22. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği	54
Şekil 4.23. At karaciğeri kaynaklı GST varlığında GSH'ın CDNB ile oluşturduğu konjugatın absorbansındaki net artış	56
Şekil 4.24. At karaciğeri kaynaklı GST aktivitesinin enzim miktarına bağımlılığı	57
Şekil 4.25. At karaciğeri kaynaklı GST için Lineweaver-Burk grafiği	58
Şekil 4.26. At karaciğeri kaynaklı GST için Lineweaver-Burk grafiği	58
Şekil 4.27. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonunun inhibitör derişimine bağımlılığı	60
Şekil 4.28. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	61
Şekil 4.29a. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	62
Şekil 4.29b. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	62
Şekil 4.30. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	63
Şekil 4.31a. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	64
Şekil 4.31b. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	64

Şekil 4. 32. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonunda tepkime hızının inhibitör derişimine bağımlılığı	65
Şekil 4.33. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	66
Şekil 4.34a. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	67
Şekil 4.34b. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	67
Şekil 4.35. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri	68
Şekil 4.36a. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	69
Şekil 4.36b. At karaciğeri kaynaklı GST'ın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik	69

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Önemli ROT ve metabolizmaları	10
Tablo 4.1. TAM ⁺ boyaların eritrosit ve sığır karaciğeri kaynaklı katalaz üzerindeki inhibitör etkileri	55
Tablo 4.2. TAM ⁺ boyalar ile at karaciğeri kaynaklı GST'nin etkileşimi	70

1. GİRİŞ

Fizyolojik olarak hücresel proseslerde görev yapan; birçok patolojik olayda rol oynayan ve ilaç geliştirmede hedef teşkil eden proteinlerin tanımlanması, yapı ve işlevlerinin aydınlatılması amacıyla son yıllarda üzerinde çalışılan Chromophore-assisted light inactivation (CALI) teknolojisinde kromofor olarak triaril metan (TAM⁺) boyalar kullanılmakta ve bu boylarla işaretlenen antikörler ilgilenilen hedef proteine yönlendirilmektedirler. Seçilen dalga boyundaki laser ışını boya tarafından absorplandığında oluşan serbest radikallerin yalnızca hedef proteini hasara uğrattığı, diğer hücresel bileşenleri etkilemediği öne sürülmektedir. CALI'nin bir çok enzimi, sinyal iletim moleküllerini, reseptörleri, iskelet proteinlerini, kinezini ve transkripsiyon faktörlerini inaktive ettiği bildirilmiştir. CALI'nin etki mekanizması konusunda yapılagelen çalışmalarda fotokimyasal indüklenme sonucu protein düzeyinde meydana gelen redoks değişimler üzerinde durulmaktadır. Fluoressein, malakit yeşili (MG) ve yeşil fluoresan protein (GFP) CALI yönteminde sıklıkla kullanılan bileşiklerdir.

Ancak TAM boyların ışıktan bağımsız olarak albumin ve diğer proteinlerle etkileşimleri de bildirilmiş; özellikle MG'in fotokimyasal olmayan tepkimeler için de uygun olduğu öne sürülmüştür. Söz konusu boyların insanda kanserojen etki gösterdiği yolundaki çalışmalar da göz önüne alındığında, TAM⁺ boylarla hücre bileşenleri arasında etkin bir etkileşim olası görülmektedir.

MG ve kristal vioyole (CV) tüm dünyada tekstil ve gıda endüstrisinde boya olarak, su ürünleri endüstrisinde fungusit, ektoparazitisit ve dezenfektant olarak kullanılmaktadır. Endüstride ve sitokimyasal boya olarak tıpta hala sıklıkla kullanılmakla birlikte FDA, MG'in besin boyası ve yenilen deniz ürünlerinde koruyucu olarak kullanımına izin vermemektedir. MG insan gastrointestinal kanalında anaerobik olarak renksiz formu olan lökomalakit yeşili (LMG)'ne dönüşmektedir ve bu form da diğer karsinojenik TAM boyların etkilerine benzer etkiler göstermektedir. CV, endüstride boya olarak, tıpta biyolojik boya, mikrobisid ve antihelmintik olarak kullanılmakta ve tıpkı MG gibi intestinal mikroflorada renksiz formuna (LCV) dönüşmektedir.

Aşırı dozda oksidana maruz kalma veya antioksidan kapasitedeki azalma gibi nedenlerle oluşan oksidatif stres, kaynağından bağımsız olarak hücre fonksiyonlarını etkilemekte, lipid peroksidasyonuna, dolayısıyla ciddi sitopatolojik sonuçlara yol açmaktadır. En bilinen antioksidan bileşik olan glutatyon (GSH), oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde indirgeyici güç olarak rol alır. GSH seviyesini muhafaza etmek için glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon transferaz (GST) gibi antioksidan enzimler birlikte hareket etmelidirler. Bu enzimlerin eksikliğine veya inhibisyonuna yol açan olay ya da bileşikler, hücrelerde redoks dengesini bozarak oksidan düzeyinin artmasına neden olur ve çoğu kez tersinmez hücre hasar ve ölümüne yol açarlar.

Bu çalışmada, önemli antioksidan enzimlerden CAT ve GST seçilerek eritrosit ve sıgır karaciğeri kaynaklı CAT ve at karaciğeri kaynaklı GST'nin TAM⁺ boyalardan MG, LMG ve CV ile etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek sonuçların sözkonusu boyalarla etkileşen antioksidan enzimlerin kimliği ve etkileşimin mekanizması açısından önemli ipuçları vereceğine ve bu önbilgiler ışığında özellikle kanser oluşumu açısından önem taşıyan yapısal ve fonksiyonel protein/enzimlerin spesifik inaktivasyonuna yönelik çalışmaların planlanabileceğine inanmaktayız.

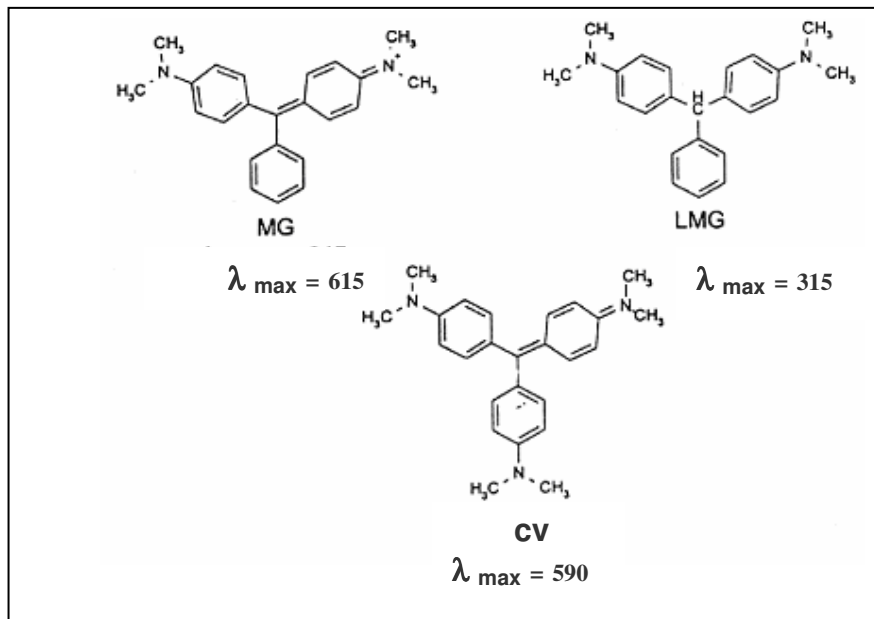
2. GENEL BİLGİLER

2.1. TAM⁺ Boyaların Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

TAM⁺ boyalar, ticari boyaların önemli bir sınıfını oluşturmaktadırlar ve katyonik boyalar sınıfına dahildirler. Genellikle organik bazların tuzları olan bu bileşikler bazik özellik gösterir ve suda çözünürlükleri yüksektir. Kromofor olarak fukson imin yapısını içeren TAM⁺ boyalar, her ikisi de renksiz olan triarilmetan veya trifenil karbinol çekirdeğine substitüsyon yoluyla türetilmişlerdir (1). Kromoforik çekirdeğe bir ya da birden fazla amino veya hidroksil grubunun para-substitüsyonu ile 3 grup TAM boyası elde edilir:

- MG serisi. Benzen halkasında iki amino grubu içerirler. Malakit yeşili ve parlak yeşil bu gruba örnek olarak verilebilir.
- Rozanilin serisi. Benzen halkasında üç amino grubu içerirler. Rozanilin, pararozanilin, kristal viole ve metil viole bu gruba örnek olarak verilebilir.
- Rozolik asit serisi. Benzen halkasında üç hidroksil grubu içerirler. Rozolik asit bu gruba örnektir.

Bu çalışmada kullanılan MG, LMG ve CV'nin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de görülmektedir.

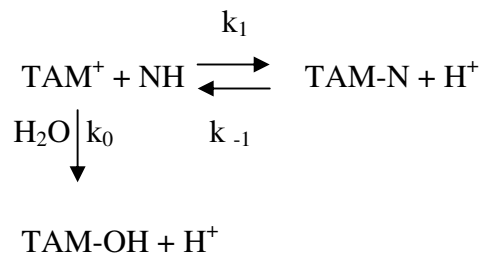


Şekil 2.1. MG, LMG ve CV'nin kimyasal yapıları.

2.1.1. TAM⁺ Boyaların Işıktan Bağımsız Tepkimeleri

TAM⁺ boyalar renklerini sadece ışığın etkisiyle değil, aynı zamanda kimyasal olaylar sonucunda da kaybedebilirler. Bazı boyaların alkali çözeltilerinin renginin tamamen solduğu gözlenmiştir. Alkalin solma, çeşitli TAM⁺ boyaların karbonyum iyonlarının nükleofiller ile tepkimesine dayanmaktadır. Sulu çözeltilerde TAM⁺ boyaların alkalin solması katyonik sürfaktanlar ve katyonik polielektrolitler tarafından misel oluşumlarla hızlandırılabilir (2). Buna karşılık anyonik sürfaktanlar ve anyonik polielektrolitler bu boyaların solmasını geciktirebilirler. Bu etkiler, boya, polielektrolit ve sürfaktan büyük hidrofobik grup içerdiğinde maksimum boyuta ulaşır.

Sulu çözeltilerde karbokasyon boyaların karbinole dönüşümü gösterilmiştir. Karbinol oluşumunun baz katalizli bir tepkime olduğu ve bu olayın karbon merkezine bir su molekülünün hız belirleyici tepkimesiyle gerçekleştiği belirtilmiştir (3).



Şekil 2.2. TAM⁺ boyaların basit nükleofillerle eklenti ürünü oluşturması.

Karbokasyon boyaların kararlılığına yapıların etkisi araştırıldığında, bir katyon boyanın nükleofilik atağa karşı kararlılığının, kendi karbokasyon merkezi ve ona bağlı aril halkalardaki 4-aminoalkilamino substituentlerinin azot atomu üzerindeki serbest e⁻ çifti arasındaki rezonans etkileşiminin derecesine bağlı olduğu görülmüştür. Fenil veya 1-naftil halkalarında 4-NHC₂H₅, 4-N(C₂H₅)₂ veya 4-N⁺(CH₃)₂ C₂H₅ substituentleri içeren triarilkarbokasyonların aril halkaları ile koplanar yapı göstermedikleri ve karbokasyon merkeze diğer boyalara göre daha az rezonans etki gösterdikleri saptanmıştır (3).

Sıcaklık, nem, O₂, O₃, SO₂ ve NO₂ gibi gazların, suda çözünebilirliğinin, fotoyıkım ürünlerinin solmayı etkilediği gösterilmiş ve yapılan çalışmalardan bunların birbirine bağlı oldukları sonucuna varılmıştır (4).

CV'nin *Trypanosoma cruzi* hücre ve homojenatlarda serbest radikal oluşturarak toksik etki gösterdiği ve bu etkinin ışık ile arttığı öne sürülmüştür (5).

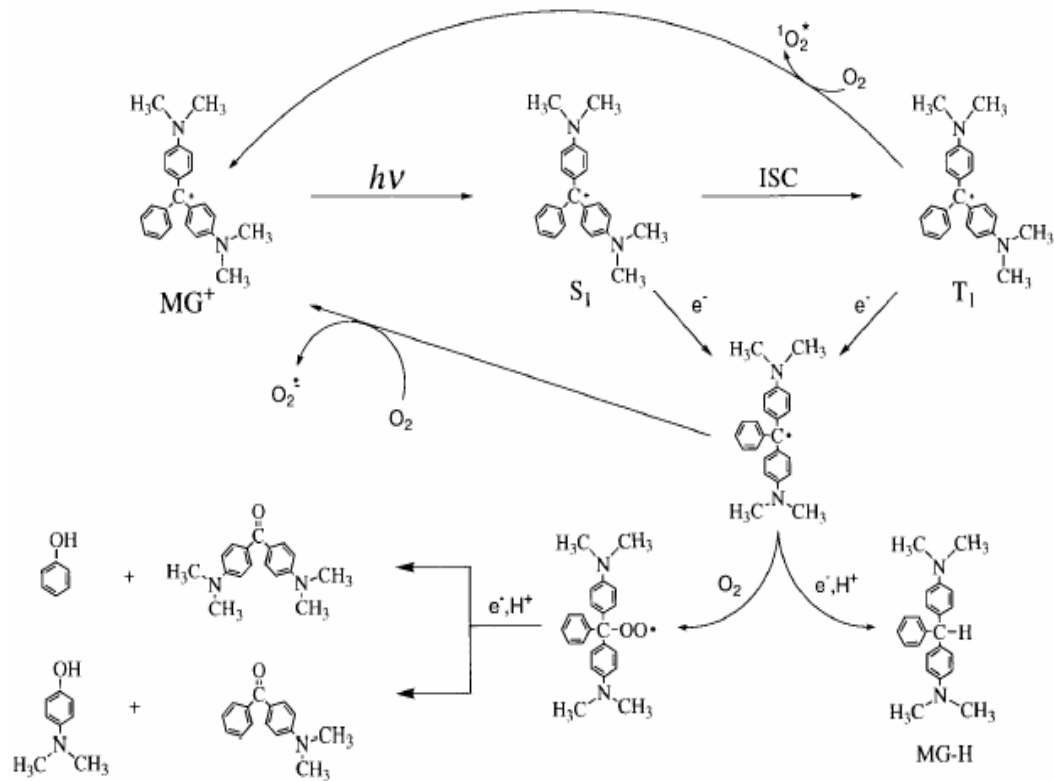
Ovalbumin (OA) ve insan serum albumini (HSA) kullanılarak MG'nin karanlık tepkimeleri üzerinde yapılan çalışmalar, ortamda protein olmadığında karbinol oluşumunun (solmanın) pseudo-first order hız kinetiği gösterdiğini ve OA ve HSA varlığında multifazik bir tepkime içerdiğini göstermiştir (6).

2.1.2. TAM⁺ Boyaların Işığa Bağlı Değişimleri

TAM⁺ boyalar, fotooksidasyon ve fotoredüksiyona duyarlıdır. Çoğu araştırmacılar katyon boyadan bir elektronun kopmasının fotooksidasyonun başlangıç aşaması olduğunu ileri sürerken, sulu çözeltilerde MG ve CV'nin fotoyıkımını esas alan fotooksidasyon olaylarında bir dikasyon radikal ve çözünmüş bir elektron oluşturulduğu ileri sürülmüştür (7).

350-420 nm dalga boyundaki güneş ışığının parlak yeşil, Victoria saf mavisi, magenta gibi bazı TAM⁺ boyaların solmasını arttırdığı gözlenmiştir. Marzenco ve Kalinowski (8) CV ve MG'nin fotoredüksiyonunda güneş ışığının suni ışığa göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

TAM⁺ boyaların löko ürünlere dönüşmesi ortamdaki nükleofiller ya da proteinlerden boyaya tek e⁻ aktarımıyla başlatılan 2e⁻ transfer işlemidir. Kısmi indirgenmiş C merkezli boya, ya çözünmüş oksijenle tepkimeye girerek benzofenon tip fotoürün oluşturur, ya da ikinci bir e⁻ alarak TAM⁺ boyanın löko türevini oluşturabilir. Şekil 2.3'de MG'nin fototransformasyon ve deaktivasyon yolları gösterilmiştir.



Şekil 2.3. MG'nin fototransformasyon ve deaktivasyonu^a.

Barlett ve diğerleri (9)'dan alınmıştır.

^aS₁, T₁, MG⁺ nin eksite durumları (singlet, triplet); ISC, sistem içi geçiş (inter system crossing); MGH, lökomalakit yeşili.

Barlett ve diğ. (7) MG ve CV'nin fotoyıkım ile aminosubstituentli benzofenonlara okside olduklarını, tüm löko bileşiklerin, özellikle demetillenmiş ürünlerin çok az miktarda oluştuğunu rapor etmişlerdir. Desai ve Vaidya (10) hidrojen peroksitin boyalarla oksidasyon ürünleri verdiğini ileri sürmüşlerdir.

2.1.3. TAM⁺ Boyaların Fotodinamik Etkileri

Fotosensitizör, ışık ve çözülmüş moleküler oksijen, biyolojik sistemlerde fototoksik etki göstermek için gereklidir. Oksijene bağımlı zararlı etkiler fotodinamik etki olarak adlandırılır. Fotokimyasal olaylar iki farklı fotosensitize oksidasyon tipi içerir. Tip 1 fotosensitizasyon tepkimesinde fotooksidasyon olaylar eksite sensitizör ve substrat arasında e⁻ ve H⁺ transferi ile başlatılır. Oluşturulan radikal çift, peroksil,

süperoksit ve $\cdot\text{OH}$ gibi sitotoksik reaktif oksijen türü (ROT) oluşturmak üzere çözülmüş moleküler O_2 ile tepkimeye girer (9). Tip 2 tepkimesinde fotooksidasyon olayları triplet sensitizörden moleküler O_2 'e enerji transferi ile başlatılır. Singlet oksijen ($\cdot\text{O}_2$), bu tepkimede oluşturulan reaktif oksijen türüdür. Yapılan çalışmalarda boya bozunumu ve singlet oksijen ürünleri arasında doğrudan bir ilişki bulunamamıştır. $\cdot\text{O}_2$ 'nin boyanın foto solma olayında yer almadığı, ancak benzofenon-tip foto ürün oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (7).

2.1.4. Boya-Protein İlişkileri

TAM^+ boyaların protein fiberlerini boyamada kullanılması tekstil endüstrisinde azalırken, biyolojik bilimlerin boya-protein bağlanmasında spektral değişiklikler üzerinde durması artmıştır. Bradford (11), spektral değişiklikleri kullanarak asit mavisi 90 TAM boyası için bir protein yöntemi geliştirmiştir.

TAM^+ boyalarının biyolojik sıvılarda sığır serum albuminine (BSA) nonkovalan olarak bağlandığı (7), proteine bağlı MG'nin solması sonucunda foto tepkime ürünü olarak LMG meydana geldiği bildirilmiştir (9).

MG'nin nonfotokimyasal solması ovalbumin (OA) ve insan serum albumini (HSA) kullanılarak pH 8 ve 10'da çalışıldığında boyanın renginin solduğu ve pH 4.5'de boyanın renginin geri kazanıldığı gözlenmiştir (6). N ve S nükleofiller kullanıldığında MG ve metil yeşili (MeG)'nin sadece merkaptolan ve GSH ile renksiz eklenti oluşturduğu bildirilmiştir (12). Yapılan diğer bir çalışmada, MG ve MeG gibi son derece elektrophilik olan TAM^+ boyaların bir kısmının biyolojik sıvılarda kovalan boya-protein eklenti oluşumu olarak etkilediği, kalan kısmının kationik nonkovalan ligandlar olarak serbest etkilediği gösterilmiştir (13).

MG'in glutatyona bağımlı enzimleri inhibe edebileceği bildirilmiş; GSH ve GST gibi antioksidan enzimlerin MG, CV ve etil viole (EV) ile inhibe oldukları öne sürülmüş, ancak mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (14).

2.1.5. TAM⁺ Boyaların Kullanım Alanları

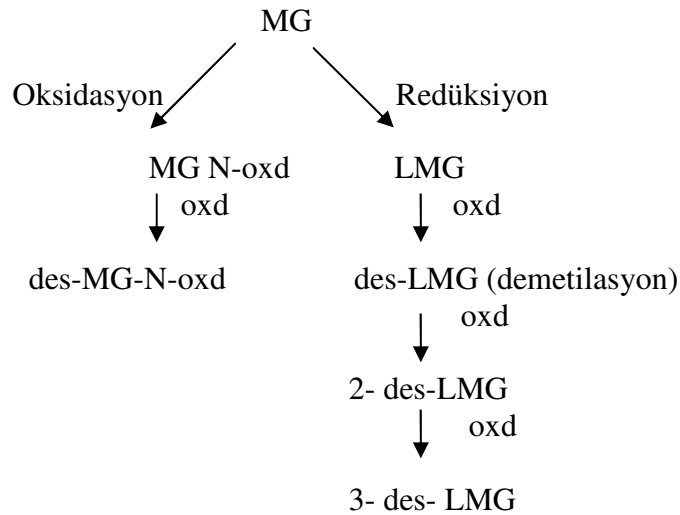
MG, (N-[4,4'-bis dimetilaminofenil] fenil metilen-2,5 sikloheksadien-1-ilidien) ve CV (N,N,N',N',N'',N''' heksametil pararosanilin) tüm dünyada tekstil ve gıda endüstrisinde boya olarak, su ürünleri endüstrisinde fungusit, ektoparazitisit ve dezenfektant olarak kullanılmakta olan suda çözünürlüğü yüksek TAM⁺ boyalardır (15). MG, yüksek adenin ve timin (AT) içeren DNA bölgelerine bağlandığı için histokimyada DNA boyası olarak da kullanılmaktadır (16). Kuvvetli etkisi ve ucuzluğu nedeniyle ipek, tahta, deri, seramik ve pamuk boyası olarak endüstride ve sitokimyasal boya olarak tıpta hala sıklıkla kullanılmakla birlikte ABD'de FDA, MG'in besin boyası ve yenilen deniz ürünlerinde koruyucu olarak kullanımına izin vermemektedir (17,18).

CV'nin tüm metil violelerin içinde en koyu mavi ton özelliğine sahip olması, Gram boyamasında bakterinin primer sınıflandırılmasına ve tanımlanmasına olanak sağlar. CV tıpta antimikrobiyel ve antihelmintik olarak da kullanılmaktadır. Kan bankalarında, *Trypanasoma crusi* içeren kanla bulaşan Chagas hastalığının önlenmesi amacıyla kan ürünlerine eklenmekte; ayrıca bebeklerde göbük kordonu dezenfeksiyonunda kullanılmakta, kümes hayvanlarının yemlerine küf ve mantar üremesini engellemek amacıyla katılmaktadır (5,16,19,20).

2.1.6. TAM⁺ Boyaların Toksik Etkileri

MG'in etkin antimikrobiyal aktivitesi, boyanın hücrelerarası enzimleri inhibe etmesine; DNA ile etkileşimine ve hücre zarları ile girişimine bağlanmaktadır. Son yıllarda MG'in çok düşük derişimde (0.1µg/ml) bile memeli hücrelerine toksik etki gösterdiği ve DNA sentezinde inhibitör etki gösterdiği öne sürülmüştür (21). MG'in bu etkisinin monooksijenaz sistemi ve serbest radikal oluşturması nedeniyle yolaçtığı lipid peroksidasyonu üzerindeki olumsuz etkisinden kaynaklandığı bildirilmiş ancak mekanizma açıklık kazanamamıştır (17,18,22). MG ve metanil sarının (MY) sıçanlarda N-nitrozodietilamin tarafından indüklenen hepatik preneoplastik lezyonların gelişiminde tümör arttırıcı etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (17).

İnsan gastrointestinal kanalında bulunan çeşitli anaerobik bakterilerin MG'i indirgeyip renksiz formuna (LMG) dönüştürdüğü bilinmektedir (15). LMG ve MG'nin oksidatif metabolizmasından türeyen ek metabolitler (demetilasyon ve N-oksijenasyon ürünleri), yapıları karsinojenler ile ilişkili olduğu bilinen birer primer arilamin içerirler (Şekil 2.4) (23).



Şekil 2.4. MG'nin ve LMG'nin oksidatif metabolizmasından türeyen ek metabolitler.

Doerge ve diğerleri (23)'den alınmıştır.

LMG'nin DNA eklenti ürünleri oluşturduğu; gama glutamil transferaz (GGT), tiroksin (T₄) ve tiroid stimüle edici hormon (TSH) düzeylerini arttırdığı; karaciğerde tümör oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (24). LMG'nin tiroid peroksidaz (TPO) katalizli tirozin iyodinasyonunu inhibe ettiği de bilinmektedir (25). CV, tıpkı MG gibi intestinal mikroflorada renksiz formu olan LCV'ye dönüşmektedir. Yüksek dozda verilen CV, tavuk embriyoları için toksik etki gösterirken, fare kemik iliğinde mitotik aktiviteyi azaltmaktadır (26). CV'nin renal, hepatik, akciğer kanserlerine ve tiroid karsinogenezisine yol açtığı bildirilmiştir (23,25).

Diğer TAM⁺ boyaların da oksidatif enzimler ile transformasyonu bildirilmiştir (25).

2.2. Reaktif Oksijen Türü (ROT)

ROT, oksijenden türeyen çok sayıdaki reaktif bileşiğin genel adıdır. Bunların bazıları hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi son derece reaktif iken, bazıları da süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi daha az reaktiftir. Paylaşılmamış elektron taşıyan düşük molekül ağırlıklı serbest moleküller ve hücreler arası serbest radikaller de ROT olarak adlandırıldığından; bu terim serbest radikal ve reaktif oksijen türü için birlikte kullanılmaktadır. Serbest radikaller ve ROT, serbest radikal oluşturan zincir tepkimesini başlatan biyomoleküller ile kolayca tepkimeye girerler. Bu zincir tepkimesini durdurmak için; yeni oluşan bir radikal ya başka bir serbest radikal ile tepkimeye girerek eşleşmemiş elektronları elimine eder ya da serbest radikal yakalayıcısı veya antioksidan ile tepkimeye girer (27).

Önemli bazı ROT'ün yapıları ve hücrel kaynakları; ROT karşıtı enzimatik savunma sistemleri ve ürünleri Tablo 2.1'de listelenmiştir.

Tablo 2.1. Önemli ROT ve metabolizmaları

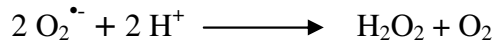
ROT	Ana Kaynaklar	Enzimatik Savunma Sistemleri	Ürün
Superoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Elektron taşıma zincirinden elektronların kırılması Aktifleşmiş fagositler Ksantin oksidaz Flavoenzimler	Süperoksit dismutaz (SOD) Süperoksit redüktaz (bazı bakterilerde)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ H_2O_2
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Süperoksit dismutaz aracılığı ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ NADPH-oksidadaz (nötrofiller) Glukoz oksidaz Ksantin oksidaz	Glutasyon peroksidaz Katalaz Peroksiredoksin	$\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ H_2O
Nitrik oksit (NO)	Nitrik oksit sentetaz	Glutasyon /Trx R	GSNO

Nordberg ve diğerleri (28)'den alınmıştır.

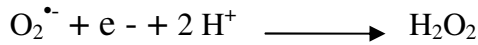
Hücresel antioksidan sistem iki önemli gruba ayrılır:

1.Enzimatik antioksidan sistem:

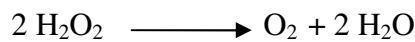
Süperoksit dismutaz (SOD): Ökaryot hücrelerde süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) iki metal içeren SOD izozimleri tarafından hidrojen peroksit'e metabolize edilir. Mitokondride bulunan Mn-SOD 80 kDa'luk tetramerik bir yapıdır. Sitozolde bulunan Cu/Zn-SOD 32 kDa'luk dimerik bir yapıdır. SOD ile katalizlenen tepkimede iki molekül süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturulur. SOD ile katalizlenen tepkime son derece hızlıdır.



Süperoksit redüktaz (SOR): Süperoksitin doğrudan indirgenmesini katalizleyen bu enzim demir içerir ve anaerobik, sülfat-indirgeyici bakterilerde bulunur.

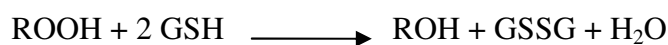


Katalaz (CAT): Hem içeren proteinlerdir. Memeli hücrelerinde en fazla peroksizomlarda bulunurlar. CAT, hidrojen peroksitin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



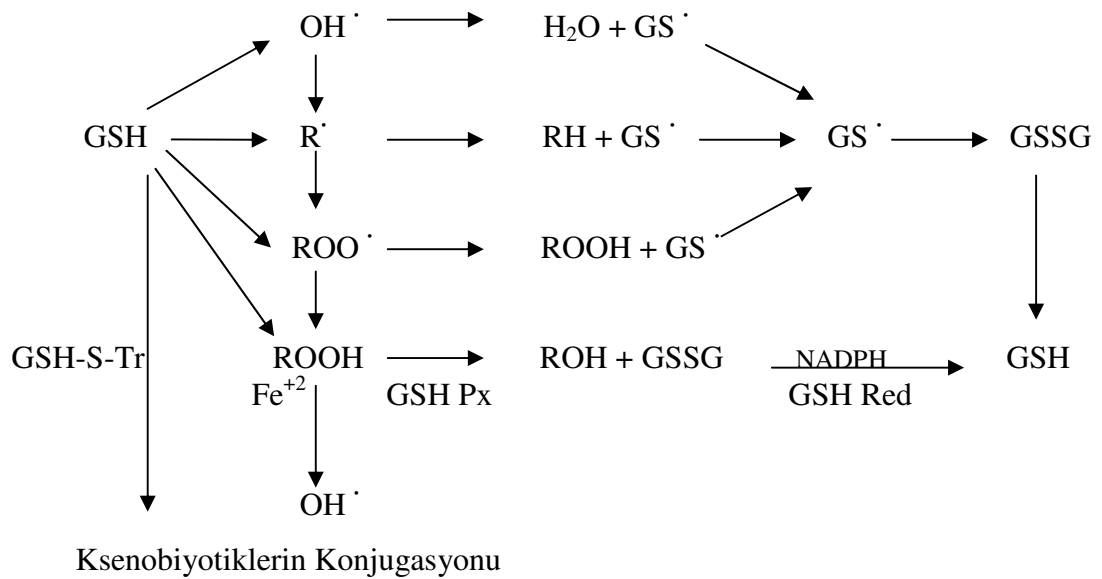
Peroksiredoksin (Prx): Hidrojen peroksit ve farklı alkil hidroperoksitleri doğrudan indirgeyen enzimlerdir. Thioredoksin (memeli hücrelerde), katalitik döngüde oluşan okside peroksidazları rejenere eder. Peroksiredoksinlerin p53 tarafından indüklenen apoptozizi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Glutasyon peroksidaz (GPx): Glutasyon peroksidazların tümü, glutasyonu substrat olarak kullanarak H_2O_2 'in indirgenmesini katalizler. Ayrıca diğer peroksitleri alkollere indirgerler. İki molekül GSH, GSSG'e oksitlenir ve ardından GSSG, glutasyon redüktaz (GR) tarafından indirgenir.



Glutasyon Redüktaz (GR): Glutasyon (GSH), hücreler arasında en çok bulunan tiyol kaynaklı antioksidandır. Ana görevi sülfidril tamponu olmakla birlikte, GST ile katalizlenen konjugasyon tepkimeleri aracılığıyla bileşikleri detoksifike eder. Okside glutasyonlar (GSSG), NADPH-bağımlı flavoenzim glutasyon redüktaz (GR) ile indirgenirler.

2. Nonenzimatik Antioksidan Sistem: GSH, Vitamin C, vitamin E, selenyum bileşikleri, lipoik asit ve ubikuinon içeren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin antioksidan olarak biyolojik önemi vardır. Şekil 2.5’de GSH ve türevlerinin serbest oksijen radikallerine karşı nötralizan rolü özetlenmiştir.



Şekil 2.5. GSH ve türevlerinin biyolojik sistemlerde önemi.

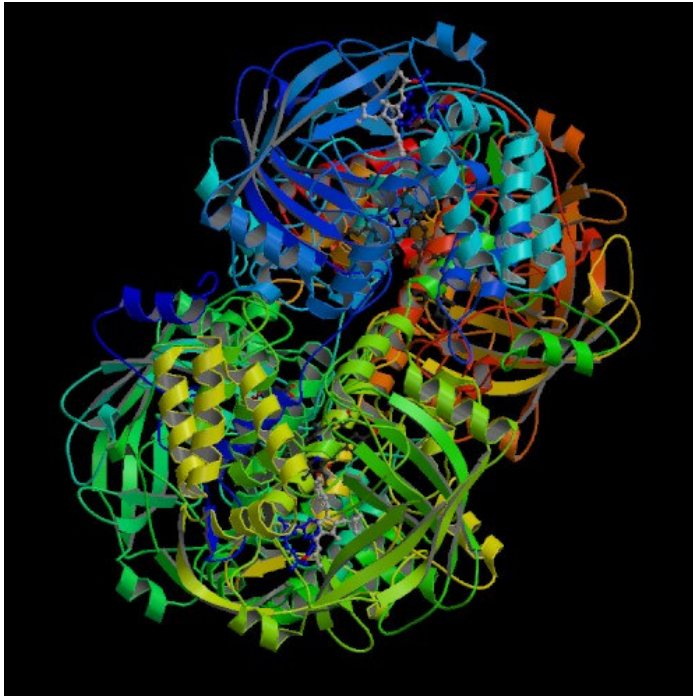
2.3. Katalaz

2.3.1 Katalazın Moleküler Özellikleri

Katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) ile ilgili ilk çalışmalar 19. yüzyıla dek uzanmaktadır. Loew, H_2O_2 'yi yıkan enzimi katalaz olarak adlandıran ilk kişi olmasına rağmen, Warburg katalazın aktif merkezinin demir içerdiğini ve siyanid ile inhibe olduğunu göstermiştir (10).

Katalazların üzerinde uzun süredir çalışılmasına rağmen, enzimin yapı ve fonksiyonuna yönelik çözülemeyen bir çok soru vardır. Herbert ve Pinsent (10) 1948'de ilk prokaryotik katalazı *Micrococcus luteus*'tan elde etmiştir.

Daha sonraki yıllarda sığır karaciğeri (BLC) , *Penicillium vitale* (PVC) (29), *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) (30), *Proteus mirabilis* (PMC) (31), *Escherichia coli* (HP11) (32), *Saccharomyces cerevisia* (CATA) (33) ve insan eritrositlerindeki (HEC) (34) katalazların kristal yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İnsan eritrosit katalazının (1.11.1.6) kristal yapısı. Putnam ve diğerleri (34)'ten alınmıştır.

2.3.2. Genel Bilgiler

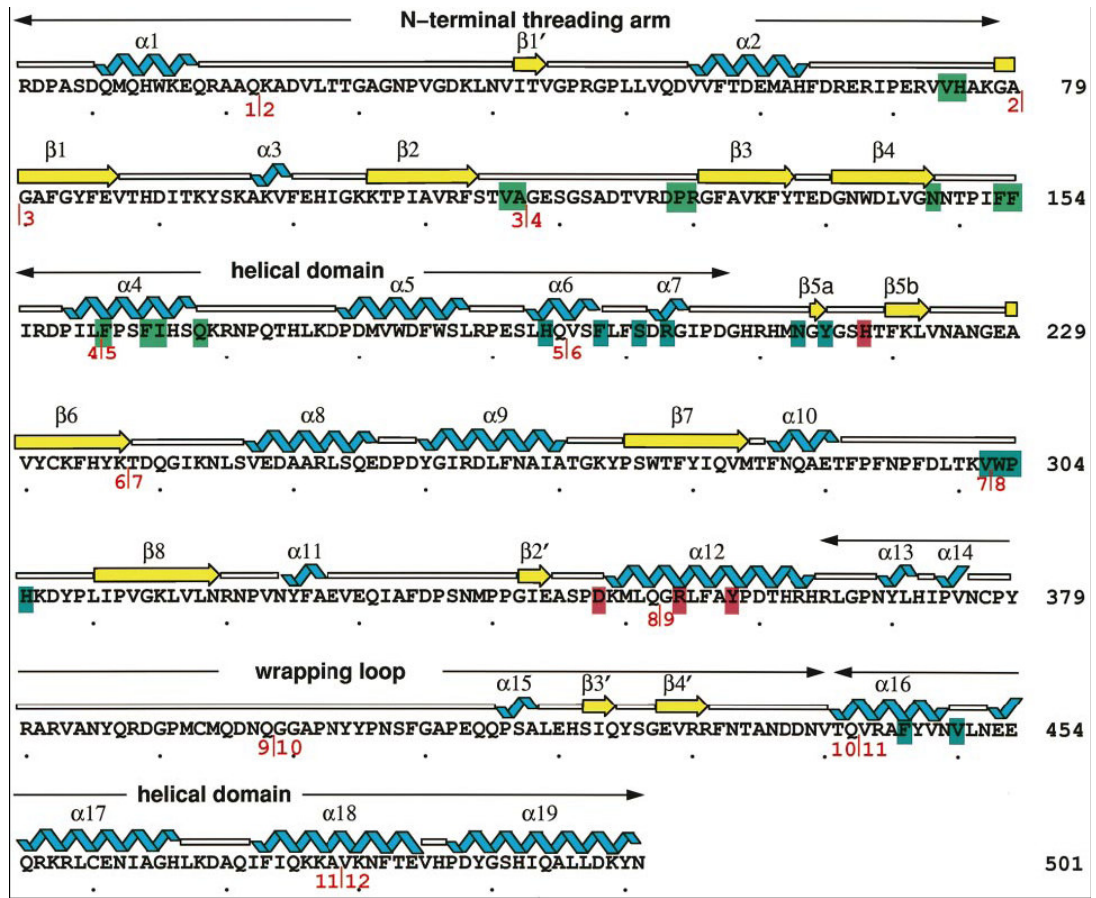
Katalaz-peroksidazlar, hücrelerin oksidatif savunmasında yer alan bir hemoprotein enzim sınıfıdır. Katalaz mutagenizde, inflamasyonda, apoptozinin önlenmesinde ve çok sayıda tümörün uyarımında rol oynayan önemli bir faktördür. Katalazlar, Fenton tepkimesi aracılığı ile H_2O_2 'den hidroksil radikali oluşum riskini azaltır; aerobik organizmaları suya ve moleküler O_2 'ye parçalayarak organizmayı H_2O_2 'nin toksik etkilerine karşı korurlar. Katalazlar başlıca 3 alt gruba ayrılırlar (34):

- Manganez katalazlar. *Lactobacillus plantarum*, *Thermus thermophilus* ve *Thermoleophilum album* gibi mezofilik laktik asit bakterilerinde bulunur. Bu enzimler hem grubu yerine redükte Mn(II) Mn(II) ve okside Mn(III) Mn(III) arasındaki dönüşümde iki-elektronlu katalitik döngü sergileyen bir dinükleer manganez aktif kısım içerirler. Molekül ağırlıkları 170-210 kDa'dur ve 266 aminoasit içerirler.

- Peroksidaz katalazlar. Prokaryotlardan *Penicillium simplicissimum*, *Septoria tritici* ve düşük ökaryotlarda (ökaryotik askorbat peroksidaz, maya sitokrom peroksidaz c) bulunur. Molekül ağırlıkları 120-340 kDa arasında değişir ve genellikle homodimerdirler. Aktif kısımlarındaki güçlü benzerliklerine rağmen, katalitik aktivite ve substrata seçicilik açısından farklılıklar vardır. En belirgin özellikleri bifonksiyonel katalitik davranış göstermeleridir. Peroksidaz katalazlar tipik katalazlara göre yüksek sıcaklık, pH ve H₂O₂ ile inhibisyona çok daha duyarlıdır.

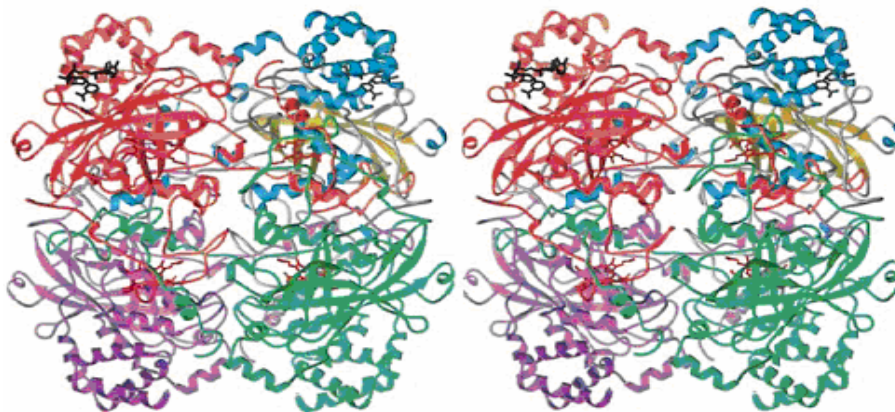
- Tipik katalazlar. Aerobik solunum yapan organizmalarda, ökaryot ve prokaryot hücrelerde bulunur. Yapısal ve biyokimyasal açıdan tamamen karakterize edilmiştir. Bu enzimler 200-340 kDa'luk 4 prostetik hem gruplu homotetramer yapıdadır ve çekirdeğinde yaklaşık 390 aminoasitli dört yapısal domain bulunur : N-ucu kolu, β-fıçı domaini, sarmal domain, α-helikal domain (Şekil 2.7). Bazı tipik katalazlarda C-ucu bölgesinde ekstra domain bulunmaktadır. β-fıçı domaini tüm canlılarda çok iyi korunurken, sarmal yapı ve α-helikal domainde bazı değişiklikler görülmekte, en büyük değişiklikler C- ve N-uç bölgelerinde oluşmaktadır. Tipik katalazı kodlayan genler, birçok organizmadan izole edilmiştir. Bazı durumlarda NADPH'nin her bir altbirime sıkıca bağlandığı saptanmıştır (34).

İnsan katalazı, altbirimlerinin her biri dört domaine bölünmüş tetramer yapıdan oluşmuştur (Şekil 2.8). Enzimin fonksiyon gösterebilmesi için tetramerik yapı şarttır. Hem bölgesi yüklü olduğunda, tetramerik yapı topluca dimerlere dönüşebilir.



Şekil 2.7. İnsan eritrosit katalazının ikincil yapısı. Aktif bölgede görev alan kısımlar, NADPH ve H_2O_2 bağlama bölgeleri sırasıyla kırmızı, mavi ve yeşil ile gösterilmiştir

Putnam ve diğerleri (34)'ten alınmıştır.



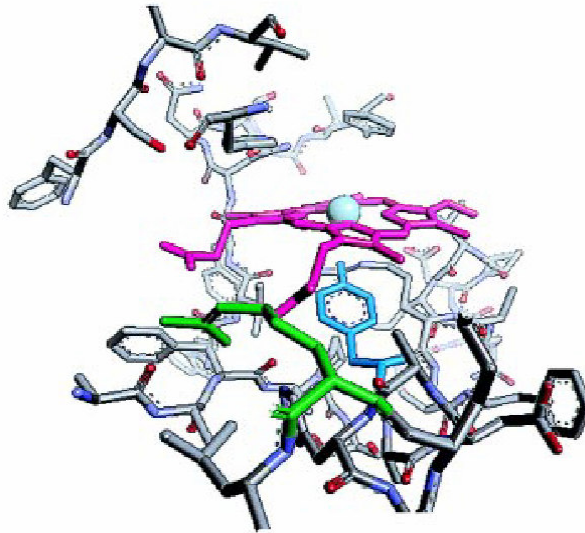
Şekil 2.8. İnsan eritrosit katalazının tetramer yapısı.

Putnam ve diğerleri (34)'ten alınmıştır.

2.3.3. Hem'in aktif yapısı:

Hem reaktivitesini kontrol eden kimyasal yapıyı belirlemek üzere, insan enziminde 1.5 Å uzaklığındaki hemin geometrik yapısı ve ortamın analizi yapılmıştır. İnsan eritrositindeki hem prostetik grubu BLC yapısına göre daha az yuvarlak bulunmuş ve aktif bölgedeki demirin pentakoordinat yapısında olduğu görülmüştür. Dört hem N-Fe uzaklığı 1.9 Å ve Tyr 358'in demire uzaklığı 1.85 Å olarak bulunmuştur (Şekil 2.9).

Dört su molekülü, aktif kısmı 25 Å derinliğindeki hidrofobik bir kanal içine gömer ve bu kısım Trp168, Phe154, Phe153, Pro129, Val116 ve Val174'ün hidrofobik yan zincirleri ile çevrelenir. Hidrofobik yapının her iki ucunda su molekülleri ve protein arasında hidrojen bağları oluşturulur. Böylelikle, sadece su, H₂O₂ ve diğer küçük moleküllerin hem molekülüne ulaşmasına izin verilir.



Şekil 2.9. *Saccharomyces cerevisiae*'nin katalaz A yapısı. Hem ligandın (Tyr 355) üst ucunun çevre domain ile bağlantısı.

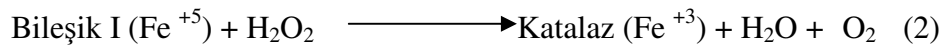
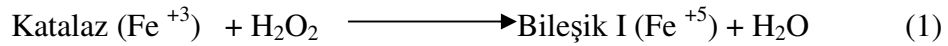
Zamocky ve diğerleri (10)'dan alınmıştır.

2.3.4. Katalazın etki mekanizması

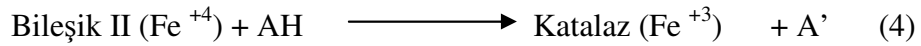
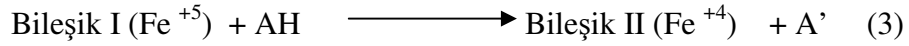
1947'de Chance katalaz ve H₂O₂ arasında oluşan birinci kompleksi keşfetmiş (Bileşik I), enzimin davranışının sadece H₂O₂'nin denge-durumu derişimine bağlı

olduğunu, düşük derişimde peroksidatik fonksiyon, yüksek derişimde katalitik fonksiyonun yaygın olabileceğini öne sürmüştü. Bileşik I'in keşfinin ardından Bileşik II ve III keşfedilmişti.

Katalazlar, substratın sırayla oksitlediği ve daha sonra aktif kısımdaki hem demiri indirgediği iki basamaklı tepkime ile fonksiyon gösterirler. İlk basamakta, hem Fe^{+3} , H_2O_2 'yi suya indirger ve bir Π -katyon parfarin radikalli okso-ferril parfarin kompleksi ($Fe^{+4}=OP'$) oluşturur. İkinci basamakta Bileşik I ikinci bir peroksit molekülünü moleküler oksijene oksitler ve ferril oksijen türlerini su olarak salıverir.



Katalaz, H_2O_2 ve diğer peroksitleri Bileşik I aracılığıyla çok sayıda bileşikleri oksitlemek (peroksidaz aktivitesi) için de kullanabilir (35). H_2O_2 derişimi düşük denge durumunda tutulduğunda



AH, elektron vericisi (fenolik bir bileşik: fenol veya ferrosiyamid)

A' , bir elektron verildikten sonra sonuçlanan radikal oluşumunu gösterir.

H_2O_2 çok yüksek derişimde olduğunda hem peroksidazlar hem de katalazlar bileşik II (Fe^{+4}) diye bilinen tersinmez inaktif türler oluşturabilirler.

2.3.5. Tipik Katalazlarda NADPH-Bağlanması

Katalaz, kendi etkisini arttıran ve onu inaktivasyondan koruyan NADPH'yi bağlar. NADPH'in tipik katalazlar arasındaki bağlanma eğilimi değişkendir. En sıkı, sıgır karaciğer katalazına, insan eritrosit katalazına ve *Proteus mirabilis* katalazına (PMC) bağlanır (36). Bağlanmanın eğilimi $NADPH > NADH > NADP^+ > NAD^+$ sırası ile azalır. Katalazların NADPH'ı bağlama bölgeleri, enzim yüzeyine yakındır. Büyük altbirimli katalazların kristal yapısında molekülün bu bölgesinin enzimin ekstra domaini ile örtüştüğü saptanmıştır (31).

NADPH'nin enzime bağlanmasındaki rolü, Bileşik II'nin yığılmasını önlemektir (36). Yapılan çalışmalarda NADPH'nin Bileşik II'nin oluşumunu engellemediği, kuaterner yapıyı stabilize ettiği belirtilmiştir.

2.3.6. Katalaz inhibitörleri

Katalazların H_2O_2 'e yüksek seçicilik gösterdiği ve sadece birkaç bileşiğin enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Memeli katalazları H_2O_2 varlığında potasyum siyanür, azid, hidroksilamin ve 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) tarafından inhibe edilmektedir (37). Katalazların azid ve hidroksilamin ile inhibisyonu nitrik okside-ferrokatalaz (38) veya Bileşik III (39) ile etkileşim temel alınarak açıklanırken, aminotriazol ile inhibisyonun protein modifikasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40,41). Fungal katalazın hidrojen peroksit bozunum kinetiğinin hidroksilamin varlığında bifazik olduğu gösterilmiştir. Salisilik asit, aspirin gibi fenolik bileşiklerin, bumetadin ($Na^+-K^+-Cl^-$ ortak taşıyıcı inhibitörü) ilacının enzimi inhibe ettiği (42); phlorizin (Na^+/D -glukoz ortak taşıyıcı inhibitörü) ilacının memeli katalazının NADPH bağlama bölgesi ile etkileştiği gösterilmiştir (43).

2.3.7. Katalazın TAM⁺ Boyalar ile Etkileşimi

Hidrojen peroksitin ve TAM⁺ boyaların kimyasal tepkimesi ile demetilasyon ürünleri, N-oksitler, ketonlar, renksiz boyalar oluştuğu gösterilmiştir. Desai ve Vaidya (10) hidrojen peroksitin boyalarla oksidasyon ürünleri verdiğini ileri sürmüştür.

Metilen mavisi, Bengal pembesi gibi singlet oksijen üreten sistemlere maruz bırakıldığında katalazın oksidatif hasara ve değişikliklere uğradığı bildirilmiştir. Bu hasar, enzimin aktivitesini kaybetmesi, karbonil grupların oluşumunun artması, peptidlerin parçalanması ve agregasyonunun artması ile gözlenmiştir (44).

2.4. Glutasyon S-Transferaz

2.4.1. Genel Bilgiler

Glutasyon S-transferazlar (GST, EC 2.5.1.18), GSH ile toksik ve karsinojenik bileşiklerin ve ksenobiyotiklerden biyotransformasyonla oluşan elektrofilik yapıların konjugasyonunu katalizleyen çok genli bir enzim süperailesinde yer alırlar (45). GST, *E.coli*'den memelilere kadar birçok organizmada bulunmakta olup insan, fare, sığır, sıçan gibi hayvanların karaciğer, akciğer, plasenta, eritrosit ve barsak mukozasından izole edilmiş ve enzimin özellikleri çalışılmıştır (46-48).

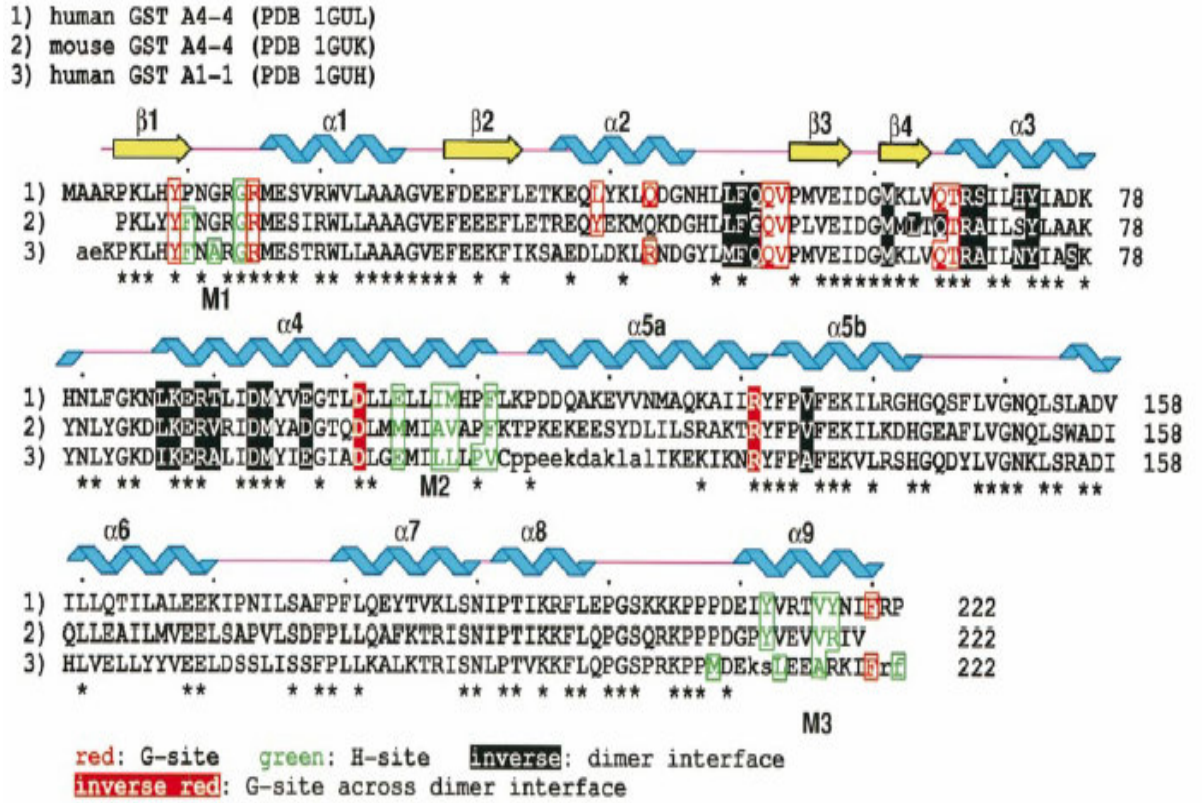
2.4.2. GST İzozimleri ve Özellikleri

GST'ler primer yapılarına ve immünolojik özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılırlar (49):

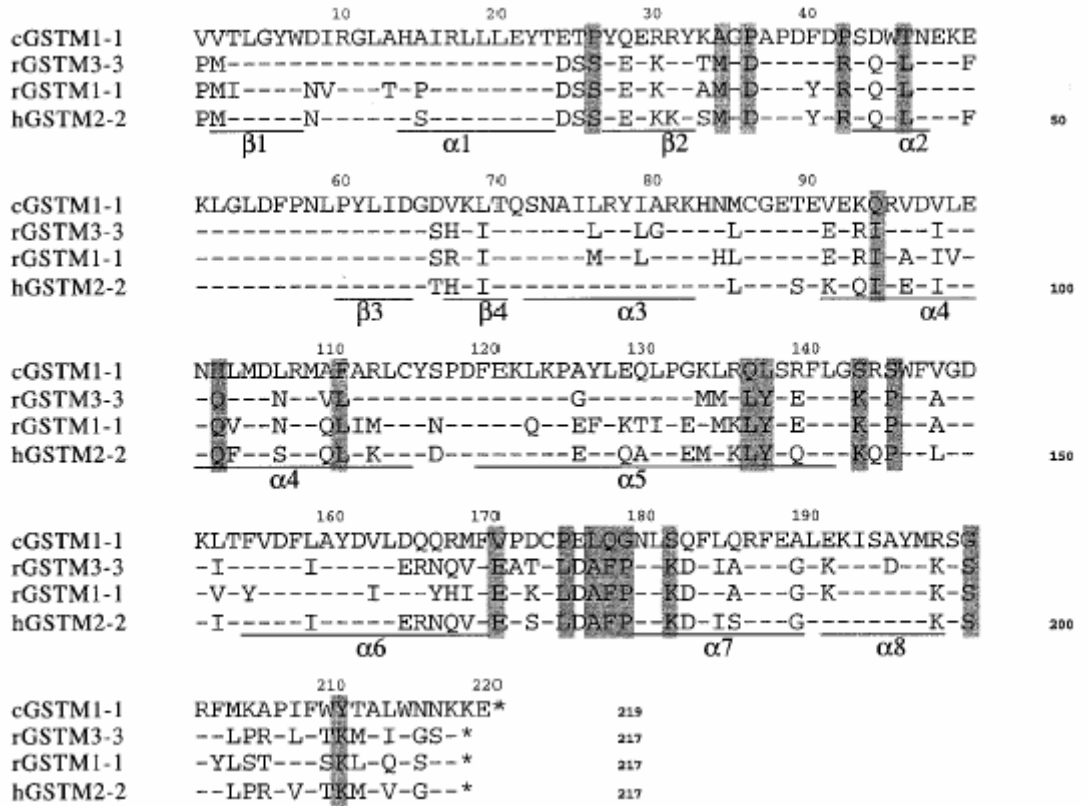
- Sitozolik GST: Alfa, mu, pi, kappa, sigma, zeta, omega GST, sitozolik olan formlardır. Sitozolik GST'ler molekül ağırlıkları 23-28 kDa arasında değişen homo veya heterodimerler halinde bulunurlar (49,50).
- Mikrozomal GST: Teta GST membrana bağlı olan formdur. Mikrozomal GST'ler lökotrien ve prostaglandin metabolizmalarında anahtar rol oynarlar (51).

GST izozimleri, insanda çeşitli organlarda farklı düzeylerde ifade edilmektedir. Bir organın birden fazla GST izozimini sentezlemesi mümkündür. İnsan karaciğeri GST alfa ve mu formunu ifade ederken GST mu formu adrenal bezde, böbrekte ve testiste bulunur. Asidik pi izozimi insan eritrositinde (52) ve plasentasında (53) yüksek derişimde bulunmaktadır.

GST'nin altı sınıfının kristal yapıları çalışılmıştır. Şekil 2.10 ve 2.11'de sıçan, insan, fare ve ördek GST alfa ve mu izoziminin ikincil yapısı, aminoasit dizisi ve fonksiyonel kısımları karşılaştırılmıştır (53,54).



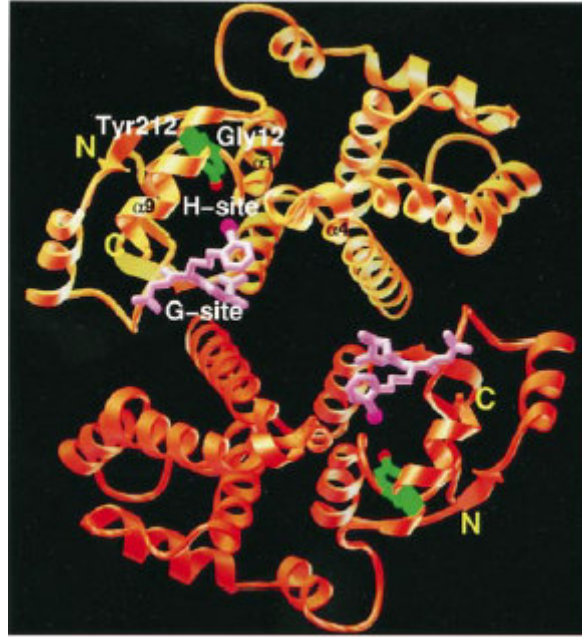
Şekil 2.10. İnsan GST A4-4, fare GST A4-4 ve insan GST A1-1'in ikincil yapısı, aminoasit dizisi ve fonksiyonel kısımların karşılaştırılması. Beyaz zemin üzerine kırmızı: G-bölgesi, yeşil: H-bölgesi, siyah: dimer etkileşimleri, kırmızı zemin üzerine beyaz: dimer etkileşimleri boyunca G-bölgesi. Bruns ve diğerleri (53)'den alınmıştır.



Şekil 2.11. cGSTM1-1, rGSTM3-3, rGSTM1-1 ve hGSTM2-2'nin aminoasit dizi karşılaştırılması.

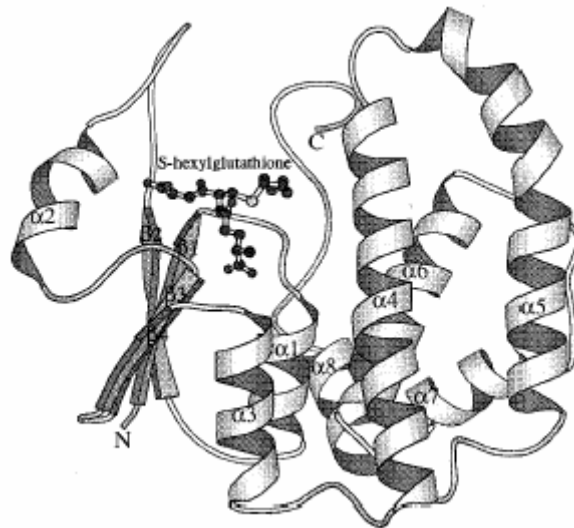
Sun ve diğerleri (54)'ten alınmıştır.

İzozimlerin farklı sınıfları arasındaki dizi benzerliği az olmasına karşın, bu proteinler iki-domain yapısını paylaşırlar. Domain I'in N-ucu dört beta-çizgili ve üç alfa-heliksli a/b yapısı gösterir. Daha büyük olan Domain II, 5-6 alfa-heliksli domain içerir. Aktif kısım daha sonra glutasyon bağlama bölgesine (G) ve hidrofobik substrat bağlama bölgesine (H) ayrılabilir. GST alfa ve mu izozimlerinin ikincil yapıları Şekil 2.12 ve 2.13'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. İnsan GST A4-4 izoziminin dimer etkileşimi ve katlanması. Alfa sınıfı GST'lerin farklı özellikler göstermesinin nedeni aktif kısım ceplerinin kimyasal yapısında yatar.

Bruns ve diğerleri (53)'den alınmıştır.



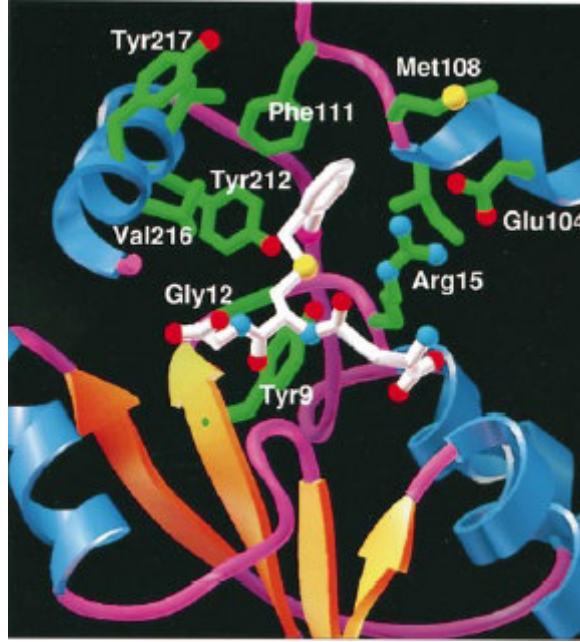
Şekil 2.13. GST $\mu 1$ 'in altbiriminin ikincil yapısı. GSH türevi olan S-hexsilglutasyon enziminin G bağlama bölgesine bağlanmış hali gösterilmiştir.

Sun ve diğerleri (54)'ten alınmıştır.

2.4.3. GST'nin Bağlama Bölgeleri

Yapılan kristalografi çalışmalarında monomer başına en az iki ligand bağlama bölgesi olduğu gösterilmiştir. Her birimde elektrofilik substratlarla etkileşen hidrofobik altbölge (H-bölgesi) ve glutatyonla etkileşen glutatyon bölgesi (G bölgesi) şeklinde iki aktif bölge bulunur (55) (Şekil 2.12, 2.14). G bölgesi glutatyona özgüdür. Kristalografi çalışmalarında GST'nin farklı sınıfları arasında H-bölgesinin tamamen ayrı olduğunu ve suda çözünebilen karsinojenlerin detoksifikasyonu için özgül olduğu öne sürülmektedir (56) . GST M1-1'de H bölgesi su molekülleri ile fonksiyonda önemli yarı hidrofobik yarı hidrofilik bir kavite bulundurmaktadır. Elektrofilik substratları bağlama bölgesi (H bölgesi) ile tirozin 115 hidroksil grubunun hidrojen bağ etkileşimi H bölgesinin esnekliğini azaltır ve katalizi etkiler.

H bölgesi, bağlı glutatyonunun tiyol fonksiyonuna bitişik hidrofobik bölge olarak tanımlanmıştır. Heliks 4'te büyük alifatik kısımlar bulunmaktadır. Leu 107, Leu 108, Pro 110, Val 111, Met 208 ve Glu 210'dan başlayan son derece dinamik C-terminal heliksin çeşitli bölgelerini içerir. Met 208 ve Pro 110 arasında bir kısımla mevcuttur, öte yandan protein mimarisi geniş hidrofobik kavitenin içine genişler. Bu bölge heliks 4, 5, 7 ve önceki C-terminal heliksin loop bölgesi ile sınırlanır. Eşleşmemiş pozitif yüklü kısımlar, enzimin nonsubstrat ligandlarının tipik bir örneği olarak organik anyonlar için potansiyel bir bağlama bölgesi içermektedirler. Lys 117'nin yan zincirine yakın bu bölgenin hidrofobik doğası, hematin gibi organik anyonlar için daha makul bağlama bölgesi sağlar. Met 208 ve Pro 110 arasındaki dar bir boşluk, H bölgesinden ayrı yer olarak tanımlanmıştır. Bu ikinci hidrofobik cebin farklı bir potansiyel bağlama bölgesi mi yoksa H-bölgesinin bir uzantısı mı olduğunu söylemek çok zordur.



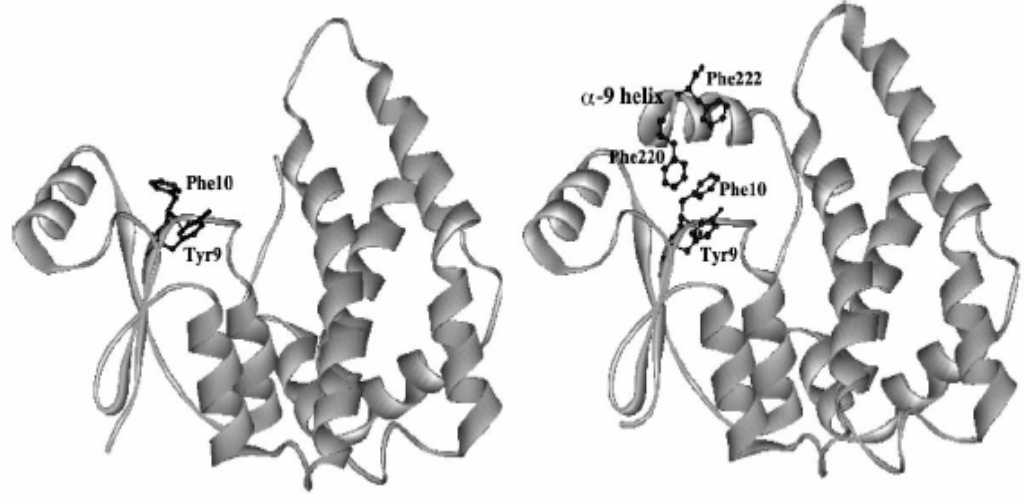
Şekil 2.14. GST A4-4'ün S-(2-iyodobenzil)-glutatyon için bağlama bölgesi (beyaz), elektrofilik bağlama bölgesi (H-bölgesi) yeşil ile gösterilmiştir. Bruns ve diğerleri (53)'den alınmıştır.

2.4.4. GST İzozimlerinin Ligandin Özelliği

Enzimatik rollerinin yanında GST'nin molekül ağırlığı 400 Da'a varabilen çok büyük bileşikler tersinir bağlayabilmesi enzime ligandin özelliği kazandırmıştır (55). GST'lerin C, S, N, O gibi elektronegatif atomları ligand olarak kullanabildiği bilinmektedir (57). Steroid hormonlar, hidrofobik bileşikler, bilirubin, ilaçlar enzime bağlanan bileşikler arasındadır. GST'nin bu bileşiklerin transportunda ve depolanmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

GST A1-1'de ligand prototipi aromattir ve en az bir anyonik fonksiyonel grup içerir. Hidrofobik ligandlar için yeni bir bağlama bölgesi sülfasalazin kullanılarak bulunmuştur. Cibacron blue ve bromosülfotaletin GST'nin bağlama bölge çalışmalarında kullanılan inhibitörlerdir (58). Enzimin ksenobiyotik substrat bölgesi içinde elektrofilik substratlar için en az üç farklı bağlama bölgesi olduğu, bazı substrat olmayan ligandlar için 1 bağlama bölgesi/dimer varlığı ileri sürülmüştür (59).

İnsan GST A1-1 izoziminin bir altbiriminin ligandlı ve ligandsız olarak kristalize edilmiş yapısı Şekil 2.15’de görülmektedir.



Şekil 2.15. İnsan GST A1-1 izoziminin bir altbiriminin ligandlı (sağ) ve ligandsız (solda) olarak kristalize edilmiş yapıları. Ligand içermeyen yapıda C uç segmenti hareketlidir. Bağlı ligand ve substituenti, aromatik aktif bölgelerinin içine sokulur. Benzil grubun uzaysal konumu iki yapıda farklılık gösterir.

Nilsson ve diğerleri (60)’dan alınmıştır.

2.4.5. GST İzozimlerin Biyolojik Sistemlerdeki Önemi

GST izozimleri arasında pi, alfa, mu ve teta sınıfının biyolojik sistemlerde çok çeşitli mekanizmalarda yer aldığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur.

GST pi sınıfı, oksidatif DNA-bazları, lipid hidroperoksid gibi lipid peroksidasyon ürünlerini ve hidroksialkanel, malondialdehid gibi lipid peroksidasyon türevlerini inaktive edebilir. Ayrıca GST pi duyarlı bir SH-grubu aracılığı ile ROT ile doğrudan tepkimeye girebilir ve GSH ile geri çevrilebilen disülfid oluşumu aracılığıyla ROT’de inaktivasyona neden olabilir. Bu özelliğinden dolayı GST oksidatif strese önemli rol oynar.

GST alfa ve teta sınıfının glutatyon peroksidaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında GST A4’ün katarakta ve ateroskleroza yol açan lezyonlara karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir. İnsanda

GST μ fenotipi, GST $\mu 1^*A$, GST $\mu 1^*B$ ve GST $\mu 1^*OU$ pozisyonunda bulunan 3 allel ile birlikte düşünülmektedir. GST μ izozimi sitotoksik ve genotoksik epoksitleri detoksifike etmede diğer GST'lerden daha etkilidir (61). GST $\mu 1^*$ genotipine sahip hastalar non fonksiyonel bir allele sahiptir ve bu yüzden izozim ksenobiyotikleri deaktive etme yeteneğine çok az sahiptir. GST θ izozimi de önemsiz bir genotip ile bu polimorfizmi gösterir (62).

2.4.6. GST'nin İnhibitörleri

GST inhibisyonu zıt etkiler gösterebilir. Bir yandan enzimin detoksifikasyon aktivitesi azaldığından enzimin inhibisyonu toksik bileşiklere neden olur; elektrofilik bileşikler yeterince detoksifike edilemediğinden kanser ve nörodejeneratif hastalıklarla sonuçlanan DNA, protein ve lipid hasarı meydana gelir (48). Öte yandan GST'nin detoksifikasyon aktivitesini inhibe etmek yararlı olabilir. GST kimyasal stres ve karsinogeneze yol açtığı bilinen çeşitli yapılar tarafından indüklenebilir. GST'yi indükleyen bileşiklerin bazılarının enzimin kendi substratı olduğu bilinmektedir. Klinikte kullanılan ilaçların çoğu GST'nin potansiyel substratı olduğu için ilaca direnç gelişiminde ve tedavide başarısızlığa düşülmesinde önemli bir etkendir. GST'lerin kemoterapi ajanlarına, insektisitlere, herbisidlere ve mikrobiyal antibiyotiklere karşı direnç gelişimine katkısı şaşırtıcı değildir (63-65). Bu yüzden GST aktivitesini inhibe edecek yönde geliştirilen bileşikler kanser terapisinde adjuvan olarak kullanılabilir.

GST'nin bilinen inhibitörleri son derece lipofilik bileşikler olan etakrinik asit ve GSH-türevi yapılardır. Sitozolik GST'nin inhibitörünün *in vivo* ortamda hücreye girebilmesi için lipofilik olması veya bir taşıyıcı sistemini kullanması gerekmektedir. GSH konjugatları ve sentetik analoglarını içeren GST inhibitörleri planlanmış, ancak var olan inhibitörlerin ya *in vivo* ortamda kullanılamayacak kadar toksik, ya da sadece *in vitro* ortamda etkili olduğu öne sürülmüştür (66,67).

GST inhibitörleri etkilerini GST aktif bölgelerindeki hidrofobik cebe bağlanarak gösterirler (H-bölgesi). İnhibitörün bu bölgeye bağlanması GST molekülünde üç boyutlu yapı değişikliğine yol açar, enzim aktivitesi kaybolur. Nonsubstrat ligandlar (parfirin, steroid ve safra tuzları), glutatyon konjugasyon

aktivitesinin inhibitörleridir ve enzimin H bölgesinin dışındaki bir bölgeye bağlanarak enzimi nonkompetitif inhibe ederler (68,69). Vitamin E'nin farklı formlarının (tokoferol, tokotrienol ve tokoferollerin farklı esterleri) GST P1-1'in aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (70). Bitki polifenollerin GST aktivitesinin potent inhibitörleri olduğu bilinmektedir. Afrikadaki tıbbi bitkilerden izole edilen Thonningia A, potent antioksidan etkili bir bileşiktir. Th A'nın GST'nin seçici bir inhibitörü olduğu bulunmuş ve GST'in neden olduğu toksisiteye karşı kemoprotektif bir ajan olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir (48).

GST aktivitesinin analizinde substrat olarak kullanılan çeşitli organik çözücülerin inhibitör etkileri araştırıldığında, tetrahidrofuran, asetonitril, metanol ve etanolün enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (72).

2.4.7. GST ile TAM⁺ Boyaların Etkileşimi

Daha önce yapılan çalışmalarda böcek ve sıçan karaciğer kaynaklı GST'lerin TAM⁺ boyalarca inhibe olduğu öne sürülmüş; inhibisyonun mekanizmasının genelde kompetitif (boya ile elektrofilik substrat yarışmakta) olduğu; ancak boya varlığında oluşan glutatyon-boya eklenti ürününün de inhibitör etki gösterebileceği bildirilmiştir (72,73). Bir diğer çalışmada insan GST izozimleri *E. Coli*'de ifade ettirilmiş; hGSTA 1-1 izoziminin MG ile inhibe olduğu, CV'nin ise ancak 50 µM derişimde inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir (14). MG'nin hGST A1-1 izozimini substrat GSH olduğunda kompetitif; CDNB olduğunda karışık tipte inhibe ettiği gösterilmiştir. MG'nin çoğunluğunun GSH ile eklenti durumunda olduğu ve eklentinin GSH ve hidrofobik bölgenin ikisine birden bağlanabileceği belirtilmiştir. Ayrıca MG'nin GST P1-1 izozimini her iki substrata göre nonkompetitif inhibe ettiği bildirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

Eritrosit kaynaklı katalaz eldesinde kullanılacak olan kan örneği, Hacettepe Üniversitesi Kan Bankası'ndan temin edildi.

Sığır karaciğeri kaynaklı ticari katalaz, at karaciğeri kaynaklı ticari glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH), 1- kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB), sığır serum albumini (BSA), MG, CV ve LMG Sigma (A.B.D.)'dan; potasyum fosfat (KP), sodyum klorür (NaCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) Merck (Almanya)'den satın alındı.

Stok boya çözeltileri son derişimleri 2 mM olacak şekilde etanol içinde hazırlandı ve daha sonra deney koşullarına uygun olarak etanol ile seyreltildi.

Santrifüj işlemlerinde Heraeus Sepatech Biofuge A santrifüjü, aktivite ve protein tayinlerinde Shimadzu UV-160 A spektrofotometresi kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması

Heparinize tam kanda siyanomethemoglobin yöntemiyle hemoglobin tayini yapıldı. Kan, 3000 x g'de santrifüj edilerek eritrosit pelletleri elde edildi; plazma ve buffycoat aspire edilerek uzaklaştırıldı. Eritrositler % 0.9 NaCl ile yıkandıktan sonra $-20^{\circ} C$ 'de saklandı. Kullanım öncesinde iki kez dondurulup çözülerek ve hacimce 3 kat fazla soğuk distile su ilavesiyle parçalandı ve eritrositler patlatıldı.

3.2.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

İnsan eritrosit kaynaklı ve sığır karaciğeri kaynaklı ticari katalaz aktiviteleri Ueda'nın önerdiği yöntem ile ölçüldü (7). Substrat stok çözeltisi (H_2O_2 , 40 mM) distile su içinde hazırlandı. Aktivite ölçümleri $30^{\circ} C$ 'de 50 mM potasyum fosfat (KP) tamponu (pH 7.4) ve 15 mM H_2O_2 içeren ortamda gerçekleştirildi. Tepkime, 1125 μ l

H₂O₂ ve 1825 µl tamponun 3 dakikalık preinkübasyonunu takiben, yeterli miktarda enzimin (50 µl) eklenmesiyle başlatıldı. Toplam hacim 3 ml idi. Enzim varlığında H₂O₂ bozunumu 240 nm'deki absorbans düşüşü üzerinden incelendi.

Bir enzim ünitesi (Ü), yukarıda belirtilen koşullarda 30°C ve pH 7.4'te dakikada 1 µmol H₂O₂'yi ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlandı. (H₂O₂ için $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.3. Katalaz - İnhibitör Etkileşiminin İncelenmesi

Enzim kinetiği çalışmalarında H₂O₂'in katalaz ile bozunumuna ilişkin ilk hızlar, 5-20 mM değişen derişimlerde H₂O₂, yaklaşık (1.72 U/ml) ($\Delta A/dk$ 'sı 0.075) eritrosit kaynaklı katalaz ve (2.27 U/ml) ($\Delta A/dk$ 'sı 0.099) sığır karaciğeri kaynaklı ticari katalaz içeren tepkime ortamlarında ölçüldü. Kinetik deneylerde eritrosit katalaz 1:500, ticari sığır karaciğeri katalaz 1:10 seyreltilerek kullanıldı.

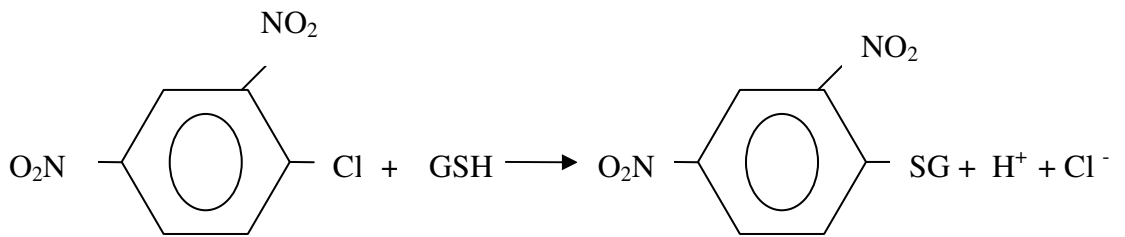
Boyaların inhibisyonunun incelendiği kinetik çalışmalarda substrat (H₂O₂) derişimi 5-20 mM, çalışılan boyaların derişimi 5-40 µM arasında değişmekte idi. Kinetik çalışmalarda genellikle boya (5-40 µM) ve enzim karışımı 30°C'de 1 saat preinkübe edildikten sonra KP (50 mM) ve H₂O₂ (5-20 mM) içeren ortama eklenerek tepkime başlatıldı.

Boya varlığında enzimin hızının, deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla karşılaştırılması ile inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında (1.1 U/ml) eritrosit lizatı, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve (1.1 U/ml) enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM boya, (1.1 U/ml) enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında boyanın son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısını incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, (1.1 U/ml) enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi.

3.2.4. GST'nin Aktivite Tayini

GST aktivitesi Mannervik'in yöntemi ile ölçüldü (47). GST aktivite tayini, enzim varlığında GSH ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) arasında oluşan konjugatın 340 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmakta idi. Her bir GST, GSH'ı nükleofilik tiyolata (GS^-) etkili şekilde deproton eden ve hidrojen bağ yapabilen tirozin ve serin kısımları içermektedir. Sıçan kaynaklı GST A1-1'in her bir altbiriminde 8 tirozin ve bir non-esansiyel triptofan bulunduğu; bu tirozinlerden Tyr-9'un GSH substratına hidrojen bağı ile bağlandığı ve nükleofilik tiyolat anyonunu stabilize ettiği bildirilmiştir (74). Tiyolat anyonu protonlanmış tiyolden daha çok nükleofil olduğundan katalitik açıdan avantajlıdır.

Tepkime mekanizması aşağıda gösterilmiştir. Bu tepkime iki aşamada gerçekleşmekte olup 1.aşamada redükte glutasyon proton (H^+) varlığında iyonizasyona uğramakta ve tiyolat anyonu (GS^-) oluşmaktadır. 2. aşamada ise tiyolat anyonu aromatik çekirdeğin 1. C'u üzerine saldırmakta, Meisenheimer konjugatı oluşmakta ve oluşan bu 1-(S-glutatyonyl)-2,4-dinitrobenzen (GS-DNB) bileşiği 340 nm'de izlenmektedir.



Substrat (CDNB) stoku 20 mM olacak şekilde % 95 etanolde hazırlandı. GSH (20 mM) distile suda hazırlandı ve buz üzerinde tutuldu. Aktivite ölçümleri $37^\circ C$ 'de 410 μ l 2 mM EDTA-200 mM KP tamponu (pH 6.5), 500 μ l distile su, 50 μ l GSH (1 mM) ve yaklaşık (11.25 mU/ml) at karaciğeri kaynaklı ticari GST ($\Delta A/dk$ 'sı 0.108) içeren ortamda gerçekleştirildi. $37^\circ C$ 'de 5 dakikalık preinkübasyon sonunda tepkime, 25 μ l CDNB (0.5 mM) eklenerek başlatıldı. Toplam hacim 1 ml idi. Tepkime, 340 nm'deki absorbans artışı üzerinden 4 dakika süreyle izlendi. Enzim

içermeyen analiz karışımı kontrol olarak kullanıldı. Net aktivite, enzim içeren karışımdaki tepkime hızından kontrolün hızının çıkarılması ile hesaplandı.

Enzim Ünitesi (Ü): 1mM GSH ve 0.5 mM CDNB varlığında, 37°C'de dakikadaki 1 µmol S-glutatyonyl-2,4-dinitrobenzen oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. Ürüne ait $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir.

3.2.5. GST'nin Kinetik Davranışı ve GST-İnhibitör Etkileşiminin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan TAM⁺ boyalar, 2 mM stok çözelti olarak olarak etanol içinde hazırlandı ve deney karışımına son derişim 0-40 µM olacak şekilde eklendi. Etanolün deney ortamındaki son derişimi % 0.5 idi. Bu derişimdeki etanolün GST aktivitesi üzerine bir etkisi olmadığı görüldü. Boya çözeltilerinin GST ile etkileşimlerinin mekanizması, enzimin substratları olarak kabul edilen CDNB ve GSH derişimleri değiştirilerek çalışıldı.

Boyalarla GST'in etkileşimin incelendiği kinetik çalışmalarda CDNB substrat olarak kabul edildiğinde deney ortamı, [GSH], 1 mM; [CDNB], 0.1-0.7 mM; enzim (11.25 mU/ml) ve [boya], 0-40 µM içermekte idi. Enzim ve boya 37°C'de birlikte 5 dakika preinkübe edildikten sonra sırasıyla KP, GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı.

GSH substrat olarak kabul edildiğinde ise deney ortamı, [GSH], 0.2-1.5 mM; [CDNB], 0.5 mM; enzim (11.25 mU/ml) ve [boya], 0-40 µM içermekte idi. Enzim ve boya 37° C'de 5 dakika preinkübe edildikten sonra sırasıyla KP, GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı.

3.2.6. Protein Tayini

Protein derişimleri standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Bradford yöntemine göre yapıldı (11).

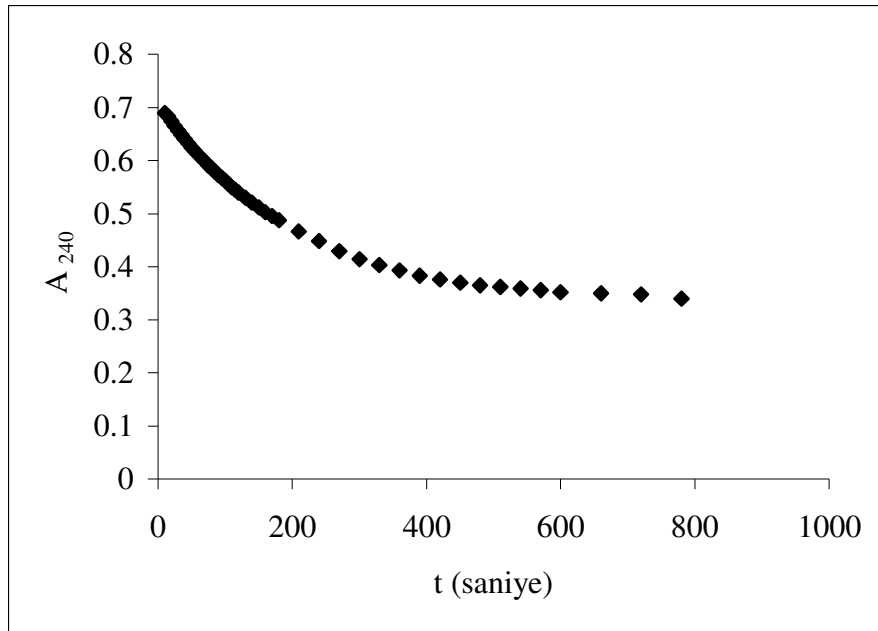
3.2.7. Kinetik Verilerin Değerlendirilmesi

Kinetik verilerin değerlendirilmesinde ‘‘Systatistica Version 4’’ istatistik paket programı ve non-linear regression programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Eritrosit ve Sığır Karaciğer Kaynaklı Katalazların Kinetik Davranışı

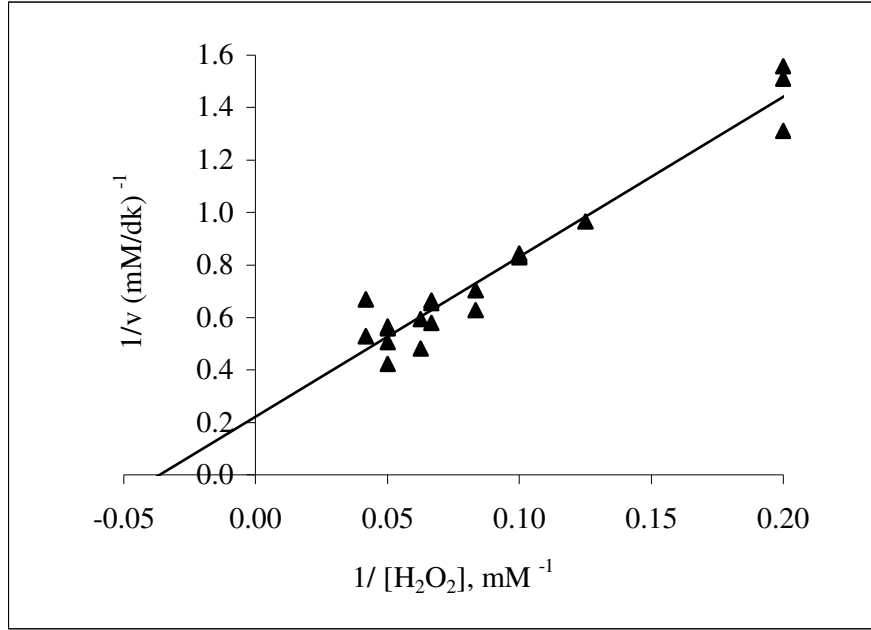
İnsan eritrosit kaynaklı katalaz, H.Ü. Kan Bankasından alınan lizattan izole edildi. Katalaz aktivite tayininde deney ortamında; 1125 µl substrat (H_2O_2 , son derişim 15 mM), 50 µl eritrosit kaynaklı katalaz (1:500 seyreltilmiş) ve 1175 µl 50 mM potasyum fosfat (KP) tamponu (pH 7.4) bulunmakta idi. Bu koşullarda $30^\circ C$ 'de eritrosit kaynaklı katalazın aktivitesi 1.72 ± 0.09 U/ml eritrosit lizatu olarak bulundu. H_2O_2 'in pH 7.4'te eritrosit kaynaklı katalaz ile bozunumu Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Hidrojen peroksitin eritrosit kaynaklı katalaz ile bozunumu. [H_2O_2], 15 mM; sıcaklık $30^\circ C$ 'dir.

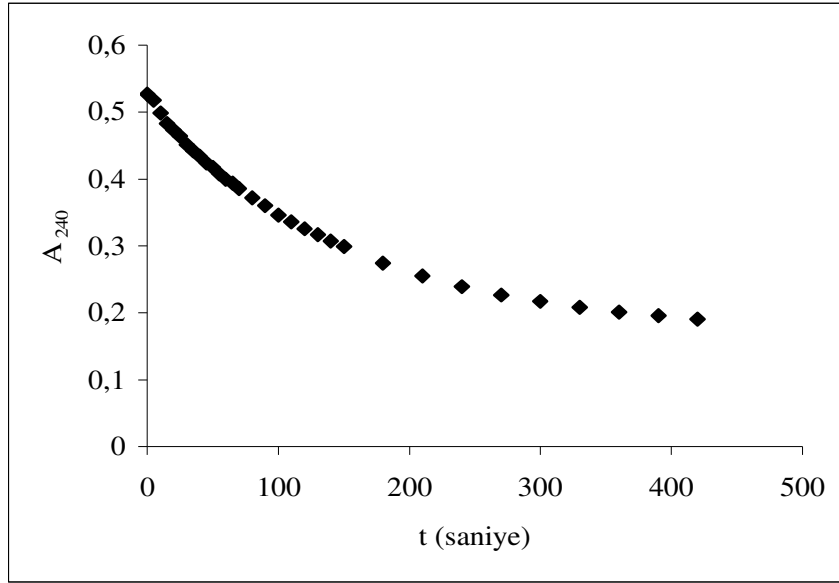
Eritrosit kaynaklı katalazın kinetiğinin, substratı olan H_2O_2 'in 5-20 mM aralığında Michaelis Menten kinetiğine uyduğunu, yüksek substrat derişimlerinde ise kinetiğın Michaelis Menten kinetiğinden saptığı gözlemlendi (veriler gösterilmedi). Bu nedenle kinetik çalışmalarda, substrat derişimi 0-20 mM aralığında tutuldu.

Eritrosit kaynaklı katalazın substratı için olan kinetik parametreleri 0-20 mM H_2O_2 derişiminde Lineweaver - Burk grafiğinden $K_m = 29.52 \pm 2.62$ mM ve $V_m = 4.5$ mM/dk olarak hesaplandı (Şekil 4.2).



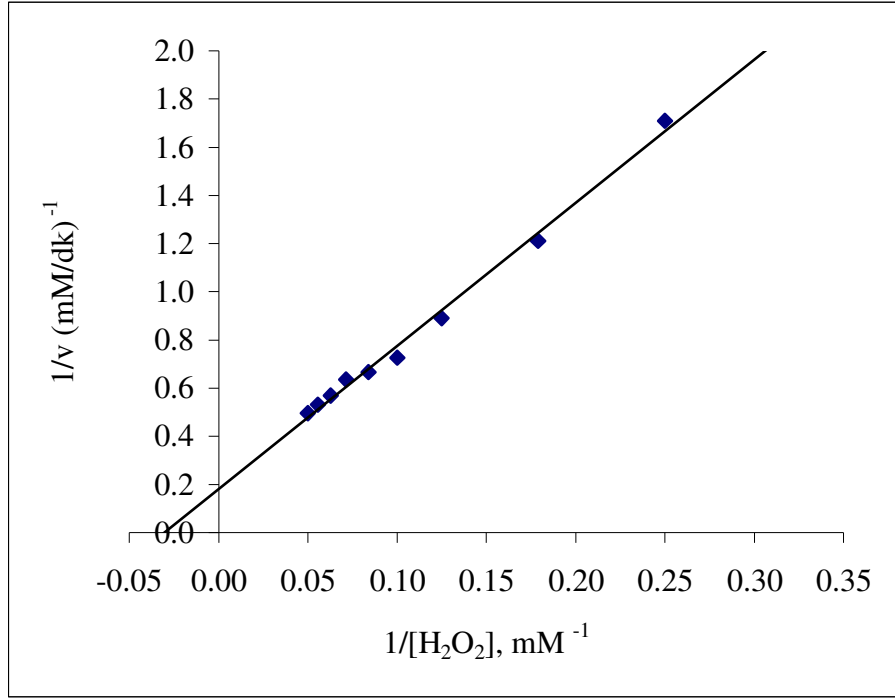
Şekil 4.2. Eritrosit kaynaklı katalaza ait Lineweaver-Burk grafiği.
[H_2O_2], 5-20 mM.

Sığır karaciğer kaynaklı ticari katalazın substratı olan H_2O_2 ile bozunumu Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Deney ortamında 1:10 seyreltilmiş halde 30 μl ticari katalaz, 5-20 mM derişimlerde H_2O_2 ve KP bulunmakta idi. Bu koşullarda ticari katalazın aktivitesi 2.27 ± 0.35 U/ml olarak hesaplandı.



Şekil 4.3. Hidrojen peroksitin sığır karaciğer kaynaklı katalaz ile bozunumu. $[H_2O_2]$, 16 mM; sıcaklık $30^\circ C$ ' dir.

Sığır karaciğer kaynaklı katalaz aktivitesine ait ilk-hız değerlendirmeleri, $[H_2O_2]$, 4-20 mM aralığında çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden $K_m = 32.88 \pm 3.10$ mM ve $V_m = 5.53 \pm 0.11$ mM/dk olarak hesaplandı (Şekil 4.4).



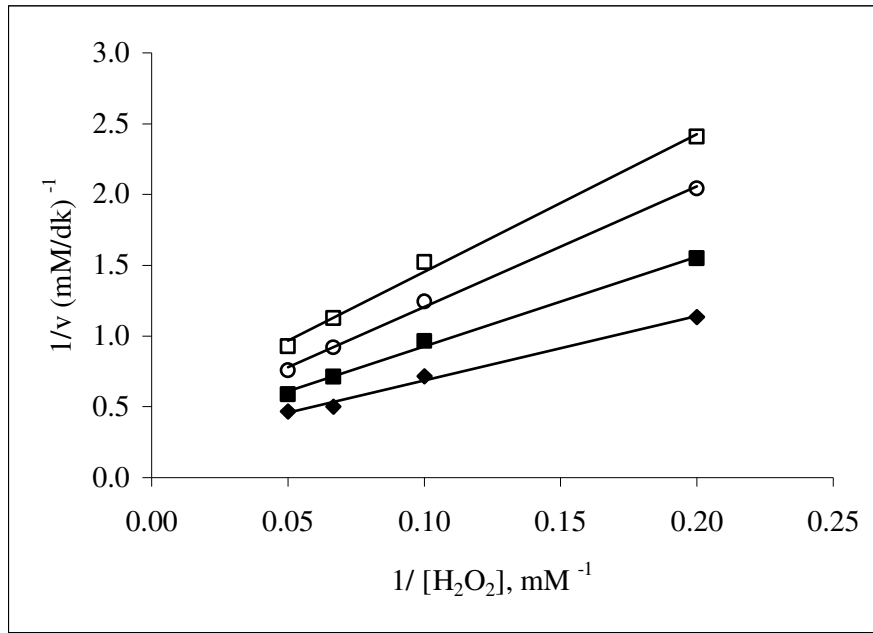
Şekil 4.4. Sığır karaciğeri kaynaklı katalaza ait Lineweaver-Burk grafiği. [H₂O₂], 4-20 mM.

4.2. Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile TAM⁺ Boyaların Etkileşimi

Katalaz ve TAM⁺ boyaların etkileşimi ile ilgili spektral değişimler boya ve H₂O₂ etkileşiminin engelleyici rolü nedeniyle kısıtlı olarak incelenebildi. Örneğin 620 nm'de (MG'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyu) etkileşim incelenirken MG'nin KP ve H₂O₂ etkisiyle zamanla solduğu gözlemlendi. Substrat derişimi 20 mM'ın üzerinde tutulduğunda kuvvet içinde H₂O₂'in hızlı bozunumu ve zamanla oluşan baloncuklar nedeniyle zorluklar yaşandı. Ayrıca kullanılan boyaların ve H₂O₂'in bir arada iken okuma sınırlarını aşan yüksek absorbans vermesi, kinetik çalışmalarda her iki değişkenin de belli derişim aralıklarında tutulmasını zorunlu kıldı.

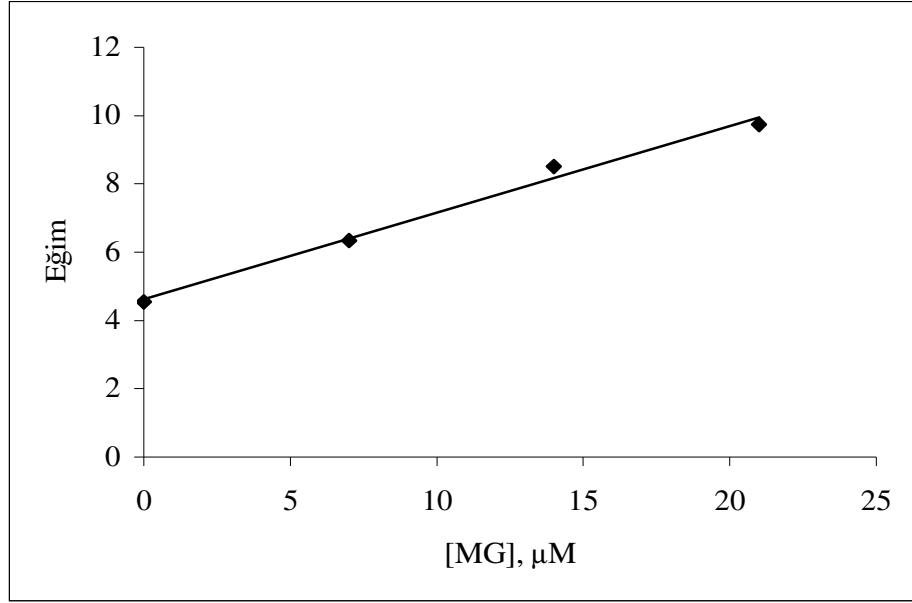
4.2.1. MG'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.5'de görülmektedir.

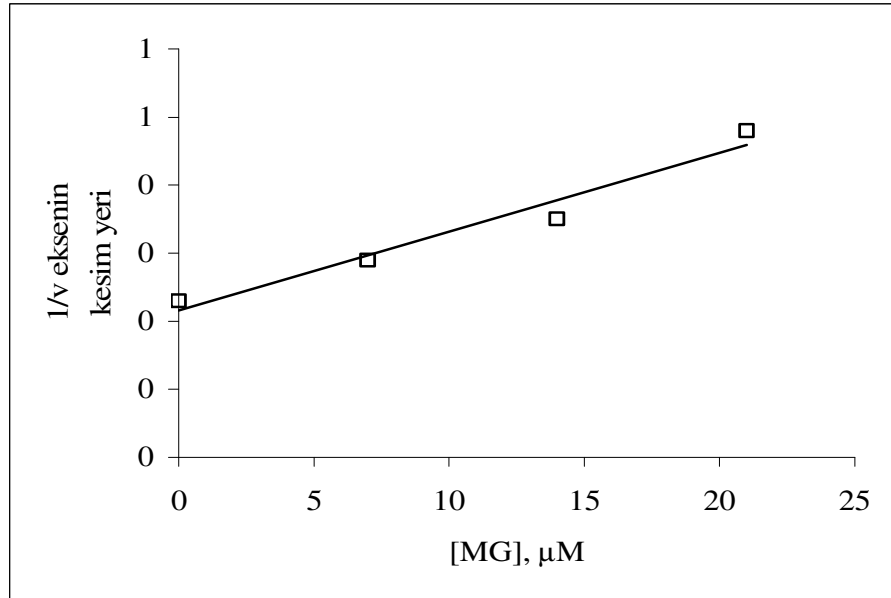


Şekil 4.5. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri. [H₂O₂], 5-20 mM; [MG], (-◆-) 0, (-■-) 7, (-○-) 14, (-□-) 21 μM. $y = 4.55x + 0.23$, $y = 6.34x + 0.29$, $y = 8.51x + 0.35$, $y = 9.74x + 0.48$, $r^2 = 0.99$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerleri boya yokluğunda elde edilen değerlerle yaklaşık aynı, ancak V_m değerleri farklı bulundu. Eğim ve $1/v$ eksenin kesim değerleri [MG]'ne karşı grafikleğinde doğruların kesim noktalarından birbirine yakın K_i değerlerinin bulunduğu (Şekil 4.6a ve b sırasıyla 18.26 ve 19.11 μM) görüldü ve inhibisyonun saf nonkompetitif olabileceği düşünüldü. K_i değeri 18.68 ± 0.28 μM olarak hesaplandı.



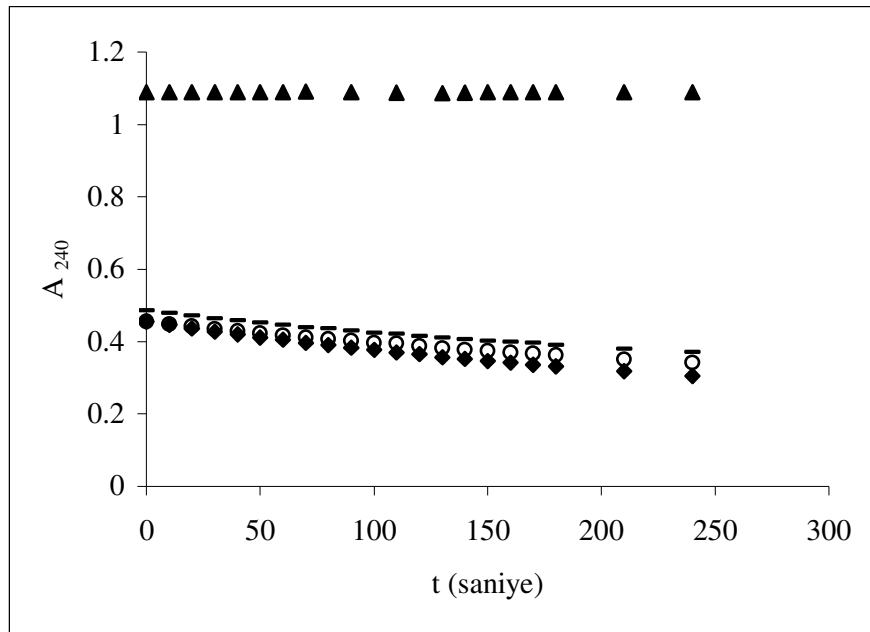
Şekil 4.6a. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonununun ait ikincil grafiği. Eğim (-◆-), $y = 0.25x + 4.62$, $r^2 = 0.99$.



Şekil 4.6b. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonununun ait ikincil grafiği. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 0.012x + 0.22$, $r^2 = 0.96$.

MG varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile

inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 1.10 U/ml eritrosit lizati, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 1.10 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM MG, 1.10 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında MG'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısı incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 1.10 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.7'de görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin MG ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.

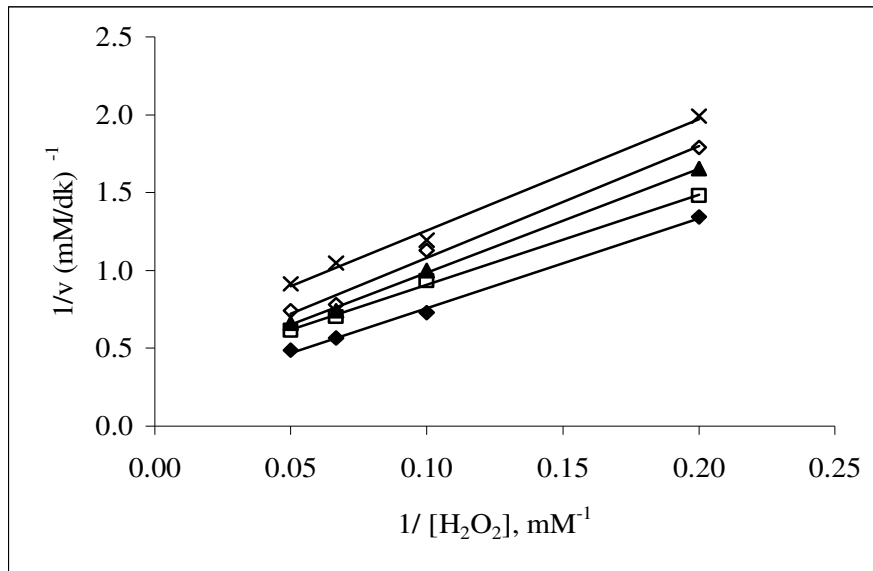


Şekil 4.7. Eritrosit kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (-◆-) Kontrol; (-○-) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (- -) Enzim ve MG (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (-▲-) E ve MG (40 µM) inkübasyon yok.

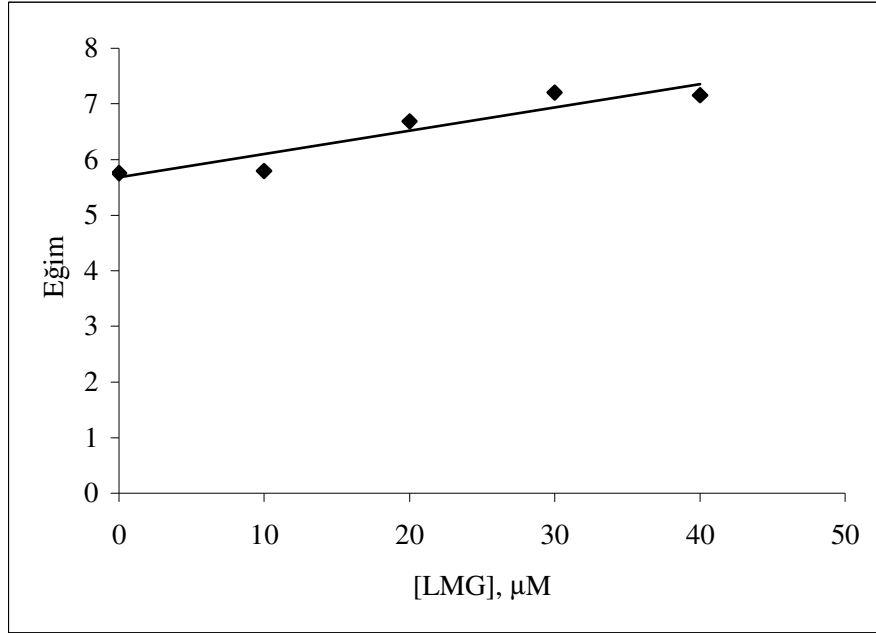
MG'in eritrosit kaynaklı katalazı saf nonkompetitif tipte ve tersinir olarak inhibe etmesi, katyonik ve hidrofobik özellikli boyanın enzimde büyük olasılıkla aktif bölge dışında bir bölgeyle etkileştiği fikrini verdi. İnhibisyonun klasik nonkompetitif davranış gösterdiği; boya ve substratın enzimde farklı bölgelere gelişigüzel, tersinir ve substrattan bağımsız olarak bağlandıkları düşünüldü.

4.2.2. LMG'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

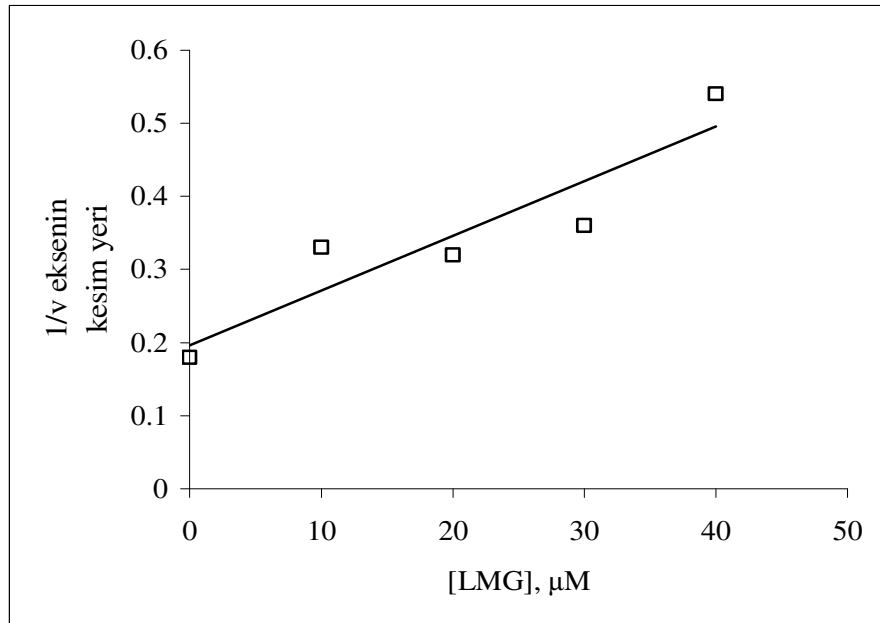
Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.8'de görülmektedir. Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m ve V_m değerleri, boya yokluğunda elde edilen değerlerden farklı bulundu. Eğimin ve $1/v$ eksenin kesim noktalarının [LMG]'ne karşı grafiklenmesi ile elde edilen doğrulardan (Şekil 4.9a ve b) sırasıyla K_i değeri $135.24 \pm 15.10 \mu\text{M}$ ve αK_i değeri $26.08 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı ve inhibisyon tipinin doğrusal karışık tip inhibisyon modeline uyabileceğini düşünüldü. α değerinin 0.19 olarak bulunması, doğruların $1/S$ ekseninin altında bir noktada kesiştiklerini gösterdi.



Şekil 4.8. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. $[H_2O_2]$, 5-20 mM; [LMG], (-◆-) 0, (-□-) 10, (-▲-) 20, (-◇-) 30, (-X-) 40 μM . $y = 5.76x + 0.18$, $y = 5.79x + 0.33$, $y = 6.69x + 0.32$, $y = 7.20x + 0.36$, $y = 7.16x + 0.54$, $r^2 = 0.99$.

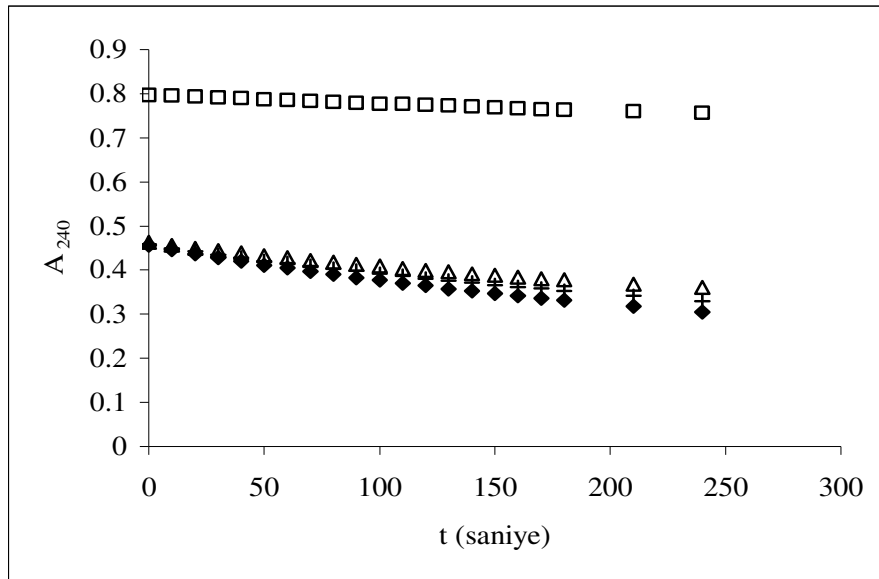


Şekil 4.9a. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.042x + 5.68$, $r^2 = 0.88$.



Şekil 4.9b. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 0.0075x + 0.19$, $r^2 = 0.85$.

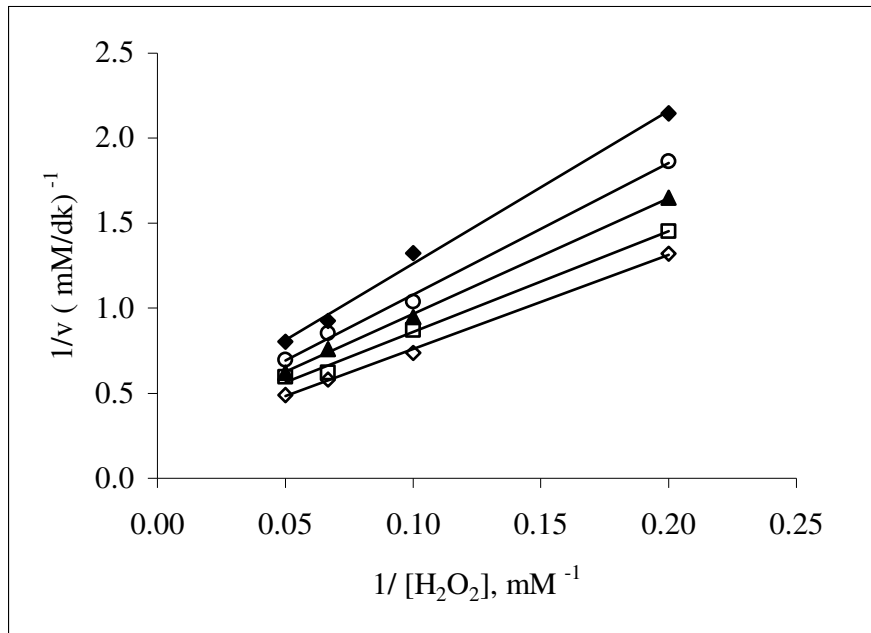
LMG varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 1.10 U/ml eritrosit lizatı, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 1.10 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM LMG, 1.10 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında LMG'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısını incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 1.10 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.10'da görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin LMG ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.



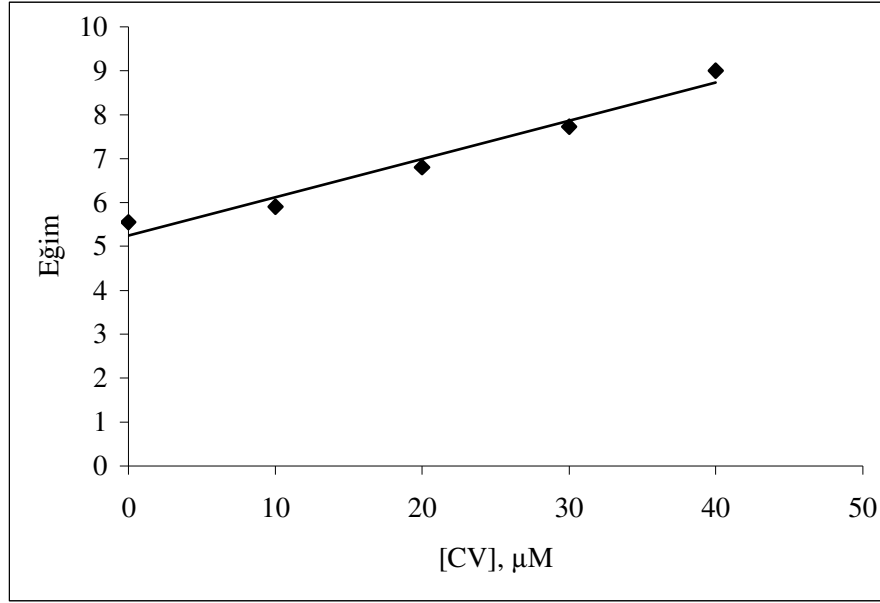
Şekil 4.10. Eritrosit kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (-◆-) Kontrol; (-+ -) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (-△-) Enzim ve LMG (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (-□-) Enzim ve LMG (40 µM) inkübasyon yok.

4.2.3. CV'nin Eritrosit Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

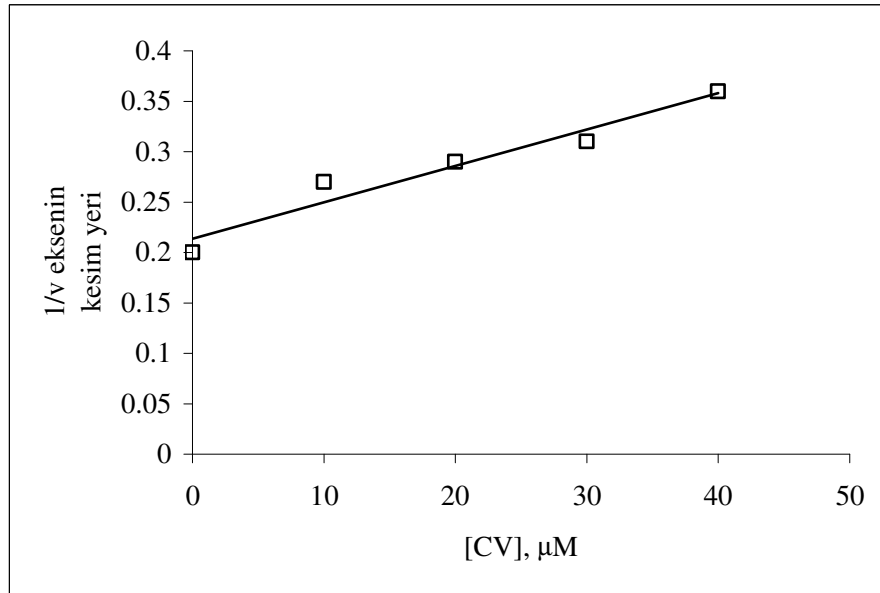
Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.11'de görülmektedir. Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerleri boya yokluğunda elde edilen değerlere yakın bulunurken, V_m değerleri farklı bulundu. Eğim ve $1/v$ eksen kesim değerleri [CV]'ne karşı grafiklendiğinde doğruların kesim noktalarından K_i değerlerinin birbirine yakın olduğu (Şekil 4.12a ve b sırasıyla 60.32 ve 61.02 μM) görüldü ve inhibisyonun saf nonkompetitif olabileceği düşünüldü. K_i değeri $60.67 \pm 1.02 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Boyanın enzimde aktif bölge dışında bir bölgeyle etkileştiği ve substrattan bağımsız olarak enzime bağlandığı düşünüldü.



Şekil 4.11. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. $[H_2O_2]$, 5-20 mM; [CV], (-◇-) 0, (-□-) 10, (-▲-) 20, (-○-) 30, (-◆-) 40 μM . $y = 5.55x + 0.20$, $y = 5.90x + 0.27$, $y = 6.80x + 0.29$, $y = 7.73x + 0.31$, $y = 9.00x + 0.36$, $r^2 = 0.99$.



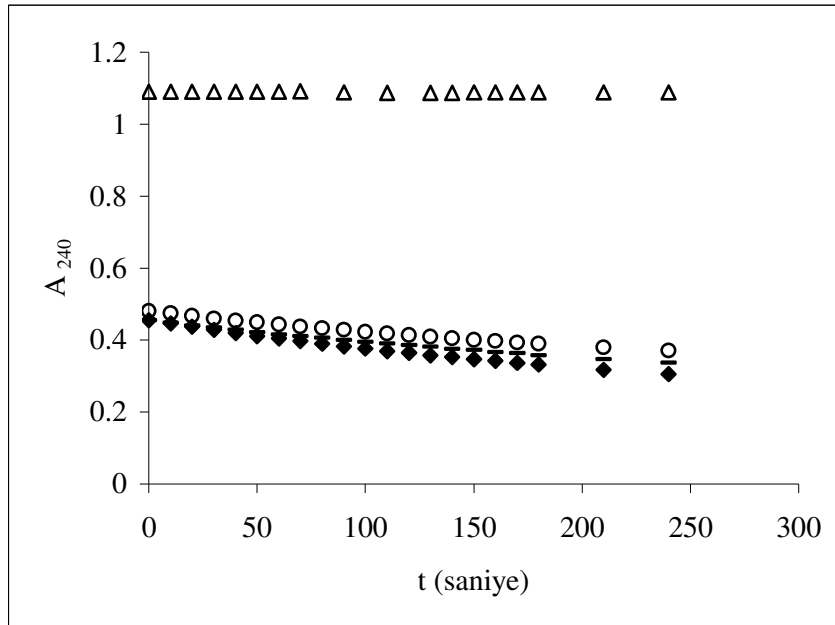
Şekil 4.12a. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.087x + 5.25$, $r^2 = 0.97$.



Şekil 4.12b. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 0.004x + 0.21$, $r^2 = 0.94$.

CV varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile

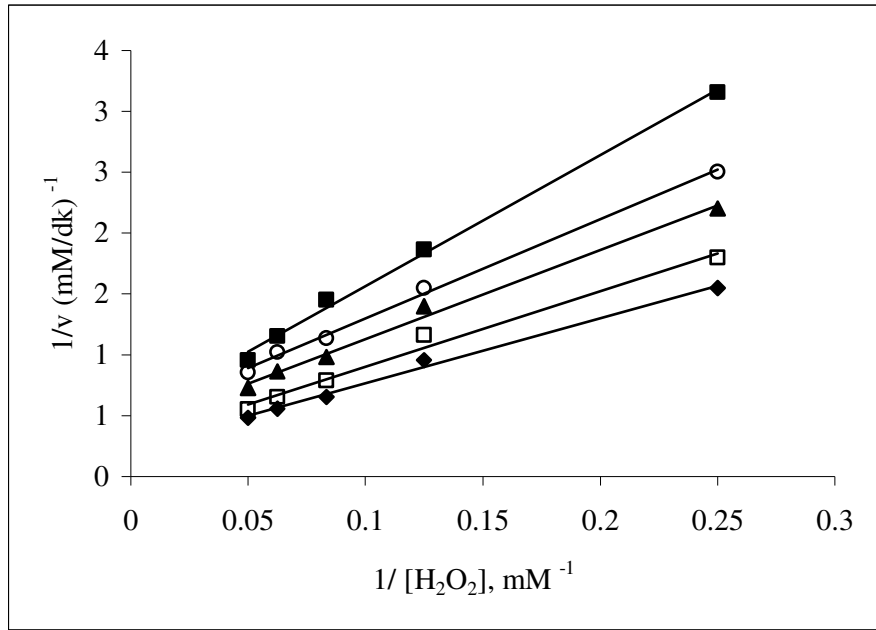
inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 1.10 U/ml eritrosit lizati, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 1.10 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM CV, 1.10 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında CV'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısı incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 1.10 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.13'de görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin CV ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.



Şekil 4.13. Eritrosit kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (-◆-) Kontrol; (-○-) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (-○-) Enzim ve CV (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (-△-) Enzim ve CV (40 µM) inkübasyon yok.

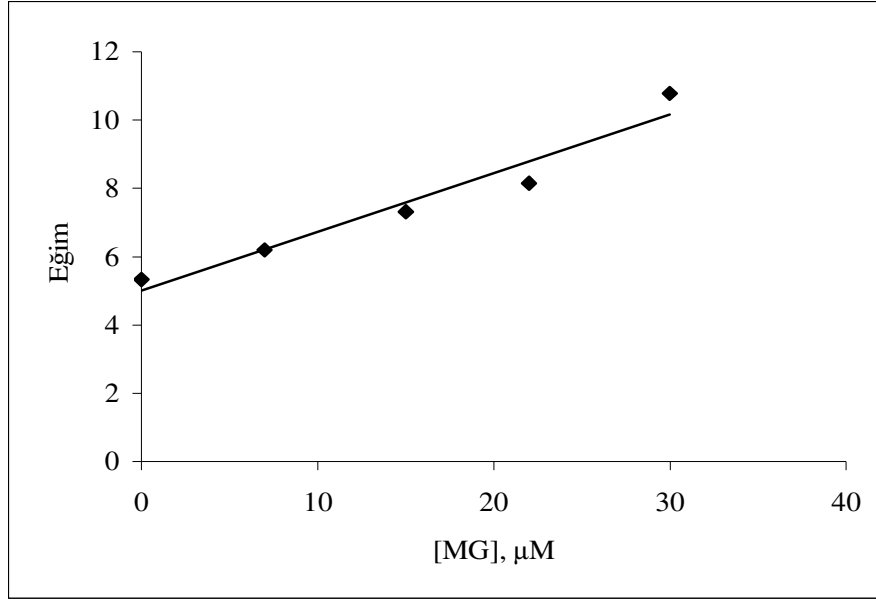
4.2.4. MG'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

Sığır karaciğeri kaynaklı ticari katalaz stok (1.4 mg/ml, 4200 U/ml) olarak hazırlandı. Stok 1: 10 dilüe edilerek kullanıldı. Deney ortamındaki enzim aktivitesi 2.27 ± 0.35 U/ml idi. İnhibisyon deneylerinde enzim ve MG (0-30 μ M) 30 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Tepkime, H₂O₂ ve tampona karışımın eklenmesiyle başlatıldı. [H₂O₂], 4-20 mM arasında kullanıldı. Boya varlığında K_m değerlerinin boya yokluğunda elde edilen değere yakın olduğu ancak, V_m değerlerinin farklı olduğu görüldü (Şekil 4.14).

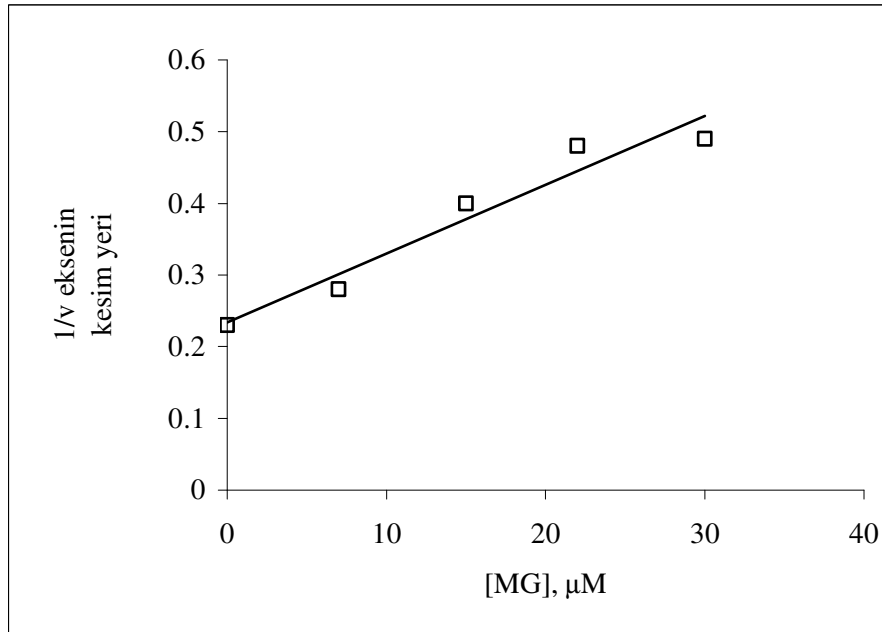


Şekil 4.14. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri. [H₂O₂], 4-20 mM; [MG], (-◆-) 0, (-□-) 7, (-▲-) 15, (-○-) 22, (-■-) 30 μ M. $y = 5.33x + 0.23$, $y = 6.20x + 0.28$, $y = 7.32x + 0.40$, $y = 8.15x + 0.48$, $y = 10.78x + 0.49$, $r^2 = 0.99$.

Boya varlığında ve yokluğunda doğrulara ait denklemlerden elde edilen eğim ve 1/v eksenin kesim değerleri [MG]'ne karşı grafiklendiğinde doğruların kesim noktalarından elde edilen K_i değerlerinin birbirine yakın bulunuşu (Şekil 4.15a ve b sırasıyla 29.25 μ M ve 25.09 μ M), inhibisyonun saf nonkompetitif olabileceğini düşündürdü. K_i değeri 27.17 ± 2.88 μ M olarak hesaplandı.



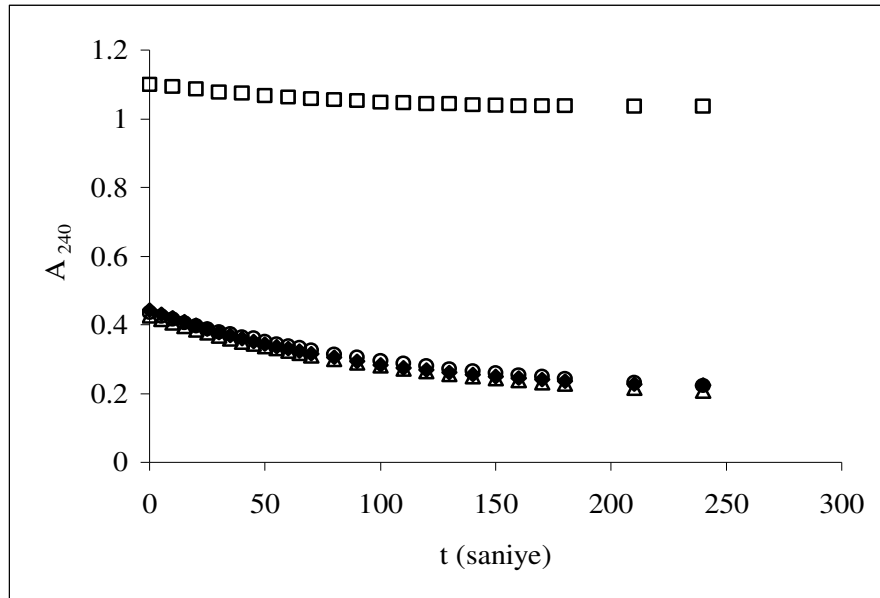
Şekil 4.15a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ilişkin ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.17x + 5.01$, $r^2 = 0.94$.



Şekil 4.15b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ilişkin ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 0.01x + 0.23$, $r^2 = 0.94$.

MG varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile

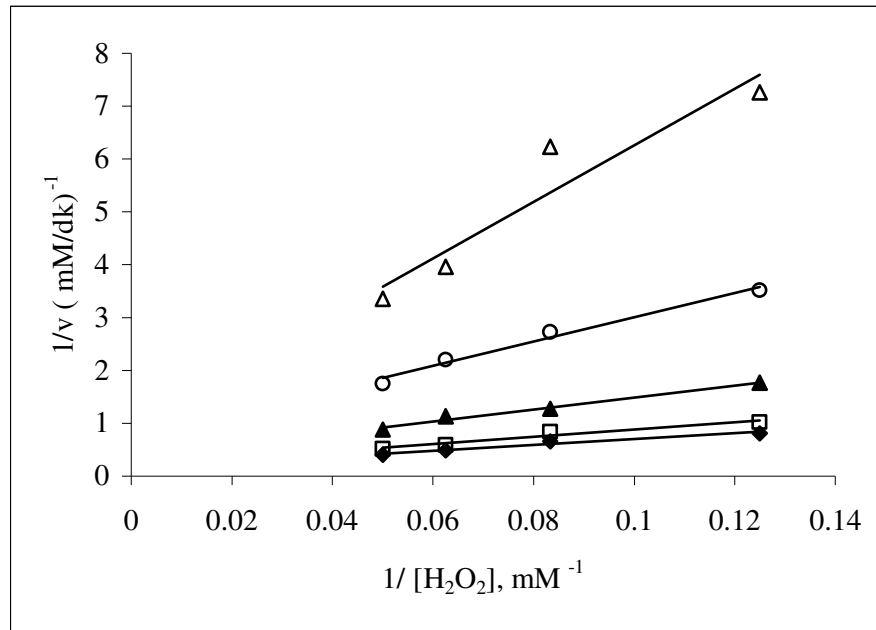
inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 2.34 U/ml ticari sığır karaciğeri kaynaklı katalaz, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 2.34 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM MG, 2.34 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında MG'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısını incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 2.34 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.16'da görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin MG ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.



Şekil 4.16. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın MG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (—◆—) Kontrol; (—○—) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (—△—) Enzim ve MG (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (—□—) Enzim ve MG (35 µM) inkübasyonu yok.

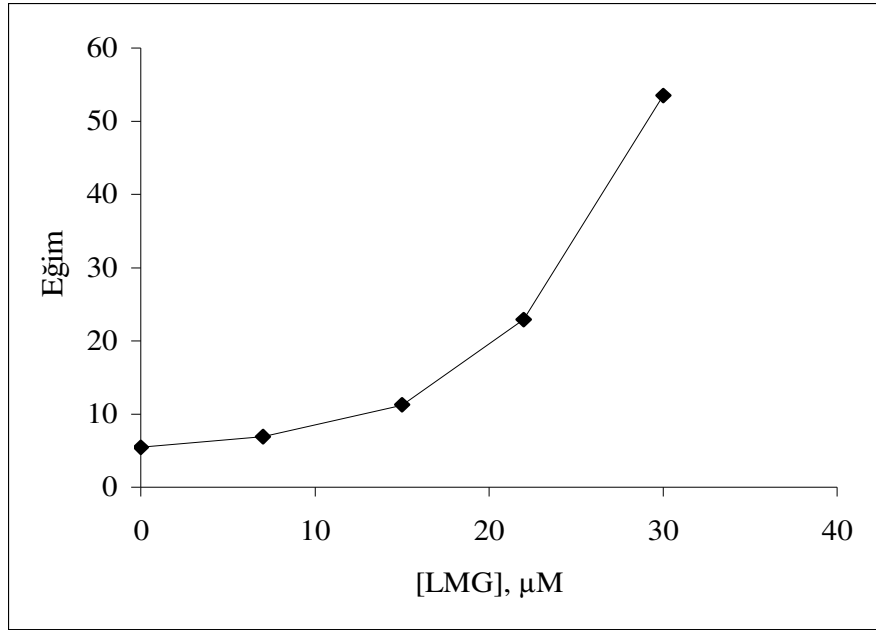
4.2.5. LMG'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

İnhibitör deneylerinde enzim ve LMG (0-30 μM) 30 $^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edildi. $[\text{H}_2\text{O}_2]$, 8-20 mM arasında kullanıldı. Tepkime, bu karışımın H_2O_2 ve tampona eklenmesiyle başlatıldı. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.17'de görülmektedir.

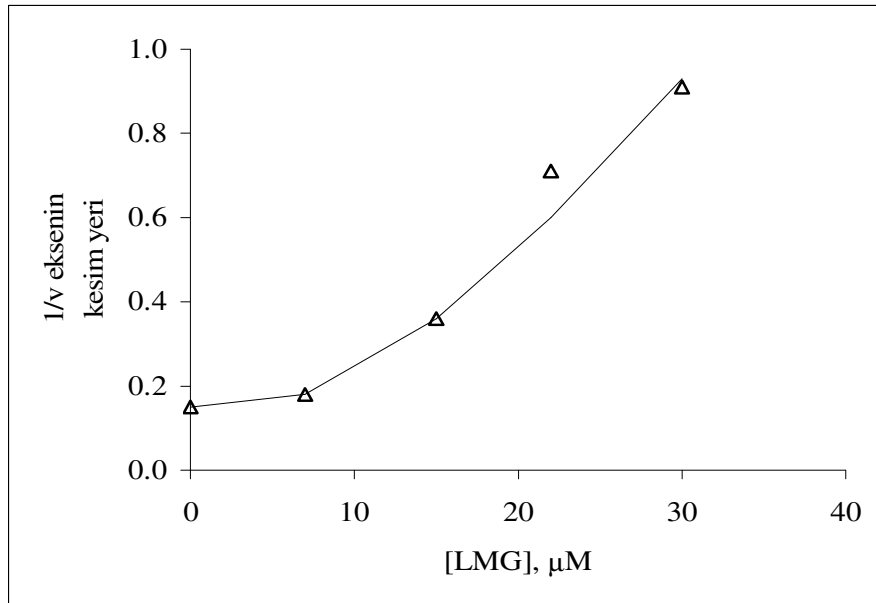


Şekil 4.17. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. $[\text{H}_2\text{O}_2]$, 8-20 mM; [LMG], (-◆-) 0, (-□-)7, (-▲-) 15, (-○-) 22, (-△-) 30 μM . $y = 5.47x + 0.15$, $y = 6.94x + 0.18$, $y = 11.26x + 0.36$, $y = 22.93x + 0.71$, $y = 53.50x + 0.91$, $r^2 = 0.95$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerlerinin boya yokluğunda elde edilen değerlere yakın, ancak V_m değerlerinin farklı olduğu görüldü. Eğim ve $1/v$ eksen kesim değerlerinin [LMG]'ne karşı grafiklenmesi sonucu parabol elde edilmesi, K_i değerinin hesaplanmasını engelledi. Boyanın enzim üzerinde birden fazla bölgeye bağlanabileceği öngörülmeyle birlikte; deney tekrarının az olması, parabolün deney hatasından kaynaklanabileceği fikrini verdi (Şekil 4.18a- 4.18b).



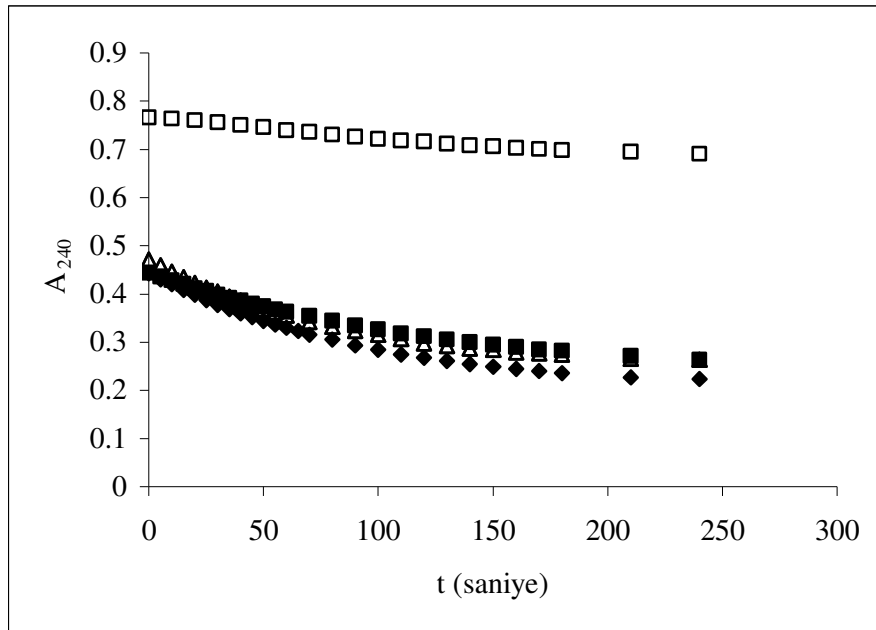
Şekil 4.18a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik.



Şekil 4.18b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik.

LMG varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile

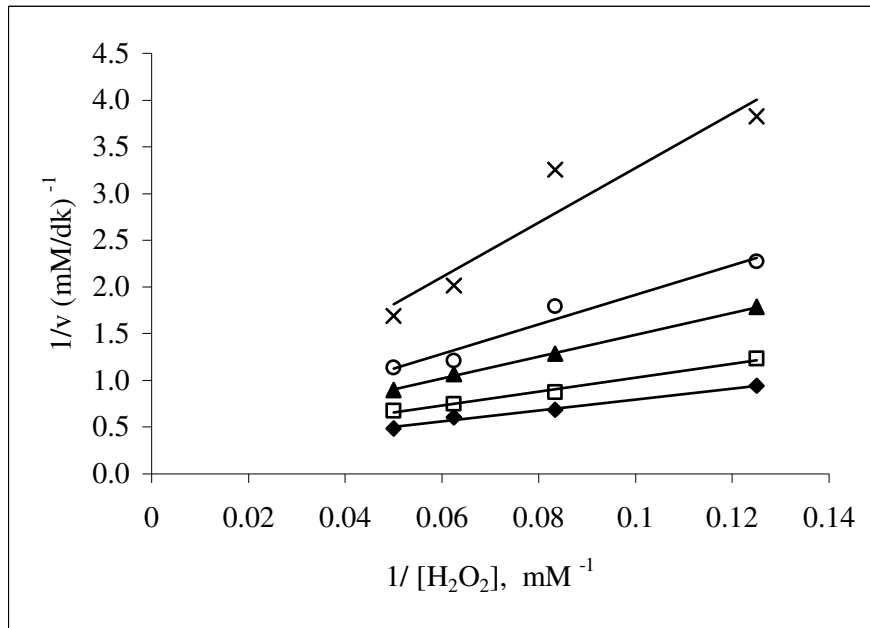
inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 2.34 U/ml ticari sığır karaciğeri kaynaklı katalaz, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 2.34 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM LMG, 2.34 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında LMG'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısını incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 2.34 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.19'da görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin LMG ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.



Şekil 4.19. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın LMG ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (◆) Kontrol; (■) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (△) Enzim ve LMG (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (□) Enzim ve LMG (35 µM) inkübasyon yok.

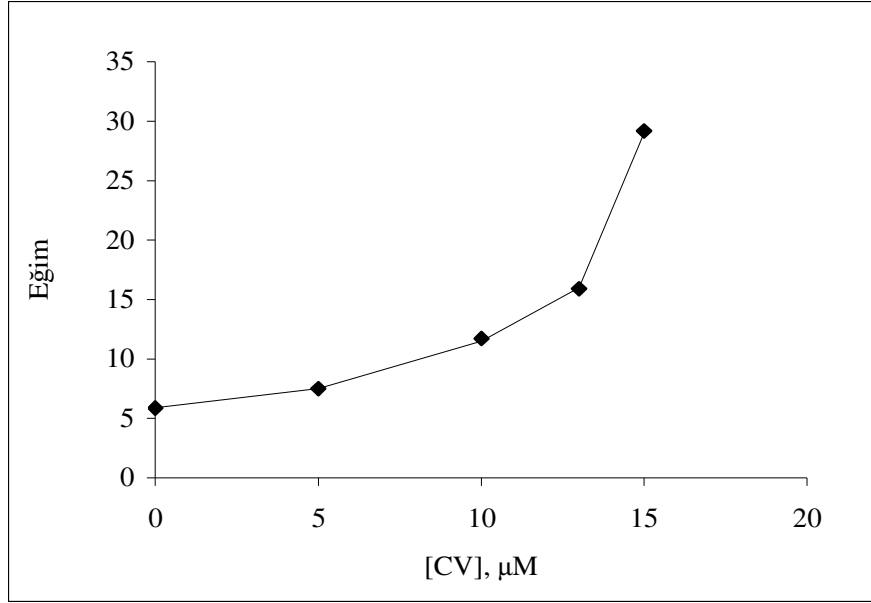
4.2.6. CV'nin Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz ile Etkileşimi

Enzim ve CV (0-15 μM) 30 °C'de 30 dakika inkübe edildi. $[\text{H}_2\text{O}_2]$, 8-20 mM arasında kullanıldı. Tepkime, karışımın H_2O_2 ve tampona eklenmesiyle başlatıldı. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.20'de görülmektedir.

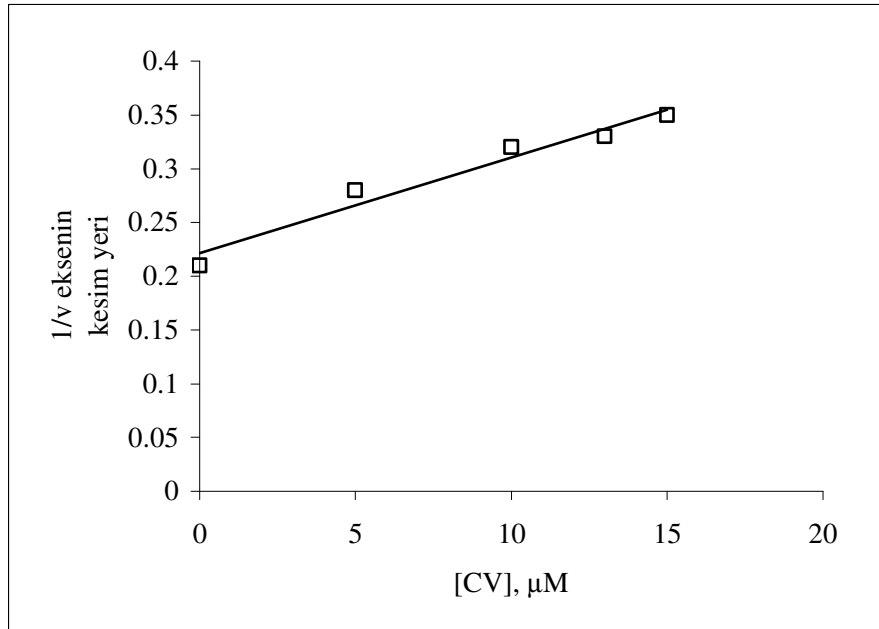


Şekil 4.20. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait Lineweaver-burk grafikleri. $[\text{H}_2\text{O}_2]$, 8-20 mM; [CV], (-◆-) 0, (-□-) 5, (-▲-) 10, (-○-) 13, (-x-) 15 μM . $y = 5.88x + 0.21$, $y = 7.50x + 0.28$, $y = 11.74x + 0.32$, $y = 15.91x + 0.33$, $y = 29.20x + 0.35$, $r^2 = 0.95$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerleri boya yokluğunda elde edilen değerlere yakın, ancak V_m değerleri farklı bulundu. Eğimin [CV]'ne karşı grafikleşmesi sonucu parabol elde edilmesi, K_i değerinin hesaplanmasını engelledi. Boyanın enzim üzerinde birden fazla bölgeye bağlanabileceği öngörülmekle birlikte; deney tekrarının az olması, parabolün deney hatasından kaynaklanabileceği fikrini verdi (Şekil 4.21a-4.22b).



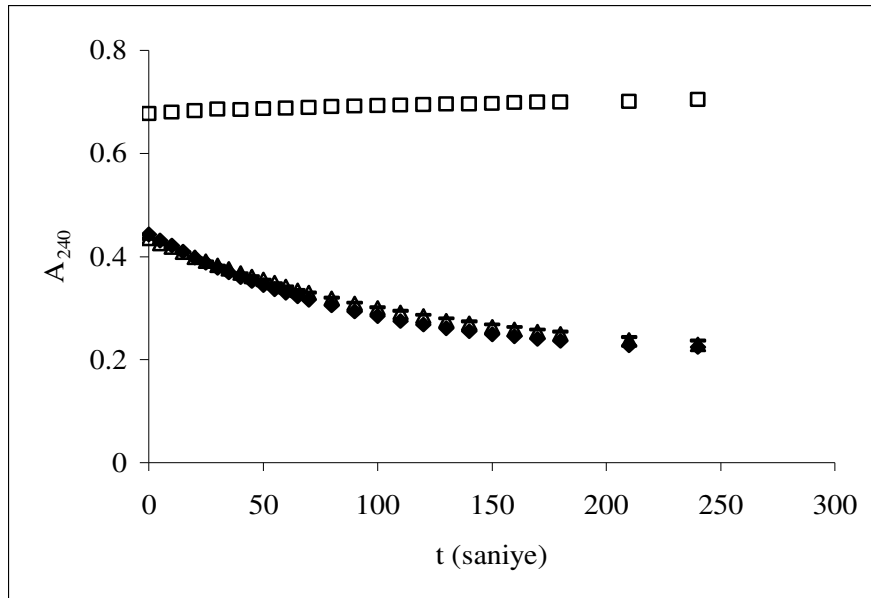
Şekil 4.21a. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik.



Şekil 4.21b. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v ekseninin kesim yeri (-□-), $y = 0.009x + 0.22$, $r^2 = 0.96$.

CV varlığında enzimin hızının deney ortamındaki boya derişiminin 1:50 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen hızla enzimin hızının karşılaştırılması ile

inhibisyonun geri dönüşümü izlendi. Kontrol deney ortamında 2.34 U/ml ticari sığır karaciğeri kaynaklı katalaz, 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ bulunmakta idi. Birinci deney ortamında 40 µM boya ve 2.34 U/ml enzim inkübe edilmeksizin tampon ve 16 mM H₂O₂ karışımına eklendi ve tepkime izlendi. İkinci deney ortamında 35 µM CV, 2.34 U/ml enzim, ve 100 mM tampon 30 dakika preinkübe edildi; bu karışım 50 mM KP ve 16 mM H₂O₂ içeren ortama eklendi. Bu sistemde deney ortamında CV'nin son derişimi 0.8 µM idi. Boyanın içinde çözüldüğü etanolün boyanın inhibitör etkisine katkısını incelemek amacıyla hazırlanan üçüncü deney ortamında, 2.34 U/ml enzim, 100 mM tampon ve etanol (kullanılan boya hacmine eşit) 30 dakika preinkübe edildikten sonra tepkime ortamına (50 mM KP ve 16 mM H₂O₂) eklendi ve tepkime izlendi. Sığır karaciğer kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafikleri Şekil 4.22'de görülmektedir. İkinci ve üçüncü deney ortamları uyarınca inhibe edilen karışımlara ait hızlar, kontrol deneyin tepkime hızına yakın bulundu ve enzimin CV ile inhibisyonunun geri dönüşümlü olduğu fikrine varıldı.



Şekil 4.22. Sığır karaciğeri kaynaklı katalazın CV ile inhibisyonuna ait tersinirlik grafiği. (-◆-) Kontrol; (-△-) Enzim ve etanol 30 dakika inkübe edildi; (- -) Enzim ve CV (0.8 µM) 30 dakika inkübe edildi; (-□-) Enzim ve CV (40 µM) inkübasyon yok.

TAM⁺ boyaların eritrosit ve sığır karaciğeri kaynaklı katalaz üzerindeki inhibitör etkilerine ilişkin inhibisyon tipi ve K_i değerleri Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

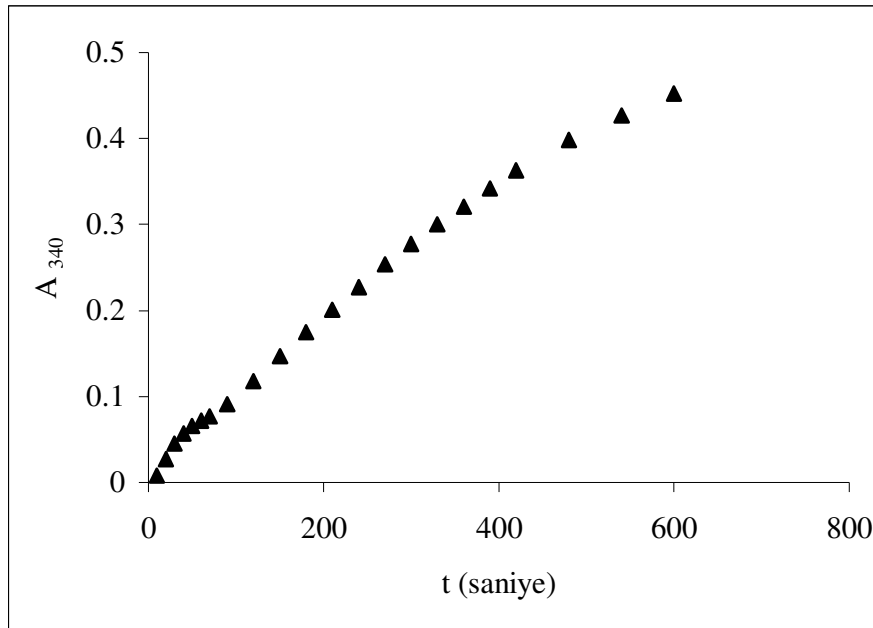
Tablo 4.1. TAM⁺ boyaların eritrosit ve sığır karaciğeri kaynaklı katalaz üzerindeki inhibitör etkileri

Enzim	Boya	K _m (mM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
Eritrosit kaynaklı katalaz		29.52 ± 2.62		
	MG		18.68 ± 0.28	Nonkompetitif (tersinir)
	LMG		135.24 ± 15.10	Karışık tip (tersinir)
	CV		60.67 ± 1.02	Nonkompetitif (tersinir)
Ticari sığır karaciğeri kaynaklı katalaz		32.88 ± 3.10		
	MG		27.17 ± 2.88	Nonkompetitif (tersinir)
	LMG		hesaplanamadı	(tersinir)
	CV		hesaplanamadı	(tersinir)

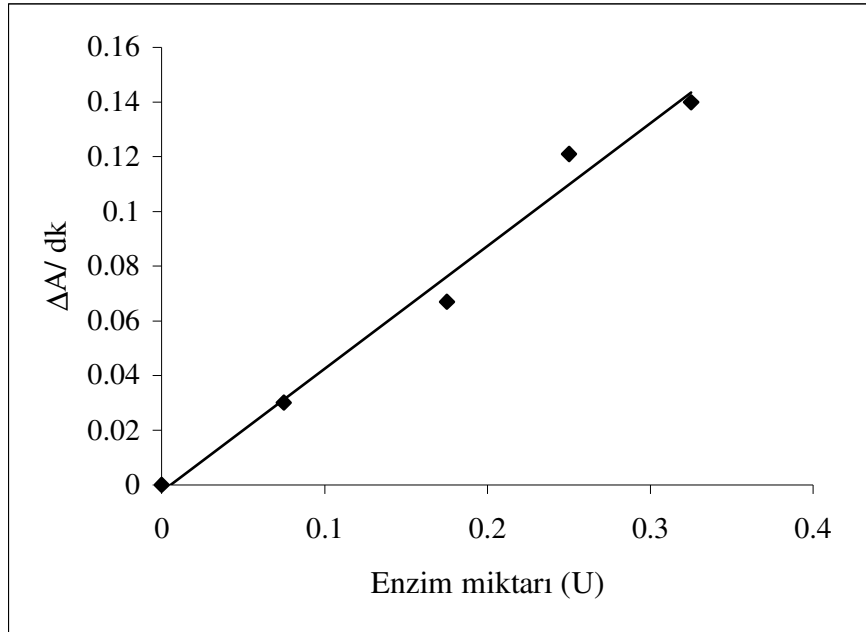
4.3 At Karaciğeri Kaynaklı GST'nin Kinetik Özellikleri

At karaciğeri kaynaklı GST (50 U/mg protein), 1 mg/ml su içinde hazırlandı. GST aktivitesi substrat olarak CDNB kullanılarak 37°C'de ölçüldü. GSH ve CDNB'nin bir arada iken olası nonenzimatik etkileşimlerini en aza indirmek üzere 2 mM EDTA-200 mM KP tamponu, pH 6.5'de sabit tutuldu. Substrat (CDNB) stoku 20 mM olacak şekilde % 95 etanol içinde hazırlandı. CDNB, solvan etkisini en aza indirmek üzere düşük derişimde (0.5 mM) tutuldu.

Aktivite ölçümlerinde deney ortamı 11.25 ± 0.09 mU/ml enzim, 1 mM GSH ve 0.5 mM CDNB içermekte idi (Şekil 4.23). Tepkime 35 µl enzim, 50 µl GSH, 410 µl tampon ve 500 µl distile su karşımına 25 µl CDNB eklenmesiyle başlatıldı. GST aktivite tayininde tepkimenin enzim miktarına bağlı olduğu görüldü (Şekil 4.24).



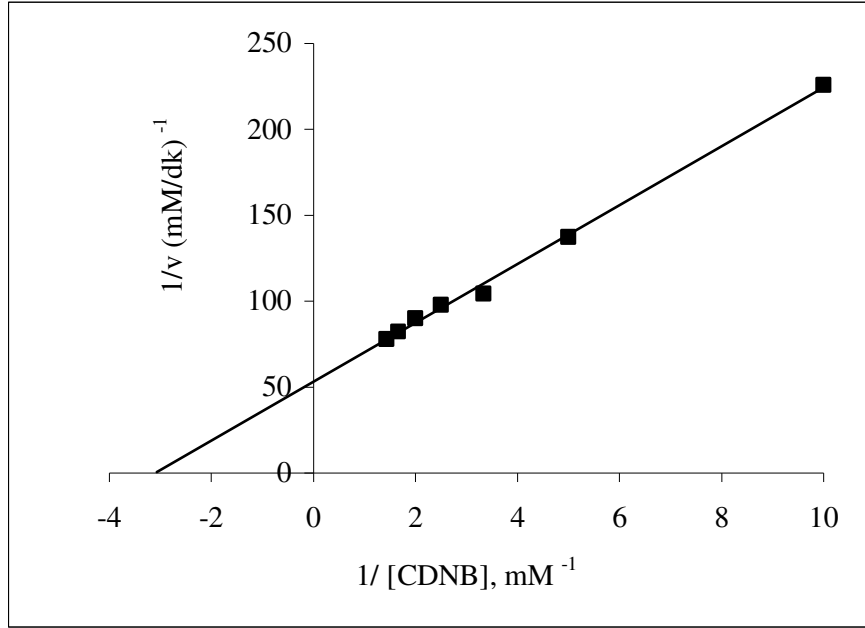
Şekil 4.23. At karaciğeri kaynaklı GST varlığında GSH'ın CDNB ile oluşturduğu konjugatın absorbansındaki net artış. [GSH], 1 mM; [CDNB], 0.5 mM; sıcaklık 37° C.



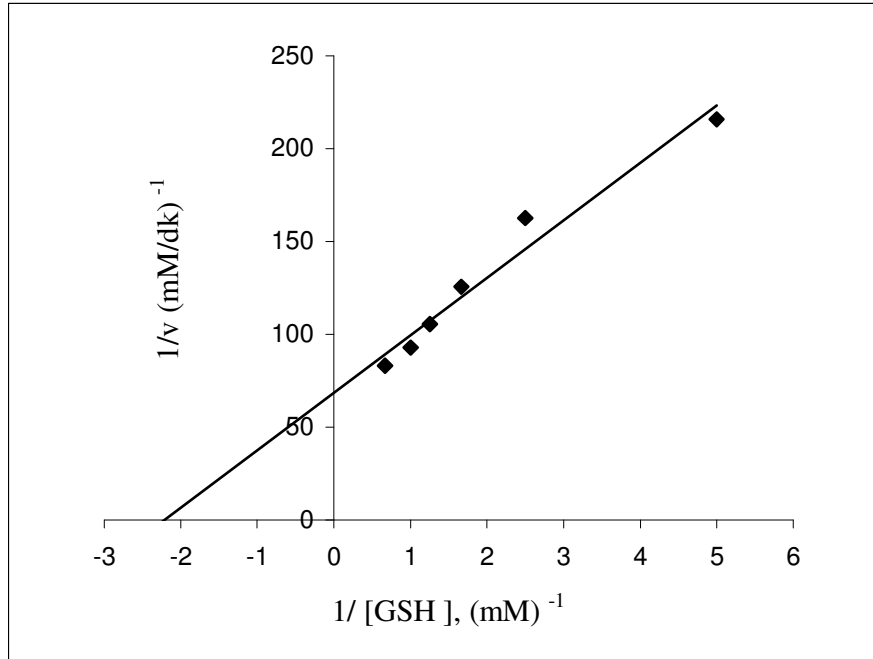
Şekil 4.24. At karaciğeri kaynaklı GST aktivitesinin enzim miktarına bağımlılığı. [CDNB], 0.5 mM; [GSH], 1 mM; sıcaklık 37° C.

GST'nin elektrofilik substratlar ve GSH için iki ayrı bağlama bölgesi olduğu bilindiğinden (45), CDNB değişken substrat kabul edilirken (0.1-0.7 mM) GSH 1 mM olarak sabit tutuldu; GSH değişken substrat kabul edilirken (0.2-1.5 mM) CDNB 0.5 mM olarak sabit tutuldu.

GSH derişimi 1 mM olarak sabit tutulduğunda ve substrat olarak CDNB (0.1-0.7 mM) kullanıldığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.25'de görülmektedir. $K_m = 0.32 \pm 0.04$ mM olarak bulundu. CDNB derişimi 0.5 mM olarak sabit tutulduğunda ve GSH substrat olarak kullanıldığında (0.2-1.5 mM) elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.26'da görülmektedir. $K_m = 0.45 \pm 0.05$ mM olarak bulundu.



Şekil 4.25. At karaciğeri kaynaklı GST için Lineweaver-Burk grafiği.
[CDNB], 0.1 -0.7 mM; [GSH],1 mM; E, 11.25 ± 0.09 mU/ml.



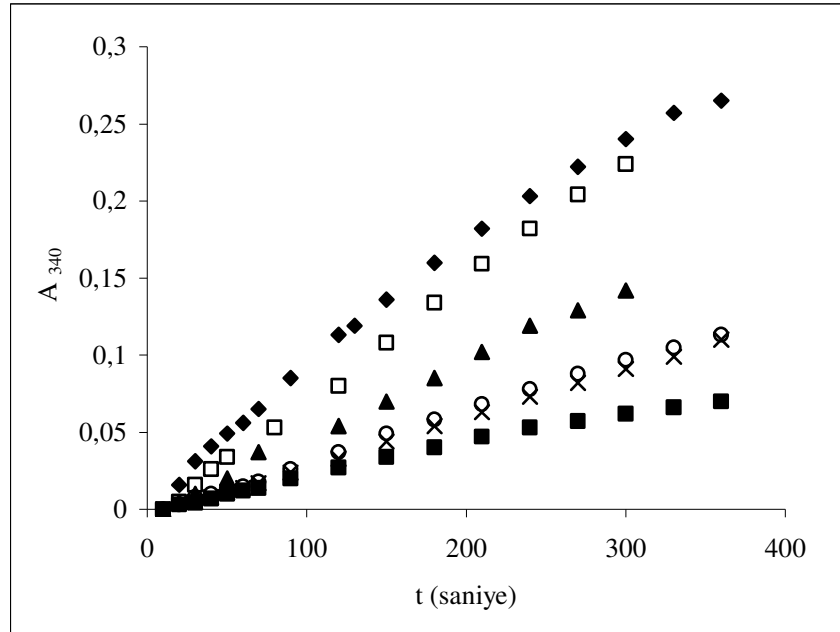
Şekil 4.26. At karaciğeri kaynaklı GST için Lineweaver-Burk grafiği.
[GSH], 0.2 -1.5 mM; [CDNB], 0.5 mM; E, 11.25 ± 0.09 mU/ml.

Daha önce yapılan çalışmalar GST'nin kinetik davranışının karmaşık olduğunu ve GSH'ın tepkimedeki derişimine bağlı olarak tepkimenin bifazik bir kinetik özelliği gösterdiğini bildirmiştir. Bu raporlarda GSH'ın 0.2 mM'ın altında ve 0.2-5 mM arasında farklı K_m değerlerine sahip olduğu; 0.15-5 mM GSH derişiminde enzim kinetiğinin sıralı ardışık mekanizmaya uyduğu ve enzime önce GSH'ın bağlandığı; GSH derişimi 0.1 mM'ın altına indiğinde ise enzim kinetiğinin ping-pong mekanizmaya uyduğu ve enzime önce CDNB'nin bağlandığı öne sürülmüştür (45). Bu çalışmada tepkime ortamında GSH 0.2-1.5 mM derişim aralığında tutulmuştur. Ancak bu koşullarda mekanizma hakkında kesin bir şey söylemek mümkün değildir.

4.4. TAM⁺ Boyaların At Karaciğeri Kaynaklı GST ile Etkileşimi

4.4.1. MG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

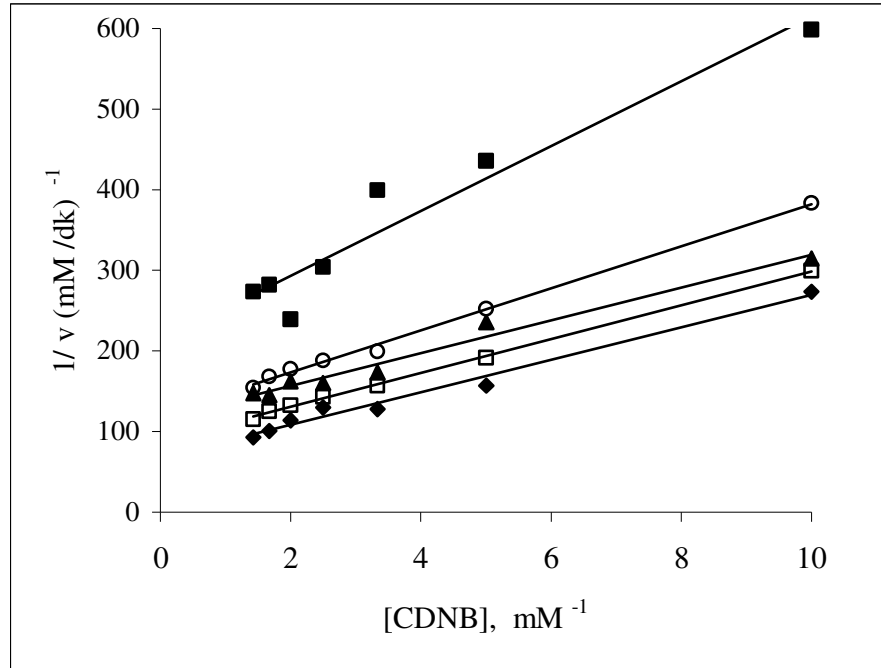
At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile olası inhibisyonu, enzimin değişik inkübasyon sürelerinde (5, 30 ve 60 dakika) 30 μ M boya ile preinkübe edilmesi ile araştırıldı. Aktivite ölçümü; inkübe edilen boya-enzim karışımına önce GSH ve sonra CDNB eklenmesi ile başlatıldı ve tepkime 5 dakika izlendi. GST aktivitesinin MG varlığında inhibe olduğu gözlemlendi. İnhibitör derişiminin, at karaciğeri kaynaklı GST'nin MG ile inhibisyonuna etkisi Şekil 4.27'de görülmektedir.



Şekil 4.27. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonunun inhibitör derişimine bağımlılığı. [GSH],1 mM; [CDNB], 0.5 mM; [MG], (-◆-) 0, (-□-) 0.5, (-▲-) 1, (-○-) 10, (-x-) 15, (-■-) 20 µM.

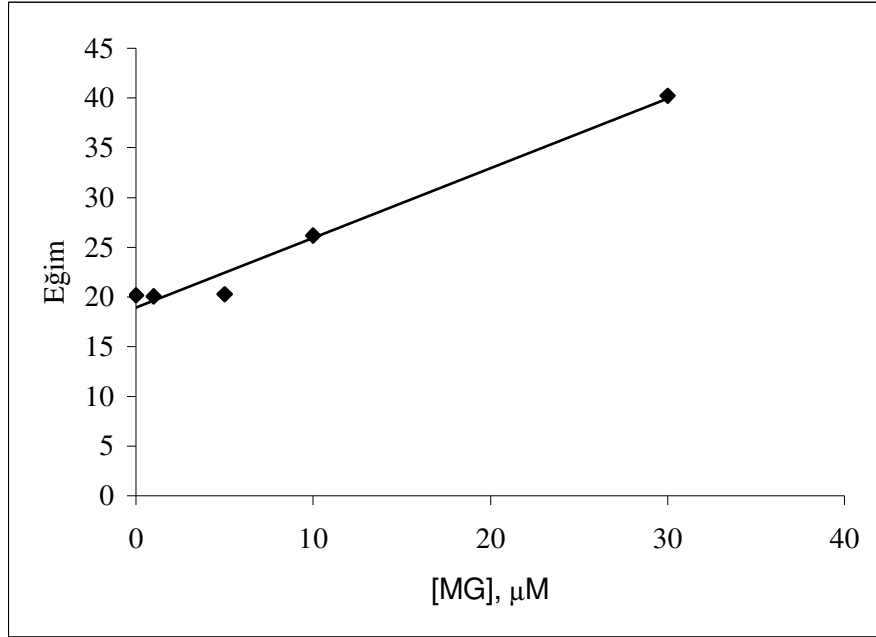
4.4.1.1. Substrat CDNB Kabul Edildiğinde MG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

At karaciğeri kaynaklı GST inhibisyon deneyleri iki farklı substrat olduğu düşünülerek GSH ve CDNB için ayrı olarak çalışıldı. Deney ortamı, [GSH], 1 mM; [CDNB], 0.1-0.7 mM; E, 11.25 ± 0.09 mU/ml ve [MG], 0-30 µM içermekte idi. Enzim ve MG, 37 °C'de 5 dakika preinkübe edildikten sonra sırasıyla KP, GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı. GST'nin MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.28'de sunulmuştur.

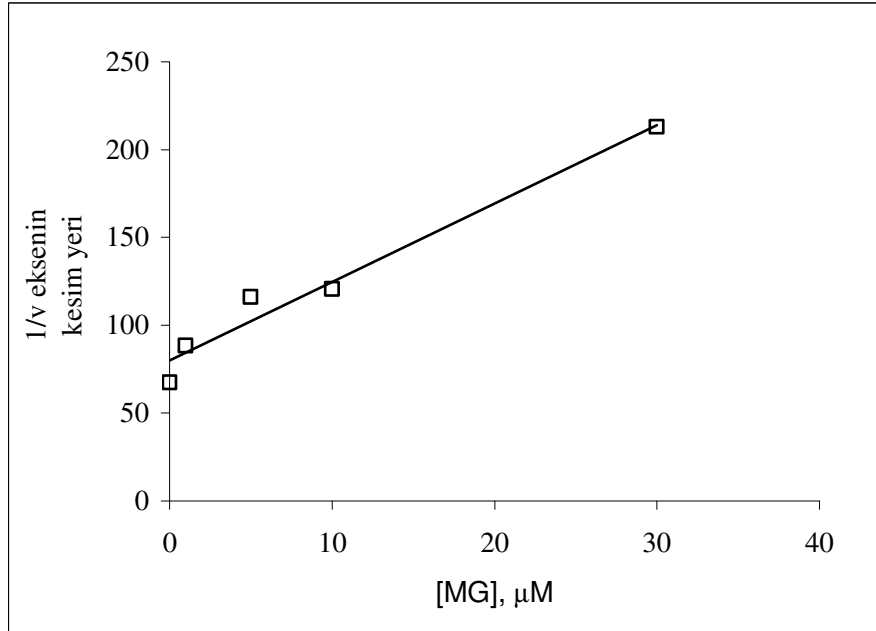


Şekil 4.28. At karaciğeri kaynaklı GST'ın MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. [CDNB], 0.1-0.7 mM; [GSH], 1 mM; [MG], (-◆-) 0, (-□-) 1, (-▲-) 5, (-○-) 10, (-■-) 30 μM . $y = 20.18x + 67.58$, $y = 20.05x + 88.35$, $y = 20.30x + 116.01$, $y = 26.18x + 120.65$, $y = 40.21x + 212.85$, $r^2 = 0.98$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerleri, boya yokluğunda elde edilen değerlerle yaklaşık aynı ve V_m değerleri farklı bulundu. Eğim ve $1/v$ eksen kesim değerleri [MG]'ne karşı grafiklendiğinde K_i değerlerinin birbirine yakın olduğu (Şekil 4.29a ve b sırasıyla 18.01 μM ve 28.21 μM) görüldü ve inhibisyonun saf nonkompetitif olabileceği düşünüldü. K_i değeri $23.07 \pm 7.26 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.



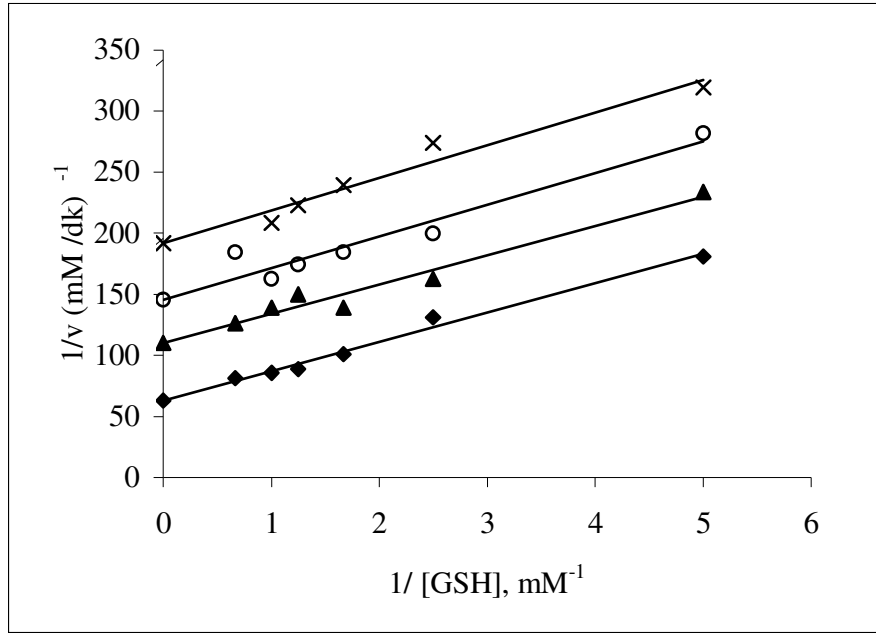
Şekil 4.29a. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.70x + 18.94$, $r^2 = 0.97$.



Şekil 4.29b. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 4.46 x + 80.03$, $r^2 = 0.97$.

4.4.1.2. Substrat GSH Kabul Edildiğinde MG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

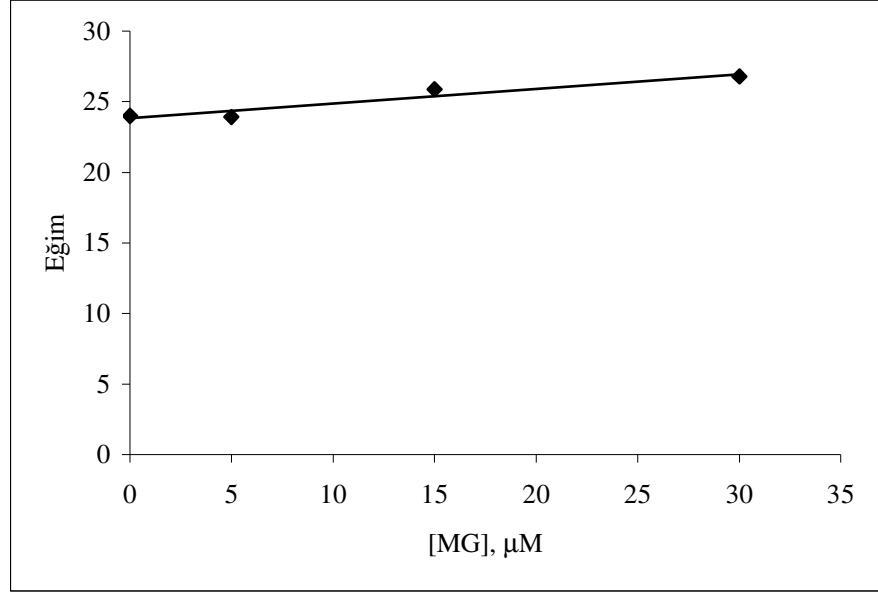
GSH 0.2-1.5 mM aralığında değişken substrat olarak kullanılırken, CDNB 0.5 mM derişiminde sabit tutuldu. 11.25 ± 0.09 mU/ml enzim ve MG (0-30 μ M) 37°C'de 5 dakika preinkübe edildikten sonra GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı. GST'in MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.30'da sunulmuştur.



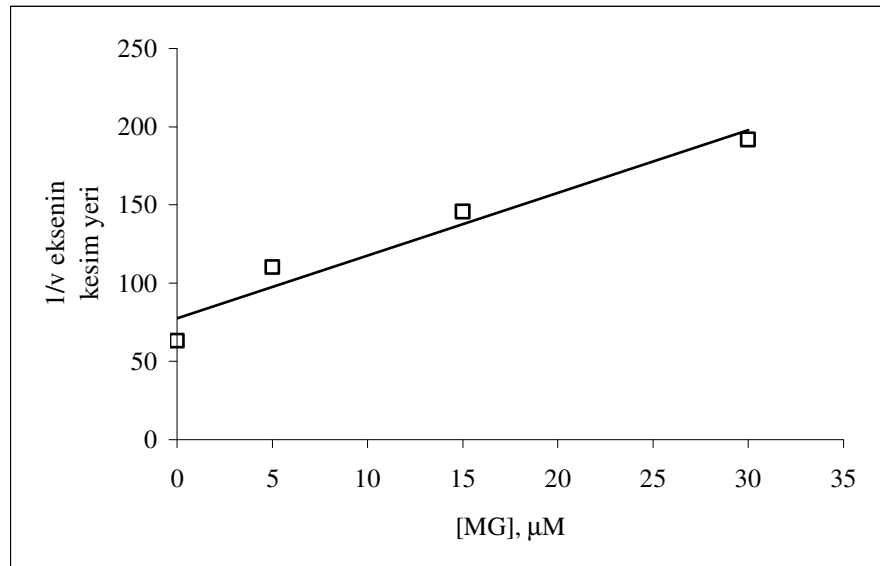
Şekil 4.30. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. [GSH], 0.2-1.5 mM; [CDNB], 0.5 mM; [MG], (-◆-) 0, (-▲-) 5, (-○-) 15, (-x-) 30 μ M. $y = 24.00x + 63.09$, $y = 23.91x + 110.14$, $y = 25.88x + 145.68$, $y = 26.78x + 191.65$, $r^2 = 0.95$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m ve V_m değerlerinin her ikisinin de boya yokluğunda elde edilen değerlerden farklı olduğu bulundu. Eğim ve $1/v$ eksenin kesim değerleri [MG]'ne karşı grafiklendiğinde farklı K_i değerleri hesaplandığından doğrusal karışık tip inhibisyon modeline uyduğu düşünüldü. Eğimden K_i değeri 210.00 ± 15.23 μ M olarak ve $1/v$ eksenin kesim

noktasından αK_i değeri $19.43 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı (Şekil 4.31a-4.31b). α değeri 0.09 bulundu. K_i değerinin bu kadar yüksek bulunması, GSH-MG eklenti ürünü oluşumu olasılığına ve sistemin karmaşıklığına yoruldu.



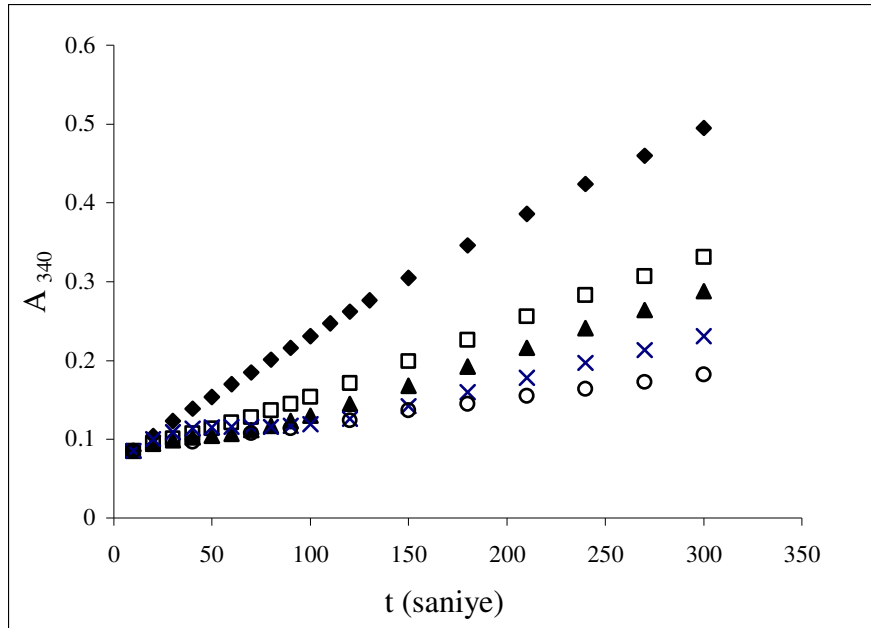
Şekil 4.31a. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.10x + 23.86$, $r^2 = 0.92$.



Şekil 4.31b. At karaciğeri kaynaklı GST'in MG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 4.00x + 77.56$, $r^2 = 0.95$.

4.4.2. LMG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

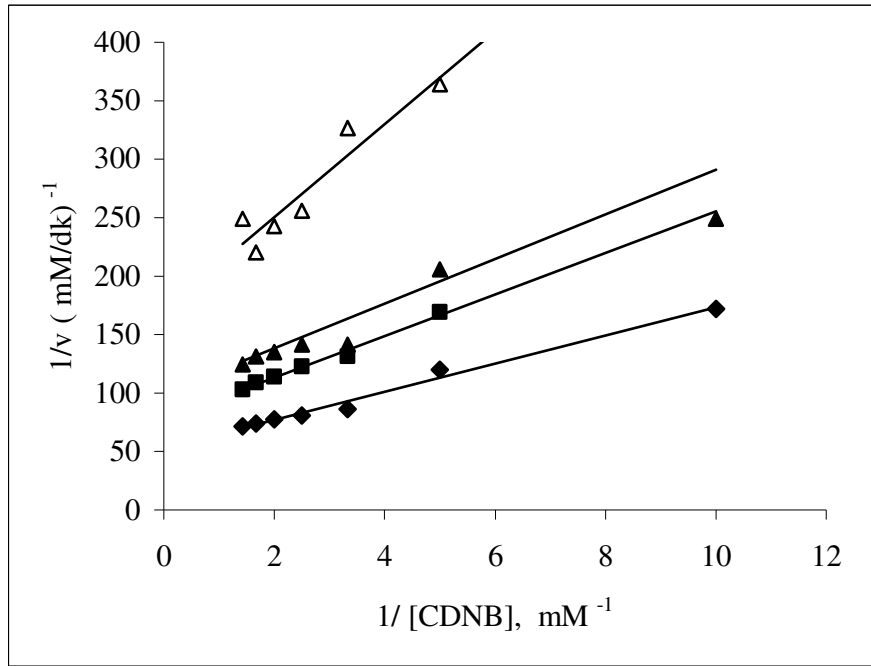
GST'in LMG ile olası inhibisyonu, enzimin değişik inkübasyon sürelerinde (5, 30 ve 60 dakika) 30 μM boya ile preinkübe edilmesi ile araştırıldı. Aktivite ölçümü; inkübe edilen boya (0-60 μM) -enzim (11.25 ± 0.09 mU/ml) karışımına GSH ve substratın (CDNB) eklenmesi ile başlatıldı ve tepkime 4 dakika izlendi. GST'in LMG varlığında inhibe olduğu gözlemlendi. İnhibitör derişiminin, at karaciğeri kaynaklı GST'nin LMG ile inhibisyonuna etkisi Şekil 4.32'de görülmektedir.



Şekil 4. 32. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonunda tepkime hızının inhibitör derişimine bağımlılığı. [GSH], 1 mM; [CDNB], 0.2 mM; [LMG], (-◆-) 0, (-□-) 5, (-▲-) 20, (-x-) 40, (-○-) 60 μM .

4.4.2.1. Substrat CDNB Kabul Edildiğinde LMG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

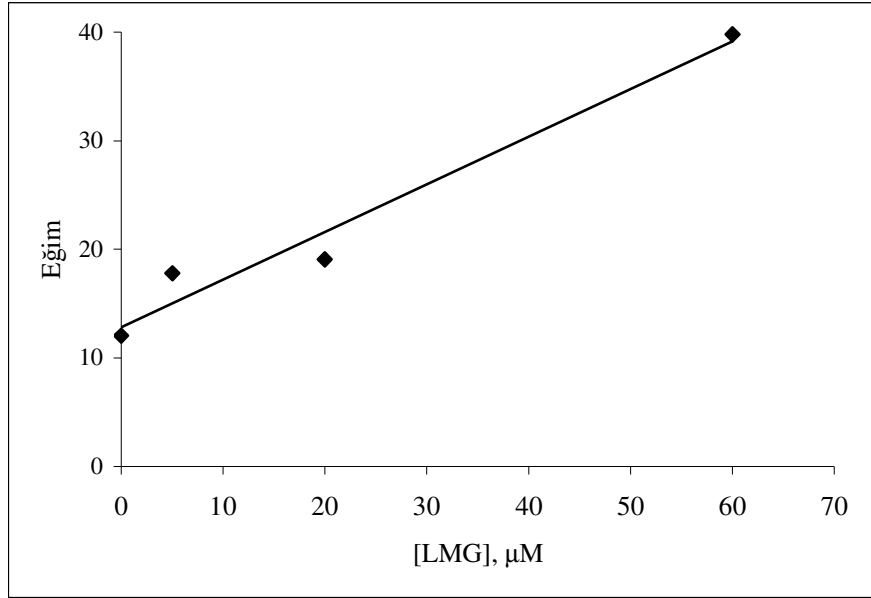
GST'nin LMG ile inhibisyon kinetiği, farklı derişimlerde CDNB ve LMG kullanılarak çalışıldı. Deney ortamında [GSH], 1 mM; [CDNB], 0.1-0.7 mM; E, 11.25 ± 0.09 mU/ml ve [LMG], 0-60 μ M bulunmakta idi. Enzim ve LMG, 37°C 'de 5 dakika preinkübe edildikten sonra sırasıyla KP, GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı. GST'nin LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.33'de sunulmuştur.



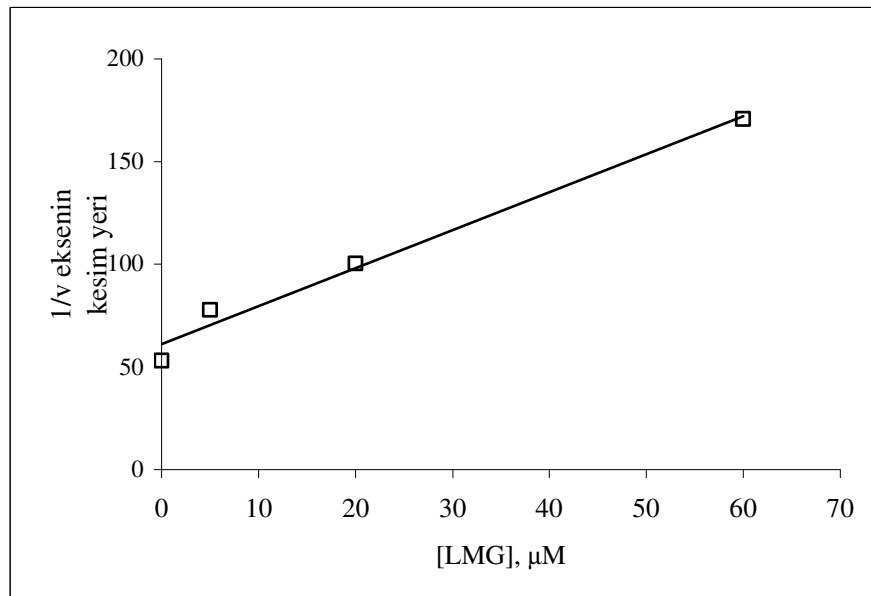
Şekil 4.33. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. [CDNB], 0.1-0.7 mM; [GSH], 1 mM; [LMG], (-◆-) 0, (-■-) 5, (-▲-) 20, (-△-) 60 μ M. $y = 12.03x + 52.87$, $y = 17.79x + 77.62$, $y = 19.06x + 100.20$, $y = 39.79x + 170.71$, $r^2 = 0.98$.

Boya varlığında doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m değerleri, boya yokluğunda elde edilen değerlerle yaklaşık aynı ve V_m değerleri farklı bulundu. Eğim ve $1/v$ eksen kesim değerleri [LMG]'ne karşı grafiklendiğinde K_i değerlerinin birbirine yakın olduğu (Şekil 4.34a ve b sırasıyla 28.56 μ M ve 32.88 μ M) görüldü ve

inhibisyonun saf nonkompetitif olabileceği düşünöldü. K_i değeri $30.72 \pm 2.60 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.



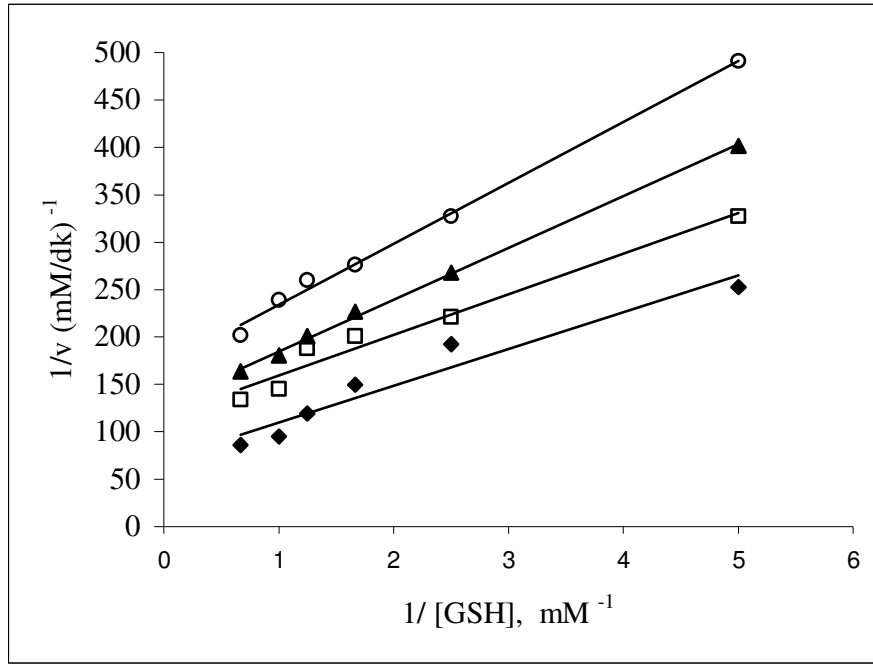
Şekil 4.34a. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.44x + 12.85$, $r^2 = 0.97$.



Şekil 4.34b. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksenin kesim yeri (-□-), $y = 1.85x + 61.04$, $r^2 = 0.98$.

4.4.2.2. Substrat GSH Kabul Edildiğinde LMG'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

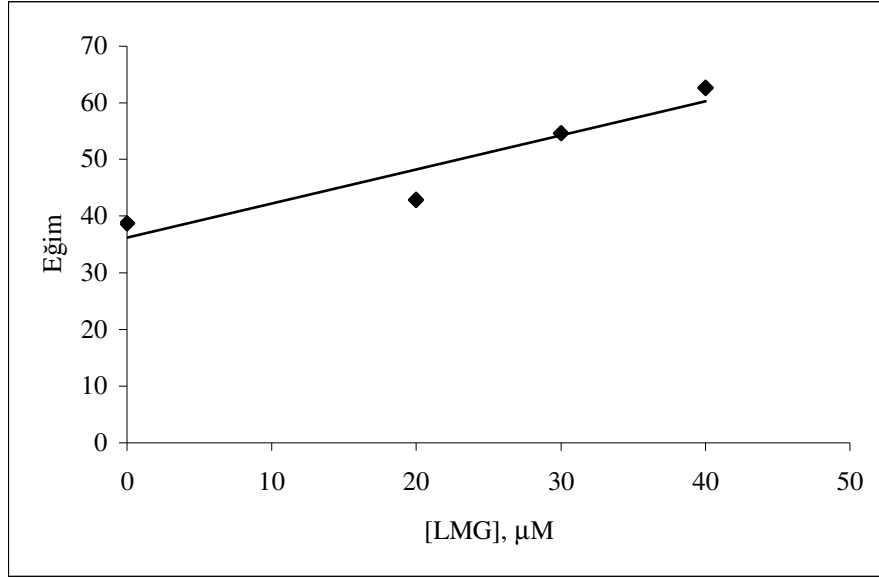
GSH 0.2-1.5 mM aralığında değişken substrat olarak kullanılırken, CDNB 0.5 mM'da sabit tutuldu. Enzim (11.25 ± 0.09 mU/ml) ve LMG (0-40 μ M) 37°C'de 5 dakika preinkübe edildikten sonra GSH ve CDNB eklenerek tepkime başlatıldı. GST'nin boya ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.35'de sunulmuştur.



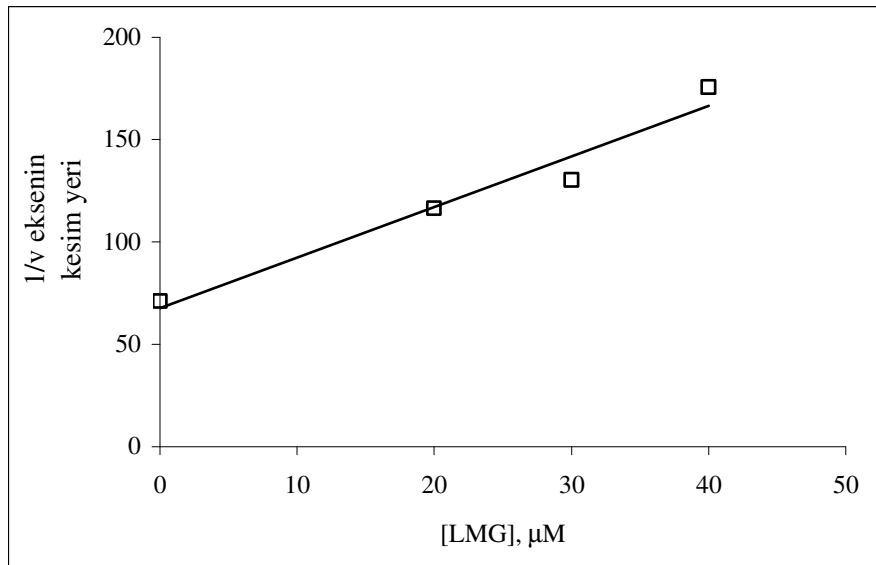
Şekil 4.35. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait Lineweaver Burk grafikleri. [GSH], 0.2-1.5 mM; [CDNB], 0.5 mM; [LMG], (-◆-) 0, (-□-) 20, (-▲-) 30, (-○-) 40 μ M. $y = 38.76x + 71.08$, $y = 42.85x + 116.39$, $y = 54.68x + 130.10$, $y = 62.67x + 175.61$, $r^2 = 0.96$.

Boya varlığında ve yokluğunda doğrulara ait denklemlerden elde edilen K_m/V_m (eğim) ve $1/V_m$ değerlerinin birbirinden farklı olduğu gözlemlendi. Eğim ve $1/v$ eksen kesim değerleri [LMG]'ne karşı grafiklendiğinde, eğimden K_i değeri 59.56 ± 3.70 μ M ve $1/v$ eksen kesim noktasından αK_i değeri 27.45 μ M olarak hesaplandı (Şekil 4.36a-4.36b) ve doğrusal karışık tip inhibisyon modeline uyduğu düşünüldü.

Bu tip inhibisyonun kısmi kompetitif ve saf nonkompetitif inhibisyonların bir karışımı olduğu bilinmektedir. α değerinin 0.46 olması doğruların 1/S ekseninin altında bir noktada kesiştiğini gösterdi.



Şekil 4.36a. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. Eğim (-◆-), $y = 0.60x + 36.17$, $r^2 = 0.88$.



Şekil 4.36b. At karaciğeri kaynaklı GST'in LMG ile inhibisyonuna ait ikincil grafik. 1/v eksen kesim yeri (-□-), $y = 2.47x + 67.78$, $r^2 = 0.96$.

4.4.3. CV'nin At Karaciğeri Kaynaklı GST Üzerindeki İnhibitör Etkisi

Yapılan çalışmalarda CV'nin at karaciğeri kaynaklı GST'ı inhibe etmediği gözlenmiştir.

TAM⁺ boyaların at karaciğeri kaynaklı GST ile etkileşimine ait kinetik veriler Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. TAM⁺ Boyalar ile At Karaciğeri Kaynaklı GST'nin Etkileşimi

Boya	Substrat	K _m (mM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
	GSH	0.45 ± 0.05		
	CDNB	0.32 ± 0.04		
MG	GSH		210.00 ± 15.23	Karışık tip
	CDNB		23.07 ± 7.26	Nonkompetitif
LMG	GSH		59.56 ± 3.70	Karışık tip
	CDNB		30.72 ± 2.60	Nonkompetitif
CV	GSH		İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
	CDNB		İnhibisyon yok	İnhibisyon yok

Tablodan da görüleceği gibi çalışılan TAM⁺ boyalardan MG ve LMG at karaciğeri kaynaklı GST'yi inhibe ederken, CV ile GST arasında bir etkileşme gözlenmemiştir. MG ve LMG'in inhibisyon kinetikleri incelendiğinde bu iki bileşiğin enzimle etkileşimlerinin enzim üzerinde farklı iki bağlama bölgesi ile etkileşen substratların (GSH ve elektrofilik substrat CDNB) varlığında değişik kinetik davranış gösterdikleri saptanmıştır. Bu farklılığın kısmen MG'in GSH ile eklenti ürünü oluşturmasından ve kimyasal yapılarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ve TAM⁺ boyalarla elde ettiğimiz öncül veriler bir arada değerlendirildiğinde, katyonik özellikli bu hidrofobik boyaların GST'nin H bölgesi dışındaki bir üçüncü bağlama bölgesi ile etkileşip enzimde inhibisyona yol açtığı varsayılabilir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada TAM⁺ boyalardan MG, MG'in löko formu olan LMG ve CV'nin önemli redoks sistemi enzimlerinden katalaz ve GST ile etkileşimleri incelendi.

MG ve CV tüm dünyada tekstil ve gıda endüstrisinde boya olarak, su ürünleri endüstrisinde fungusit, ektoparazitisit ve dezenfektant olarak kullanılmakta olan suda çözünürlüğü yüksek TAM⁺ boyalardır (10).

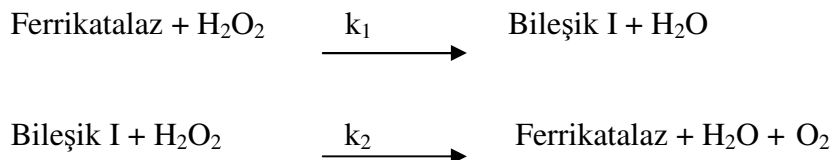
Son yıllarda MG'in memeli hücrelerine toksik etki gösterdiği; hepatik pre-neoplastik lezyonların gelişimine katkıda bulunduğu ve DNA sentezinde inhibitör etki gösterdiği öne sürülmüş; MG'in bu etkisinin serbest radikal oluşturması nedeniyle yol açtığı lipid peroksidasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (12,13,16,17,22). MG insan gastrointestinal kanalında anaerobik renksiz löko formuna (LMG) dönüşmektedir ve bu form da diğer karsenogenik TAM boyaların etkilerine benzer etkiler göstermektedir (17, 22). CV de tıpkı MG gibi intestinal mikroflorada löko formuna (LCV) dönüşmektedir. CV'nin renal, hepatik, akciğer kanserlerine ve tiroid karsinogenitesine yol açtığı bildirilmiştir (18,20,23).

Aşırı dozda oksidana maruz kalma veya antioksidan kapasitedeki azalma gibi nedenlerle oluşan oksidatif stres, hücre fonksiyonlarını etkilemekte ve ciddi sitopatolojik sonuçlara yol açmaktadır (78, 79). Major antioksidan GSH, oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde indirgeyici güç olarak rol almakta ve GSH seviyesi katalaz ve GST'in da dahil olduğu antioksidan enzimlerle dengede tutulmaktadır (80).

Antioksidan enzimlerden katalazlar, üzerinde bir çok çalışma yapılmakla birlikte bir çok organizmada farklı formlarda bulunan; işlevleri ve yapıları tam olarak aydınlatılamamış enzim grubudur (29,35). Başlıca üç tip olan katalazlardan manganez katalaz yalnızca prokaryotlarda bulunurken, peroksidaz katalaz prokaryotlarda ve basit ökaryotlarda bulunur. Tipik katalaz ise homotetramer yapılı hem içeren türdür ve ökaryotlarda yaygındır (28, 33). İnsan eritrosit ve sığır karaciğeri kaynaklı katalaz her altbiriminde hidrofobik bir çekirdek taşıyan tetramerdir ve bu tetramerik yapı aktivite için şarttır (34). İnsan eritrositindeki hem prostetik grubu sığır karaciğeri katalazın yapısına göre daha az yuvarlak bulunmuş ve

aktif bölgedeki demirin pentakoordinat yapısında olduğu görülmüştür (33). Dört hem N-Fe uzaklığı 1.9 Å ve Tyr 358'in demire uzaklığı 1.85 Å'dur. Desai ve Vaidya (10) H₂O₂ ve TAM⁺ boyaların kimyasal tepkimesi ile demetilasyon ürünlerin, N-oksitlerin, ketonların ve renksiz boyaların oluştuğunu ileri sürmüştür. Katalazın bilinen inhibitörleri, siyanür, sodyum azid ve 3-amino-1,2,4-triazoldür. Reaktif oksijen türleriyle etkileşerek organizmayı hücresel hasara karşı koruduğu bilinen katalazın çeşitli bileşiklerle inhibisyonunun, özellikle memelilerde serbest radikal hasarı oluşturabileceği açıktır.

Bu çalışmada, insan eritrosit lizatından izole edilen katalazın aktivitesi 1.72 ± 0.09 U/ml eritrosit lizati olarak bulundu. Sığır karaciğer kaynaklı ticari katalazın aktivitesi ise 2.27 ± 0.35 U/ml olarak saptandı. Eritrosit ve karaciğer kaynaklı katalazların K_m değerleri sırasıyla 29.52 ± 2.62 ve 32.88 ± 3.10 µM olarak bulundu. Eritrosit ve sığır karaciğer kaynaklı katalazların her ikisinin de tetramerik yapıya sahip olup tipik katalazlar sınıfına dahil olmaları, kinetiklerini de benzer kılmaktadır. Katalazın kinetiğinin, substratı olan H₂O₂'in 5-20 mM aralığında Michaelis Menten kinetiğine uyduğu; yüksek substrat derişimlerinde ise Michaelis Menten kinetiğinden saptığı gözlemlendi. Katalazların genelde geniş substrat derişim aralığında klasik Michaelis-Menten kinetiklerinden saptığını bildiren yayınlar mevcuttur (75) ve bu çalışma eritrosit ve karaciğer kaynaklı katalazların da benzer davranış sergilediğini ortaya koymuştur. Düşük substrat derişimlerinde teorik ve pratik doğrular uyumlu bulunmuş ve 5-20 mM H₂O₂ derişiminde hızın substrat derişimine bağımlılığının Michaelis-Menten kinetiği ile açıklanabileceği görülmüştür. Yüksek substrat derişimlerdeki sapmanın, katalazın katalitik tepkimesinin iki basamaklı yapısından ve substratlarıyla tam olarak doyamamalarından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü (75). H₂O₂'in katalaz ile bozunumunun enzimdeki "fast loop" bölgesinde katalitik aktivitede veya "slow loop" bölgesindeki peroksidatik aktivite ile gerçekleşebileceği öne sürülmektedir (82). Genelde tepkime iki fazlıdır ve olay ferrikatalaz ile iki-elektronlu-oksidede faz arasında gider gelir:

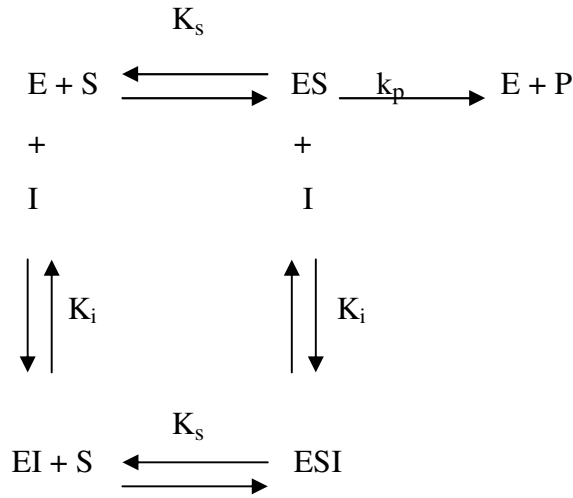


Katalaz, ayrıca substratı olan H_2O_2 'in aşırı miktarı ile inaktive olmaktadır (6).

Elde ettiğimiz öncül sonuçlar MG'in insan eritrosit kaynaklı katalazı ortalama $18.68 \pm 0.28 \mu M K_i$ değeriyle saf nonkompetitif olarak inhibe ettiğini gösterdi. İnhibisyonun tersinir olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde MG'nin sığır karaciğer kaynaklı ticari katalazı $27.17 \pm 2.88 \mu M K_i$ değeriyle saf nonkompetitif olarak inhibe ettiği görüldü. İnhibisyonun tersinir olduğu gözlemlendi.

Kaynaklarına göre farklılıklar göstermekle birlikte memeli katalazların genellikle iç kısma gömülmüş bir aktif bölge içerdikleri ve substratlarının bu bölgeye üç dar kanalı aşarak ulaştığı rapor edilmektedir. Katalazın aktivitesi, hem grubunun düzlemi ve bu kanalların yerleşimi ile doğrudan ilişkilidir. Söz konusu kanalların dar oluşu, hem içerdiği bilinen aktif bölgeye ancak su, H_2O_2 ve çok küçük moleküllerin girebilmesine olanak sağlamaktadır (38). Katalazın bu yapısı gözönüne alındığında katyonik özellikli TAM⁺ boyaların molekül büyüklüğü nedeniyle enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye nonkovalan olarak bağlanabilecekleri ve enzimde üç boyutlu bir yapı değişikliği yaratarak inhibisyona yol açabilecekleri düşünülebilir. Deneylerimizde kullandığımız katalaz, insan eritrosit lizatından izole edilmiş, ancak ileri bir saflaştırmaya gidilememiştir. Elde ettiğimiz öncül sonuçların saf enzimle yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, siyanid ve azidin katalazın hem grubuna bağlanarak enzimi tersinir ve nonkompetitif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (82). Azid varlığında katalazın bir kısmının Bileşik I ile oksidasyona uğrarken, bir kısmının da Bileşik II'ye dönüştüğü ve yavaş fazda Bileşik II olarak biriktiği ve enzimi bloke ettiği gösterilmiştir (33,82). Siyanidin ise serbest enzim ile birleşerek aktif kısmı bloke ettiği rapor edilmiştir (83). Anyonik her iki bileşiğin aktif bölgeye yakın bir bölgeye bağlandığı ve enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiği ileri sürülmüştür. Katyonik özellikli MG'nin ise enzimde aktif bölge dışında bir bölgeyle etkileşmesi olası gözükmektedir. İnhibitörün enzimin bu farklı bölgesine tersinir, gelişigüzel ve substrattan bağımsız olarak bağlandığı ve oluşan ESI kompleksinin ürün oluşturmadığı düşünülebilir (Şema 1).



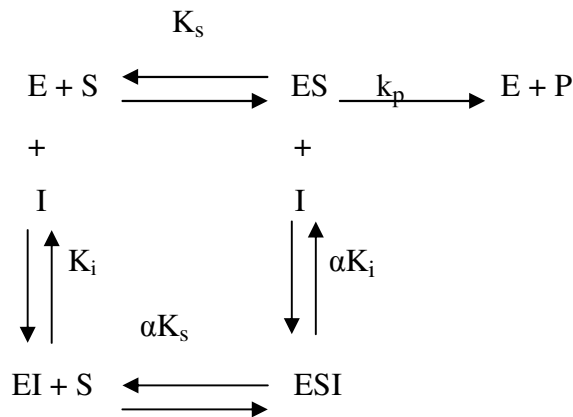
Şema 1. Nonkompetitif inhibisyon modeli.

Nonkompetitif inhibisyon için hız denklemi:

$$1/v = K_m / (V_{\max} [S]) (1 + [I]/K_i) + 1/V_{\max} (1 + [I]/K_i)$$

Burada boya enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği gibi, substrat EI kompleksine de bağlanabilir. Ancak boya ve substratın enzime birinci bağlanması, diğerinin bağlanmasını engellemez. Oluşan ESI kompleksi her şekilde ürün veremez.

LMG'nin insan eritrosit kaynaklı katalazı $135.24 \pm 15.10 \mu\text{M}$ K_i değeri ve 0.19α değeri ile doğrusal karışık tipte inhibe ettiği görüldü. İnhibisyonun tersinir olduğu gözlemlendi. Bu sistemde inhibitör varlığında enzime ait K_m ve V_{\max} değerlerinin ikisinin birden değiştiği bilinmektedir.



Şema 2. Karışık tip inhibisyon modeli.

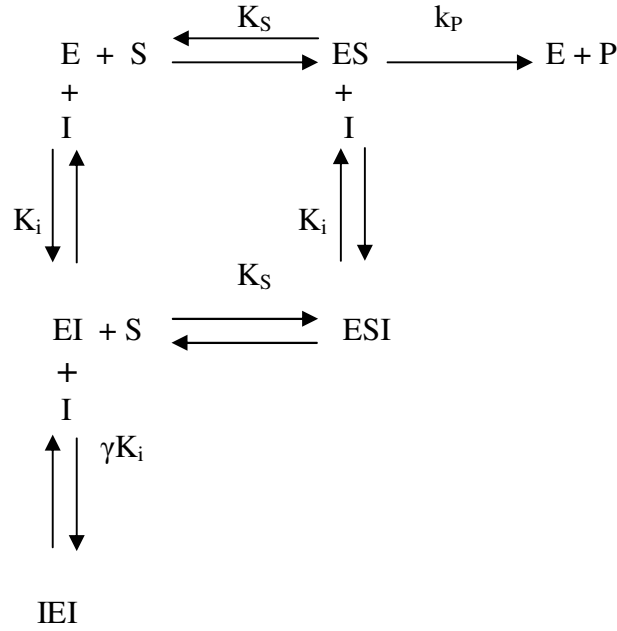
Karışık tip inhibisyon için hız denklemi:

$$1/v = K_S / (V_{\max}[S]) (1 + [I]/K_i) + 1/V_{\max} (1 + [I]/\alpha K_i)$$

Bu tip inhibisyonda EI kompleksinin substrata olan ilgisinin serbest enzime oranla daha az olduğu ve ESI kompleksinin ürün vermediği bilinmektedir (76). İnhibitör varlığında enzimin bir kısmı ESI formunda bulunur. Verilerimiz $\alpha < 1$ ve $\beta = 0$ olduğunu gösterdiği için, ikincil grafiğe ait doğruların 1/S ekseninin altında kesiştiği kabul edildi. Bu durumda ESI kompleksinin hızının artan inhibitör derişimiyle sifira yaklaşabileceği varsayıldı.

Verilerimiz göz önüne alındığında, LMG'nin MG'den farklı bir mekanizmayla etkidiği; katalaza bağlanan boyanın substratın bağlanmasını engellemediği ancak, büyük olasılıkla boya bağlanması ile enzimin üç boyutlu yapısının değişerek ürün oluşumunun engellendiği düşünülebilir (Şema 2). Buradaki inhibisyonun kısmi kompetitif ve saf nonkompetitif inhibisyonların bir karışımı olabileceği düşünüldü.

LMG'in ticari sığır karaciğeri kaynaklı katalazı ile ilişkisine ait verilerimiz önce inhibisyonun nonkompetitif olduğunu düşündürdü. Ancak eğim ve 1/v eksen kesim değerleri [LMG] derişimine karşı grafiklendiğinde elde edilen ikincil grafiğin doğrusal olmadığı görüldü. Bir inhibitörün iki farklı bölgeye bağlanmasının doğrusal karışık tipte inhibisyon ile sonuçlanabileceği öne sürülmektedir (76). Bu tip inhibisyonda inhibitörün bir bölgeye tamamen bağlanması substratı dışlarken, ikinci bölgeye bağlanması substratın bağlanması üzerinde bir etkiye sahip değildir. Ancak oluşan ESI kompleksi katalitik açıdan inaktiftir. İki bağlanma bölgesi ayrı değilse IEI kompleksi oluşabilir. İkincil grafikler aynı noktada kesişmezler ve parabol oluşur. Bu durumda enzimde inhibitörün bağlanabileceği birden fazla bölge olabileceği sonucuna varılabilir (Şema 3). Ancak bu hipotez çok sayıda ayrıntılı deney ile doğrulanmalıdır.



Şema 3. İnhibitörün enzim üzerindeki birden fazla bölgeye bağlanma modeli.

İnhibitörün enzim üzerindeki birden fazla bölgeye bağlanmasında hız denklemleri:

$$v = (V_{\max} [S]) / (K_S (1 + [I] / (\gamma / (1 + \gamma) K_i)) + [S] (1 + [I] / K_i))$$

CV'nin insan eritrosit kaynaklı katalazı $60.67 \pm 1.02 \mu\text{M}$ K_i değeriyle nonkompetitif olarak inhibe ettiği görüldü (Şema 1). İnhibisyonun tersinir olduğu gözlemlendi. Mekanizmanın saf nonkompetitif inhibisyon tipine uygun gerçekleştiği düşünüldü.

CV'nin ticari sığır karaciğer kaynaklı katalazı üzerindeki inhibitör etkisi incelendiğinde Lineweaver Burk grafiği göz önüne alınarak önce inhibisyonun nonkompetitif olduğu düşünüldü. Ancak eğim ve $1/v$ eksen kesim değerleri [CV] derişimine karşı grafikle edildiğinde elde edilen ikincil grafiğin parabol olması, K_i değerinin hesaplanmasını engelledi. Bu durumda enzimde inhibitörün bağlanabileceği birden fazla bölge olabileceği sonucuna varıldı (Şema 3).

Daha önce yapılan bir çalışmada MG ile katalaz muamele edilip laser ile fotoaktivasyona tabi tutulduğunda katalazda yapısal değişikliklerin meydana geldiği; enzimin bunu takiben oksidatif modifikasyona uğradığı bildirilmiş ve katalazda oluşan bu singlet-oksijen hasarının hücrel savunma sistemini inaktive ettiği öne

sürülmüştü (44). Bu çalışmada katalazın fotoaktivasyon olmaksızın da boyadan etkilendiği ve aktivitesini kaybettiği gösterilmiştir. Biyolojik sistemlerin ROT'ne karşı en etkin doğal antioksidan sistemini oluşturan katalazın TAM⁺ boyalarla inhibisyonunu gösteren bu öncül sonuçlar, söz konusu boyaların canlı sistemlerde kanserojen etki yaptığı yolundaki raporların mekanizmasına açıklık getirebilecek yeni çalışmalara bir önveri niteliği taşımaktadır.

GST, hücreleri ksenobiyotiklere ve ROT'ne karşı koruyan; elektrofilik substratları GSH ile konjuge ederek uzaklaştıran çok genli bir enzim grubudur (53). GST'lar primer yapılarına ve immünolojik özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılırlar (57). İnsan karaciğeri GST'nin alfa ve mu formunu ifade ederken; adrenal bez, böbrek, testis sadece mu formu içerir. Asidik pi izozimi ise insan eritrositinde (60) ve plasentasında (58) yüksek derişimde bulunmaktadır.

Domuz akciğer pi sınıfı GST'nin 2.3 Å resolusyonuyla elde edilen veriler, enzimin bir homodimer olduğunu; N ucu (1-74 aminoasitler arası) ve C ucu (81-207 aminoasitler arası) olmak üzere iki bölgesi olduğunu göstermiştir (58). G bölgesi, GSH'ı bağlar ve N ucu kısmında oluşurken, H bölgesi elektrofilik substratlara özgüdür ve C bölgesini içerir. Enzim, elektrofilik ve hidrofobik substratları GSH konjugatı haline çevirerek çözünür forma dönüştürmekte ve organizmadan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (84). G bölgesinin GST tiplerinde korunduğu; H bölgesinin değişken olduğu ve farklı hidrofobik substratlarla etkileştiği bildirilmiştir (77). GST, hidrofobik ligandlarla tersinir olarak bağlanmaktadır ve bu etkiye 'ligandin' etkisi denmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, enzimin nonsubstrat ligandları için H bölgesi yakınında potansiyel bir bağlama bölgesi daha bulunduğunu; bu bölgenin hidrofobik doğasının, hematin gibi organik bileşikler için uygun olduğunu göstermiştir. Met 208 ve Pro 110 arasında dar bir boşluk şeklinde yer alan bu kısım, H bölgesinden ayrı bir kısım olarak tanımlanmıştır (58). Bu ikinci hidrofobik cebin farklı bir potansiyel bağlama bölgesi mi yoksa H-bölgesinin bir uzantısı mı olduğu henüz aydınlatılamamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar GST'nin kinetik davranışının karmaşık olduğunu ve GSH'ın tepkimedeki derişimine bağlı olarak tepkimenin bifazik bir kinetik özelliği gösterdiğini bildirmiştir. Bu raporlarda GSH'ın 0.2 mM'ın altında ve

0.2-5 mM arasında farklı K_m değerlerine sahip olduğu; 0.15-5 mM GSH derişiminde enzim kinetiğinin sıralı ardışık mekanizmaya uyduğu ve enzime önce GSH'ın bağlandığı; GSH derişimi 0.1 mM'ın altına indiğinde ise enzim kinetiğinin ping-pong mekanizmaya uyduğu ve enzime önce CDNB'nin bağlandığı öne sürülmüştür (81).

Çalışmamızda, at karaciğeri kaynaklı GST ve TAM⁺ boyalar arasındaki etkileşimler incelendi. CDNB değışken substrat kabul edilirken (0.1-0.7 mM) GSH 1 mM olarak sabit tutuldu; GSH değışken substrat kabul edilirken (0.2-1.5 mM) CDNB 0.5 mM olarak sabit tutuldu. Enzimin GSH ve CDNB varlığındaki kinetik davranışı incelendiğinde GSH'a ait K_m değeri 0.45 ± 0.05 mM ve CDNB'e ait K_m değeri 0.32 ± 0.04 mM olarak hesaplandı.

MG'in karaciğer kaynaklı GST ile etkileşimi iki farklı substrat açısından değerlendirildiğinde, Substrat CDNB olarak kabul edildiğinde, MG'nin GST'yi 23.07 ± 7.26 μ M K_i değeriyle saf nonkompetitif olarak inhibe ettiği fikrine varıldı (Şema 1). Katyonik bir boya olan MG'in GST'deki bilinen G ve H bölgeleri dışındaki olası üçüncü hidrofobik bir bağlama bölgesine bağlanmış olabileceği düşünöldü. Karaciğer kaynaklı GST'in MG ile etkileşimine ait verilerimiz, MG varlığında enzime ait K_m değerinini değışmediğini ve V_m değerinini azaldığını göstermiş olduğundan inhibisyon tipinin nonkompetitif olduğunu düşündürdü. Substrat GSH olarak kabul edildiğinde MG'nin enzimi 210.00 ± 15.23 μ M K_i ve 0.09 α değeriyle doğrusal karışık tipte inhibe ettiği saptandı (Şema 2). Bu yüksek K_i değerinini, MG ve GSH'ın eklenti ürünler oluşturduğu karmaşık bir sistemden kaynaklanmış olabileceği düşünöldü. İnhibisyonun kesin mekanizmasının, bu olasılıkla ilgili ek deneylerin yapılmasını takiben açıklanabileceği düşünöldü.

LMG'nin GST üzerindeki inhibisyonu MG'de olduğu gibi iki farklı substrat açısından değerlendirildi. Substrat CDNB olarak kabul edildiğinde, LMG'nin GST'yi 30.72 ± 2.60 μ M K_i değeriyle saf nonkompetitif olarak inhibe ettiği gösterildi (Şema 1). Substrat GSH olarak kabul edildiğinde LMG'nin enzimi 59.56 ± 3.70 μ M K_i ve 0.46 α değeriyle doğrusal karışık tipte inhibe ettiği düşünöldü (Şema 2). Bu tip inhibisyon kısmi kompetitif ve saf nonkompetitif inhibisyonların bir karışımı olmakla birlikte, bu sistemde boyanın enzimin hangi bölgesine

bağlandığını saptamak bu aşamada olası değildir. Boyanın bağlanmasını takiben enzimin üç boyutlu yapısında bir değişiklik yaratabileceği düşünülebilir.

Çalışılan TAM⁺ boyalardan MG ve LMG at karaciğer kaynaklı GST'yi inhibe ederken, CV ile GST arasında bir etkileşim gözlenmedi. CV'nin üçüncü aromatik halkasındaki substituentlerin sterik engel oluşturmasının enzime etkileşime girmesini engellemiş olabileceği düşünüldü.

İncelenen boyalardan özellikle MG'in proteinlerle etkileştiğinde boya-protein eklenti ürünleri oluşturduğunu ve oluşan bu eklenti ürünlerin hedef proteinle kovalan eklenti formasyonu oluşturarak aktivite kaybına yol açtığını (13); TAM⁺ boyaların enzim inhibisyonuna yol açan fraksiyonunun serbest boyadan çok boya-GSH eklentisi olduğunu öne süren (14) çalışmalar bulunmaktadır. Eklentinin hem GSH'a hem de enzimin hidrofobik kısmına bağlanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sülfidril grubu nükleofillerin (GSH ve merkaptotanol) TAM⁺ boyalar (MG, MeY) ile tepkimeye girdiği; geçici bir eklenti ürünü oluşturduğu ve ardından hızlı bir şekilde renksiz yapı oluşturarak dengeye ulaştığı belirtilmiştir (12). Ancak TAM⁺ boyaların redoks sistem enzimleriyle etkileşimleri konusunda yapılmış kısıtlı araştırma mevcuttur ve bu etkileşimin mekanizmasını açıklayabilecek kesin bir model oluşturulamamıştır. GST ile boya-GSH eklenti ürünlerin arasındaki ilişkinin detaylı kinetik incelenmesinin konunun aydınlatılmasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Bu öncül çalışmadan elde ettiğimiz veriler, redoks sistemi enzimlerinden katalaz ve GST'in TAM⁺ boyalar ile inhibe olduğunu; bu etkileşimin hücrelerde redoks dengesini bozarak oksidan düzeyinin artmasına ve tersinmez hücre hasarına neden olabileceğini düşündürdü. Bu çalışmanın, boyaların canlı sistemlerde kanserojen etki yaptığı yolundaki raporların mekanizmasına açıklık getirebilecek yeni çalışmalara bir önveri niteliği taşıyacağını ümit etmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Krahler, S.E. Miscellaneous Dyes. 'The Chemistry of Synthetic Dyes and Pigments' (E.d.H.A.Lubs), Reinhold Publishing Corporation, New York, 228-301.
2. Okubo, T., Ise, N., Coenzyme model studies. I. Synthesis of 3-carbamoyl pyridinium salts containing nucleic acid bases and their equilibria and reaction rates with cyanide ion in the presence of polyelectrolytes, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 4031-406, 1973.
3. Gupta, S.K.S., Mishra, S., Rani, V.R., A study on equilibrium and kinetics of carbocation-to-carbinol conversion for di- and triarylmethane dye cations in aqueous solution, *Ind. J. Chem.*, 39A, 703-708, 2000.
4. Allen, N.S., McKellar, J.F., *Photochemistry of Dyed and Pigmented Polymers*, Elsevier Applied Science, London, 51, 1980.
5. Docampo, R., Muriz, R.P.A., Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of crystal violet, *Science*, 220, 1292-1295, 1983.
6. Özer, I., Çağlar, A., Protein-mediated nonphotochemical bleaching of malachite green in aqueous solution, *Dyes and Pigments*, 54, 11-16, 2002.
7. Barlett, J.A., Indig, G.L., Effect of self-association and protein binding on the photochemical reactivity of triarylmethanes, *Biochem. Photobiol.*, 70, 490-498, 1999.
8. Duxbury, D.F., The photochemistry and photophysics of triphenylmethane dyes in solid and liquid media, *Chem. Rev.*, 93, 381-433, 1993.
9. Barlett, J.A., Indig, G.L., Spectroscopic and photochemical properties of malachite green noncovalently bound to bovine serum albumin, *Dyes and Pigments*, 43, 219-226, 1999.

10. Zamocky, M., Koller, F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 72, 19-66, 1999.
11. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
12. Eldem, Y., Özer, İ., Electrophilic reactivity of cationic triarylmethane dyes towards proteins and protein-related nucleophiles, *Dyes and Pigments*, 60, 49-54, 2004.
13. Tacal, Ö., Özer, İ., Adduct-forming tendencies of cationic triarylmethane dyes with proteins, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 18, 253-256, 2004.
14. Glanville, S.D., Clark, A.G., Inhibition of human glutathione S-transferases by basic triphenylmethane dyes, *Life Sci.*, 60, 1535-1544, 1997.
15. Safarik, I., Safarikova, M., Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water, *Water Res.*, 36, 196-200, 2002.
16. Littlefield, N.A., Blackwell, G.N., Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5, 902-912, 1985.
17. Sundarajan, M., Fernandis, A., Subrahmanyam, G., Overexpression of G1/S cyclins and PCNA and their relationship to tyrosine phosphorylation and dephosphorylation during tumor promotion by metanil yellow and malachite green, *Toxicol. Lett.*, 116, 119-130, 2000.
18. Panadiker, A., Fernandes, C., Rao, K.V.K., The cytotoxic properties of malachite green are associated with the increased demethylase, aryl hydro carbon hydroxylase and lipid peroxidation in primary cultures of Syrian hamster embryo cells, *Cancer Lett.*, 67, 93-101, 1992.
19. Fox, K.R., Higson, S.L., Scott, J.E., Methyl green and its analogues bind selectively to AT-rich regions of native DNA, *Eur. J. Histochem.*, 36, 263-270, 1992.

20. Allen, R.L.M., Cationic and related dyes, colour chemistry, Ed., 103-110, 1971.
21. Rao, K.V.K., Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter, *Toxicol. Lett.*, 81, 107-113, 1995.
22. Henderson, A., Schmitt, T.C., Heinze, T.M., Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4099-4101, 1997.
23. Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Gehring, T.A., Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 1625-1634, 1998.
24. Culp, S.J., Blankenship, L.R., Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice, *Chem. Biol. Interact.*, 122, 153-170, 1999.
25. Doerge, D.R., Chang, H.C., Divi, R.L., Mechanism for inhibition of thyroid peroxidase by leucomalachite green, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1098-1104, 1998.
26. Au, W., Butler, M.A., Bloom, S.E., Matney, T.S., Further study of the genetic toxicity of gentian violet, *Mutat. Res.*, 66, 103-112, 1979.
27. Davies, K.J., Delsignore, M.E., Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J. Biol. Chem.*, 262, 9908-9913, 1987.
28. Nordberg, J., Arner, E.S.J., Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biol. Med.*, 31, 1287-1312, 2001.
29. Vainshtein, B.K., Melik-Adamyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Grebenko, V.V., Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 188, 49-61, 1986.

30. Murshudov, G.N., Melik-Adamyany, W.R., Grebenko, V.V., Barynin, V.V., Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution, FEBS Lett., 312, 127-131, 1992.
31. Gouet, P., Jouve, H.M., Dideberg, O.J., Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH, Mol. Biol., 249, 933-954, 1995.
32. Bravo, J., Mate, M.J., Schneider, T., Switala, K., Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution, Proteins, 34, 155-166, 1999.
33. Mate, M.J., Zamocky, M., Nykyri, L.M., Herzog, C., Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, J. Mol. Biol., 286, 135-149, 1999.
34. Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A., Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, J. Mol. Biol., 296, 295-309, 2000.
35. Schonbaum, G.R., Chance, B. Catalase, The Enzymes, (Ed.Boyer PD), II.Baskı, Academic Pres, New York, 13, 363-408, 1976.
36. Kirkman, H.N., Galiano, S., Gaetani, G.F., The function of catalase-bound NADPH, J. Biol. Chem., 262, 660-666, 1987.
37. Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Takase, M., Hanada, H., Inhibitor and temperature effect on catalase in the liver of adult diploid and haploid *Rana rugosa*, Comp. Biochem. Physiol., 119, 235-239, 1998.
38. Keilin, D., Hartree, E.F., Reactions of methaemoglobin and catalase with peroxides and hydrogen donors, Nature ,173, 720-723, 1954.
39. Lardinois, O.M., Rouxhet, P.G., Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation, Biochim. Biophys. Acta.,1298, 180-190, 1996.
40. Margoliash, E., Novogrodsky, A., Schejter, A., Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase, Biochem J., 74, 339-348, 1960.

41. Chang, J.Y., Schroeder, W.A., Reaction of 3-amino-1:2:4-triazole with bovine liver catalase and human erythrocyte catalase, Arch. Biochem. Biophys., 148, 505-508, 1972.
42. Ottallah-Konac, M., Tripier, D., Brühl, B., Platte, H.D., Jouvenal, K., Schuh, K., Kemer, H., Petzinger, E., The 60-kDa bumetadine-binding protein from rat liver membranes is a catalase, Eur. J. Biochem., 228, 506-514, 1995.
43. Kitlar, T., Döring, F., Diedrich, D.F., Frank, R., Wallmeier, H., Kine, R.K.H., Deutscher, J., Interaction of phlorizin, a potent inhibitor of the Na⁺/D-glucose cotransporter, with the NADPH binding site of mammalian catalases, Protein Sci., 3, 696-700, 1994.
44. Kim, S.Y., Kwon, O.J., Park, J-W., Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye, Biochimie., 83, 437-444, 2001.
45. Marcus, C.J., Habig, W.H., Jacoby, W.B., Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver, Arch. Biochem. Biophys., 188, 287-293, 1978.
46. Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., Mannervik, B., Glutathione transferases from human liver, Methods Enzymol., 113, 499-504, 1985.
47. Mannervik, B., Guthenberg, C., Glutathione transferase (human placenta), Methods Enzymol., 77, 231-235, 1981.
48. Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., Inhibition of glutathione S-transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro, Food Chem. Toxicol., 42, 1401-1408, 2004.
49. Habig, W.H., Jacoby, W.B., Glutathione S-transferases (rat and human), Methods Enzymol., 77, 218-231, 1981.
50. El-Missiry, M.A., El-Sayed, I.H., Othman, A.I., Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats, Ann. Clin. Biochem., 38, 694-700, 2001.

51. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., Samuelsson, B., Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 7220–7225, 1999.
52. Jakoby, W.B., Glutathione transferases: an overview, *Methods Enzymol.*, 113, 495-499, 1985.
53. Bruns, C.M., Hubatsch, I., Ridderström, M., Mannervik, B., Tainer, J.A., Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products, *J. Mol. Biol.*, 288, 427-439, 1999.
54. Sun, Y.-J., Kuan, I.C., Tam, M.F., Hsiao, C.D., The three dimensional structure of an class-mu glutathione s-transferase cGSTM1-1 at 1.94 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 278, 239-252, 1998.
55. Misra, H. P., Fridovich, I., The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins, *J. Biol. Chem.*, 246, 6886-6890, 1971.
56. Misra, H. P., Fridovich, I., The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones, *J. Biol. Chem.*, 247, 188-192, 1972.
57. Misra, H. P., Fridovich, I., The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, 247, 3170-3175, 1972.
58. Oakley, A.J., Bello, M.L., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P., Parker, M.W., The ligandin (nonsubstrate) binding site of human pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H site), *J. Mol. Biol.*, 291, 913-926, 1999.
59. Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., Interactions of bilirubin and other ligands with ligandin, *Biochemistry*, 14, 2175-2180, 1975.
60. Nilsson, L.O., Edalat, M., Pettersson, L., Mannervik, B., Aromatic residues in the C-terminal region of the glutathione transferase A1-1 influence rate-determining sites in the catalytic mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, 157-163, 2002.

61. Strange, R.C., Matharoo, B., Faulder, G.C., The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of GST1 0 phenotypes in patients with adenocarcinoma, *Carcinogenesis*, 12, 25-28, 1991.
62. Saadat, I., Saadat, M., Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancer, *Canc. Lett.*, 169, 21–26, 2001.
63. Tew, K.D., Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.*, 54, 4313–4320, 1994.
64. McLellan, L.I., Wolf, C.R., Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance, *Drug Resist. Update*, 2, 153–164, 1999.
65. Tang, A.H., Tu, C.P., Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21, *J. Biol. Chem.*, 269, 27876–27884, 1994.
66. Burg, D., Hameetman, L., Filippov, D.V., van der Marel, G.A., Mulder, G.J., Inhibition of glutathione S-transferase in rat hepatocytes by a glycine-tetrazole modified S-alkyl-GSH analogue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 1579-1582, 2002.
67. Liou, J.Y., Huang, T.M., Chang, G.G., Inhibition of octopus glutathione transferase by Meisenheimer complex analog, S-(2,4,6-trinitro phenyl) glutathione, *J. Protein Chem.*, 19, 615-620, 2000.
68. Bhargava, M.M., Listowsky, I., Arias, I.M., Ligandin. Bilirubin binding and glutathione-S-transferase activity are independent processes, *J. Biol. Chem.*, 253, 4112-4115, 1978.
69. Jagt, D.L., Wilson, S.P., Dean, V.L., Simons, P.C., Bilirubin binding to rat liver ligandins (glutathione S-transferases A and B). Relationship between bilirubin binding and transferase activity, *J. Biol. Chem.*, 257, 1997-2001, 1982.
70. van Haaften, R.I., Haenen, G.R., van Bladeren, P.J., Bogaards, J.J., Evelo, C.T., Bast, A., Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR-alpha-tocopherol, *Toxicol. In Vitro*, 17, 245-251, 2003.

71. Aitio, A., Bend, J.R., Inhibition of rat liver glutathione-S-transferase activity by aprotic solvents, *FEBS Lett.*, 101, 187-190, 1979.
72. Balabaskaran, S., Smith, J.N., The inhibition of 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl) ethane (DDT) dehydrochlorinase and glutathione S-aryltransferase in grass-grub and housefly preparations, *Biochem. J.*, 117, 989-996, 1970.
73. Ueda, M., Mozaffar, S., Tanaka, A., Catalase from *Candida boidinii* 2201, *Methods Enzymol.*, 188, 463-465, 1990.
74. Atkins, W.M., Wang, R.W., Bird, A.W., Newton, D.J., Lu, A.Y.H., The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST), *J. Biol. Chem.*, 268, 19188-19191, 1993.
75. Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P., Loewen, P., Activity, peroxide compound formation, and heme synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 342, 58-67, 1997.
76. Segel I.H., *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience Publication, New York, 125-135, 1975.
77. Lyon, R.P., Atkins, W.M., Kinetic characterization of native and cysteine 112-modified glutathione S-transferase A1-1: reassessment of nonsubstrate ligand binding, *Biochemistry*, 41: 10920-10927, 2002.
78. Sies, H., Cadenas, E., Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 311, 617-631, 1985.
79. Girotti, A.W., Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid. Res.*, 39, 1529-1542, 1998.
80. Carlberg, I., Mannervik, B., Reduction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate by glutathione reductase and the effect of NADP⁺ on the electron transfer, *J. Biol. Chem.*, 261, 1629-635, 1986.
81. Nay, B., Fournier, D., Baudras, A., Baudras, B., Mechanism of an insect glutathione S-transferase: kinetic analysis supporting a rapid equilibrium random

sequential mechanism with housefly II isoform, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 71-79, 1999.

82. Ghadermarzi, M., Moosavi-Movahedi, A., Ghadermarzi, M., Influence of different types of effectors on the kinetic parameters of suicide inactivation of catalase by hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1431, 30-36, 1999.
83. Eckelt, V.H.O., Liebau, E., Walter, R.D., Henkle-Dührsen, K., Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 95, 203-214, 1998.
84. Cardoso, R.M.F., Daniels, D.S., Bruns, C.M., Tainer, J.A., Characterization of the electrophile binding site and substrate binding mode of the 26-kDa glutathione S- transferase from *Schistosoma Japonicum*, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 51, 137-146, 2003.