

**HİNDİ KARACİĞERİNDEN NADPH-SİTOKROM P450
REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL
MADDELERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ebru AKKEMİK

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ
2012**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HİNDİ KARACİĞERİNDEN NADPH-SİTOKROM P450
REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL MADDELERİN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ebru AKKEMİK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2012**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




TEZ ONAY FORMU

Hindi Karaciğerinden NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Ebru AKKEMİK tarafından hazırlanan bu çalışma 16/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum



Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirimlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

HİNDİ KARACİĞERİNDEN NADPH-SİTOKROM P450 REDÜKTAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL MADDELERİN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ebru AKKEMİK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

NADPH-Sitokrom P450 redüktaz (CPR; EC 1.6.2.4) enzimi detoksifikasyon metabolizmasında elektron transferini katalizleyen kilit bir enzimdir. Bu tez kapsamında CPR enziminin hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde hindi karaciğer dokusundan elde edilen mikrozomal pelet emulgen kullanılarak çözündürülmüş ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklenerek enzim %23,43 verimle 114,15 kat saflaştırılmıştır. İkinci yöntemde ise hindi karaciğer dokusundan elde edilen mikrozomal pelet emulgen kullanılarak çözündürülmüş DE52-Selüloz kolonuna ardından da 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklenerek enzim %8 verimle 124 kat saflaştırılmıştır. Enzim saflığı her iki yöntemde de SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Saflaştırılan enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri tespit edilmiştir. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ag^+ , Tl^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Co^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} ve As^{+5} metal iyonlarının inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. Ag^+ , Hg^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,60, 13,52 ve 227 μM K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla $0,02967 \pm 0,0067$; yarışmalı, $10,37 \pm 2,24350$; yarışmalı ve $251 \pm 108,6247$; yarışmasız olarak tespit edilmiştir. Daha sonra çalışma kapsamında enzim aktivitesi üzerine oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, enrofloksasin, tilyosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, amikasin sülfat, linkomisin HCl, seftriakson disodyum ve vankomisin HCl antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

2012, 134 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitokrom P450 redüktaz, hindi karaciğeri, metal inhibisyonu, antibiyotikler

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NADPH CYTOCHROME P450 REDUCTASE ENZYME FROM TURKEY LIVER (*Meleagris gallopavo*) AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME CHEMICAL SUBSTANCES ON ENZYME ACTIVITY

Ebru AKKEMİK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR; EC 1.6.2.4) is the key enzyme that catalyzes the electron transfer in detoxification metabolism. Within the scope of this thesis, two different methods were used for purification of CPR enzyme from turkey liver microsomes. By the first method, the enzyme was solubilized by detergent from microsomal fraction of turkey liver and was purified 114.15 fold with a yield of 23.43% using 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column. By the second method, CPR was solubilized by detergent from microsomal fraction of turkey liver and was purified 124-fold with a yield of 8% using DE52-cellulose column and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column. The purity of the enzyme was verified by SDS-PAGE in both methods. Characteristics and kinetic properties of the purified enzyme were determined. In addition, the effects of metal ions Ag^+ , Tl^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} and As^{5+} on NADPH-cytochrome P450 reductase enzyme activities purified from turkey liver microsomes were investigated in *in vitro* conditions. IC_{50} value and K_i constants were calculated for the metals which show inhibition effects. It was determined that Ag^+ , Hg^{2+} and Cu^{2+} metal ions showed inhibitory effects on the enzyme activity. IC_{50} values were determined as 1.60, 13.52 and 227 μM respectively; K_i constants and inhibition types were found as 0.02967 ± 0.0067 ; competitive, 10.37 ± 2.24350 ; competitive and 251 ± 108 , 6247 μM ; noncompetitive for the metals which showed inhibitory effects. Then, in the scope of the study inhibitory effects of some antibiotics; oxytetracycline dihydrate, kanamycin sulfate, gentamicin sulfate, enrofloxacin, tylosin, chloramphenicol, cefuroxime sodium, cefazolin sodium, amikacin sulfate, linkomisin HCl, disodium ceftriaxone and vancomycin HCl, on the enzyme activity were investigated in *in vitro* conditions.

2012, 134 pages

Keywords: Cytochrome P450 reductase, turkey liver, metal inhibition, antibiotics

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTCİ yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle çalışmalarımda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTCİ'ye derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca yardım ve destekleri için biyokimya çalışma grubu hocalarımdan Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVIÖĞLU'na Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasındaki yardımları için Sayın Arş. Gör. Pınar TAŞER'e ve biyokimya araştırma labratuarında çalışan tüm arkadaşlarıma, Sayın Arş. Gör. Fatma Betül ÖZGERİŞ'e ve ekip arkadaşlarına, Sayın Öğr. Gör. Büşra KONCUK'a, Sayın Arş. Gör. Sevil AYDIN'a ve Sayın Arş. Gör. Müslüm KUZU'ya

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme ve yakın arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Zuhul ALIM ve Sayın Züleyha KUDAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması 2011/94'nolu "Hindi Karaciğerinden NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaç ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine *İn Vitro* Etkilerinin İncelenmesi" adlı proje Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Ebru AKKEMİK

Aralık 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sitokrom P450 Monoksijenaz (CYP450) Enzim Sistemleri	4
1.2. NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz (CPR)	11
1.3. Toksik Metaller ve Zararları.....	22
1.4. Antibiyotikler	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	43
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	44
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	45
3.2. Yöntemler	51
3.2.1. NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivite ölçümü.....	51
3.2.2. Protein tayini	52
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini	52
3.2.2.b. Lowry yöntemiyle kantitatif protein tayini	52
3.2.3. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom c redüktaz enziminin saflaştırılması	53
3.2.3.a. Hindi karaciğeri mikrozomlarının hazırlanması	53
3.2.3.b. Hindi karaciğer mikrozomlarının parçalanması	54
3.2.3.c. DE52 anyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun paketlenmesi.....	54
3.2.3.d. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite jelinin hazırlanması ve	

kolona paketlenmesi	55
3.2.3.e. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunu ile saflaştırılması	56
3.2.3.f. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin DEAE52 anyon değişim ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunu kullanılarak saflaştırılması	56
3.2.4. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	57
3.2.5. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları	59
3.2.5.a. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin moleköl kütesinin tayini	59
3.2.5.b. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet ve optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik çalışmalar	60
3.2.5.c. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik çalışmalar	60
3.2.5.d. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin aktivasyon enerjisinin (E_a) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar	61
3.2.5.e. NADPH ve sitokrom c substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar	61
3.2.6. Hindi karaciğerinden saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi için İnhibisyon Çalışmaları	62
4. ARAşTIRMA BULGULARI	64
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	64
4.2. Hindi Karaciğer Mikrozomal NADPH-Sitokrom c Redüktaz Enziminin Saflaştırılması	64
4.2.1. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom c redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	67
4.3. Hindi Karaciğer Mikrozomlarından Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz Enziminin Karakterizasyon	

Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar.....	69
4.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar...	69
4.3.2. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütlesinin belirlenmesine yönelik sonuçları	70
4.3.3. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	71
4.3.4. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	72
4.3.5. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik sonuçlar	73
4.3.6. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar	74
4.3.7. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi (E_a) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi	75
4.3.8. NADPH ve sitokrom c substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgüllük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	76
4.4. Hindi Karaciğer Mikrozomlarından Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	105
KAYNAKLAR	124
ÖZGEÇMİŞ	135

SİMGELER DİZİNİ

ΔH	Aktivasyon entalpisi
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BM3	<i>B.Megaterium</i> P450 içeren redüktaz
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CEES	2-kloroetil etil sülfid
CPR	NADPH-Sitokrom P450 redüktaz
CYP	Sitokrom sistemi
CYP450	Sitokrom P450 sistemi
Da	Dalton
DE	Dietil
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dikloro difenol trikloroetan
E.C.	Enzim kod numarası
E_a	Aktivasyon enerjisi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
EROD	Ethoksiresorufin-O-deetilaz aktivitesi
EÜ	Enzim ünitesi
FAD^+	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononucleotide
FNR	Ferrodoksin $NADP^+$ redüktaz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_{cat}	Turnover sayısı
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

K_M	Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MSR	Metiyonin sentaz redüktaz
MT	Metiltransferaz
NADH	Nikotinamidadeninükleotid (redükte form)
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
NAT	N-asetiltransferaz
NOS	Nitrik oksit sentaz
NRI	Yeni redüktaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCD	Poliklorine difeniller
PER	Amonyum peroksidisülfat
PROD	7-pentoksiresorufin O-dealkilasyon
Q_{10}	Aralarında 10 °C fark olan iki aktivite değerinden büyük olanın küçük olanına oranı
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SR	Sülfid redüktazın
SULT	Sulfotransferaz
T3	Tiroit Hormonu
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilendiamin
UGT	Uridin difosfat glukuronosiltransferaz
V_{max}	Maksimum hız
V_o	Özgüllük sabiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Ksenobiyotik metabolizmasının iki fazı	3
Şekil 1.2.	Bir ilacın sitokrom P450 sistemi tarafından oksidasyonu	9
Şekil 1.3.	Difalavin redüktaz ailesinin bölgesel organizasyonunun şematik gösterimi	11
Şekil 1.4.	(A) CPR enziminin üç boyutlu yapısı ve (B) CPR proteinin kofaktör tanımada görevli bölgelerini gösteren topoloji diyagramı	14
Şekil 1.5.	Monoksijenaz sisteminde sitokrom P450 redüktazın rolü	16
Şekil 1.6.	Ökaryotik hücrelerin birçoğundaki endoplazmik retikulum üzerinde bulunan birkaç enzim için elektron verici olan CPR	18
Şekil 1.7.	Endoplazmik retikulumdaki elektron zincirinde gerçekleşen, elektron transferi ve fizyolojik fonksiyonları	19
Şekil 1.8.	Metal içeren oksidatif stres için olası mekanizma	24
Şekil 2.1.	CPR'ın hidrofobik domaininin biyolojik membrana bağlanması için mümkün olan iki ihtimal.....	30
Şekil 4.1.	Lowry yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	64
Şekil 4.2.	Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik (Yöntem 1)	65
Şekil 4.3.	Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–Sitokrom P450 redüktaz enziminin DEAE-Selüloz anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik	66
Şekil 4.4.	Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik (Yöntem 2)	66
Şekil 4.5.	DE52 Anyon değişim sonrası elde edilen NADPH-sitokrom P450 redüktazın SDS-PAGE fotoğrafı	67
Şekil 4.6.	a) 1. Yöntem sonunda (2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla) b) 2. Yöntem sonunda SDS-PAGE ile saflık kontrolü	68

Şekil 4.7.	2. Yöntem sonunda 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılan hindi karaciğer mikrozomal NADPH–Sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	68
Şekil 4.8.	SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-R _f grafiği	69
Şekil 4.9.	Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorpsiyon değerleri	70
Şekil 4.10.	Jel filtrasyon sonucu çizilen Log MK-K _{av} grafiği.....	71
Şekil 4.11.	Jel filtrasyon kolonundan alınan enzimin aktivite-tüp sayısı grafiği	71
Şekil 4.12.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği.....	72
Şekil 4.13.	Değişik konsantrasyonlardaki K-fosfat (pH 7,6) tampon çözeltileri kullanılarak hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği	73
Şekil 4.14.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için farklı pH lardaki K-fosfat ve Tris tamponu ile belirlenen stabil pH grafiği	74
Şekil 4.15.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği	75
Şekil 4.16.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği	76
Şekil 4.17.	Sitokrom c substratı için K _M ve V _{max} bulunmasına yönelik 1/V-1/[Sitokrom c] çizilen Lineweaver-Burk grafiği	78
Şekil 4.18.	NADPH substratı için K _M ve V _{max} bulunmasına yönelik 1/V-1/[NADPH] çizilen Lineweaver-Burk grafiği	78
Şekil 4.19.	Ag ⁺ 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda).....	80
Şekil 4.20.	Hg ⁺² 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)	81

Şekil 4.21. Cu ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)	82
Şekil 4.22. Zn ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)	83
Şekil 4.23. Cd ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)	84
Şekil 4.24. Co ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)	85
Şekil 4.25. Mn ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-fosfat (b) HEPES Tamponu)	86
Şekil 4.26. Ni ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-fosfat (b) HEPES Tamponunda)	87
Şekil 4.27. (a) Ca ⁺² ve (b) Mg ⁺² hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) HEPES (b) K-Fosfat Tamponunda).....	88
Şekil 4.28. a)TI ⁺ ve b) Pb ⁺² ,nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	89
Şekil 4.29. a) As ⁺⁵ ve b) Al ⁺³ ,ün hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	90
Şekil 4.30. Oksitetrasiklin'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	91
Şekil 4.31. Kanamisin Sülfat'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	92
Şekil 4.32. Gentamisin Sülfat'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	93
Şekil 4.33. Enrofloksasin'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	94
Şekil 4.34. Tiylosin'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)	95
Şekil 4.35. Kloramfenikol'ün hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	96
Şekil 4.36. Sefuroksim Sodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450	

redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	97
Şekil 4.37. Sefazolin Sodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	98
Şekil 4.38. Amikasin Sülfat'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.39. Linkomisin HCl'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	100
Şekil 4.40. Seftriakson Disodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	101
Şekil 4.41. Vankomisin HCl'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	102
Şekil 4.42. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit [Ag^+] için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	103
Şekil 4.43. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit [Hg^{+2}] için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	103
Şekil 4.44. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit [Cu^{+2}] için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	İlaç metabolize edici aktivitenin organlara göre dağılımı	2
Çizelge 1.2.	CPR tarafından indirgendiği bilinen bileşikler	20
Çizelge 2.1.	Farklı kaynaklı CPR enzimleri için K_M ve K_i değerleri.....	37
Çizelge 3.1.	NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonunda kullanılan gradient çizelgesi	47
Çizelge 3.2.	NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği	51
Çizelge.4.1.	Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları.....	67
Çizelge 4.2.	300 mM K-fosfat tamponu kullanılarak hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	72
Çizelge 4.3.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 7,6) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	73
Çizelge 4.4.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH ile ilgili sonuçlar	74
Çizelge 4.5.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi	75
Çizelge 4.6.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık, E_a ve Q_{10} tayini sonuçları.....	76
Çizelge 4.7.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasınayönelik Aktivite-sitokrom c derişim çizelgesi	77
Çizelge 4.8.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları	

	için K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları	78
Çizelge 4.9.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Ag^{+} 'nin etkisi	80
Çizelge 4.10.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Hg^{+2} 'nin etkisi	81
Çizelge 4.11.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'nin etkisi	82
Çizelge 4.12.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi	83
Çizelge 4.13.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Cd^{+2} 'nin etkisi	84
Çizelge 4.14.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Co^{+2} 'nin etkisi	85
Çizelge 4.15.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi	86
Çizelge 4.16.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Ni^{+2} 'nin etkisi	87
Çizelge 4.17.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine a) Ca^{+2} ve b) Mg^{+2} 'nin etkisi	88
Çizelge 4.18.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine a) Tl^{+} ve b) Pb^{+2} 'nin etkisi	89
Çizelge 4.19.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine As^{+5} ve b) Al^{+3} 'nin etkisi	90
Çizelge 4.20.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Oksitetrasiklin'nin etkisi	91
Çizelge 4.21.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Kanamisin Sülfat'ın etkisi	92
Çizelge 4.22.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Gentamisin Sülfat'ın etkisi	93
Çizelge 4.23.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Enrofloksasin'in etkisi	94
Çizelge 4.24.	Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom	

P450 redüktaz aktivitesi üzerine Tiylosin'in etkisi	95
Çizelge 4.25. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Kloramfenikol'ün etkisi	96
Çizelge 4.26. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi	97
Çizelge 4.27. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Sefazolin Sodyum'un etkisi	98
Çizelge 4.28. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi	99
Çizelge 4.29. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Linkomisin HCl'in etkisi	100
Çizelge 4.30. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Seftriakson Disodyum'un etkisi.....	101
Çizelge 4.31. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Vankomisin HCl'in etkisi	102
Çizelge 4.32. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metallerin IC ₅₀ değerleri	104
Çizelge 4.33. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metallerin IC ₅₀ değerleri, K _i sabitleri ve İnhibisyon Tipleri ...	104
Çizelge 5. 1. Farklı kaynaklı CPR enzimleri için K _M	116

1. GİRİŞ

İnsanlar, ilaçlar ve gıdalardaki katkı maddeleri veya çevre kirleticiler vasıtasıyla çeşitli şekillerde giderek artan bir biçimde birçok yabancı kimyasalın (ksenobiyotiklerin) etkisine maruz kalmaktadırlar. Ksenobiyotiklere nasıl maruz kaldığımızın ve onlarla nasıl başa çıkmamız gerektiğinin öğrenilmesi ancak ksenobiyotiklerin hücrelerde nasıl metabolize olduklarının bilinmesi ile aydınlığa kavuşacaktır.

Ksenobiyotik maddeler vücut için yabancı bileşiklerdir. Genel olarak tıp bilimleri ile ilişkili olan ksenobiyotikler; poliklorine difeniller (PCDler), ilaçlar, kimyasal karsinojenler vb. bileşiklerdir (Murray *et al.* 2004).

Ksenobiyotikler metabolizmaya dâhil olduğu andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalırlar. Bu kimyasalların enzimlerin etkisi ile vücutta kimyasal değişikliğe uğramasına biyotransformasyon denilir. Biyotransformasyon sonucu ksenobiyotikler genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilirler. Bu nedenle biyotransformasyon etkinliğe yansımaları bakımından bir biyoaktivasyon olayıdır. Biyotransformasyona detoksifikasyon (zehirsizlenme) adı da verilir. Fakat bu terimin sözcük anlamında ifade ettiği durum her zaman meydana gelmez. Bazen ilaçlar biyotransformasyon sonucu daha etkili ve/veya daha toksik bileşiklere dönüşerek biyoaktif olurlar. Metil alkolün formaldehite dönüşmesi bu olaya güzel bir örnektir (Kayaalp 2002).

Ksenobiyotik maddelerin biyotransformasyonunda, içerdiği enzim çeşitliliğinin etkinliğinin fazlalığı nedeniyle karaciğerin rolü çok büyüktür. Akciğerler, böbrekler, mide-barsak mukozası, kan, diğer yapılar ve barsak florasındaki bakterilerde içerdiği çeşitli enzimlerle biyotransformasyona katkıda bulunur. Karaciğerin metabolik aktivitesi 100 olarak kabul edilirse diğer organların metabolik işlevi Çizelge 1.1'deki gibi sıralanabilir.

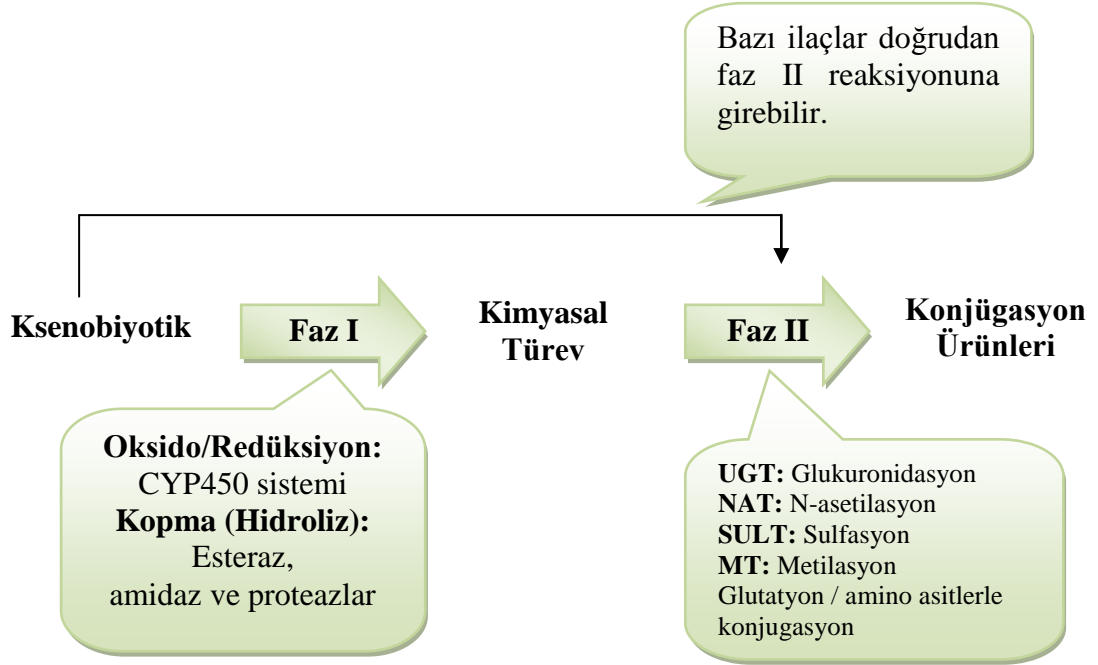
Çizelge 1.1. İlaç metabolize edici aktivitenin organlara göre dağılımı (Kayaalp 2002)

Organ	% Aktivite
Karaciğer	100
Akciğer	20
Böbrek	8
Bağırsak	6
Plasenta	5
Adrenal	2
Deri	1
Beyin	0,5

Ksenobiyotik metabolize edici aktivitenin büyük bölümü hücre içi bir organel olan endoplazmik retikulum (ER) ve sitozolda gerçekleşir. Bunun yanı sıra, ksenobiyotikler mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranında da biyotransformasyona uğrarlar. Dokular homojenize edildikten sonra kademeli olarak değişik hızlarda santrifüj edilirse ER parçalanır ve membran parçaları mikrozom adı verilen mikrovezikülleri oluştururlar. ER'de bulunan ksenobiyotik metabolize-edici enzimlere bu nedenle mikrozomal enzimler adı verilir.

İlaçların ve diğer ksenobiyotiklerin vücutta maruz kaldıkları enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre dört ana grupta toplanırlar: 1. Oksidasyon 2. İndirgenme 3. Kopma 4. Konjügasyon. Bunlardan ilk üçüne birinci faz reaksiyonları denilir. İlk ikisinde, moleküldeki bir kimyasal grubun genellikle daha polar bir gruba dönüşmesi söz konusudur. Üçüncüsünde, esterleşme veya eterleşme sonucu maskelenmiş bir polar grup, vücutta kopma sonucu serbest hale gelir. Konjügasyon ise esas itibariyle bir sentez reaksiyonudur, buna ikinci faz reaksiyonu adı da verilir. İkinci faz reaksiyonu, genellikle birinci faz reaksiyonu sonucu molekülün değişen kısmı üzerinde sekonder bir reaksiyon şeklinde, bazen de doğrudan (primer) olur. Bazı ilaçlar sadece birinci faz reaksiyonlarına primer olarak maruz kalıp atılırlar. Ancak ilaçların çoğu peş peşe birinci

ve ikinci faz reaksiyonlarına maruz kalır. İkinci faz reaksiyonu, birincisi sonucu oluşan polar metaboliti daha da polar yapar (Kayaalp 2002).



Şekil 1.1. Ksenobiyotik metabolizmasının iki fazı (Kayaalp 2002)

*CYP450, sitokrom P450; UGT, Uridin difosfat glukuronosiltransferaz; NAT, N-asetiltransferaz; SULT, sulfotransferaz; MT, metiltransferaz

Zararlı kimyasallar vücuda girdikten sonra yukarıda bahsedilen biyotransformasyon reaksiyon türlerinin genellikle sadece birine maruz kalmaz. Birçok kimyasal reaksiyona maruz kaldıkları için birkaç tane metabolit (Biyotransformasyon sonucu ksenobiyotiklerin dönüştüğü bileşiklere o kimyasalın metaboliti adı verilir) oluşur. Bazen oluşan bu metabolitler biyotransformasyona uğrayarak vücuttan atılır. Bazen ksenobiyotikler değişikliğe uğramadan da atılıma uğrayabilir (Kayaalp 2002).

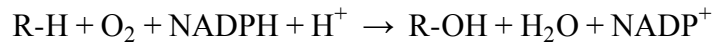
Faz I, monooksijenazlar veya sitokrom P450 türleri olarak da adlandırılan enzim sınıfının üyeleri tarafından katelizlenen hidroksilasyon reaksiyonlarıdır. Faz I'de oluşmuş hidroksile veya diğer bileşikler Faz II'de spesifik enzimler aracılığı ile glukuronik asid, sülfat, asetat, glutasyon veya metilasyon sonucu çeşitli polar metabolitlere dönüştürülürler. Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın amacı,

ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini arttırmak ve böylece vücuttan atılımlarını kolaylaştırmaktır. Hidrofob özellikte olan bazı ksenobiyotikler daha polar bileşiklere dönüştürülmeseydi, hemen hemen süresiz olarak adipoz dokuda devamlılıklarını sürdürürlerdi (Murray *et al.* 2004).

1.1. Sitokrom P450 Monoksijenaz (CYP450) Enzim Sistemleri

Aeorobik yaşayan hücrelerin kullandığı moleküler oksijenin yaklaşık %95'i solunum zinciri tarafından suya indirgenir. Geri kalan kısmı ise, ya H₂O₂ oluşturan oksidazlar, ya da oksijen molekülünün bir veya her iki atomunun hidroksil grubuna dönüşüp, direkt olarak organik substrat moleküllerinin yapısına girdiği reaksiyonları katalizleyen oksijenaz enzimleri tarafından kullanılır. Oksijenazlar kendi içinde iki sınıfa ayrılırlar: Oksijen molekülünün her iki atomunu organik substrat molekülün yapısına katan dioksijenazlar ve sadece bir atomunu katan monoksijenazlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Monoksijenazlar (karışık fonksiyonlu oksijenazlar), moleküler oksijenden gelen bir oksijen atomunu bir substratın yapısına katar (bir hidroksil gurubu oluşturur) diğer oksijen atomunu ise suya indirger. Sitokrom P450 sisteminde, bu reaksiyonlar için gereken indirgeyici güç NADPH'dan sağlanır. Bir sitokrom P450 enziminin katalizlediği reaksiyonun tümü:



şeklinde gösterilir. Burada R bir steroid, ilaç veya başka bir kimyasal olabilir.

Sitokrom P450 monoksijenaz (CYP450) enzim sistemleri olgun eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunan hem protein ailesidir. Sitokrom P450 enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerden biridir. Bu sistem indüksiyon veya inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir. CYP450 enzimleri, 400–530 aminoasitten oluşan proteinlerdir. Baz dizilimi

benzerliklerine göre P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır (Özerol 1996; Çetin 1999). Bu güne kadar 1200'den fazla farklı sitokrom P450 genlerinin var olduğu proteinlerin yapılarının belirlenmesi ya da saptanması sonucu tespit edilmiştir (Stoilovl *et al.* 2001). Moleküler kütleleri 48 ile 56 kDa arasında değişen ve aminoasit dizilimi bakımından farklılık gösteren hemoproteinlerdir (Kayaalp 2002).

CYP450 sistemi katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorban spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbondioksit gazı geçirildikten sonra sodyum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorban spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO bağlanır ve 450 nm'de pik yapan absorban spektrumu elde edilir. Bu enzimlere P450 adı, 450 nm'de absorban gösterdiği için verilmiştir. Spesifik CYP450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorban veren dalga boylarına sahiptir. Karaciğerde bir çok CYP450 enzimleri bulunmakta ve CYP450 enzimleri baz dizilimi benzerliklerini kontrol eden gen ailelerine veya substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar (Özerol 1996).

CYP450 proteinlerinde bir tek demir protoporfirin IX prostetik grubu bulunur. Her hem proteininde, hem bir oksijen molekülünün hem de substratların bağlanabileceği yerler vardır. Bilinen tüm CYP450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 pirol azot atomuna ve iki aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş bir sistein aminoasidine ait sülfidril grubu bulunur. Hem demiri, hekza yerleşimde düşük spinli demir ve penta yerleşimde yüksek spinli demir olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik kalkanlar olarak tanımlanır ve hemdeki demir atomunu hekza yerleşimli durumdan penta yerleşimli duruma çevirir. CYP450 molekülü bir substrata bağlanınca, bu elektronik kalkanda irritasyon meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşime geçer. Substrata bağlı, penta koordine durum (-170 mV), substrata bağlanamayan hekza koordine duruma (-270 mV) göre daha fazla

pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için CYP450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir. Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyonunun meydana gelmesi sırasında oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik (Fe^{+3}) durumundan ferro (Fe^{+2}) durumuna indirgenmelidir. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e^-) gerekir. Elektronlar CYP450 molekülüne tek tek transfer edilir. İlk önce oksijen bağlanır ve daha sonra substratın reaksiyona katılabilmesi için aktif oksijen türleri oluşturularak ayrılır (Özerol 1996).

CYP Enzimlerinin Özellikleri

1. Birçok dokuda işlev görürler,
2. Hepatositlerde en yüksek derişimde bulunmaları ile birlikte diğer dokularda da vardır,
3. Primer olarak oksidatif metabolizmayı düzenlerler,
4. Hücre içinde bulunduğu yere göre: Mitokondride bulunan streoidojenik CYP enzimleri ve endoplazmik retikulumda bulunan ksenobiyotik CYP enzimleri olmak üzere iki grupta incelenirler (Nemeroff *et al.* 1996; Çetin 1999).

Streoidojenik CYP Enzimleri

1. Tek hücreli organizmaların hücre zarı bütünlüğünü sağlarlar,
2. Farklılaşmış organizmaların gelişiminin hormonal düzenleyicileridirler,
3. Etki ettiği maddeler konusunda özgündürler,
4. Tüketilen maddelerin biyolojik kullanım yapılarına dönüştürülmesini sağlarlar, (steroidler, safra asitleri, kolesterol, prostaglandin sentezi) (Nemeroff *et al.* 1996; Çetin 1999).

Ksenobiyotik CYP Enzimleri

1. Streoidojenik CYP enzimlerinin bir türevidirler,
2. Transferaz enzimleriyle eş zamanlı olarak oluşmuşlardır,
3. Bitkilerin oluşturduğu diyet toksinlerini yıkarlar,
4. Eliminasyon için ilaçları biyotransformasyona uğratırlar,

5. Tüketilen maddelerin detoksifikasyonunda görev alırlar (toksinler, karsinojenler, ilaçlar, mutajenler) (Nemeroff *et al.* 1996; Çetin 1999).

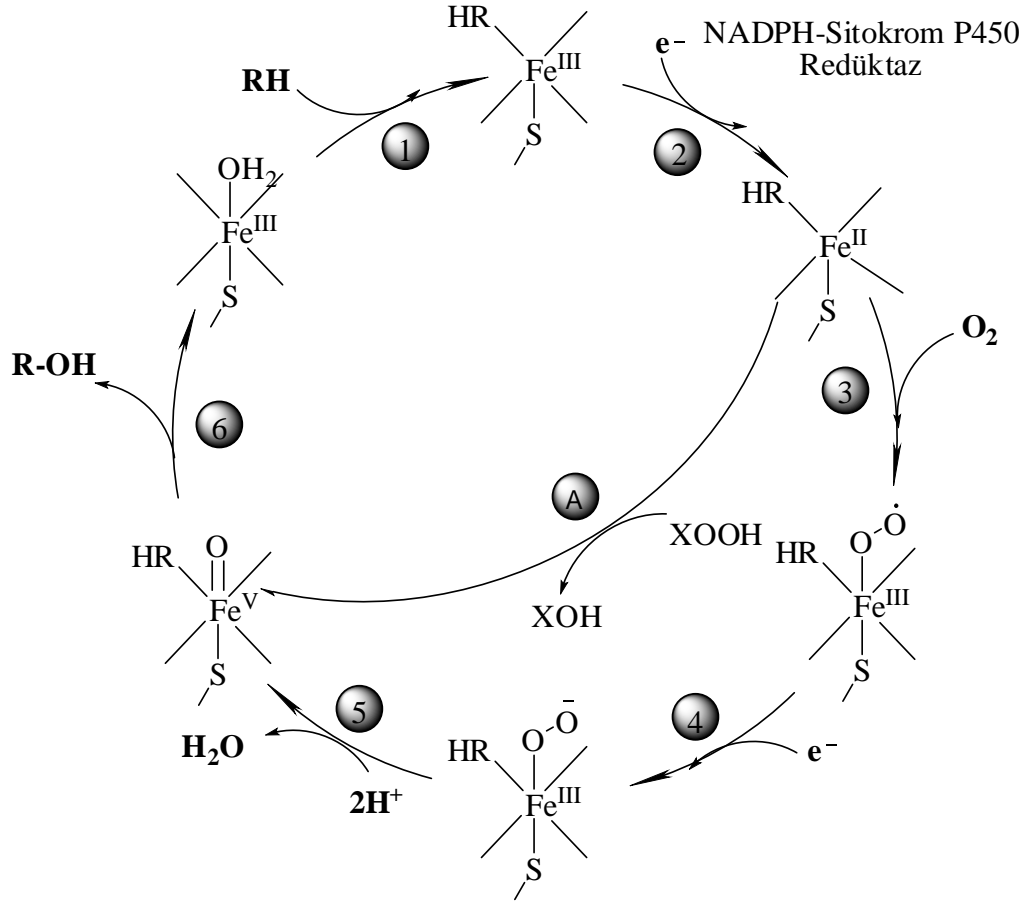
Spesifik CYP enzimlerini kodlayan genlerin izole edilmesiyle bu enzimlerin aminoasit dizilimleri belirlenebilmiştir. Bu bilgi kullanılarak, farklı enzimler aminoasit dizilimine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada enzimler hem yapı hem fonksiyonel olarak birbirlerine yakın enzimlerdir. CYP enzimleri ilk numaradan itibaren ailelere ayrılmıştır. Bu ailedeki bütün enzimler aminoasit dizilimi yönünden en az %40 benzerlik gösterenler aynı aile içine alınmaktadır. Alfabetik harfler ile alt grup ailelere ayrılmaktadır. Aynı alt aile grubunda ise aminoasit dizilim homolojisi en az %55 olmaktadır. En son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (Çetin 1999).

Sitokrom P450 sistemi süper bir gen ailesine sahiptir. Sitokrom P450 monooksijenazlar ekzojen ve endojen bileşiklerinin farklı tiplerinin çok geniş bir oranının metabolizmalarını katalizleyebilir. Ekzojenaz bileşikler; ilaçların birçoğu (amfetaminler, p-asetaminofen), endüstriyel çözücüler (benzen, piridin, toluen, aseton), kimyasal karsinojenler, polisiklik aromatik ve halojenli hidrokarbonlar (benzopren, TCDD, poliklorinat bifeniller), insektisitler (forat, tiokarb), pestisidler (paration), herbisidler (diklorabenil), sabun ve deodorantların karışımındaki maddeler, belirli zehirli mantarlar, antibiyotikler, kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapik ajanlar (klortrianisen, TACE, TAM), mutajenler (nitrozaminler, N-metil-N'-nitro-N-nitrozguanidin), amino azo boyaları ve diazo bileşikleri, aromatik aminler, heterosiklikler, nitrofuranlar, odun terpenleri, epoksitler, karbamataz, alkil halidler, izosafrol, bitkilerin kökünde bulunan birçok yiyecekte var olan safrol türevleri, antioksidanlar, yiyecek katkı maddeleri, fermante alkollü içecekler vb. endogenaz bileşenler; steroidler, yağ asitleri, D vitamini, proslandinler ve safra tuzu içermektedir.

Sitokrom P450 sistemi hücrelerde iki değişik yerde fonksiyon gösterir. Birincisi mitokondriyal sitokrom P450 monooksijenaz sistemi, steroidlerin hidroksilasyonunda görev yapar. Böylece bu bileşiklerin suda daha iyi çözünür

hale gelmesini sağlar. Örneğin plasenta, yumurta hücreleri, testisler, steroid hormonları sentezleyen dokularda, bu sistem, kolesterolden steroid hormonlar sentezlenirken oluşan ara ürünlerin hidroksillenmesinde kullanılır. Karaciğer bu sistemi safra asidi sentezinde kullanır. Böbrek ise Vitamin D'yi (vitamin 25-hidroksikolekalsiferolü) hidroksilleyerek biyolojik aktif (1,25-hidroksillenmiş) şeklini oluşturmada kullanır.

İkincisi ise mikrozomal sitokrom P450 sistemidir. Granülsüz endoplazmik retikulum membranları (özellikle karaciğerde) ile ilişkili olan mikrozomal sitokrom P450 sisteminin en önemli fonksiyonu yabancı bileşiklerin (ksenobiyotikler) detoksifikasyonudur. Bunlar arasında çeşitli ilaçlar, petrol ürünleri karsinojenler ve böcek ilaçları gibi maddeler bulunur. Sitokrom P450 monoksigenaz sistemi, yine indirgeyici güç kaynağı olarak NADPH'ı kullanıp, bu toksinleri hidroksilleyebilir. Bu değişmelerin iki amacı var; Birincisi ilacın kendisini aktive veya inaktive edebilir. İkincisi ise toksik bir bileşiği daha çözünür hale getirerek, atılımını hızlandırır. Ama sıklıkla, yeni oluşan hidroksil grubu, polar bir bileşikle, konjugasyon yeri olarak görev yapar. Örneğin, glukoronik asit, hidroksil grubundan bağlanarak, bileşiğin çözünürlüğünü önemli derecede arttıracaktır (Champe *et al.* 2007).



Şekil 1.2. Bir ilacın sitokrom P450 sistemi tarafından oksidasyonu

*Akif bölgedeki hem demiri “Fe” olarak gösterilmiştir. Elektronlar sitokrom P450 redüktaz tarafından NADPHdan sağlanmaktadır (Meunier *et. al.* 2004)

1. Substrat enzimin peptid zincirinin karşısına, hem grubu ihtiva eden aktif kısmına bağlanmaktadır. Substrat bağlandığında enzimin aktif kısmının konformasyonunda değişme meydana gelir. (İnhibitörler ve belirli substratlar hem grubunda yer alan demir grubuna direkt olarak da bağlanabilmektedir) (Şekil 1.2) (Montellano 1995; Poulos *et al.* 1995; Meunier *et al.* 2004).

2. Aktif bölgenin elektron durumundaki değişimden dolayı NADPH’tan bir elektron transfer edilerek hem grubundaki Fe⁺³, Fe⁺²’ye indirgenir. Bu reaksiyonu NADPH sitokrom P450 redüktaz katalizlemektedir (Şekil 1.2) (Sligar 1979).

3. Moleküler oksijen distal aksiyal koordinasyon pozisyonuna kovalent olarak bağlanır. Oksijen molekülünün bağlanması ile birlikte sistein ligandı hem proteinlerinde daha aktif hale gelmekte ve bu yüzden de histidinden daha iyi bir elektron donörü olmaktadır. Ancak bu durum bazen aradaki bağı kopmasına sebep olup süperoksit radikallerinin serbest kalmasıyla katalitik döngüyü yarıda kesebilmektedir. Bu olay decoupling reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2) (Meunier *et al.* 2004).

4. İkinci bir elektron ya CPR, ferredoksinler ya da sitokrom-b5 üzerinden NADH tarafından verilerek dioksijeni negatif yüklü perokso grubuna dönüştürür. Bu kısa ömürlü bir ara basamaktır.(Şekil 1.2) (Meunier *et al.* 2004).

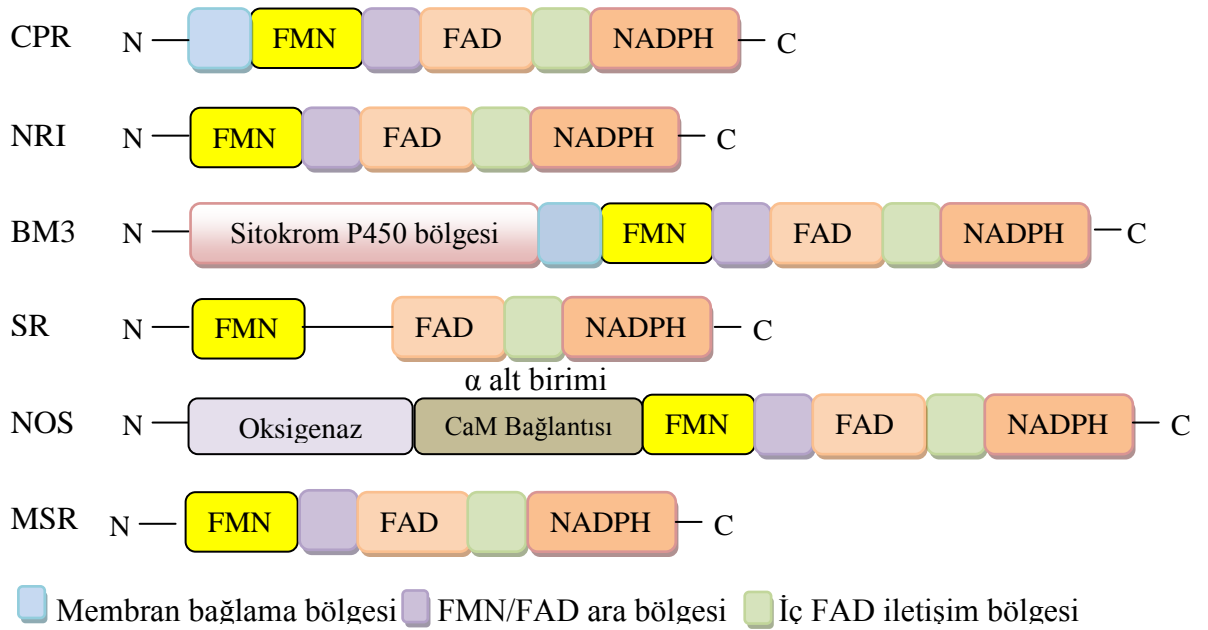
5. Dördüncü grupta oluşan perokso grubu çevredeki aminoasitlerin yan grupları tarafından çabucak protonlanarak bir mol su çıkışına sebep olur, ve oldukça reaktif Fe (V)-okso ürünleri oluşur (Şekil 1.2) (Meunier *et al.* 2004).

6. İçerdiği substrat ve enzime bağlı olarak P450 enzimleri çok çeşitlilikteki reaksiyonları katalizler. Tahmin edilen hidroksilasyon yukardaki şekilde gösterilmiştir. Ürün aktif bölgeden ayrıldıktan sonra, bir su molekülü tekrar hem grubundaki distal pozisyonuna bağlanır ve enzim yeniden orijinal halini alır (Şekil 1.2).

A: Monooksijenasyona perokside yol diye adlandırılan alternatif bir rota yoluyla da gidilebilir. Bu rotada peroksitler ve hipokloritler gibi oksijen donörleri yardımıyla demir-okso ara ürünü oluşur ve katalitik döngü 3, 4, ve 5. basamaklara gidilmeden tamamlanmış olur (peroksit diyagramda XOOH olarak gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Meunier *et al.* 2004).

1.2. NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz (CPR)

NADPH-sitokrom P450 redüktaz (E.C 1.6.2.4) hem FAD hem de FMN flavoproteinlerini içeren dört memeli enziminden biridir (Porter and Kasper 1986). Diğerleri metiyonin sentaz redüktaz (MSR) (Leclerc *et al.* 1998), yeni redüktaz (NRI) (Paine *et al.* 2000) ve nitrik oksit sentaz (NOS) (McMillan *et al.* 1992) dır (Şekil 1.3). Ailenin bakteriyel üyeleri ise *B.Megaterium* P450 içeren redüktaz (BM3) (Narhi *et al.* 1986) ve sülfid redüktazın redüktaz α alt birimidir (SR) (Ostrowski *et al.*1989) (Şekil 1.3). Bu enzimlerin hepsi yapısal olarak benzerdirler fakat küçük farklılıklar vardır. Örneğin MSR ve yeni redüktaz NRI her ikisinde CPR ile aynı bölgeleri içerirler ancak membran bağlama bölgeleri yoktur dolayısıyla sitozolde bulunmaktadır. Dahası MSR fonksiyonu henüz açıklanamamasına rağmen CPR'dan daha büyük bir ara bağlantı bölgesine sahiptir. NOS ise elektron transferi için ekstra bir kalmodinin bağlama bölgesine sahiptir ve redüktaz bölgesi hem grubu ile iç içe geçmiştir.

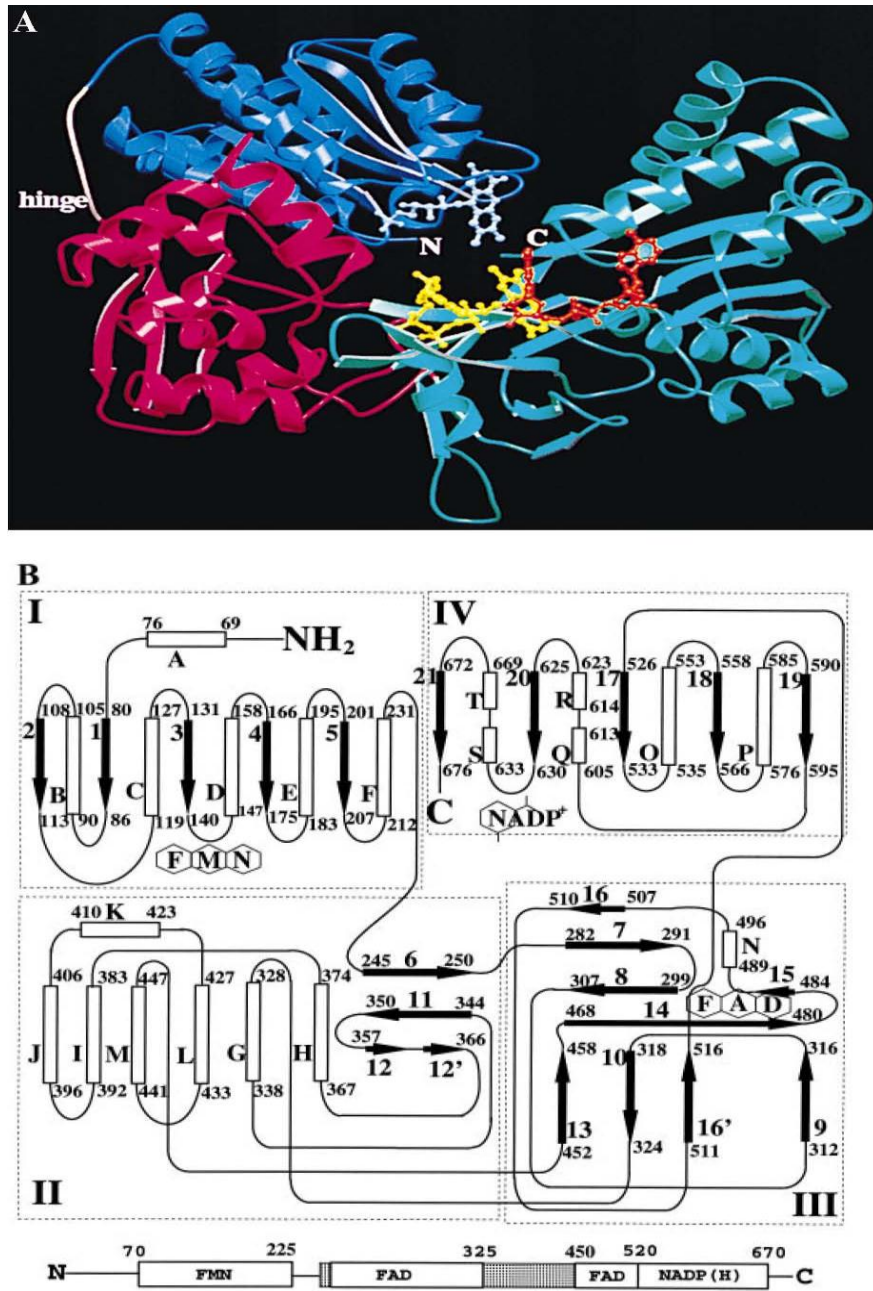


Sekans homoloji analizlerine göre amino terminal FMN bağlama domaini bakterial FMN içeren flavodoksinlerle önemli derecede benzerlik gösterirken FAD ve NADPH bağlanma bölgeleri ise ferrodoksin-NADP⁺ redüktaz (sitokrom b5 redüktaz ve nitrat redüktazı içeren proteinler) olarak adlandırılan flavoproteinlerin diğer bir sınıfı ile benzerlik göstermektedir (Shen and Kasper 1993).

E.colide eksprese edilen ve belirli seviyedeki tripsinolisiz ile çözündürülen sıçan karaciğer CPR enziminin üç boyutlu yapısı 2,6 Å çözünürlükte X-Ray kristografisi yardımı ile Wang *et al.* (1997) tarafından belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre parçalanmış sıçan karaciğer CPR'nin kristal yapısı dört yapısal domain (N terminalden C terminale kadar) içermektedir. FMN bağlama bölgesi, iletişim bölgesi, FAD bağlama bölgesi ve NADPH bağlama bölgesi Şekil 1.4 A da temsili olarak gösterilmiştir. İki C terminal dinükloetid bağlanma domaini ferrodoksin NADP⁺ redüktaza (FNR) benzerken FMN bağlanma bölgesi flavodoksinin yapısına benzerdir. FMN bağlama bölgesi ile FNR gibi domainlerin arasında yer alan iletişim bölgesi etkili iletişim bölgesi için gerekli olan iki flavinin uygun bir hizalama sağlayan diğer domainlerin göreceli hizalanmasında sorumludur. Aralarındaki en yakın mesafe yaklaşık olarak 4 Å olan iki flavin nükleotidinin izoalloksin halkası yan yanadır. FMN bağlanma bölgesine yakın olan kase biçimindeki yüzey sitokrom P450, b5 ve hem oksijenazıda içeren fizyolojik redoks partnerleri ile sitokrom c nin yerleşim yeri olduğu ihtimali ileri sürülmüştür. CPR'nin yüzeyi çoğunlukla negatif yüklü sitokrom c nin yüzeyi pozitif yüklü olduğu için aralarındaki bağlanmanın bu şekilde gerçekleştiği belirtilmektedir. CPR'daki FMN ile sitokrom c deki hem arasındaki mesafe 9Å'dan azdır. Sitokrom P450'ler CPR'nin elektron partnerleri olan sitokrom b5 ve sitokrom c den daha büyük olduğu için CPR P450 lerle etkileşim bilmek için çanak şeklinde olduğu ifade edilmiştir (Wang *et al.* 1997). Çözünmüş kristal proteinin sekans analizi sonucu N-terminal rezidüsünün Ile-57 olduğu, ancak kristalografik elektron yoğunluğundan elde edilen sonuçlarda Val-64 olduğu belirlenmiş bunun da CPR enziminin N-terminal hidrofobik domain ucunun değişkenliğini kanıtladığı bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bütün enzimin bu bölgesinin proteolitik parçalanmalara karşı oldukça savunmasız ve duyarlı olduğunu

gösterdiği belirtilmiş ve enzimin bütün olarak kristal halde elde edilememesinin ve üç boyutlu yapısının belirlenememesinin sebebi böylece açıklanmıştır (Wang *et al.* 1997).

FMN bağlanma bölgesi β kırmalı tabakanın C terminal ucunda bulunan FMN ile 5 tane α heliks tarafından çevrilmiş 5 tanede β kırmalı tabakadan oluştuğu ifade edilmiştir. FAD bağlanma domaininin merkezinin antiparalel düz β silindir yapısında, NADPH bağlanma domaininin ise bir α heliks tarafından sarılmış paralel beş sıkı β tabakadan oluştuğu bildirilmiştir. İki flavin domaini arasında bulunan bağlanma domaini 240 ile 270 ve 325 ile 450 arasındaki rezidülerden oluştuğu ve çoğunlukla α heliks yapıda bulunduğu belirlenmiştir. Şekil 1.4. B’de görülen heliks F ile 6 nolu iplikçik arasındaki lobun kristal yapıda net olarak belirlenemediği, FMN domaini ile bağlanma domaini arasında bir eklem noktası oluşturduğu, FMN domaini ile bağlanma domaini arasındaki rezidülerin çoğunlukla hidrofilik olduğu dolayısıyla bu bölgedeki etkileşimlerin elektrofilik olduğu bildirilmiştir. Bağlanma domaini ile FAD bağlanma domaini arası ve FAD ile NADPH bağlanma domainleri arasındaki kısımların göreceli olarak daha hidrofobik olduğu, bu üç domainin lineer sekanslarının birbirine sarılmış durumda bulunduğu ve bu nedenle de domainlerin fonksiyonel olarak birbirinden ayıramayacağı belirtilmiştir. Molekülün bütün olarak şeklinin 50 Å derinliğinde 70 Å genişliğinde ve 60 Å yüksekliğinde oval kase yapısında bulunduğu bildirilmiştir. Şekil 1.4’de N-terminal bağlanma bölgesinden yoksun enzimin üç boyutlu yapısı verilmiştir.



Şekil 1.4. (A) CPR enziminin üç boyutlu yapısı ve (B) CPR proteinin kofaktör tanıma görevli bölgelerini gösteren topoloji diyagramı (Wang *et al.* 1997)

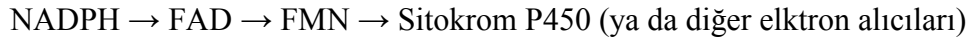
*(A) Mavi, FMN bağlanma bölgesi, kırmızı bağlanma domaini, yeşil, FAD ve NADPH bağlanma domainleri. Kofaktörler küre ve çubuk şeklinde gösterilmiş, FMN açık mavi, FAD sarı, NADPH⁺ turuncu, eklem (hinge) bölgesi pembe renk ile verilmiştir. (B) α heliks açık silindir, β tabakalar koyu oklar, düzensiz sarıgılar ise çizgi olarak verilmiştir. I FMN, II bağlanma, III FAD ve IV NADPH⁺ bağlanma domainleri. α heliks harf ile β tabakalar ise sayı ile işaretlenmiştir. Lineer diyagramda kofaktör bağlanma bölgeleri belirtilmiş, çizgili kutular ise bağlanma domainini göstermektedir. Sayılar aminoasit sekansını belirtir. Lineer yapıda FAD ve bağlanma bölgeleri birbirine girmiştir

CPR mikrozomal sitokrom P450 monooksijenaz sisteminin temel bileşenidir. CYP süper familyasından farklı olarak CPR şu ana kadar çalışılan hayvan türlerinin tamamında bu flavoproteininin tek bir gen tarafından kodlandığı belirtilmiştir. CPR geninin uzunluğu 50 kb dan daha büyüktür. Türlerle bağlı olarak monomer molekül kütlesi 76-81 kDa arasında değişmektedir (Arınc *et al.* 1995; Şen and Arınc 1998; Wohlover 2008). İnsanda 7q11.23 (S90469) ve farede kromozom 6 da haritalanmıştır (Simmons *et al.* 1985; Shephard *et al.* 1995). Sıçan redüktaz için gen klonlanmıştır ve ilki kodlanmayan 16 ekzondan oluştuğu belirtilmiştir (Porter *et al.* 1990).

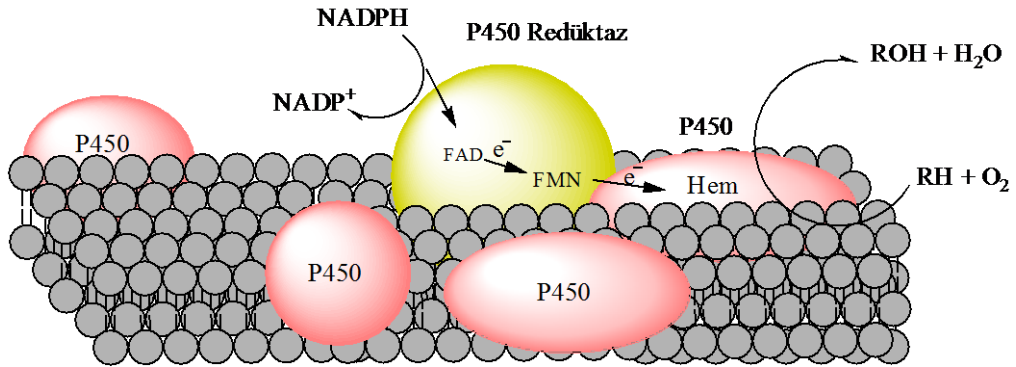
Kodlama sekansı ekzon 2'den başlar. Membran bağlama bölgesi ekzon 2, sonra gelen iletişim bölgesi ekzon 3 tarafından kodlanır. FMN bağlama rezidüleri ekzon 4, 5 ve 6'da bulunmaktadır. Ekzon 6 ve 7 sitokrom c ve sitokrom P450 bağlama rezidülerini içerir. FAD ve NADPH bağlantı bölgeleri 12-15 ekzonları üzerinde bulunur. Ekzon 12 FAD izoalloloksini, ekzon 13 pirifosfat bağlama bölgesini ve ekzon 13, 14 ve 15 NADPH bağlama bölgesini içerir. Ekzon 8, 9, 10 ve 11'in belirlenmiş fonksiyonu yoktur. Bu bölgelerin FAD den FMN ye elektron transferi için ya da iki flavinin doğru yönlendirilmesine izin vermek amacıyla polipeptid zincirinin uygun katlanması için gerektiği düşünülmektedir (Porter *et al.* 1990; Shen and Kasper 1993). Sıçan CPR enziminin üç boyutlu yapısı intraflavin elektron transferinde amino asit rezidü atomlarına ihtiyaç olmadığını göstermiştir (Wang *et al.* 1997). Bu yüzden bağlama bölgesinin iki flavin arasındaki elektron taransferini düzenlemek ve bağlamak amacı ile polipeptid zincirinin uygun pozisyonda olmasını sağlamak için gerekli olabileceği ifade edilmiştir (Çelik 2002).

NADPH-sitokrom P450 redüktaz elektronların NADPH'tan sitokrom P450'ye aktarılmasını katalizleyen bir flavoproteindir. Iyanagi and Mason (1973) yaptıkları bir çalışmada enzimin iki flavin molekülünü (FAD ve FMN) içerdiğini tespit etmişlerdir. Sonraki çalışmalarda ise enzimin elektron akışında flavinlerin rolü aydınlatılmıştır (Iyanagi *et al.* 1974; Vermilion and Coon 1978; Vermilion *et al.* 1981; Oprian *et al.* 1982). Her iki flavininde redüktaza kovalent olarak bağlı olmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle flavinler redüktazdan (2 M KBr varlığında farklı pH değerleri ile örneğin FMN

için pH 8,5, FAD için ise pH 6,5) seçici olarak uzaklaştırılabilmektedir (Vermilion and Coon 1978; Kurzban and Strobel 1986). FAD-bağlı redüktaz sitokrom c ve ferrisiyanid içine alan birçok elektron alıcısı için neredeyse elektron transfer yeteneğini kaybederken (Kurzban and Strobel 1986) FMN bağlı enzim; sitokrom c, menadion ve diklorofenolindofenol elektron alıcıları için elektron transfer yeteneğinin çoğunu kaybetmekte fakat ferrisiyanid için bu yeteneğini korumaktadır (Vermilion and Coon 1978). Bu sonuçlar göstermektedir ki FMN direkt olarak NADPH'dan elektron alamazken FAD elektronları NADPH'dan almaktadır. NADPH-sitokrom P450 redüktazın katalizlediği reaksiyon sonucu elektronların NADPH'dan sitokrom P450 ye ve diğer elektron alıcılarına aktarımı:



şeklindedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Monooksijenaz sisteminde sitokrom P450 redüktazın rolü (Ohkawa *et al.* 1998)

CPR'ın elektron alıcıları iki farklı yol izlemektedir. Birinci yoldaki elektron alıcıları sitokrom P450 ve fizyolojik olmayan substratı sitokrom c gibi FMN bağlama bölgesinden elektronları alır (Vermilion *et al.* 1981; Kurzban and Strobel 1986). Ferrisiyanid gibi ikinci tip elektron alıcıları ise FAD bağlama bölgesinden elektron alır. Transhidrogenaz reaksiyonlarında da NADP^+ bir elektron alıcısı olarak görev yapar. CPR gibi çok substratlı enzim reaksiyonları için iki kinetik mekanizma yapısı vardır. Ping-Pong ve düzenli ya da rastgele Bi-Bi kinetik mekanizmalarıdır. Ping-Pong mekanizmasında ilk substrat bağlanır ve ikinci substrat bağlanmadan önce salıverilir. Bi-Bi kinetik mekanizmasında ise substratlar enzime aynı anda bağlanır ve üçlü

kompleks oluşturur. Bu kompleks substratlar ayrılmadan önce reaktif ara ürün görevi görür (Cleland 1977).

NADPH sitokrom P450 redüktaz (CPR) ökaryotik hücrelerin birçoğundaki endoplazmik retikulum üzerinde bulunan birkaç enzim için elektron verici bir proteindir (Şekil 1.6). Bu oksijenazlar birçok ilaç ve besin maddesinin metabolizması ile ilişkili bir enzim ailesi olan aynı zamanda steroid hormonlarının ve diğer hücre dışı lipid uyarıcı moleküllerin sentezinde görev alan sitokrom P450'leri, Hemin bilirubine indirgenmesini katalizleyen reaksiyonun ilk adımında görev alan bir hem proteini olan hem oksijenaz ve steroid biyosentezi için belirlenen yolun ikinci enzimi olan skualen monoksijenazı içerir. Ayrıca CPR steroid sentez yolunda görev alan 7 dehidrosikolesterol redüktaza ve yağ asidi desaturasyonunda, steroid sentezinde ve elongaz yollarında görev alan sitokrom b5 de elektron verebilir.

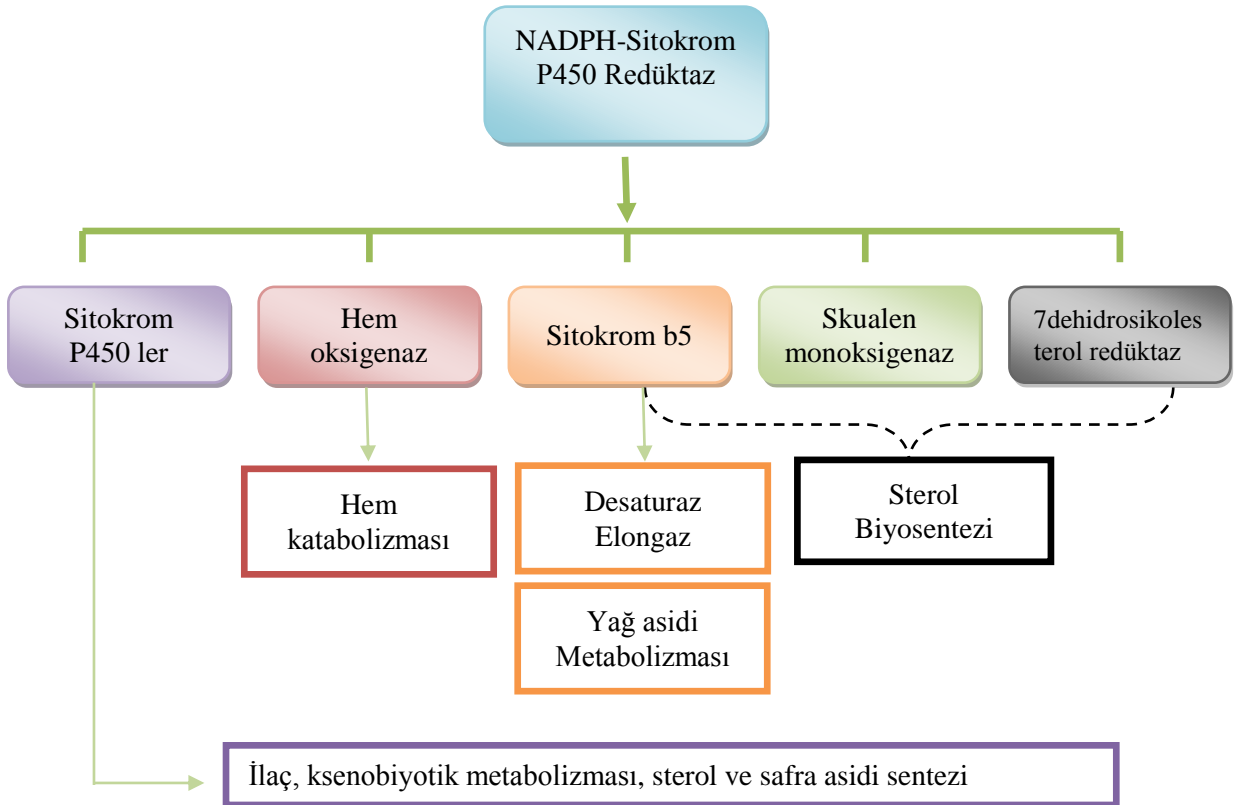
Skualen epoksidaz olarakta bilinen skualen monoksijenaz kolesterol sentezinde görev alan bir enzimdir. Endoplazmik retikuluma bağlı olan enzim FAD içerir ve 64 kDa ağırlığındadır. İndirgeyici elektronlar için CPR ile etkileşim halinde olması gerekir (Laden *et al.* 2000).

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin zincir reaksiyonları tarafından doymamış lipidlerin oksidatif zarara uğramasıdır. Hücre membranındaki çoklu doymamış lipidler bu durumdan çok kolay bir şekilde etkilenir ve hücre membran yapısı bozulur. CPR lipid peroksidasyonunun iki durumu için elektron kaynağı olarak hareket eder; birincisi ADP-Fe⁺³ indirgenmesi ile radikal ADP-Fe⁺³-O₂⁻ nin oluşması ve ikincisinde ise peroksidasyon prosesleri boyunca yeni lipid radikalleri oluşmasına yol açan lipid hidroperoksit türlerini oluşturur (Sevanian *et al.* 1990).

Hemin yıkımındaki ilk basamak RE hücrelerindeki mikrozomal hem oksijenaz sistemi tarafından katalizlenir. NADPH ve O₂ varlığında enzim iki pirol halkası arasındaki metenil köprüsüne hidroksil grubu ekler, buna paralel olarak da ferröz demir iyonu

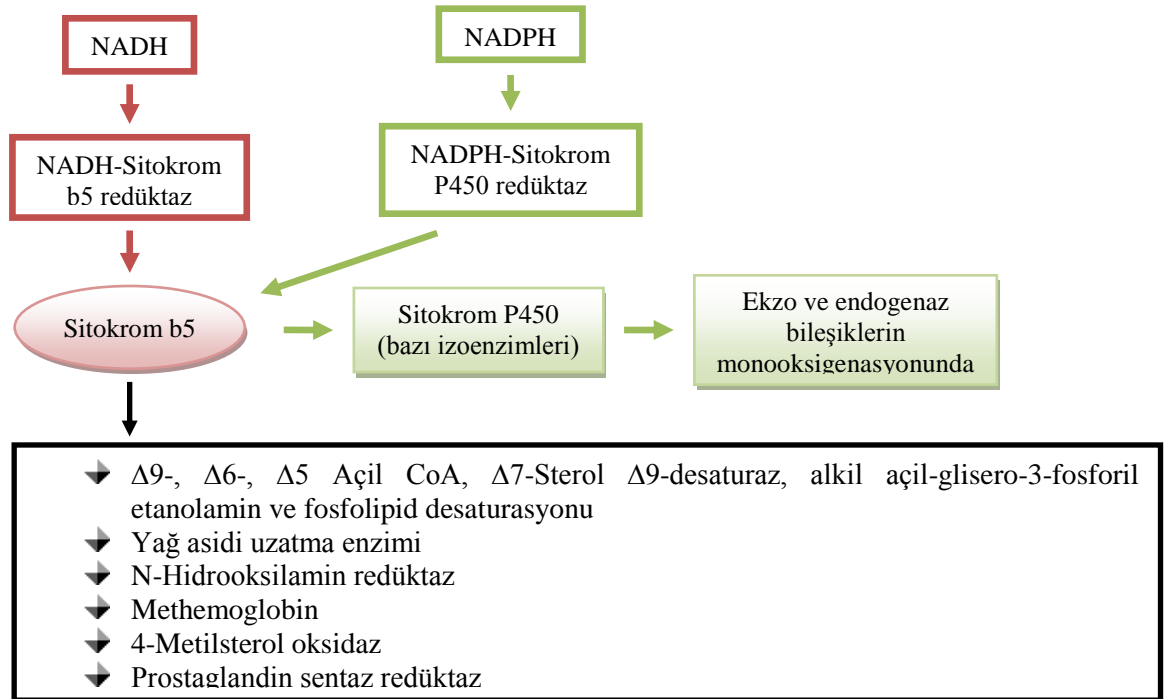
Fe^{+3} 'e okside olur. Aynı enzim sistemi ile ikinci bir oksidasyon porfirin halkasının kopmasına neden olur. Ferrik demir iyonu ve karbon monoksit açığa çıkar ve yeşil bir pigment olan biliverdin oluşur. Biliverdin indirgenerek kırmızı-kavuniçi renkli bilirubini oluşturur. Bilirubin oluşması sırasında hem oksijenaz gerekli elektronları CPR dan aldığı belirtilmiştir (Schacter *et al.* 1972).

Kolesterol biyosentezinde görev alan ve çift bağ taşınmasından sorumlu olan 7 dehidrosikolesterol redüktaz indirgeyici elektronlar için CPR'a ihtiyaç duymaktadır. 7 dehidrosikolesterol redüktaz enziminin eksikliğinde nispeten sık rastlanan bir otozomal çekinik kolesterol biyosentez bozukluğu olan Smith-Lemli-Opitz sendromu (SLOS) na yol açar. SLOS embryonik gelişimde kolesterolün önemini yansıtacak biçimde multisistem anomalileri ile karakterizedir (Champe *et al.* 2007). CPR'ın elektron alıcısı olarak sitokrom P450 ile ilişkisi bölüm 1.1'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.



Şekil 1.6. Ökaryotik hücrelerin birçoğundaki endoplazmik retikulum üzerinde bulunan birkaç enzim için elektron verici olan CPR

NADPH ve NADH bağlı olduğu yolların birbiriyle ilişkili olduğu bulunmuş ve bir yoldan diğerine elektronların transferi Şekil 1.7’de karşılaştırılmıştır. Böylece sitokrom b5’in bu iki elektron transport sistemi arasında bir bağlayıcı olarak hareket ettiği belirtilmiştir (Arınç 1991). NADH bağlı sitokrom b5 sistemi lipid metabolizmasının birkaç reaksiyonunu katalizler örneğin stearil CoA (C-18) ve palmitoil CoA (C-19) nın $\Delta 9$ desaturasyonunu, oleik, linoleik, linolenik asitin $\Delta 6$ desaturasyonunu, 20 karbon atomu üreten eicostrienoik asid ve araşidonik asid ile doymamış yağ asitlerinin $\Delta 5$ desaturasyonunu sayabiliriz. $\Delta 6$ desaturasyonunu esansiyel yağ asidi, prostaglandinler c-AMP sentezi için gerekli olan desaturasyonlardan biridir. Aynı zamanda hücre bölünmesi sırasında düzenleyici bir role sahip olduğu ifade edilmektedir. $\Delta 6$ desaturasyonunun aktivitesinin kanserli hücrelerin birçok tipinde eksik olduğu belirtilirken hatta bu durumun kanserli hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesinin nedenleri arasında olabileceği belirtilmektedir (Dippenaar *et al.* 1982). Methemoglobinin indirgenmesi hariç Şekil 1.7’de gösterilen reaksiyonlar sadece amfiptatik redüktazlar ya da sitokromların eksiksiz olması durumunda gerçekleştiği ifade edilmiştir (Çelik 2002).



Şekil 1.7. Endoplazmik retikulumdaki elektron zincirinde gerçekleşen, elektron transferi ve fizyolojik fonksiyonları (Arınç and Çakır 1999)

CPR'nin terapötik olarak çok önemli antitümör ilaçları, antibiyotikler, aromatik nitro bileşikleri, böcek öldürücüler ve diğer çevre kirleticilerini içeren çeşitli kimyasalların indirgenme reaksiyonlarını katalizleme fonksiyonu da vardır (Çizelge 1.2) (Aoi *et al.* 1981; Kappus 1986; Sinha 1989). Hatta lipid peroksidasyonunda ve genotoksisite ve sitotoksisite ile sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Çelik 2002).

Çizelge 1.2. CPR tarafından indirgendiği bilinen bileşikler (Lu 1991)

Sınıflar	Bileşikler
Antikanser ilaçları ve antibiyotikler	Adriamisin Mitomisin c Daunorubisin Bleomisin Porfiromisin
Kinonlar	1,4-naftakinon Benzo(a)piren-3,6-kinon Menadion Resorufin
Nitroimidazoller	Metroidazol Ronidazol Misonidazol
Aromatik nitro bileşikleri	Nitrofurantoin 4-nitrokinolin N-oksit
Herbisitler	Parakuat
Azo boyları	Neoprontosil Dimetilaminoazobenzen

NADPH bağlı indirgenme reaksiyonlarında reaktif oksijen türleri, karbon merkezli serbest radikaller ve reaktif metabolitler oluşturulabilir. Örneğin kinonlar redüktaz tarafından bir elektron basamağı ile nükleik asit ve proteinlere kovalent olarak bağlı

olan semikinon radikallerine indirgenebilir bu da genotoksisite ve sitotoksisiteyle sonuçlanabilir. Alternatif olarak semikinonlar hidroksil radikalının yanı sıra hidrojen peroksit meydana getiren süperoksit anyon radikalini oluşturmak için bir elektronu moleküler oksijene transfer edebilir. Hidroksil radikali en reaktif oksijen türüdür ve inanılıyor ki hidroksil radikali DNA iplikçiklerinin bozulmasından, lipid peroksidasyonundan ve kinon redoks çevrimi süresince enzimlerin inaktivasyonundan sorumludur (Kappus 1986; Halliwell and Auroma 1991; Lu 1991).

CPR sitokrom P450 enzim sistemi için gerekli olmasına rağmen redüktaz gen ekspresyonu P450 gen ekspresyonundan farklı olarak düzenlenir. Hücrede çoğu fonksiyonu CPR ile uyumlu olmasına rağmen CPR çalışılan bütün dokularda belirli seviyelerde bulunan geniş bir alanda eksprese olan bir proteindir. Çoğunlukla karaciğerde bol miktarda bulunur. Yüksek seviyede eksprese olur. Ancak CPR seviyesi P450 siteminden düşüktür. Çoğu dokuda CPR'ın P450 ye oranı 1:10 veya daha azdır (Reed *et al.* 1986) ancak beyin ve koku alma epitalinde bu durum farklıdır. Beyinde 3:1 (Gherzi-Egea *et al.* 1989) oranında koku alma epitalinde ise 1:3 oranındadır (Reed *et al.* 1986).

P450 sistemi indükleyicileri CPR ekspresyon seviyesinde dikkate değer bir etki oluşturmaz. Fenobarbital ve pregnenolon-16 α karbonit gibi tipik kuvvetli P450 indükleyicileri CPR seviyesini yalnızca 2-3 kat yükseltir. 3 metil kolantirenin ve etanolün çok az ya da hiç etkilemediği belirtilmiştir (Shen and Kasper 1993).

CPR ekspresyonu transkripsiyonel safhada hipofiz ve tiroit ortak çalışması sonucu düzenlenir. Tiroit hormonu (T3) CPR ekspresyonunun düzenlenmesi için gereklidir (Waxman *et al.* 1989; Ram and Waxman 1992; Li *et al.* 2001). Hipofiz bezinin alınması (Hipofiztomiy) tiroit hormonu ekspresyonunu düşürür ve bu da hepatik redüktaz seviyesinde %50'den çok daha büyük bir azalmaya sebep olur. Adrenokortikotropik hormon (ACTH), sığır adrenokortikal hücrelerinde redüktaz seviyesini hem mRNA ve hem de protein seviyesinde fenobarbital olmaksızın arttırmıştır (Dee *et al.* 1985). Follik

uyarıcı hormonda sıçan granuloza hücrelerinde redüktaz seviyesini arttırmıştır (Durham *et al.* 1985). Her iki durumda da gözlenen etkiler dibütiril cAMP benzetilmiştir.

Williams sendromu veya Williams–Beuren Sendromu, ilk kez 1961 yılında Williams ve Beuren adlı doktorlar tarafından teşhis edilmiş ve tanımlanmış bir hastalıktır. Dünyada çok ender görülen genetik bir hastalıktır. Ortalama 20 000’de bir görülebilen bu bozukluk, kız ve erkek çocuklarda eşit olarak ortaya çıkabilir. 7 numaralı kromozom çiftinin herhangi birinde oluşan hatadan dolayı meydana gelir.

Genetik bir hastalık olan Williams sendromu, 7 numaralı kromozomun uzun kolunda (q) yaklaşık olarak 1,2 m.b kısmın silinmesiyle ortaya çıktığı gösterilmiştir. Ve bu silinme 25 genin ekspresyonunu etkilemektedir. Bu genetik silinme CPR’ın transkripsiyonunda bir azalmaya neden olur. Çünkü CPR genin ekspresyonunu düzenleyen cis düzenleyici elementler silinen kısımda yer almaktadır (Merla *et al.* 2006). Moleküler genetik mekanizma bakımından mikro-delesyon grubuna dahil bir genetik hastalıktır. Williams sendromulu bazı hastalarda CPR eksikliğinin karakteristik yapıları gözlenir (Charvat 1991). Bu gruptaki bazı hastalar Sendromdaki genetik bozukluk anne babadan geçebileceği gibi kendiliğinden ortaya çıkan genetik mutasyonlardan da kaynaklanabilir. Bu nedenle birçok Williams sendromlu çocuğun aile geçmişinde hastalık bulunmayabilir.

CPR eksikliğinin farenin noral tüpünde, kardiyak sisteminde, göz ve esneklik özelliklerinde anormallikler ortaya koymuştur genel olarak gelişmede geciktirme meydana geldiği belirtilmiştir. Fenotipteki bu çeşitlilik CPR ın birçok fonksiyonu yüzündendir.

1.3. Toksik Metaller ve Zararları

20. yüzyılın başlarından itibaren biyosferdeki ağır metaller belirgin şekilde artmaya başlamış toprak, su ve hava ekosistemlerinde birikerek, bitkiden insana her çeşit

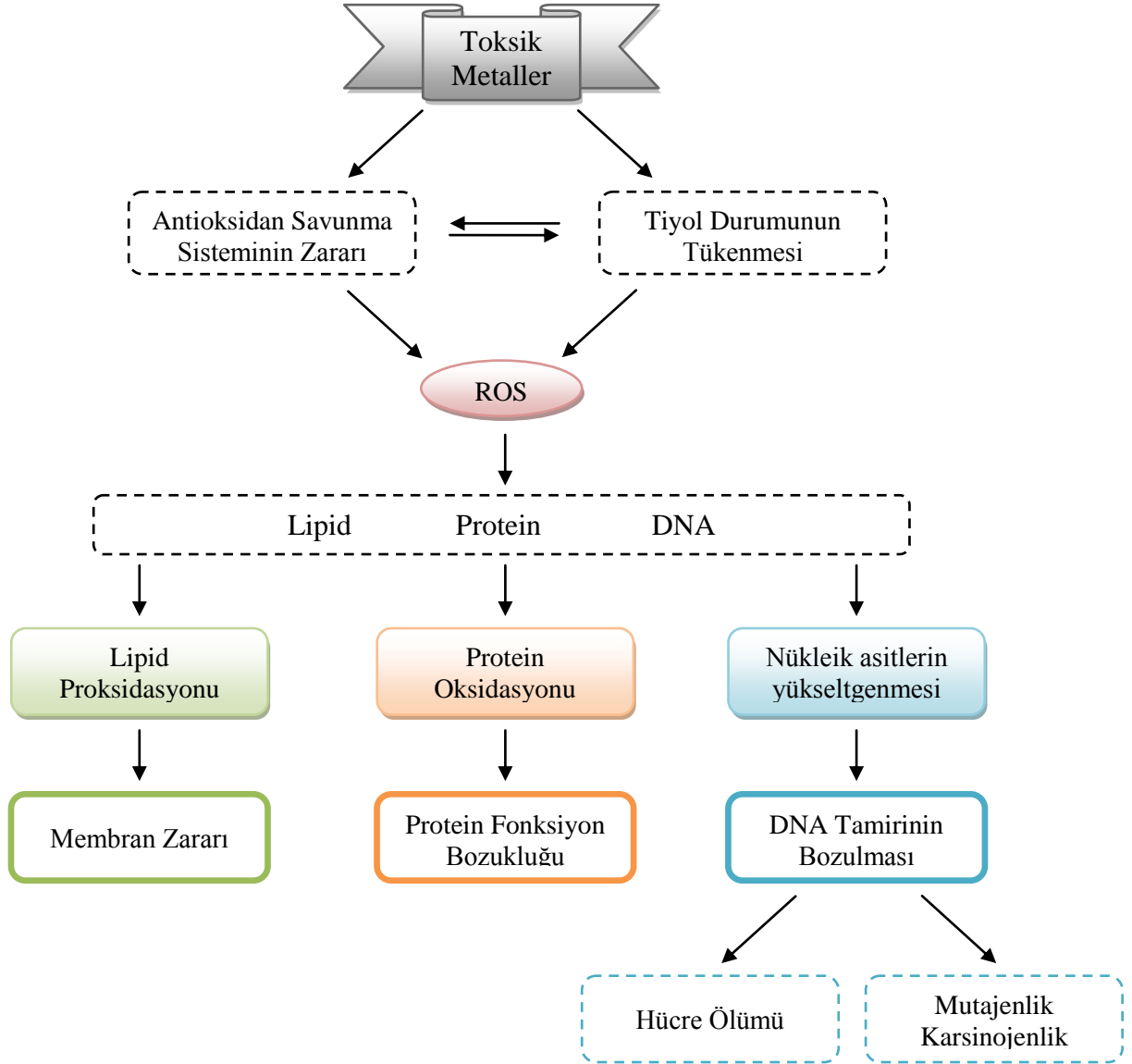
organizma için acilen tedbir alınması gereken bir çevre sorunu haline gelmiştir (Sağlam ve Cihangir 1995).

Yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yoğun olan metallere ağır metal denir. 60'tan fazla element ağır metal olarak kabul edilse de bakır (Cu), demir (Fe), çinko (Zn), kurşun (Pb), civa (Hg), kobalt (Co), mangan (Mn), krom (Cr), selenyum (Se), nikel (Ni) ve kadmiyum (Cd) en sık rastlanan ve en çok tanınan ağır metallerdir (Azevedo ve Lea, 2005).

Bazı elementler enzim, vitamin ve hormonların bileşenlerinde bulunur. Emilme, sindirim ve metabolizmada görev alırlar ve belirli vücut yapılarında tamamlayıcı olarak rol oynarlar. Doğada bulunan Cd, Cr, Hg ve Pb gibi ağır metaller canlılar için mutlak gerekli olmayıp eser miktarları bile toksik etki gösterirken, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Zn ve Ni gibi ağır metaller canlılar için belli bir doza kadar gereklidir, bu elementler "iz" veya "eser" element olarak adlandırılır (Somers 1974).

Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. İlgili endüstri kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını ihtiva etmektedir (Sağlam ve Cihangir 1995). Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etmen ağır metallerin çevredeki miktarlarını artırmakta ve biyolojik sistemlerde birikime neden olmaktadır (Kahvecioğlu vd 2001). Toksikite, metallerin proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanması sonucu oluşur. Bitkilerin kirliticileri bünyelerinde toplamaları hem bitki yaşamını hem de besin zincirini etkiler. (Brekken and Steinnes 2004). Diğer taraftan, bakırın yüksek miktarı nörotoksiktir, bilişsel ve davranışsal değişikliklerle birliktedir. Çok yüksek bakır derişimi karaciğer hasarına da yol açar (Turgut vd. 2000). Bazı ağır metallerin belirlenen sınırların üzerinde vücuda alınması durumunda, Cd: Itai-Itai hastalığı, organlarda kanser, kemik kırılması ve şiddetli ağrılara Cu: Wilson hastalığı, böbrek bozuklukları ve nörolojik

bozukluklara Zn: Gastrointestinal bozukluklara Pb: Beyinde hasar, kansızlık, böbrek hastalıkları, ve nörolojik fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (Oehlenschläger 2000; Yazkan vd. 2002).



Şekil 1.8. Metal içeren oksidatif stres için olası mekanizma (Ercal 2001)

1.4. Antibiyotikler

Antibakteriyel ilaçlar içinde özel bir yer tutan önemli bir ilaç grubu olan antibiyotikler bakteriler, funguslar ve aktinomisetler gibi çeşitli mikroorganizma türleri tarafından

biyosentez edilen ve diğerk mikroorganizmaların gelişmesini önleyen ya da onları öldüren kimyasal maddelerdir (Kayaalp 2002).

Antibiyotiklerde ana ilke konakçıda hiç veya çok az toksik etki yapan bir kimyasal madde ile hastalık etkeni organizma üzerinde yeteri kadar toksik veya letal (öldürücü) etki oluşturmaktadır.

Belirli bir antibiyotiğe duyarlı olan mikroorganizma türlerinin tümüne o ilacın antimikrobik spektrumu adı verilir. Bir kısım antibiyotik ilaçlar sadece bir bakteri türüne veya birkaçına karşı etkilidirler; bunlara dar spektrumlu antibiyotikler denilir. Diğerk bazı antibiyotikler ise fazla sayıda bakteri ve diğerk mikroorganizma türlerine karşı etkilidirler; Bunlara geniş spektrumlu antibiyotikler adı verilir (Kayaalp 2002).

Bakteri enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotik ve diğerk antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları beş grup halinde belirtilmiştir (Kayaalp 2002).

1. Bakteri hücre duvarının sentezini inhibe etmek ve litik enzimleri aktive etmek suretiyle
2. Sitoplâzma membranının geçirgenliğini artırmak suretiyle
3. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle
4. Genetik materyal içinde DNA sentezinin veya DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezinin bozulması ile
5. İntermediyer metabolizmayı bozmak suretiyle

Bugün için bütün dünyada genel kapsamıyla kemoterapötik ilaçlar olarak nitelendirilen antibakteriyel ve antiparaziter ilaçlardan beklenen çok yönlü etkinin sağlanabilmesi için her ilaç etkin maddesinin etki şeklinin, etki spektrumunun, etkili yoğunluğunun, vücutta uğradığı metabolik değişikliklerin, vücuttaki dağılım modelinin, sık karşılaşılan başlıca bakteri türlerindeki dirençlilik durumunun, formülasyon şekillerinin ve bütün bu bilgiler çerçevesinde ilacın sağlayabileceği biyolojik yararlılık durumunun çok iyi bilinmesi gerekir. Ayrıca hayvanların fizyolojik durumuna, yetiştirme şekline, hastalık çeşitlerine ve boyutlarına göre seçilecek ilacın dozu, uygulama sıklığı, sağaltım süresi,

ilacın farmasötik şekli ve kalıntı bırakma özelliklerine ilişkin olarak yeterli bilgiye sahip olunması önem taşır (Booth and MeDonaid 1991; Şanlı ve Kaya 1993).

Yukarıda belirtilenlerin tersine, rastgele ve bilinçsizce kullanılan antibakteriyel ilaçlar herhangi bir yarar sağlayamayacakları gibi, insan ve hayvan popülasyonlarının ekolojik ortamında çoğul dirençli bakteri suşlarının yaygınlaşmasına, kanatlılardan elde edilen besinlerin yaygın biçimde kirlenmesine, allerjiler ve organik bozukluklarla sonuçlanan akut ve kronik toksik etkiler gibi ciddi olumsuz tepkimelerin doğmasına ve sonuçta önemli ekonomik kayıplara yol açarlar (Kaya ve Şahal 1989; Bilgili 1990).

Son yıllarda ortaya konulan bilimsel verilere göre, geride bıraktığımız 35-40 yıllık süreçte hayvan yetiştiriciliğinde daha çok ilaç kullanılması sonucu, bütün dünyada hayvansal besin üretimi %70-80 oranlarında artırılabilmiştir (Booth and MeDonaid 1991). Gelişmiş ülkelerde ve Türkiye'de böylesine önemli bir üretim aşamasının gerçekleştirilebilmesi için besin üretiminde kullanılan kanatlıların hemen hemen tümünün ömür boyu antibiyotik, antikoksidial ilaçlar, antioksidan maddeler, vitaminler, mineraller ve anabolik maddeler katılmış yemlerle beslendiği varsayılmaktadır. Artık yem katkısız kanatlı besiciliği düşünülemez hale gelmiştir (Bilgili 1994).

Bizim bu çalışmadaki amacımız, çeşitli hayvan dokularından saflaştırılan ve karakterize edilen NADPH sitokrom P450 redüktaz enzimini hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırmak ve ayrıca enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirerek türlere özgü farklılıklarını incelemektir. Aynı zamanda ilaç metabolize edici enzim sisteminin vazgeçilmez bir parçası olan NADPH sitokrom P450 redüktaz enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve antibiyotiklerin etkilerini araştırmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

E.colide eksprese edilen ve belirli seviyede tripsinoliz ile çözündürülen sıçan karaciğer CPR enziminin üç boyutlu yapısı 2,6 Å çözünürlükte X-Ray kristografisi yardımı ile Wang *et al.* (1997) tarafından belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre parçalanmış sıçan karaciğer CPR'ın kristal yapısı FMN bağlama bölgesi, iletişim bölgesi, FAD bağlama bölgesi ve NADPH bağlama bölgesi olmak üzere dört yapısal domain (N terminalden C terminale kadar) içermektedir.

CPR'ın komple amino asit sekan analizi sıçan karaciğeri (Porter and Kasper 1985), insan karaciğeri (Haniu *et al.* 1989; Yamano *et al.* 1989) domuz karaciğeri (Haniu *et al.* 1986; Vogel and Lumper 1986), tavşan karaciğeri (Katagiri *et al.* 1986) ve alabalık karaciğeri (Urenjak *et al.* 1987) için belirlenmiştir. Sıçan karaciğer CPR, alabalık CPR'la %79 luk bir homoloji gösterirken diğer memeli dokuları ile %90 lık bir homoloji göstermektedir. Bunun yanı sıra maya ve bakteri redüktazlar ile %33 ten az bir homoloji gösterdiği belirtilmiştir (Shen and Kasper 1993).

Afrika kurbağasının karaciğerinden cDNA izole edilmiş ve CPR'ın diğer türlerdeki homolojisine bakılmıştır. Buna göre afrika kurbağası CPR'ın amino asit sekans homlojisi insanla %80, sıçanla %78 ve tavşanla %81 oranında olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın devamı olarak CPR'ın ekspresyonu afrika kurbağasının çeşitli dokularında ve gelişim safhalarında Western Blotting yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre en yüksek CPR seviyesi böbrekte yer alırken bunu karaciğer, akciğer ve kalbin takip ettiği buna karşın CPR seviyesinin en düşük olduğu yerin beyin olduğu belirtilmiştir. CPR'ın ekspresyonu afrika kurbağasının gelişim safhalarında incelendiğinde embriyo safhasında farelerde CPR eksikliğinin sebep olduğu anormal bölgenin benzerine rastlandığı belirtilmiştir (Mori *et al.* 2006).

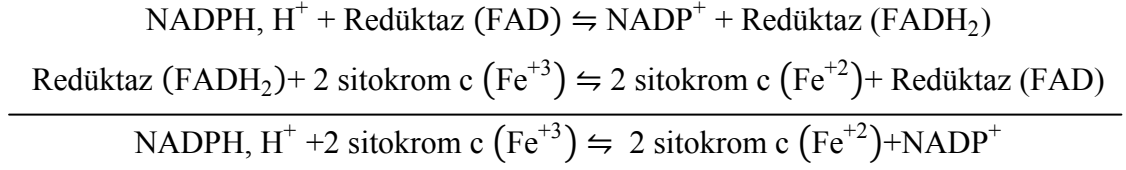
CPR'ın nasıl bir aktivite aralığına sahip olduğunu anlamak için laboratuvar ortamında gerçekte olmayan bir yapı tasarlanmıştır. Moleküler yer değiştirme için araştırma

modeli olarak sıçan ve maya yapılarının yayınları kullanılmıştır. Bunun için maya FMN domaini (44-211 amino asit) ve insan FAD domaini (232-677 amino asit) birleştirilmiştir. Tasarlanan yapı üretilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen kristallerin monoklinik boşluk grupları C2'ye ait olduğu ve her bir asimetrik ünitenin 1 molekülle devam ettiği belirtilmiştir. Sonuç olarak önceden çözülen yapılar için elde edilen elektron yoğunluğu haritalarından farklı bir konformasyonda kristalize edilen hayali enzim ortaya çıkmıştır (Aigran *et al.* 2009).

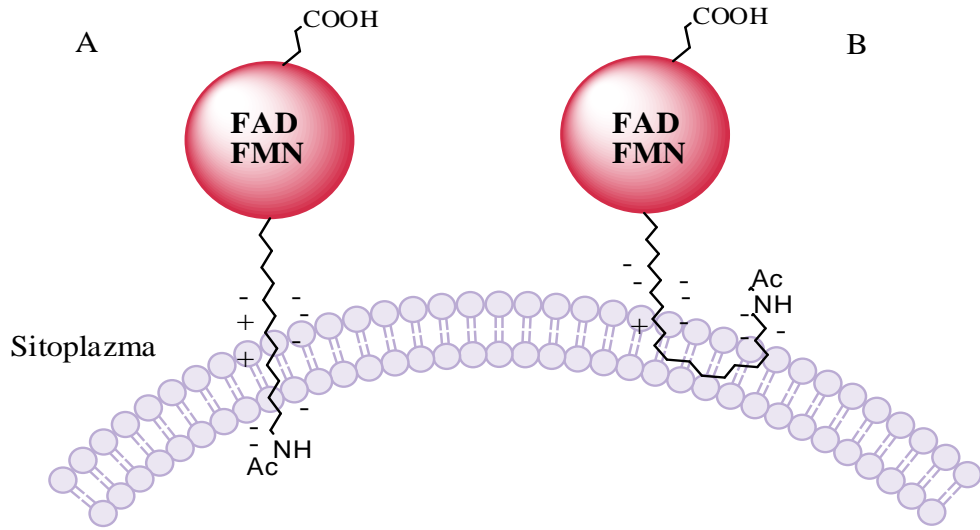
İnsan P450 1A2:sıçan NADPH P450 redüktaz füzyon proteini vasıtasıyla saflaştırılmıştır. İnsan P450 1A2 nin sekans kodununun 5' ucunda sıçan CPR sekans kodunu, 3' ucunda da bir oligonükleotid sekans kodlayan hidrofilik dipeptid Ser-Thr içeren bir cDNA tasarlanmıştır. Rekombinant DNA E.coli de eksprese edilerek CPR'ın saflaştırma prosedürü ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan protein insan P450 1A2'nin karakteristik özelliklerine sahip olmasının yanı sıra tavşan CPR ile karşılaştırıldığında sitokrom c indirgeme aktivitesine de sahip olduğu tespit edilmiştir. Füzyon protein 7etoksisorofin O-dietil ve Fenasetin O-dietili, NADPH ve fosfolipid varlığında dikkate değer bir seviyede katalizlediği belirtilmiştir (Parikh and Guengerich 1997).

Memeli NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi (aynı zamanda NADPH bağlı sitokrom c redüktaz olarakta adlandırılır) ilk olarak Horecker tarafından 1950 yılında domuz karaciğerlerinin tripsin ve aseton tozu ile işleme tabi tutulması sonucunda yüksek saflıkta izole edilmiştir (Horecker 1950). Yapılan ilk çalışmalarda enzimin karaciğer mitokondrilerinde lokalize olduğu düşünülürken (Phillips and Longdon 1962) daha sonra lipaz ve tripsin tarafından membrana bağlı redüktazın çözüldürülmesiyle karaciğer mikrozomlarında bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar bu enzimin endoplazmik retikulum mikrozomlarında bulunduğunu göstermesine ilave olarak nonfizyolojik elektron alıcılarını da (sitokrom c, ferrisiyanid, menadion ve diklorofenolindofenol) indirgeyebildiğini göstermiştir (Williams and Kamin 1962; Phillips and Langdon 1962).

Bir mitokondrial protein olan sitokrom c CPR'nin doğal redoks partneri olmamasına rağmen NADPH bağlı sitokrom c redüktaz ismi kullanılmaya devam edilmiştir. NADPH-sitokrom P450 redüktaz tarafından katalizlenen sitokrom c'nin indirgenme reaksiyonu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



NADPH bağlı redüktaz başlangıçta karaciğer mikrozoamlarının hidrolitik enzimler ile muamele edilmesi sonucu saflaştırılmıştır. Daha sonraki yıllarda integral membran proteinlerinin saflaştırılmasında büyük bir adım atılarak deterjan ile proteinlerin çözündürülmesi sağlanmıştır. Sonuç olarak hem deterjan hem de hidrolitik enzimlerin etkisi ile saflaştırılan CPR'nin amfipatik bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Hidrolitik enzimler ile doğal redüktaz muamele edildiği zaman çözünebilir büyük bir hidrofilik peptid zinciri (M.K≈71 kDa) ile küçük bir hidrofobik kısımdan (M.K≈6 kDa) oluştuğu tespit edilmiştir. Hidrofilik peptid zinciri hem FAD hem de FMN içermesinin yanı sıra tabii enzimin spektral karakteristik kısımlarını içermektedir. Hidrofobik özellikte olan küçük peptid kısmı ise redüktazın sitokrom P450/b5 veya biyolojik membranla özel etkileşime girme yeridir (Çelik 2002).



Şekil 2.1. CPR'nin hidrofobik domaininin biyolojik membrana bağlanması için mümkün olan iki ihtimal (Black and Coon 1982)

*A) Membranın karşı kenarına geçer B) membranın aynı tarafındadır (NH₂- ve COOH- terminal kısımlar)

Lipaz ya da proteaz ile çözüldürülen redüktazın monomer molekül kütleleri birbirlerine benzer olarak bulunurken deterjanla çözüldürülen redüktazın monomer molekül kütlesi hidrolitik yolla olarak çözüldürülen redüktazın kütesinden 5-10 kDa daha ağır olduğu belirtilmektedir. Bilindiği gibi CPR proteolitik yarılmalara karşı son derece dayanıksızdır ve kolaylıkla hücredeki proteaz varlığı nedeniyle mikrozomların çözüldürülmesi sırasında ya da saflaştırma işlemleri sırasında kolaylıkla yarılabilmektedir. Koyun karaciğer redüktazın proteolitik yarılmalara karşı koyun akciğer redüktazdan daha dayanıksız olduğu belirtilmiştir (Iscan and Arınç 1988). Proteolitiklerin değişik miktarlarda varlığı sonucu inaktif redüktazın küçük molekül kütlelerine yarıldığı tavşan karaciğeri (French and Coon 1979), domuz karaciğeri (Yasukochi *et al.* 1980), kobay faresi karaciğeri (Kobayashi and Rikans 1984) ve sıçrayan kefal balığı (*liza salians*) karaciğeri (Sen and Arınç 1998) saflaştırılan CPR için rapor edilmiştir.

Deterjanla çözüldürülen redüktazın saflaştırma işlemlerinde afinite kromatografisinin kullanılmaya başlaması ile önemli bir adım daha atılmıştır. CPR'nin saflaştırılması için kullanılan afinite kolonunda ligand olarak 2', 5'-ADP (Yasukochi and Masters 1976) ve NADP⁺ (Dignam and Strobel 1977) kullanılmıştır. Afinite kromatografisi yönteminin

yaygın olarak kullanılması ile CPR enzimi çeşitli memeli dokularından ve memeli olmayan türlerden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sitokrom P450 redüktazın fonksiyonel ve yapısal özellikleri detayları ile tespit edilmiş ve bazı kinetik yapısal ve fonksiyonel farklılıkları belirlenmiştir.

Örneğin tavşan karaciğeri (Iyanagi and Mason 1973; French and Coon 1979), sıçan karaciğeri (Vermilion and Coon 1974; Dignam and Strobel 1977), domuz karaciğeri (Yasukochi and Masters 1976), tavşan akciğeri (Serabjit-Singh *et al.* 1979), ev sineği (Mayer and Durrant 1979), insan karaciğeri (kısmi saflaştırma) (Kamataki *et al.* 1979), sinarit balığı karaciğeri (Klotz *et al.* 1983), kobay faresi karaciğeri (Kobayashi and Rikans 1984), koyun karaciğeri ve akciğeri (Iscan and Arinc 1986; 1988), sığır karaciğeri (Arinc and Çelik 2002), gökkuşuğu alabalığı karaciğeri (Williams *et al.* 1983) ve sıçrayan kefal balığı karaciğeri (Sen and Arinc 1998) mikrozomlarından saflaştırılan sitokrom P450 redüktazın fonksiyonel ve yapısal özellikleri detayları ile tespit edilmiş ve bazı kinetik yapısal ve fonksiyonel farklılıkları belirlenmiştir.

CPR enzimi hemstır karaciğerinden iki farklı yöntem kullanılarak saflaştırmıştır. İlkinde deterjan ekstraksiyonu ve afinite kromatografisi kullanılarak hızlı ve basit bir yöntemle saflaştırılmıştır. Bu çalışmada mikrozomlar %0,07 protamin sülfatla kombine edilen Chaps (3-[(cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid) ile muamele edilmiş ardından santrifüj yapılarak mikrozomal pelet elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen mikrozomal peletten CPR enzimi sodyum kolat ve Lubrol PX deterjanlarının bir kombini kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bu uygulamanın sonucunda CPR enziminin spesifik aktivitesinin 5 kat kadar arttığı belirtilmiştir. Daha sonra elde edilen ekstrakt direkt olarak 2', 5'-ADP agaroz afinite kromatografisine uygulanmıştır. Saflaştırılan CPR enzimi sitokrom c elektron akseptörü olarak kullanıldığı zaman 26,400 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. CPR enzimi %58 verimle 59,5 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE de yapıldığında 76 kDa civarlarında tek bant elde edildiği belirtilmiştir. Aynı grup ikinci metotta ise mikrozomları Triton N101 uygulamasına tabi tutmuş ardından uydun prosedür ve santrifüj yöntemleri kullanılarak elde edilen CPR ekstraktı direkt olarak DEAE-

Sephadex A-25 kolonuna tatbik edilmiştir. 80-400 mM KCl gradientinin ardından elde edilen elüat 2', 5'-ADP agaroz afinite kromatografisine yüklenmiş bu işlem sonucunda enzim %63 verimle 58,7 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesinin 26,700 EÜ/mg olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Ardies *et al.* 1987)

CPR enziminin sıçrayan kefal (İlanya) balığı karaciğer mikrozomlarına emulgen 913 ve kolat deterjanlarının uygulaması ile çözündürüldüğü ve daha sonra elde edilen örneğin sırasıyla DEAE-selüloz 1, DEAE-selüloz 2, 2', 5'-ADP-Sepharoz 4B ve Hidroksilapatit kromatografik yöntemlerine tabi tutularak %17,5 verimle 438 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir. Saflaştırılan redüktaz spektral, elektroforetik ve biokatalitik özellikleri açısından karakterize edilmiştir. Multikromatografik yöntemlerin kullanılmasıyla saflaştırılan CPR sodyum dodesil sülfat varlığında denatüre edici şartlar altında poliakril amid jel elektroforezine tabi tutulduğu ve bir major band bir de minor band elde edildiği belirtilmiştir. Bu minor bandın (70 kDa) proteaz enzimleri vasıtası ile CPR'ın yarılması sonucu oluştuğu varsayılmıştır. Eğer örnekler elektroforeze az miktarda yüklenirse bu minor bandın ortaya çıkmadığı belirtilmiştir. CPR'ın monomer molekül kütlelerinin 77 kDa olarak hesaplandığı belirtilmiştir (Sen and Arınç 1998).

CPR enzimi afrika kurbağasından DE-52, 2', 5'-ADP-Sepharoz 4B ve DEAE-SPW (HPLC) kromatografik teknikleri kullanılarak saflaştırıldığı belirtilmiştir. Saflaştırılan CPR'ın elektron transfer aktivitesi substrat olarak sitokrom c kullanıldığında 23,8 unit/min/mg olarak belirlendiği ifade edilmiştir (Mori *et al.* 2006).

CPR sığır karaciğer mikrozomlarından elektroforetik homojenite yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma prosedürü mikrozomların deterjanla çözündürülmesinin ardından peş peşe iki tane DEAE selüloz anyon değişim kolonuna uygulanmasını ve anyon değişimden alınan fraksiyonların son olarak 2', 5' ADP sepharoz 4B afinite kolonuna uygulanmasını içermektedir. Daha sonra enzimin konsantre hale getirilmesi, 2' AMP ve emulgen 913'ün ortamdaki uzaklaştırılması için afinite sonucu elde edilen enzim çözeltisi hidroksilapatit kolon kromatografisine tatbik edilmiştir. Enzim bu

prosedür vasıtası ile 239 kat %13,5 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin monomer molekül kütlesi 76 ± 3 (N=5) kDa olarak belirlenmiştir (Çelik 2002).

CPR deterjanla çözündürülen sıçan ve domuz karaciğer mikrozoamlarından 2', 5' ADP sepharoz 4B afinite kromatografisi ortak olmak üzere sırasıyla üç ve dört kromatografik adımla saflaştırılmıştır. Mikrozoamlar bir poliethilennonfenil eter ile kolat ya da deoksi kolatı kombine ederek ve DEAE selüloz iyon değişim ardından 2', 5' ADP sepharoz 4B afinite kolonuna uygulanmıştır. Mikrozoamlardan saflaştırılan enzim %30'dan daha büyük bir verimle elde edilmiştir. Enzimin monomer molekül kütlesi 78 kDa olarak belirlenmiştir. Turnover sayısı domuz karaciğer enzimi için 1360 min^{-1} iken sıçan karaciğeri için 1490 min^{-1} olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu preparatlarda Benzafetamin N dimetilasyon aktivitesi kısmen saflaştırılmış CYP P450 ve diklorofosfotidilkolin varlığında ölçülmüştür. Her iki enzimin afiniteden saflaştırılması sırasında 0-5 mM 2'AMP gradienti uygulanmıştır. İki enzim de farklı konsantrasyonlarda elüe edilmiştir. Ayrıca NADH'ında enzim elüsyonu sırasında etkisiz olduğu ayrıca 5' AMP sıçan karaciğer CPR enzimde kısmen etkili olurken domuz karaciğer CPR da etkili olmadığı belirtilmiş bunun sonucunda enzimlerin afiniteye biospesifik olarak tutunduğunu iddia etmişlerdir (Yasukochi and Master 1976).

CPR koyun akciğer mikrozoamlarından deterjanla çözündürüldükten sonra DEAE selüloz, ultrafiltrasyon PM-30 filter, 2', 5' ADP sepharoz 4B, sephadex G-25, propak Q ve hidroksilapatit olmak üzere sekiz adımda %50 verimle 285 kat saflaştırılmıştır. Enzimin monomer molekül kütlesi 78 kDa olduğu, FAD ve FMN nin her ikisinden de 1 mol içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca ($160 \mu\text{M}$ ötesinde) enzimin ürün inhibisyonuna maruz kaldığı, bu durumda da CPR için düşünülen kinetik mekanizmanın ping-pong olduğu ifade edilmiştir. Saflaştırılan redüktaz akciğer CYP P450 ve lipid varlığında benzo(a)pirenin aktivitesinde bio katalitik bir şekilde aktif olduğu belirtilmiştir. Elde edilen CPR da 30 günlük bir bekleme süresinin ardından bir preteolitik bir yarımla söz konusu olmadığı belirtiliyor (Iscan and Arınc 1986). Tavşan akciğer mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'ın monomer molekül kütlesi Guengerich (1977) ve Serabjit-Singh *et al.* (1979) tarafından belirlenmiş sırasıyla 79 kDa ve 72 kDa olarak rapor edilmiştir.

Guengerich (1977) ikinci bir polipeptid varlığından söz etmezken Serabjit-Singh *et al.* (1979) deterjanla çözüldürülen ve taze saflaştırılan akciğer CPR preparatlarında biokatalitik açıdan inaktif olan CPR'ın değişik miktarlarda 68 kDa da bir bant verdiği belirtilmiştir.

Fenobarbitalle muamele edilen sıçanların karaciğerlerinden CPR enzimi iki farklı yöntemle saflaştırılmıştır. Birinci yöntemde uygun tampon çözelti ve işlemlere tabi tutularak elde edilen çözüldürülmüş mikrozomal çözelti direkt olarak 2', 5' ADP Agaroz afinite kolonuna tatbik edilmiş ve 5 mM 2' AMP ile elüe edilmiştir. İşlem sonunda enzim %91 verimle 188 kat saflaştırılmıştır. İkinci yöntemde ise elde edilen mikrozomal çözelti ilk olarak n-oktilamino sepharose 4B ye ardından 2', 5' ADP Agaroz kolonuna tatbik edilmiştir. Bu yöntem sonucunda ise enzim %80 verimle 182 kat saflaştırılmıştır. Her iki yöntem sonucunda elde edilen enzim örnekleri SDS-PAGE ye yüklenmiş 76 kDa tek bant elde edilmiştir. Bunun üzerine Shephard *et al.* (1983) birinci yöntemin daha hızlı ve çabuk bir yöntem olduğunu belirterek çalışmanın tek kademede gerçekleşmesinin önemini vurgulamaktadır.

CPR enzimi tırtıl sürüsü midgut membranından bromelainle çözüldürülüp ve sukroz profosfat ile yıkanan mikrozomal fraksiyonun sephadex G-100 kolonuna ardından da peşpeşe iki iyon değişim (DEAE selüloz) kolonuna yüklenmesi ile 405 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi 70 ± 13 kDa olarak tespit edilmiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

İpliksi mantar (*Rhizopus nigricans*) parçalarındaki redüktaz saflaştırılması için ilk önce mikrozomal membran Triton X 100 ile mumele edilerek çözüldürülmüştür. Ardından 2', 5'ADP sefaroze afinite kolonu ve yüksek performanslı anyon değişim kolonu tatbik edilmiştir. 360 kat saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 37 μ mol sitokrom c ind/dk/mg protein olarak belirtilmiştir. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE 79 kDa da tek bant verdiği belirtilirken enzimin her molu başına FAD ve FMN'den birer mol içerdiği tespit edilmiştir. Progesteron ile steroid hidroksilasyon sisteminin indüksiyonu

araştırdıklarında mikrozomal NADPH-sitokrom c (P450) redüktaz aktivitesinin 10 kat arttığı belirtilmiştir (Makovec and Breskvar 1998).

CPR enzimi hibrit Petunya çiçeklerinden 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propen sülfonat deterjanı ve 2', 5'ADP sepharoz afinite kolonu ve takibinde anyon değişim kolonu kullanılarak yüksek bir saflaştırma oranı ve iyi bir verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS PAGE de 75 ve 81 kDa da iki farklı protein bandı elde edilmiştir. Western Blot analizi için iki farklı antikor kullanılmış ve 84 kDa tek bir bant elde edilmiştir. Enzimin amino asit sekans analizi bitkilerle hayvanlardaki CPR NADPH bağlama bölgesinde önemli derecede benzerlik olduğunu göstermiştir. Ferrisitokrom c'nin indirgenmesi için optimum pH 7,4 bulunmuştur. NADPH ve sitokrom c için K_M değeri sırasıyla 9,2 ve 2,8 μ M olarak tespit edilmiştir (Menting *et al.* 1994).

İnsan notrofil membranına bağlı olan NADPH sitokrom c redüktaz ve Sitokrom b558, iyon değişim safaroz, N aminoaktil agaroz, 2', 5'ADP sepharoz ve heparin sapharoz kolonlarının kombinasyonundan ayrı ayrı elüe edilerek yüksek bir oranda saflaştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi 68 kDa olarak tespit edilmiştir (Nisimoto *et al.* 1994).

Farklı kaynaklardan izole edilen CPR enziminin kinetik mekanizması olarak ping-pong mekanizması birçok bilim adamı tarafından düşünülmüştür. Örneğin domuz karaciğerinden (Master *et al.* 1965), domuz böbreğinden (Fan and master 1974), tavuk böbreğinden (Kulkoski *et al.* 1979) ve ev sineğinden (Mayer and Durant 1979) saflaştırılan CPR için bahsi geçen mekanizma önerilmiştir.

Ev sineği (Wilson and Hodgson 1971; Mayer and Prough 1977) ve *Spodoptera eridania* (Crankshaw *et al.* 1979) böcek CPR enzimi için Ping-Pong mekanizması önerilmiş ancak Murataliev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ev sineği CPR enziminin

rastgele Bi-Bi kinetik mekanizmasına göre işlediğine dair çok güçlü kanıtlar bulunmuştur (Murataliev *et al.* 1999).

Tırtıl sürüsünün midgut membranından saflaştırılan CPR enziminin FMN ve FAD yi neredeyse eşit oranlarda içerdiği ifade edilmiştir. Yapılan kinetik analizler neticesinde sitokrom c nin indirgenmesinin Bi Bi Ping Pong mekanizması ile gerçekleştiği ifade edilmiştir. NADPH ve sitokrom c nin K_M değerleri sırasıyla 32 ve 46 μM olarak tespit edilmiştir. 2'AMP ve $NADP^+$ nin K_i değerlerinin sırasıyla 201 μM ve 15 μM bulunduğu ifade edilmiştir. Bulunan bu değerlerin memeli redüktaz için bulunan değerlerden daha yüksek olduğu ifade edilmiştir Ayrıca enzimin aktivasyon enerjisinin 31,65 kJ/mol bulunduğu sıçan karaciğerinde ise bu değer 60,16 kJ/mol olarak bulunmuştur. Neredeyse iki katı oranında bir fark oluşu enzimin aktif bölgesin de türlere göre farklı olduğu düşüncesini desteklemiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

Rock *et al.* (2001) yapmış olduğu bir çalışmada CPR enziminin saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan 2', 5' ADP Agaroz afinite kolonundan enzimin saflaştırılması sırasında tercih edilen 2' AMP yerine farklı bileşenleri denemiştir. Bu çalışmaya sebep olarak 2' AMP nin pahalı bir materyal olduğunu ileri sürmüştür. Bu amaçla $NADP^+$ denenmiş ancak yine aynı nedenle kullanmayı istememiştir. Yine bu doğrultuda 2' AMP ile 3' AMP nin bir karışımı olan 2', 3' AMP yi kullanmış ve bu karışımın 2' AMP ile aynı derecede saflaştırdığını ileri sürmüştür. Aynı zamanda 2', 3' AMP nin, 2' AMP den 20 kat daha uygun fiyatta olduğunu ve 2', 5' ADP Agaroz afinite kolonunun da yaşam süresini uzattığını iddia etmiştir.

Bu güne kadar hindi karaciğerinden ksantin dehidrogenaz (Cleere and Coughlan 1974), fruktoz 1,6-bisfosfataz (Han *et al.* 1974), aspartat aminotransferaz (Barra *et al.* 1979), fruktoz 1,6-bisfosfataz (Cherif *et al.* 2006), glutatyon redüktaz (Taşer 2010) ve glutatyon s transferaz (Akkemik *et al.* 2012) enzimleri saflaştırılıp çeşitli uygulamalar ile karakterize edilmiştir.

CPR'nin immunoreaktif bantları küçük kanguru ve sıçan için 79 kDa belirlenirken insan protein için 76 kDa olarak belirlenmiştir. Ancak koala CPR'nin immunoreaktif bandı yaklaşık 82 kDa olarak belirlenmiştir (Kong *et al.* 2009). Çoğu memeli CPR enzim molekül kütlesi 72-79 kDa arasında iken bazı bitki CPR enzimlerinin molekül kütlesi SDS-PAGE'de daha büyük bulunmuştur. Örneğin tatlı patates 81 kDa (Fujita and Asahi 1985), nane 82 kDa (Ponnamperuma and Crteauna 1996), petunya 84 kDa (Menting *et al.* 1994) ve yer elmasında 80, 82 ve 84 kDa (Benveniste *et al.* 1991) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 2. 1. Farklı kaynaklı CPR enzimleri için K_M ve K_i değerleri

Enzim kaynağı	K_M (μM)		K_i (μM)		Kaynaklar
	NADPH	Sit c	2'AMP	NADP ⁺	
Domuz karaciğeri	3,8	5,4	-	2	Williams and Kamin 1962
Domuz karaciğeri	3,4	2,6	54	4,8	Phillips and Langdon 1962
Ev sineği	23,5	16,6	640	14	Mayer and Prough 1977
Tırtıl sürüsü midgut	32,5	46,6	201	15	Crankshaw <i>et al.</i> 1979
Koyun akciğer	11,1±0,70	20,0±2,15			Iscan and Arinc 1986

Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan CPR enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M değerleri hesaplanmıştır. Örneğin domuz karaciğeri CPR'nin sırasıyla 28 μM ve 14 μM (Master 1980) ve kobay faresi karaciğeri için 15,7 μM ve 10,7 μM dır (Kobayashi and Rikan 1984).

Sıçrayan kefal balığı karaciğeri dokusundan saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine pH, iyonik şiddet ve substrat konsantrasyonunun etkilerinin incelendiği ifade edilmiştir. Buna göre sitokrom c için K_M değeri 7,69 μM , optimum pH'nın 7,4-7,6 arasında optimum iyonik şiddetin ise 600 mM olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Ayrıca enzimin biyokatalitik aktivitesi saflaştırılan CPR'nin EROD aktivitesi yeniden yapılandırılarak çalışılmıştır (Sen and Arinc 1998).

Sığır karaciğer redüktazın tam absorpsiyon spektrumu aralığında flovo proteinlerin karakteristik piki olan 478 nm de bir omuz, 455 ve 378 nm de ise iki pik gözlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin, pH nın ve sitokrom c nin konsantrasyon etkisi incelenmiştir. Enzimin optimum pH değerinin pH 7,4-7,8 arasında olduğu pH 7,8 üzerinde enzimin aktivite kaybettiği ayrıca enzim aktivitesinin maksimum olduğu iyonik şiddet değerinin 0,3 M K-fosfat olarak bulunduğu belirtilmiştir. Dahası tampon konsantrasyonu artıkça enzim aktivitesinde küçük oranlarda bir azalma olduğu belirtilmiştir. Sitokrom c için K_M değeri 47,7 μ M V_{max} değeri ise 20,1 μ mol/min/mg protein olarak bulunmuştur. Ayrıca 37 ve 25°C sıcaklıklarda %20 gliserol varlığında ve yokluğunda CPR aktivitesinin stabilitesine bakılmıştır. Gliserol varlığında her iki sıcaklıkta enzimin aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. 25°C de 100 saatlik bir zaman diliminde enzimin ilk bir saatte %75 yedinci saatte ise %83'lük bir aktivite kaybı yaşanırken aynı sıcaklıkta gliserollü ortamda enzimin gliserolsüz ortama nazaran daha az aktivite kaybettiği belirtilmiştir. Yani yüz saatin sonunda %75 lik bir aktivite kaybı gerçekleşmiştir. 37°C ise yedi saatlik bir inkübasyon süresi içinde enzim gliserolsüzde %85 lik aktivite kaybına uğrarken gliserollüde %77'lik bir aktivite kaybına uğradığı belirtilmiştir (Çelik 2002).

Yapılan bir çalışmada tek bir P450 izoenzimi yeniden yapılandırılan sistemde kombine edildiğinde başka izoenzimlerin işlevlerini etkileyebildiği gösterilmektedir. Bu amaçla çalışmada P450 2B4 (LM2), P450 1A2 (LM4) ile karşılaştırıldığında benzafetamin ve 7 pentoksiseforanın P450 2B4 (LM2) için substrat olarak seçilebileceği belirtilmiştir. Fakat bu substratların her iki P450 izoenzimi ve redüktazı içeren yeniden yapılandırılan sisteminde farklı karakteristik özellik sergilediği belirtilmiştir. Benzfetamin demetilasyon hem P450 1A2 hem de 2B4 içeren yeniden yapılandırılan sistem aktivitesinde küçük bir artış gösterirken, 7-pentoksiresorufin O-dealkilasyon (PROD) her iki izoenzimi içeren yeniden yapılandırılan sistemi önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar yeniden yapılandırılan sistemdeki P450 izoenzimleri arasındaki fonksiyonel etkileşimlerin substrat varlığına bağlı olduğunu göstermektedir. (PROD) un inhibisyonu (subsaturating) redüktaz inhibitör etkisi daha belirgin olmak üzere, aynı zamanda redüktazın seviyesine bağlıdır. Son olarak yeniden oluşum

sisteminde protein-protein etkileşimleri P450 konsantrasyonundan ziyade redüktazın konsantrasyonuna bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu görüş P450 1A2'nin redüktaz molekülleri için P450 2B4 ile yarıştığına reaksiyonun inhibe olması ile desteklenmektedir (Cawley *et al.* 1995).

Tırtıl sürüsünün midgut membranından saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine p-hidroksimerkürbezoatın ve mersalinin inhibisyon etkisi incelendiğinde enzimi mikromolar konsantrasyonda inhibe ettiği ifade edilmiştir. Ortama koruyucu olarak NADPH ve merkaptoetanol ilave edildiğinde bahsi geçen inhibitörler için CPR çok küçük bir koruma sağlayabilmiştir. İlaç metabolizmasının inhibitörleri olarak bilinen 4,5 dikloro-1,2 metilendioksibenzen ve 1 fenilimidazol saflaştırılan CPR üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. 1 mM kinon alizan CPR aktivitesinde %53'lük bir oranda inhibisyona sebep olurken başka bir kinon olan menadion 1 mM konsantrasyonda CPR aktive etmiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

Bozcaarmutlu *et al.* (2011) sığır karaciğerinden saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} 'nin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkisini araştırmış üç metal iyonunda enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona sebep olduğunu belirterek IC_{50} değerlerinin sırasıyla 0,027, 0,059 ve 2,9 mM olduğunu ifade etmişlerdir. K_i sabitini ve inhibisyon tipini belirlemek için Lineweaver-Burk ve Dixon eğrileri çizilmiştir. Çalışılan metal iyonlarının K_i sabitleri ise sırasıyla 0,03, 0,04 ve 2 mM bulunurken üçününde yarışmasız inhibisyon sergilediği belirtilmiştir.

Sıçrayan kefal balığının karaciğerinden saflaştırılan CPR enziminin aktivitesi üzerine Hg^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cr^{+3} ve Zn^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Zn^{+2} hariç diğer metal iyonlarının tamamının inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir. 50 μM metal iyonu konsantrasyonunda Hg^{+2} CPR aktivitesinde %100'lük bir inhibisyon gösterirken aynı konsantrasyonda Cd^{+2} , Ni^{+2} ve Cr^{+3} metal iyonları ise %66, %65 ve %37'lik bir inhibisyona sebep olmuştur. Zn^{+2} metal iyonu ise herhangi bir inhibisyona sebep olmamıştır. IC_{50} değerleri $HgCl_2$, $CrCl_3$, $CdCl_2$ ve $NiCl_2$ için sırasıyla 0,07 μM , 24 μM , 33 μM ve 143 μM olarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk ve Dixon

grafığı ile dört metalinde yarışmasız inhibisyon sergilediğı belirtilmiştir. K_i değerleri Dixon grafiğinden sırasıyla 0,048 μM , 18 μM , 73 μM ve 329 μM olarak belirlenmiştir (Bozcaarmutlu and Arinç 2007).

Sıçrayan kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine AlCl_3 ve TlCl_3 inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmış her iki metalinde enzim aktivitesinde güçlü bir inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla 34 μM ve 3 μM olduğu belirtilmiştir. Lineweaver-Burk ve Dixon grafiğı ile her iki metalin yarışmasız inhibisyon sergilediğı ve K_i sabitlerinin ise sırasıyla 8,3 ve 5,6 μM olduğu belirtilmiştir. 1 mM EDTA varlığında CPR enzim aktivitesi üzerinde Al^{+3} ve Tl^{+3} 'ün inhibisyon etkisi kısmen kurtarıldığı belirtilmiştir. İlaveten kalay ve magnezyumun saflaştırılan CPR'ın aktivitesinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediğı belirtilmiştir (Bozcaarmutlu 2007).

Kim *et al.* (2002) yapmış olduğu çalışmada Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının sıçan karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini araştırılmıştır. Bu çalışma neticesinde sadece Cu^{+2} 'nin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değerinin de 5,8 μM olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda ortamda EDTA olduğunda Cu^{+2} 'nin sebep olduğu inhibisyonda %25 oranında enzim aktivitesi üzerinde bir azalma gözlenmiştir.

Sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine bir, iki ve üç değerlikli katyonların etkileri araştırılmıştır. Çoğu iki değerlikli katyonlar (ağır metaller hariç) CPR'yi uyarırken bir ve üç değerlikli katyonlar az bir etki ya da inhibisyon etkisi göstermiştir (Fouts and Pohl 1971).

Araştırmacılar, geçmiş yıllarda ağır metal iyonlarının farklı enzimler üzerine istenmeyen etkilerini sıklıkla rapor etmişlerdir. Örneğin Ekinci *et al.* (2007) kurşun, bakır, kobalt ağır metallerinin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinden bahsetmişlerdir. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan

glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} ve Al^{+3} metal iyonlarının inhibisyon etkileri rapor edilmiştir (Çoban *et al.* 2007). Aynı çalışma grubu gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimine aynı metal iyonlarının inhibisyon etkilerini incelemiş ve benzer sonuçlar bulduklarını rapor etmişlerdir (Tekman *et al.* 2008).

Yapılan bir çalışmada bir flovoprotein inhibitörü olan difenileneiodonyum sülfat (DPI) vasküler CPR inhibisyonu vasıtasıyla aortan izole edilen gliseril trinitrat (GTN)'ın metabolik aktivasyonunu dönüşümsüz olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (McGuire *et al.* 1998).

Tannik asidin insan ve sıçan karaciğer mikrozomal CPR enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış söz konusu enzim için inhibisyona sebep olduğu belirlenerek IC_{50} değerleri sırasıyla 17,4 μM ve 11,8 μM olarak tespit edilmiştir (Yao *et al.* 2008).

Sülfür musturad içeren vesikantların solunmasının üst solunum yollarında ciddi zarara neden olabileceği belirtilerek yapılan bir çalışmada bir sülfür musturad analogu olan 2-kloroetil etil sülfid (CEES), tip II akciğer epitel hücrelerindeki ve β -naftiloflavin ve salin uygulanmış sıçanların karaciğer mikrozomlarında doğal CPR'ın yanı sıra insan rekombinant CPR için potansiyel bir inhibitör olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada CEES'in CPR için seçici bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (Gray *et al.* 2010).

Sanazol ile metronidazolun ksantin/ksantin oksidaz ve CPR üzerinde sitokrom c nin indirgenme etkisi araştırılmış her iki enzimde de sanazol ilavesinde sitokrom c^{+3} 'ün indirgenmesinde önemli derecede artış gösterdiği ancak metronidazolün göstermediği belirtilmiştir. Bunun sonucunda da her iki enziminde sanazolün biyoaktivasyonunda ve timöridikal aktivitesinde görev alan enzimler olabileceği belirtilmiştir (Schepetkin *et al.* 2001).

NADPH'tan sitokrom P450 türlerine ve diğer birkaç mikrozomal enzime elektron transfer eden CPR aynı zamanda birçok kimyasal ve ilacın bir elektronla indirgenmesini de katalizlemektedir. CPR tarafından 5-siyano-2,3-ditiol tetrazolum kloride (CTC)'in indirgenmesi CPR aktivitesinin incelenmesi için bir metot olarak önerilmiştir. CPR tarafından NADPH'tan salınan elektronlar CTC'nin reaksiyon ortamına transfer edilmiş ve CTC indirgenme aktivitesi spektrometrik ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Michaelis–Menten ile CTC'nin reaksiyon kinetiği incelenmiştir. Buna göre $K_M=50 \mu\text{M}$, $k_{cat}=2,520 \text{ dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu metot CPR'in enzimatik aktivitesi için devamlı kullanılacak bir ölçüm olarak sunulmuştur (Kim *et al.* 2009).

Redoks-aktif kemoterapik ajan üreten yüksek toksik radikal anyonlar ile reaktif oksijen türleri bir elektronla indirgenir. Bu prosesi katalizleyen ana enzim CPR dır. Çünkü birçok tümörlü hücrede yüksek miktarda ekspresse olan bu enzim bu hücrelerde kemoterapik ajanların redoks döngüsünde seçici antitümör aktivitesi verebilir. Bu amaçla yapılan çalışmada nitrofuranın redoks döngüsü ile CPR arasındaki bağlantının yanı sıra nitrofuranın hücre tamamında sitotoksitesi'nin olup olmadığına bakılmıştır. Çalışmanın sonucunda CPR ile nitrofuranın redoks döngüsü arasında güçlü bir bağlantı bulunurken umulmadık bir şekilde reaktif oksijen türlerinin üretiminde ve gözlemlenen sitotoksitede nitrofuranın redoks döngüsü arasında bir bağlantı bulunmamıştır (Wang *et al* 2008).

3. METARYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2', 5' ADP-sepharose 4B	Pharmacia
2'-adenosin monofosfat (2'-AMP)	Sigma
6-amino kaproik asid (ϵ -ACA)	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Brom timol mavisi	Sigma
Bütil hidrositoluen (BHT)	Sigma
Coomessie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomessie Brilliant Blue R-250	Sigma
DE52	Whatman
Emulgen (polyoksietilen nonylfenileter)	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Fluka
Fenilmetilensülfonill florid (PMSF)	Sigma
Folin Reaktifi Phenol Reagent	Sigma
Gliserol	Sigma Chemical Comp.'den
Glisin	ICN Biomedicals. inc.
Glutalaldehit	Sigma
Molekül kütlesi Standartları Jel filtrasyon için	Sigma
Molekül kütlesi standartları (M.W. 30,000- 200,000)	Sigma
Protein Marker V	peqGOLD/peqlab
Protein Marker	BioRad 0375
N,N'- metilen bisakrilamid	Sigma
N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum fosfat	Riedel de Haen
Sephadex G-100	Sigma
Sitokrom c	Sigma
Sodyum azotür	E.Merc AG
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	E.Merc AG
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum kolat hidrat (kolat)	Sigma
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Sigma

Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
β -merkaptto etanol	Fluka
β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH)	Sigma
β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP ⁺)	Sigma

Çalışmamızda kullanılan diğer kimyasallar Sigma Chemical Comp.'den ya da E.Merc AG'den, temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Ultrasatrifüj	: Beckman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Spektrofotometre	: Shimatzu
Spektrofotometre	: Beckman coulter
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midii Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20

Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
 Buzdolapları : Siemens
 Derindondurucu
 (-20°C'ye kadar) : Sanyo Madical Freezer
 (-85°C'ye kadar) : Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 300 mM K-fosfat (pH 7,7) /0,1 mM EDTA: 4,1 g KH_2PO_4 + 0,003 g EDTA tartılarak 90 ml saf suda çözüldü, pH 7,7'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 0,036 mM Sitokrom c çözeltisi: 0,00445 g Sitokrom c alınarak bir miktar saf suda çözüldü, toplam hacim saf suyla 10 ml'ye tamamlandı.
4. 1 mM NADPH çözeltisi: 0,0042 g NADPH alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Saf suyla 5 ml'ye tamamlandı.
5. %0,05 (w/v) sığır serum albumin çözeltisi: 0,005 g sığır serum albumin alınarak bir miktar saf suda çözüldü son hacim saf su ile 10 ml tamamlandı.

Hindi karaciğer mikrozomlarının hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 1 mM EDTA içeren %1,5'lik KCl çözeltisi: 1,15 g KCl+0,0292 g EDTA tartılıp bir miktar saf suda çözüldü saf su ile son hacim 100 ml tamamlandı.
2. 1 mM EDTA, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA içeren %1,5'lik KCl çözeltisi: 0,0292 g EDTA+1,15 g KCl 0,00435 g PMSF+0,0032 g ϵ -ACA tartılıp bir miktar saf suda çözüldü saf su ile son hacim 100 ml tamamlandı.
3. %25 gliserol, 2 mM EDTA, 20 μ M BHT, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,5 Emülgen 913, %0,5 Na-kolat içeren 200 mM K-fosfat tamponu pH 7,5 Mikrozom eritilmesinde kullanılan çözelti: 2,72 g KH_2PO_4 +25 ml Gliserol+0,058 g

EDTA+0,00044 g BHT+0,0015 g DTT+0,0043 g PMSF+0,0032 g ϵ -ACA+500 μ l Emülgen 913+0,5 g Na-kolat tartılıp bi miktar saf suda çözülüp pH 7,5 ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 ml tamamlandı.

DE-52 anyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

1. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler 0,2 M Tris/HCl pH 7,5 tamponu (24,2 g Tris alınır 800 ml saf suda çözülür pH-metre kullanılarak 1 M HCl ile pH 7,5 ayarlanır son hacim saf suyla 1 L'ye tamamlanır.
2. DE52 kolonunun dengelenmesinde kullanılan çözeltiler: (%20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,1 Emülgen 913 içeren 20 mM K-fosfat pH 7,7) Tampon A 400 ml Gliserol+0,058 g EDTA+0,031 DTT+0,087 g PMSF+0,065 ϵ -ACA+2 ml Emülgen 913+5,44 g KH_2PO_4 tartılıp 1800 ml saf suda çözüldü pH 7,7 ayarlandı ve son hacim saf su ile 2 L tamamlandı.
3. DE52 kolonunun elüsyonunda kullanılan çözeltiler: Tampon A nın içine 50-300 mM KCl ilave edilmesi ile elde edilen çözeltiler.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. Afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan çözeltiler: (%20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,1 Emülgen 913 içeren 50 mM K-fosfat pH 7,7) 40 ml Gliserol+0,0058 g EDTA+0,0031 DTT+0,0087 g PMSF+0,0065 ϵ -ACA+200 μ l Emülgen 913+1,36 g KH_2PO_4 tartılıp 180 ml saf suda çözüldü pH 7,7 ayarlandı ve son hacim saf su ile 200 ml tamamlandı.
2. Afinite kolonunun yıkanmasında kullanılan çözeltiler: (%20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,1 Emülgen 913 içeren 200 mM K-fosfat pH 7,7) 40 ml Gliserol+0,0058 g EDTA+0,0031 g DTT+0,0087 g PMSF+0,0065 g ϵ -ACA+200 μ l Emülgen 913+5,44 g KH_2PO_4 tartılıp 180 ml saf suda çözüldü pH 7,7 ayarlandı ve son hacim saf su ile 200 ml tamamlandı.

3. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması için kullanılan tampon çözelti: (%20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,1 Emulgen 913 içeren 50 mM K-fosfat (1 7,7) (Tampon A)/0,5-2,5 mM 2'-AMP ihtiva eden çözelti) (Çizelge 3.1). 5 ml Gliserol+0,72 mg EDTA+0,39 DTT+1,08 mg PMSF+0,81 ϵ -ACA+25 μ l Emulgen 913+0,17 g KH_2PO_4 + tartılıp 20 ml saf suda çözüldü pH 7,7 ayarlandı ve son hacim saf su ile 25 ml tamamlandı.

Çizelge 3.1. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonunda kullanılan gradient çizelgesi

Tüp Sayısı	1	2	3	4	5
2'-AMP (mM)	0,5	1	1,5	2	2,5
Tampon A (ml)	4	3	2	1	0
2,5 mM 2'-AMP(ml)	1	2	3	4	5

4. 0,1 M Na-asetat/0,5 M NaCl pH 4,5 (afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat ve 14,61 g NaCl alınıp 400 ml saf suda çözüldü, pH 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

5. 0,1 M Tris-HCl /0,5 M NaCl pH 8,5 (afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl alınıp 400 ml saf suda çözüldü, pH'a 8,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler:

- 0,8 N NaOH çözeltisi: 32 g (0,8 mol) NaOH alınarak bir litre destile suda çözüldü.
- Lowry reaktifi A: 0,2 g sodyum tartarat ve 10 g sodyum karbonat 55 ml 1 N NaOH içinde çözülerek daha sonra toplam hacim destile suyla 100 ml tamamlandı.
- Lowry reaktifi B: 2 g sodyum tartarat ve 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 ml 0,1 N NaOH içinde çözüldü.

4. Lowry reaktifi C: Ticari folin reaktifinin destile suyla 1/2 (V/V) oranında katılmasıyla taze olarak hazırlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl pH 8: 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl pH 6,8: 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml saf suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl pH 8'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkapttoetanol ilave edildi.
12. %0,1'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Gümüş Boyamada Kullanılan Çözelti:

1. Tespit çözeltisi: (60 ml saf su, 30 ml %96'lik etanol, 10 ml asetik asit)
2. Redüksiyon çözeltisi: (4,8 g Sodyum asetat, 45 ml Etanol ve 80 ml saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml glutalaldehit eklenip saf su ile 150 ml'ye tamamlandı).

3. Boyama çözeltisi: (150 mg gümüş nitrat, 150 ml saf su, 30 µl formaldehit)
4. Yıkama çözeltisi 1: (3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf su ve 120 µl formaldehit)
5. Yıkama çözeltisi 2: (1 ml gliserin ve %5'i asetik asit olan 250 ml saf su)

Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

1. 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH 7,5 (kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve standartların çözülmesi için kullanılan tampon): 6,055 g Tris, 7,45 g KCl alınarak 950 ml saf suda çözüldü. pH 7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Çalışmamızda kullanılan metal çözeltiler

1. 0,1 M AgNO_3 çözeltisi: 0,169 gr AgNO_3 tartılıp 10 ml saf suda çözüldü.
2. 0,1 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,297 gr $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
3. 0,1 M $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,291 gr $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
4. 0,1 M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,308 gr $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
5. 0,1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,249 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
6. 2 mM $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,0068 gr $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
7. 0,1 M $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,237 gr $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı..
8. 0,1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,246 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı..
9. 0,1 M $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,251 gr $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.

10. 0,1 M CaCl_2 çözeltisi: 0,110 gr CaCl_2 tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
11. 40 mM As_2O_5 çözeltisi 0,092 gr As_2O_5 tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
12. 0,1 M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi:0,331 gr $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
13. 0,1 M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,666 gr $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.
14. 0,1 M Tl_2SO_4 çözeltisi: 0,5048 gr Tl_2SO_4 tartılıp hacmi saf su ile 10 ml tamamlandı.

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin hazırlanması

1. 0, 403 M Oksitetrasiklin dihidrat çözeltisi: 200 mg oksitetrasiklin dihidrat tartılıp hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.
2. 0, 429 M Kanamisin sülfat çözeltisi: 250 mg kanamisin sülfat tartılıp hacim saf su 1 ml'ye tamamlandı.
3. 0,069 M Gentamisin sülfat çözeltisi: 80 mg gentamisin sülfat tartılıp hacim saf su 2 ml'ye tamamlandı.
4. 0,278 M Enrofloksasin çözeltisi: 100 mg enrofloksasin tartılıp hacim saf su 2 ml ml'ye tamamlandı.
5. 0,218 M Tiylosin çözeltisi: 200 mg Tiylosin tartılıp hacim saf su 1 ml'ye tamamlandı.
6. 0,151 M Seftriakson Disodyum 3,5 H_2O : 1 g Seftriakson Disodyum 3,5 H_2O tartılıp hacim saf su 10 ml'ye tamamlandı.
7. 3,365 mM Vankomisin HCl: 1 g Vankomisin HCl tartılıp hacim saf su 20 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
8. 0,560 M Sefuroksim Sodyum: 250 mg Sefuroksim Sodyum tartılıp hacim saf su 1 ml'ye tamamlandı.
9. 0,519 M Sefozolin Sodyum: 1 g Sefozolin Sodyum tartılıp hacim saf su 4 ml'ye tamamlandı.
10. 0,0516 M Kloramfenikol: 1 g Kloramfenikol tartılıp hacim saf su 6 ml'ye tamamlandı.

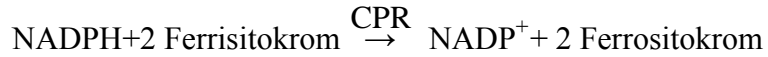
11. 0,0677 M Linkomisin HCl: 600 mg Linkomisin HCl tartılıp hacim saf su 2 ml'ye tamamlandı.

12. 0,319 M Amikasin Sülfat: 500 mg Amikasin Sülfat tartılıp hacim saf su 2 ml'ye tamamlandı.

3.2 Yöntemler

3.2.1. NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivite ölçümü

NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivitesi Masters *et al.* (1967) uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Aktivite tayinin esası 550 nm'de indirgenmiş sitokrom c' nin oranının belirlenmesine dayanır.



Reaksiyon NADPH çözeltisinin ilavesiyle başlar ve 2 dk içinde tamamlanır. Mekanizma 1 cm ışık yolu spektrofotometre'de 550 nm'de absorbans artışı ile takip edilir.

Çizelge 3.2. NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivitesinin belirlenmesindeki küvet içeriği

Çözeltiler	Kör (µl)	Numune (µl)
Sitokrom c çözeltisi (300 mM potasyum fosfat, 0,1 mM EDTA, 0,036 mM sitokrom c)	920	920
Enz çözeltisi	-	80
%0,05 Sığır Serum Albumin	80	-
1 mM NADPH	100	100

$$\text{EÜ/ml} = \frac{(\Delta A_{550} / \text{min Num} - \Delta A_{550} / \text{min Kör})(1,1)(df)}{(21)(0,08)}$$

1,1= Toplam hacim (ml), df= Seyreltme faktörü, 0,08= kullanılan enzim miktarı (ml)
21= sitokrom c nin okside ve redükte formları arasındaki ekstriksiyon katsayısı farkı

3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2.b. Lowry yöntemiyle kantitatif protein tayini

Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırılması sırasında kullanılan her iki yöntemin her basamağında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem Folin reaktifinin aromatik amino asitlerle indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-200 µg'dır (Nelson and Cox 2005).

Protein tayini işlemlerinde şu yol izlendi: Önce standart bir eğri hazırlandı. Bu amaçla 8 ayrı tüpe standart serum albumin çözeltisinden (0,5 mg/ml); 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 µl otomatik pipetlerle konuldu ve daha sonra toplam hacimler destile suyla 600 µl 'ye tamamlandı. Her bir tüpe %24'lük TCA'dan 200 µl ilave edilerek karıştırıldı ve 5 dakika kadar 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra proteinler tüp tabanına çöktüğünden üstteki sıvı dökülerek tüpler baş aşağı çevrilerek 1-2 dakika kadar süzgeç kâğıdı üzerinde tutuldu. Her tüpe 450 µl "reaktif karışımı" eklenerek karıştırıldı ve daha sonra 2x300 µl Lowry reaktifi C, iki kısım halinde 1-2 dakika zaman aralığıyla ilave edilerek iyice karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra, 750 nm'de 1. tüp sıfır absorbansa ayarlanarak bütün tüpler sırasıyla okundu. Absorbans değerleri, µg proteine karşılık grafiğe geçirilerek standart grafik elde edildi.

Bu işlemlere paralel olarak, uygun miktarlarda numune 2 ayrı tüpe alınarak aynı şekilde çalışıldı ve sonuçlar standart grafikten değerlendirildi (Robynt and White 1987).

Deney sırasında kullanılan reaktif karışımı şöyle hazırlandı: 25 kısım 0,8 N NaOH, 18 kısım Lowry reaktifi A, 2 kısım Lowry reaktifi B ihtiyaç duyulduğu kadar karıştırıldı, bu işlem deneyden hemen önce yapıldı.

3.2.3. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırılması

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi deterjan ile çözülebilir hale getirilmiş karaciğer mikrozomlarından iki farklı yöntemle saflaştırıldı. Birinci yöntemde elde edilen deterjanla çözüldürülmüş mikrozomal pelet direkt olarak 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edilerek tek kromatografik metodla saflaştırıldı. İkinci yöntemde ise elde edilen deterjanla çözüldürülmüş mikrozomal pelet DE52 anyon değişim kolonuna, ardından da 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Böylece iki farklı yöntemle enzim saflaştırılmış oldu.

3.2.3.a. Hindi karaciğeri mikrozomlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak hindi karaciğeri Banvit (Bandırma Vitaminli Yem San. A.Ş.)'ten temin edildi. Alınan karaciğerler daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de derin dondurucuda donduruldu. Mikrozomlar yaklaşık 1 adet hindi karaciğerinden (yaklaşık 20 g) hazırlandı. Karaciğer önce 1 mM EDTA içeren %1,5'lik soğuk KCl çözeltisi ile yıkandı. Bundan sonraki bütün çalışmalar 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Bir süzgeç kağıdı üzerinde bekletilerek süzülmesi ve kuruması sağlandı. Bir neşter yardımıyla karaciğerler yaklaşık 100 mg ağırlığındaki küçük parçalara ayrıldı. Yeteri miktarda küçültülmüş karaciğer parçaları buz ile soğutulularak 1 mM EDTA, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ε-ACA içeren %1,5'lik KCl çözeltisi içerisinde homojenizatör vasıtasıyla 2.400 rpm'de işlem birkaç kez tekrarlanarak homojenize edildi. Bu işlemde kullanılan çözelti

hacmi karaciğer miktarının 2,5 katı kadar olmalıdır. Elde edilen homojenat 10500 rpm'de 40 dk santrifüj edilerek hücre parçaları, çekirdek ve hücre mitokondrisi ayrılmış oldu. Endoplazmik retikulum ve diğer çözünebilir hücre fraksiyonlarını içeren süpernatant Buchner hunisi vasıtasıyla çift kat filtre kağıdı kullanılarak ve gevşek çözeltinin süpernatanta bulaşmasından kaçınarak süzüldü. Mikrozomlar 110000 rpm'de ultrasantrifüj kullanılarak 60 dk santrifüj edilerek süpernatant çözeltisinden çöktürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde boşaltıldı. Oluşan mikrozomal pelet 1 mM EDTA içeren %10'luk Gliserol çözeltisi içinde çözüldü.

3.2.3.b. Hindi karaciğer mikrozomlarının parçalanması

Karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi, karaciğer mikrozomlarının Emülgen 913 ve sodyum kolat ile muamele edilmesi ile çözünebilir hale getirildi. Sitokrom P450'nin yüksek oranda çözünebilmesi için, 5 mg/ml mikrozomal protein, %25 gliserol, 2 mM EDTA, 20 µM BHT, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ε-ACA, %0,5 Emülgen 913, %0,5 Na-kolat içeren 20 mM K-fosfat tamponu pH 7,5 kullanıldı.

İlk olarak mikrozom çözeltisi Na-kolat ve Emülgen 913 ilave edilmeden yukarıda belirtilen çözeltiler ile muamele edildi ve kuvvetlice çalkalandı. Emulgen 913 ve Na-kolat sırasıyla ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak damla damla 10 dk içerisinde ilave edildikten sonra buz banyosu içerisinde 40 dk daha karıştırılmaya devam edildi. Daha sonra deterjanla parçalanmış mikrozomları içeren süspansiyon 110 000 rpm'de 40 dk santrifüj edildi. Berrak sarı süpernatant alındı ve pelet atıldı.

3.2.3.c. DE52 anyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun paketlenmesi

DE52 anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyeli hazır olarak satın alındığı için şişirme işlemine tabi tutulmadı. Islak iyon değişim jeli 15-30 ml/g

oranında ve 200 mM Tris-HCl tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Daha sonra karışımın pH'sı asit veya baz ile 7,5'ye ayarlandı. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 15-30 ml/g oranında süspansiyon edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibe çökmesi beklendi. Bekleme süresi $t=n.h$ formülünden hesaplandı. Burada; t = zaman (dk), h = Jelin kolon içersindeki yüksekliği (cm), $n=1,3$ ile $2,4$ arasında değişen bir faktör.

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı ve bu hacim kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacminin %20 fazlasıdır. Süpernatant derhal dekante edildi. Kolon ısı ve güneş ışığı olmayan bir yere dikey olarak yerleştirildi. Karıştırılmış jel çözeltisi kolona döküldü yerçekimine karşı jelin yatak hacmi sabit kalana kadar bu şekilde dengeleme tamponu ile paketlenildi. Daha sonra saatte 45 ml akacak şekilde peristaltik pompa ile kolon akış hızını sabitlendi. Tampon A (%20 gliserol, 2 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,25 Emulgen 913, %0,2 Na-Kolat içeren 20 mM K-fosfat, pH 7,5) ile kolonun dengelenmesi sağlandı.

Not: Dengeleme tamponu ile Jelin hazırlandığı tampon aynı olmamalı fakat benzer olmalı.

3.2.3.d. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite jelinin hazırlanması ve kolona paketlenmesi

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındı ve daha sonra dengeleme tamponu (%20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ϵ -ACA, %0,1 Emulgen 913 içeren 50 mM K-fosfat pH 7,7) (Tampon B) ilave edilerek jel süspansiyon edildi. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla tampon B ile yıkanarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu

elüat ile tampon çözeltide 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

Safıaştırmada Kullanılan Birinci Yöntem

3.2.3.e. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunu ile safıaştırılması

Hindi karaciğer mikrozomlarının elde edilmesinin ardından deterjanla muamele edilerek çözündürülen mikrozomal çözelti tampon B ile dengelenmiş olan 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Daha sonra kolon 0,2 M K-fosfat içeren tampon B ile yıkandı. Örnek tatbiki ve yıkama işlemleri süresince NADPH-sitokrom P450 redüktaz fraksiyonunun içerisinde bulunan sitokrom b5'in neredeyse tamamı kolondan elüe edildi. Yıkama işlemine 418 nm'deki absorban değeri "0" oluncaya kadar devam edildi. Daha sonra 0,5-2,5 mM 2'-AMP ihtiva eden tampon B çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve NADPH-Sitokrom P450 redüktaz elde edildi.

Safıaştırmada Kullanılan İkinci Yöntem

3.2.3.f. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin DE52 anyon değışim ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunu kullanılarak safıaştırılması

DE52 kolonu (3.0x50 cm) tampon A ile dengelendikten sonra Hindi karaciğer mikrozomlarının elde edilmesinin ardından deterjanla muamele edilerek çözündürülen mikrozomal çözelti kolona uygulandı. Akış hızı 45 ml/h olacak şekilde ayarlandı. Kolon, 5 kolon hacmine eşit hacimde tampon A ile 45 ml/h akış hızında yıkandı. Yıkama boyunca hemoglobin, sitokrom P4502B homologu ve NADPH-sitokrom b5 redüktaz kolondan elüe edildi.

Kolondan NADPH-sitokrom b5 redüktaz gelişi bittikten sonra 50 mM-300 mM KCl içeren Tampon A enzim gradientli elüsyon yapıldı. 150 mM KCl içeren Tampon A ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz keskin bir şekilde elüe edildi. Bu NADPH-sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu az miktarda sitokrom P450A1'i de içerir. KCl konsantrasyonu 0,3 M'a çıkarıldığında kalan sitokrom b5 ile denatüre edilmiş sitokrom P450 elüe edildi. Ancak bundan daha yüksek KCl konsantrasyonlarında belirlenebilir sitokrom elüe edilemez.

DE52 anyon değişim kolonunundan alınan numune tampon B ile dengelenmiş olan 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Yöntem 1 deki çalışma bu aşamadan sonra aynen tektar edildi.

3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970) metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 4,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,130 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %10'luk PER ve 3,13 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,030 ml %10'luk SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %10'luk PER ve 2,45 ml saf su karıştırılacak. PER çözeltisi taze hazırlandı.

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel

hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin polimerizasyonun gerçekleştiğinden emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jeli polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak (+) anot, (-) katot elektrotlar yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jeller 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada Redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jeller 3'er defa 5 dk'da bir saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkandıktan sonra siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 ml gliserin ve 250 ml %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.2.5. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.5.a. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin molekül kütlelerinin tayini

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 40 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-100, 500 ml saf su içine alındı. Bir gece oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali pH 7,5 100 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 3 ml/h olarak ayarlandı. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2 000 kDa, maya alkol dehidrogenaz; 150 kDa, albumin (sığır serum); 66 kDa sığır eritrosit karbonik anhidraz; 29 kDa, sitokrom c 12,4 kDa ayrı ayrı kolona uygulandı (Keha and Küfrevioğlu 2009).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu pH'sı 7,5 100 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 1'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. Enzim elüe edilirken tüplerde 550

nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MK değerleri hesaplandı. Log MK- K_{av} grafiği bilgisayarda çizildi. Son olarak Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz enziminin K_{av} değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi hesaplanılmaya çalışıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı ve Log MK- K_{av} grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_o = void hacim, V_e = elüsyon, V_t = kolon yatak hacmi

3.2.5.b. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet ve optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik çalışmalar

Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,7, 7,8 ve 8,0 olan 0,3 M K-fosfat tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH'da 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM K-Fosfat tamponları kullanıldı. Her bir tampon konsantrasyonunda ayrı ayrı enzim aktivitesi bakıldı. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 70°C arasında 10'ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.5.c. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 6,6, 7,0, 7,4, 7,6 ve 7,8 olan fosfat tamponları ayrıca pH'sı 8,2 olan Tris/HCl tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki

tampon çözeltilerinin 1 ml'si 1 ml enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

3.2.5.d. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin aktivasyon enerjisinin (E_a) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı belirlendikten sonra, E_a ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi amacıyla optimum sıcaklık çalışmasında elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları ($\log k$) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte $1/T \times 1000K^{-1}$ olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Daha sonra bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formülden aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplandı.

$$\text{Eğim} = \frac{-E_a}{2,303 \times R}$$

(Wilson 1971; Segel *et al.* 1975; Onganer *et al.* 1998). Daha sonra bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

3.2.5.e. NADPH ve sitokrom c substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar

Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit sitokrom c konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda sitokrom c'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve sitokrom c için K_M ve V_{max} değerleri

hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

Daha sonra, K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (E_T) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

formülünden faydalanılarak hesaplandı.

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}$ formülü kullanılarak hesaplandı (Nelson and Cox 2005).

3.2.6. Hindi karaciğerinden saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi için inhibisyon çalışmaları

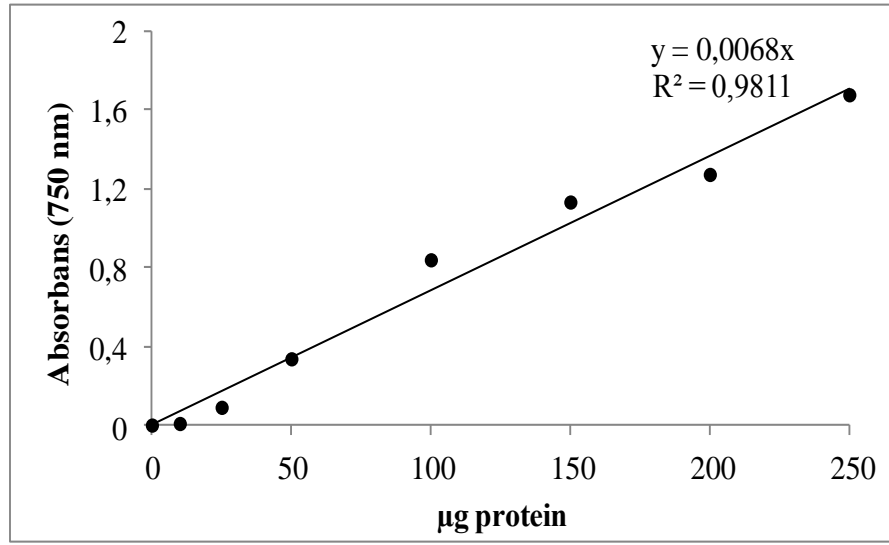
Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ag^+ , Tl^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Co^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} ve As^{+5} metal iyonlarının ve oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, amikasin sülfat, linkomisin HCl, seftriakson disodyum ve vankomisin HCl antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda şekilde araştırıldı (Çizelge 4.9-31-Şekil 4.19-41). Öncelikle metal iyonlarının en az 5 farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi kontrol edildi. Çalışmalar hem fosfat tamponunda hemde HEPES tamponunda gerçekleştirildi. İnhibisyon gösteren metal iyonları için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı.

Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metallerin inhibisyon tipi ve K_i sabiti üç farklı inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek belirlendi (Lineweaver and Burk 1934).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Lowry yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.2.b’de anlatıldığı gibi hazırlandı. İki farklı yöntemle saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında kullanılan her iki yöntemin her aşamasındaki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorban değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.

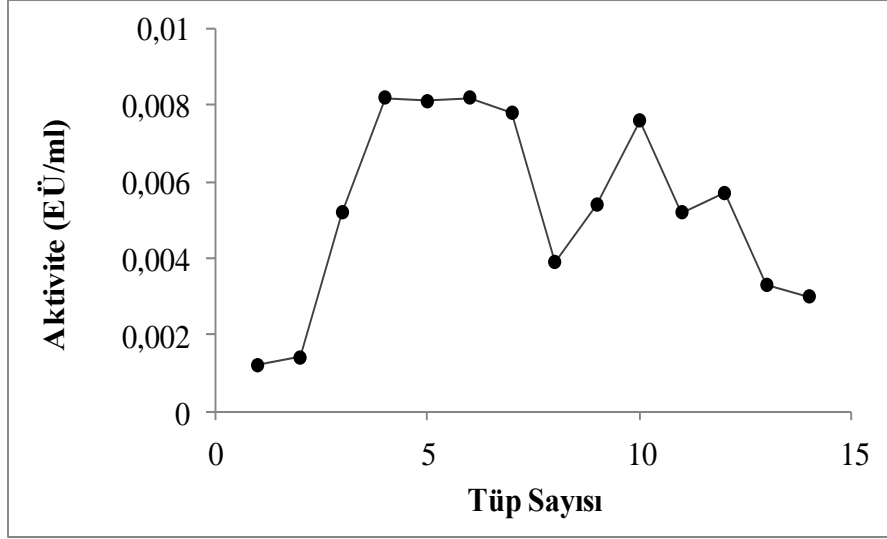


Şekil 4.1. Lowry yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Hindi Karaciğer Mikrozomal NADPH–Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması

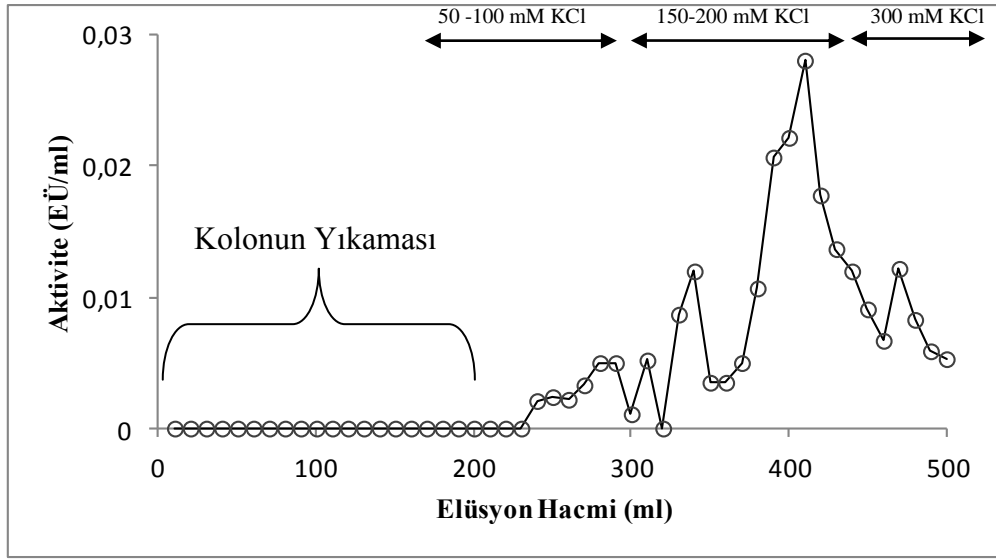
Saflaştırmada kullanılan birinci yöntemin sonuçları: Hazırlanan homojenat (deterjanla çözüldürülmüş mikrozomal çözelti) 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite

kolonuna yüklendi. Tampon A'nın içine 0,5-2,5 mM 2'-AMP ilave edilerek gradientli elüsyon yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterildi.

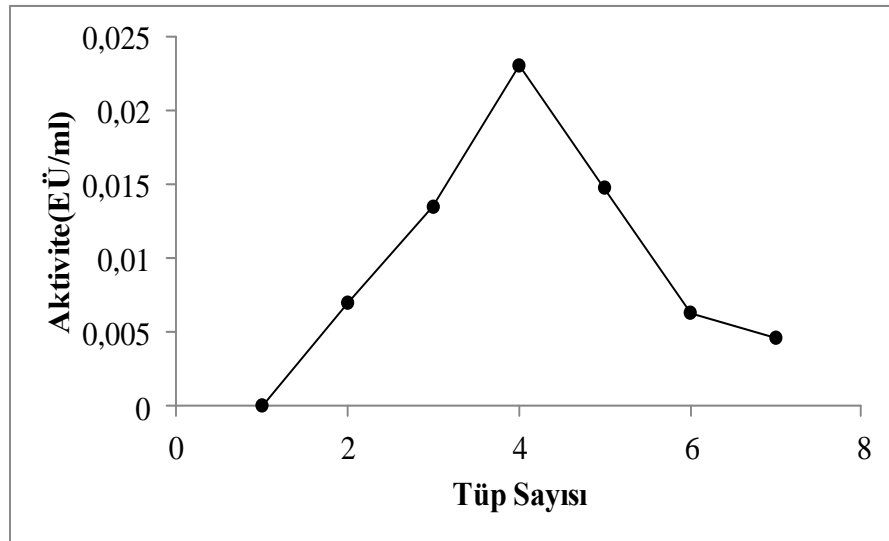


Şekil 4.2. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik (Yöntem 1)

Safılaştırmada kullanılan İkinci yöntemin sonuçları: Hazırlanan homojenat (deterjanla çözündürülmüş mikrozomal çözelti) DE52-anyon değişim kolonuna yüklendi. 50 mM-300 mM arasında KCl içeren Tampon A ile gradientli elüsyon yapıldı. 150 mM arasında KCl içeren Tampon A ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz keskin bir şekilde elüe edildi. DE52 sonrası elde ettiğimiz fraksiyonlar 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Tampon A'nın içine 0,5-2,5 mM 2'-AMP ilave edilerek gradientli elüsyon yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.'ve 4.4.'de gösterildi.



Şekil 4.3. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin DE52-Selüloz anyon değişim kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik



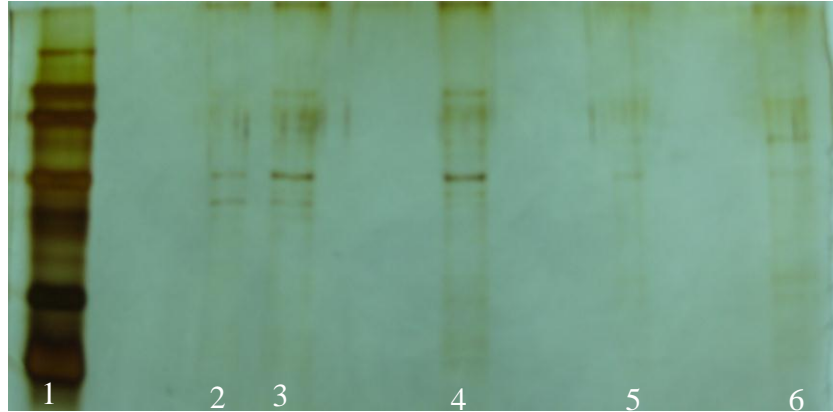
Şekil 4.4. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile elüsyonunu gösteren grafik (Yöntem 2)

Çizelge.4.1. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
						1.Yöntem
Çözünmüş Mikrozom	20	177,4	0,64	0,0036	100	1
2', 5'-ADP Sepharose 4B Afinite kromatografisi	5	0,365	0,15	0,410	23,43	114,15
						2.Yöntem
Çözünmüş Mikrozom	20	79,2	1,12	0,014	100	1
DE52 Anyon değişim kromatografisi	10	1,26	0,28	0,222	25	15,86
2', 5'-ADP Sepharose 4B Afinite kromatografisi	5	0,049	0,085	1,73	8	124

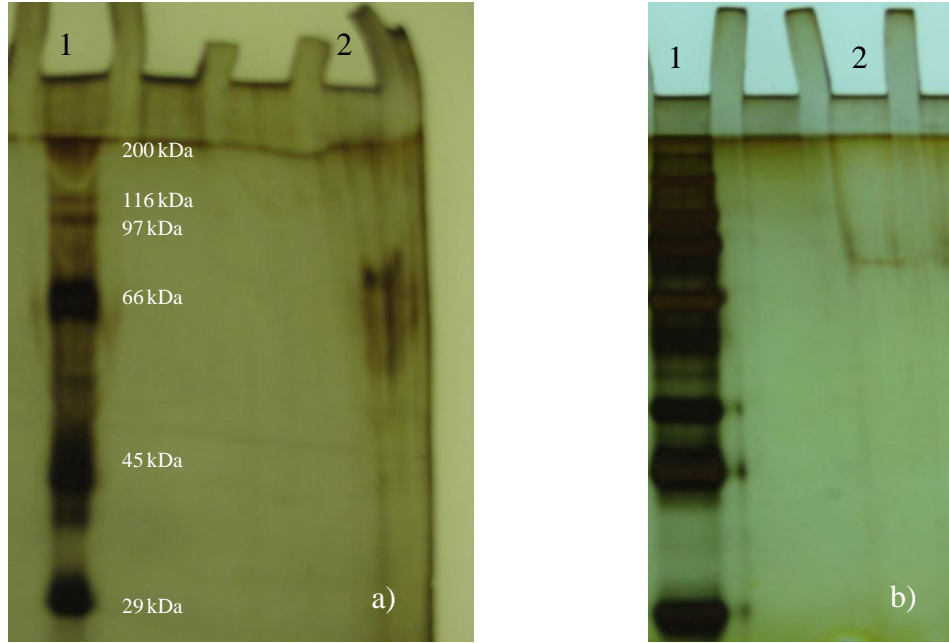
4.2.1. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom P450 redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4.'te izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.5-4.6-4.7'de gösterildi.



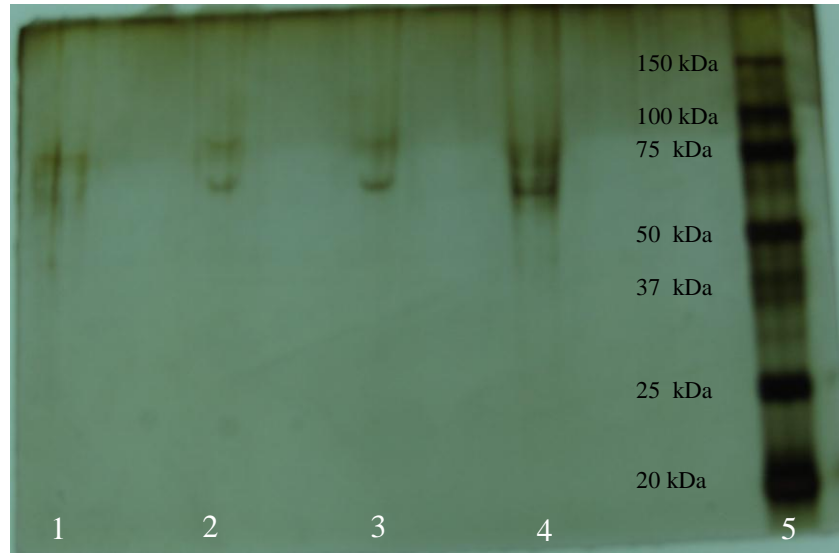
Şekil 4.5. DE52 Anyon değişim sonrası elde edilen NADPH-sitokrom P450 redüktazın SDS-PAGE fotoğrafı

*(1. Kuyu: Standart proteinler (130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa), 2.3.4.5.6. Kuyu: DE52-Selüloz anyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen farklı fraksiyonlar)



Şekil 4.6. a) 1. Yöntem sonunda (2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla) b) 2. Yöntem sonunda

*(b) DE52+2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla) (250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa; 10 kDa BioRad 61-0375) 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılan hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü



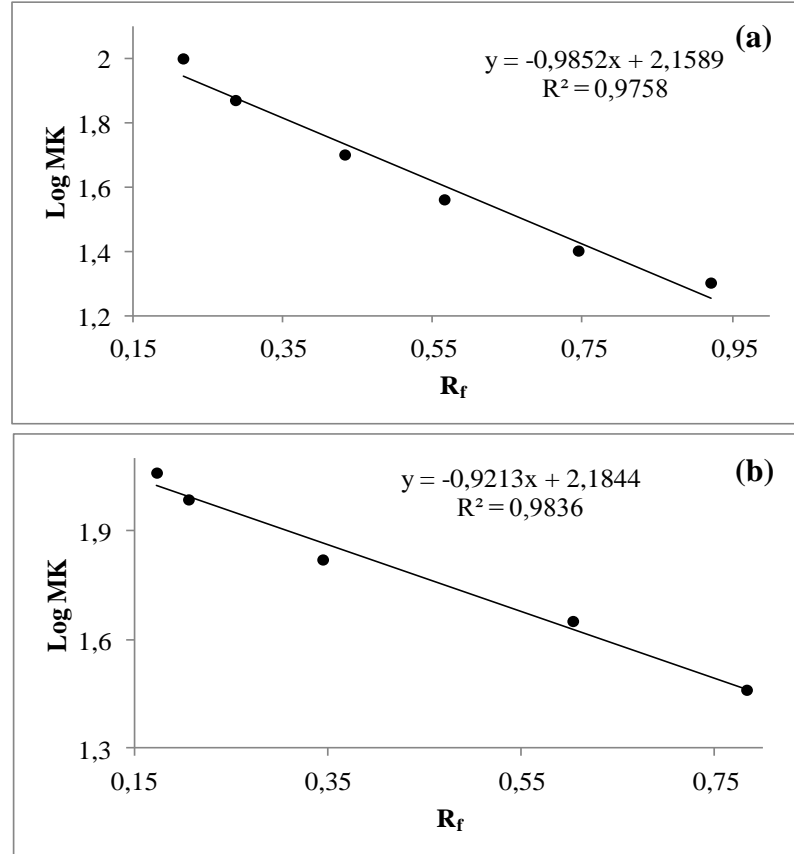
Şekil 4.7. 2. Yöntem sonunda 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılan hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*(1.2.3.4. **Kuyu:** 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılan hindi karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi), **5. Kuyu:** Standart proteinler (150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 20 kDa)

4.3. Hindi Karaciğer Mikrozoamlarından Saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.3.1. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçları

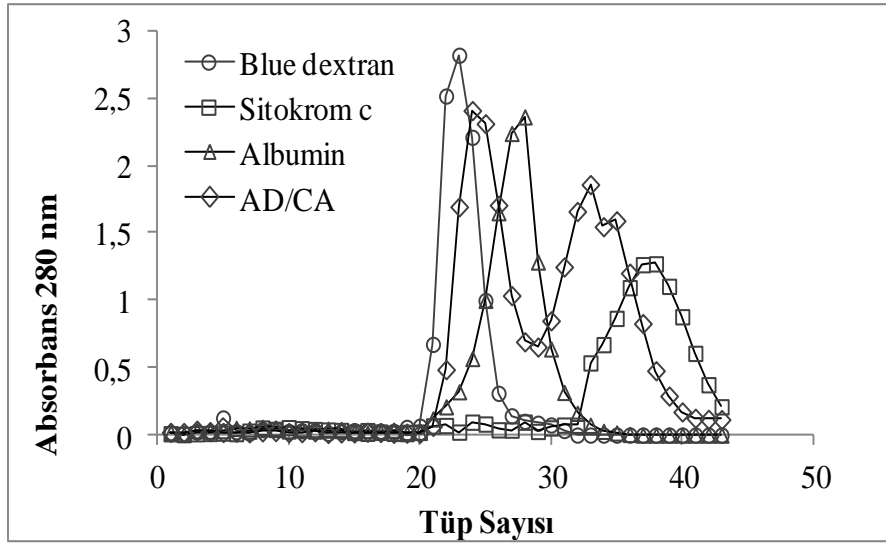
Elde edilen saf enzim SDS-PAGE’te yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.6 (a)-Şekil 4.7) Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $\log MK-R_f$ değerleri ile grafikler çizildi (Şekil 4.9 (a)-(b)). Grafiklerden faydalanarak hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin monomer mol kütesi her iki grafiğe göre yaklaşık 81,3 kDa olarak hesaplandı. Aynı zamanda protoelitik yarımlar sonucu olduğunu düşündüğümüz Şekil 4.7 de yaklaşık 69,2 kDa’da bir bant daha gözlemlendi.



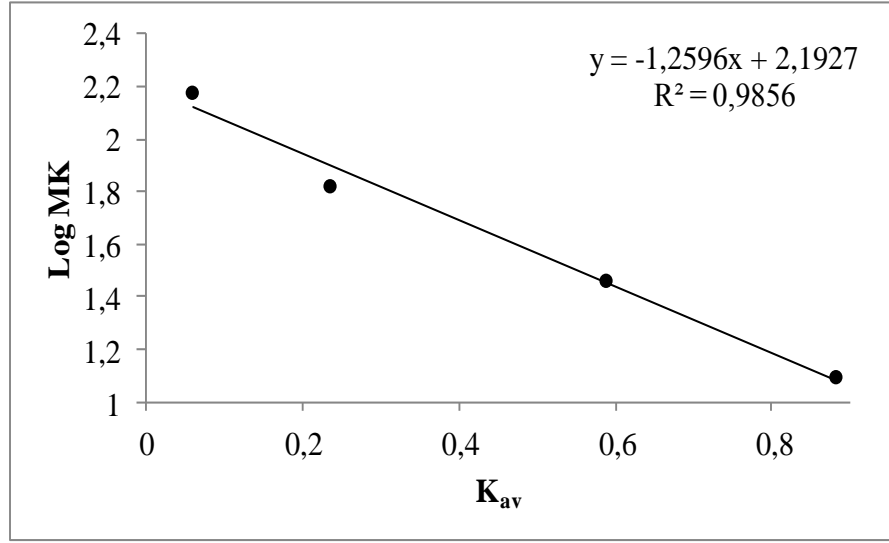
Şekil 4.8. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK- R_f grafiği

4.3.2. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar

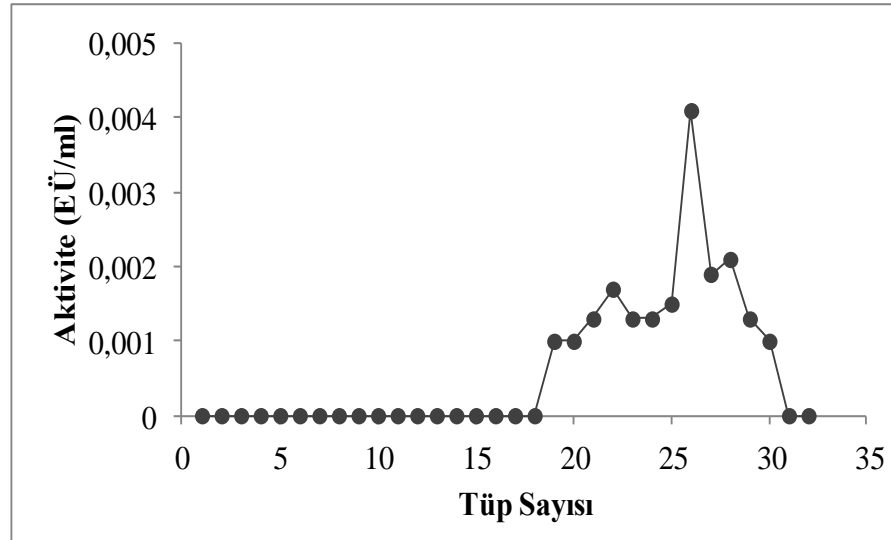
Jel filtrasyon kolonundan önce blue dekstran sonra standart proteinler daha sonra ise afinite kolonundan elüe edilen enzim çözeltisi Bölüm 3.2.5.a'da anlatıldığı şekilde yüklendi. Elüe edilen numunelerde 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak Şekil 4.9.'daki grafik çizildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.10.'da log MK- K_{av} grafiği çizildi. Elüe edilen enzimin 550 nm'de aktivite değerlerine karşılık tüp sayısı grafiği Şekil 4.11.'deki gibi çizildi. Bu grafikten faydalanarak K_{av} değeri 0,176 bulundu. Bu değer denklemde yerine konulduğunda enzimin molekül kütlesi yaklaşık olarak 100 kDa olarak bulundu.



Şekil 4.9. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbans değerleri



Şekil 4.10. Jel filtrasyon sonucu çizilen Log MK-K_{av} grafiği



Şekil 4.11. Jel filtrasyon kolonundan alınan enzimin aktivite-tüp sayısı grafiği

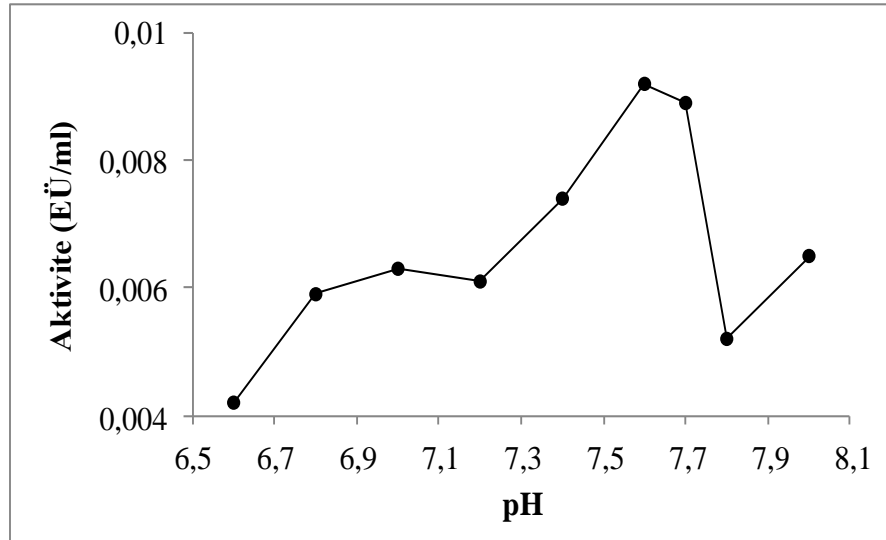
4.3.3. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,7, 7,8 ve 8,0 olan 0,3 M K-fosfat tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik

olarak belirlendi (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.2). Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH 7,6 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. 300 mM K-fosfat tamponu kullanılarak hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,7	7,8	8,0
Aktivite (EÜ/ml)	0,0042	0,0059	0,0063	0,0061	0,0074	0,0092	0,0089	0,0052	0,0065



Şekil 4.12. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

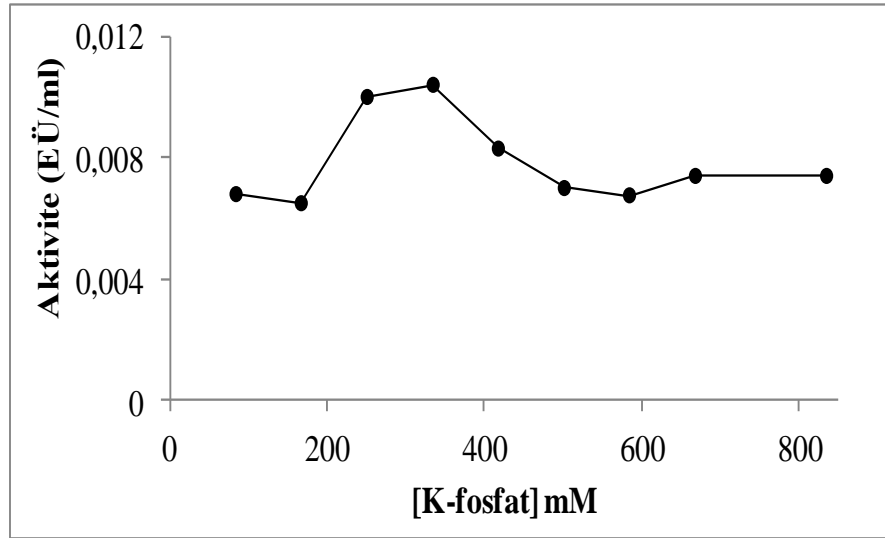
4.3.4. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddet belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen K-fosfat tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı K-

fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak K-fosfat konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim için en uygun iyonik şiddetin 400 mM (küvet içi 335 mM) K-fosfat (pH 7,6) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 7,6) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[K-fosfat] (mM)	84	167	251	335	418	502	585	669	836
Aktivite (EÜ/ml)	0,007	0,006	0,0100	0,0104	0,0083	0,007	0,0067	0,0074	0,0074



Şekil 4.13. Değişik konsantrasyonlardaki K-fosfat (pH 7,6) tampon çözeltileri kullanılarak hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

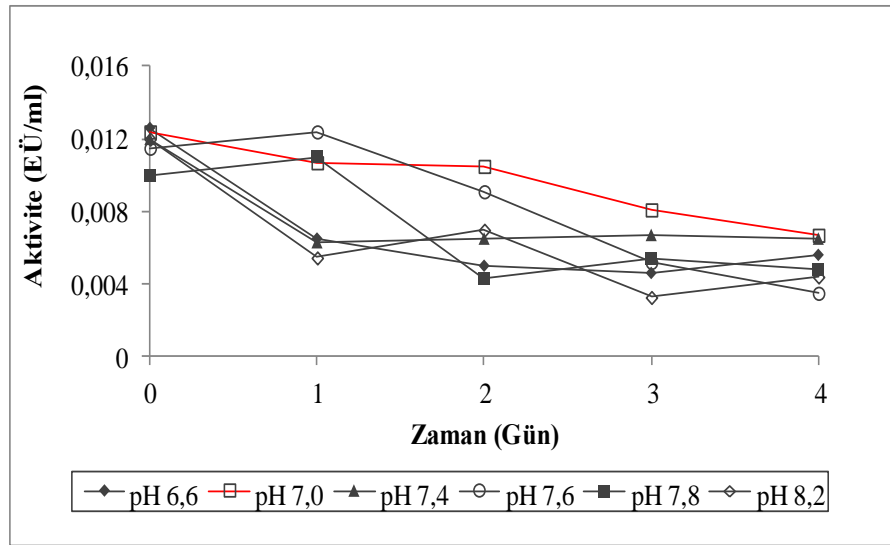
4.3.5. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik sonuçlar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 6,6, 7,0, 7,4, 7,6 ve 7,8 olan fosfat tamponları ayrıca pH'sı 8,2 olan Tris/HCl tamponu kullanıldı. Konu 3.2.5.c. belirtildiği

şekilde karışımlar hazırlandı. Çizelge 4.4 ve Şekil 4.14’de gösterildi. Enzimin stabil olduğu pH 7,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH ile ilgili sonuçlar

pH	Aktivite (EÜ/ml)				
	0 gün	1 gün	2 gün	3 gün	4 gün
6,6	0,012	0,0065	0,0050	0,0046	0,0056
7,0	0,012	0,0107	0,0105	0,0081	0,0067
7,4	0,012	0,0063	0,0065	0,0067	0,0065
7,6	0,012	0,0124	0,0091	0,0052	0,0035
7,8	0,010	0,0110	0,0043	0,0054	0,0048
8,2	0,012	0,0054	0,0069	0,0033	0,0044



Şekil 4.14. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için farklı pH lardaki K-fosfat ve Tris tamponu ile belirlenen stabil pH grafiği

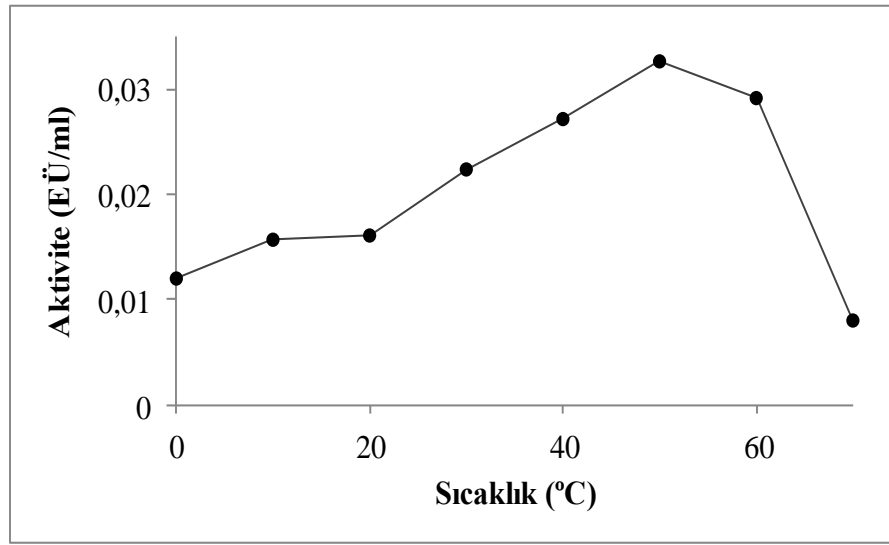
4.3.6. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete

sahip 400 mM K-fosfat (pH 7,6) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C’de bir olmak üzere bölüm 3.2.5.b’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15’de ve Çizelge 4.5’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
Aktivite (EÜ/ml)	0,012	0,0157	0,0161	0,0224	0,0272	0,0327	0,0292	0,008

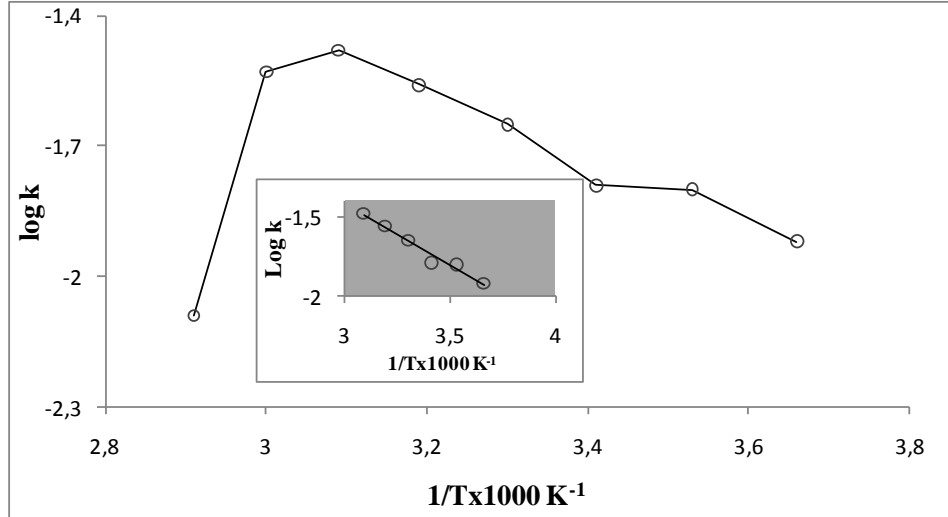


Şekil 4.15. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği

4.3.7. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi (E_a) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi

Optimum sıcaklıkta elde edilen veriler kullanılarak E_a ve Q_{10} değerleri hesaplandı. Bunun için; optimum sıcaklıktaki aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak $\log k - 1/T \times 1000K^{-1}$ grafikleri çizildi. Bu grafiklerden faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde

edildi ve hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için E_a ve Q_{10} değerleri hesaplandı (Şekil 4.16) (Çizelge 4.6).



Şekil 4.16. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.6. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık, E_a ve Q_{10} tayini sonuçları

NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz	
Optimum sıcaklık (°C)	50
Aktivasyon enerjisi (E_a) (kal/mol)	3,505
Q_{10}	1,56

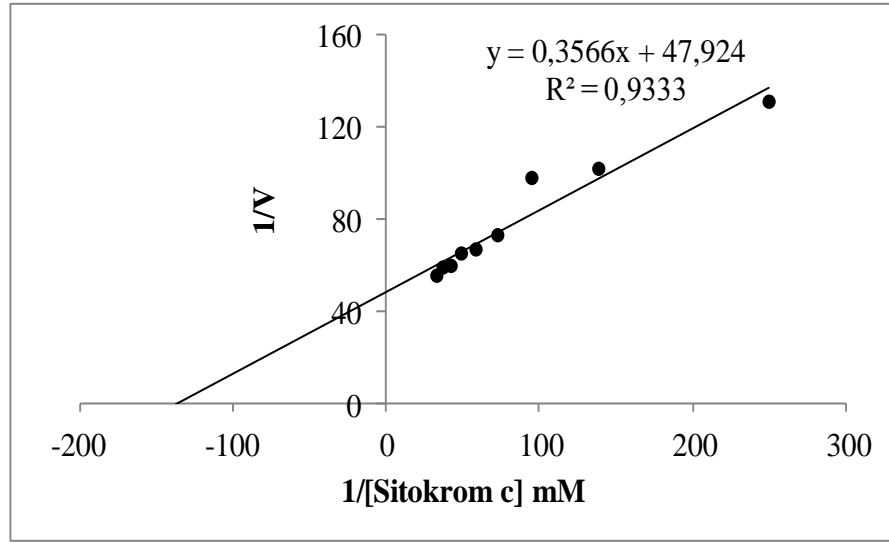
4.3.8. NADPH ve sitokrom c substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH ve sitokrom c substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.2.5.e'de anlatıldığı gibi sabit sitokrom c konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/V_0$ - $1/[NADPH]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda

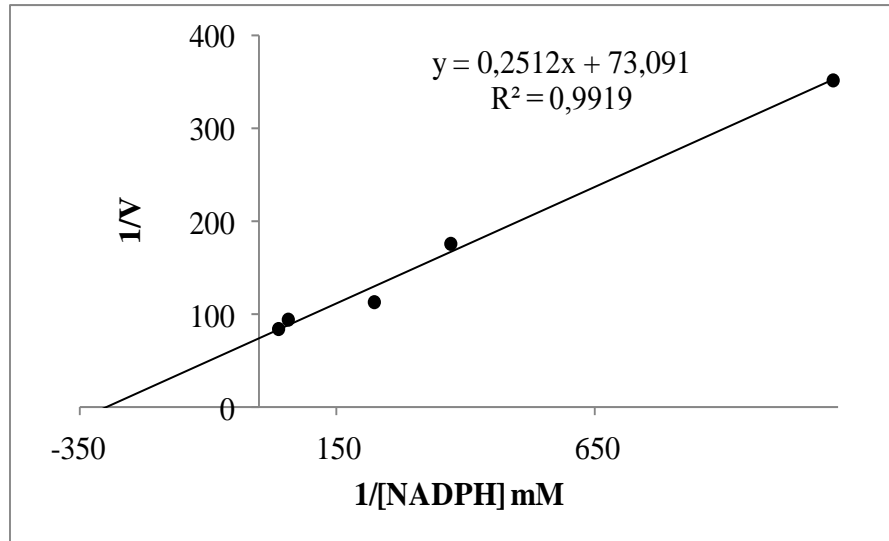
sitokrom c'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/V-1/[sitokrom\ c]$ - Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve sitokrom c için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADPH için K_M değeri $3,44\ \mu M$ ve V_{max} değeri $0,014\ E\ddot{U}/ml$ olarak; sitokrom c için ise, K_M değeri $7,44\ \mu M$ ve V_{max} değeri $0,021E\ddot{U}/ml$ olarak tespit edildi. Daha sonra bulunan K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin sitokrom c substratı için turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri V_0 tespit edildi. Bu değerler Çizelge 4.9.'de verildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7-4.8 ve Şekil 4.17-4.18'da görülmektedir.

Çizelge 4.7. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Aktivite-sitokrom c derişim çizelgesi

[Sitokrom c] mM	Aktivite (E \ddot{U} /ml)	[NADPH] mM	Aktivite (E \ddot{U} /ml)
0,0040	0,00763	0,0090	0,0028
0,0072	0,00982	0,0027	0,0057
0,0105	0,01020	0,0045	0,0089
0,0137	0,01370	0,0180	0,0107
0,0170	0,01500	0,0272	0,0120
0,0203	0,01540		
0,0235	0,01680		
0,0268	0,01700		
0,0301	0,01810		



Şekil 4.17. Sitokrom c substratı için K_M ve V_{\max} bulunmasına yönelik $1/V-1/[\text{Sitokrom c}]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. NADPH substratı için K_M ve V_{\max} bulunmasına yönelik $1/V-1/[\text{NADPH}]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M , V_{\max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları

Substrat	K_M (μM)	V_{\max} (EÜ/ml)	k_{cat} (s^{-1})	V_0 ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Sitokrom c	7,44	0,021	2258,06	303,5
NADPH	3,44	0,014	1854,83	539,2

4.4 Hindi Karaciğer Mikrozomlarından Saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve Bazı Antibiyotiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

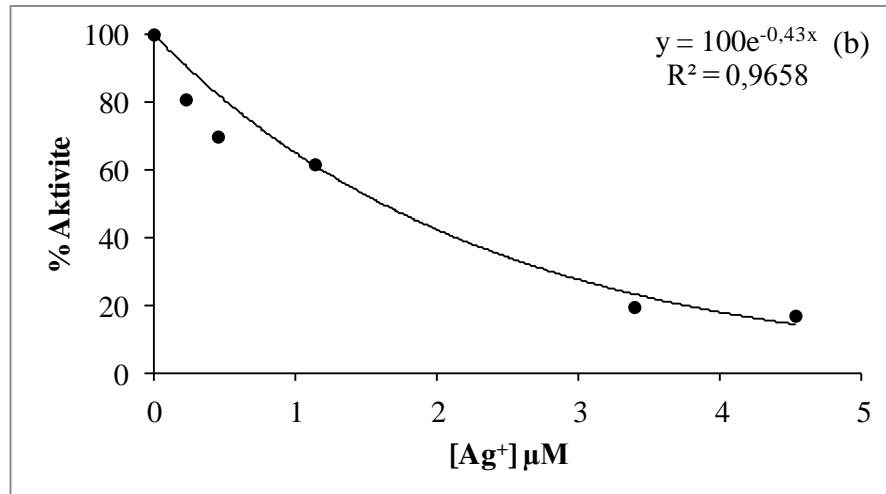
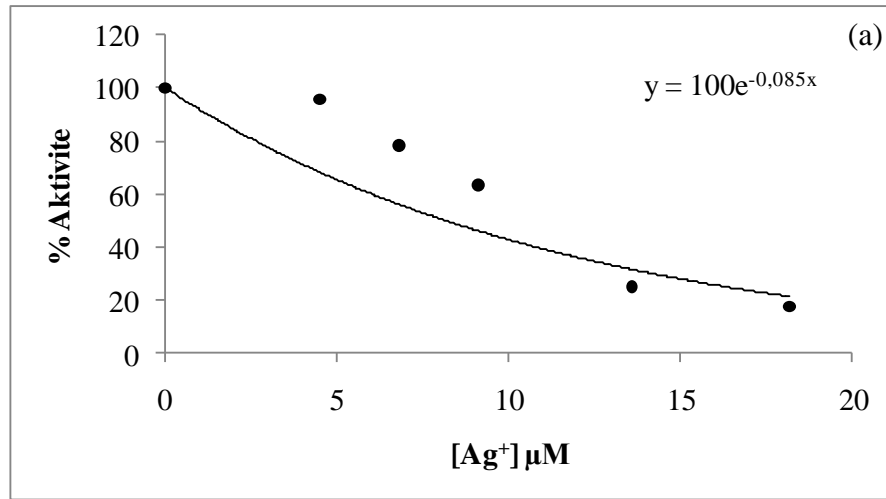
Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve yok edilmesine de inhibisyon denir. Buna neden olan bileşiklere ise inhibitör adı verilir. (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Yarışmalı inhibisyonda yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Fakat enzime dönüşümlü bağlanan inhibitörün substrat konsantrasyonu artırıldığı durumlarda inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Başka bir söylemle enzimin V_{max} değeri değişmezken K_M değerinde artış gözlenir (Segel *et al.* 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ile substrat arasında enzimin aktif bölgesine bağlanma hususunda bir yarış söz konusu değildir. Çünkü inhibitör enzimin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için $K_M^I = K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max}^I = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.33 verilmiştir.

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda 3.2.6'da anlatıldığı şekilde araştırılmıştır (Çizelge 4.9-31-Şekil 4.19-41). Ag^+ , Hg^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.19-21). İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,60, 13,52 ve 227 μM K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla $0,02967 \pm 0,0067$; yarışmalı, $10,37 \pm 2,24350$; yarışmalı ve $251 \pm 108,6247$; yarışmasız olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.42,43,44-Çizelge 4. 33)

Çizelge 4.9. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Ag^+ 'nin etkisi

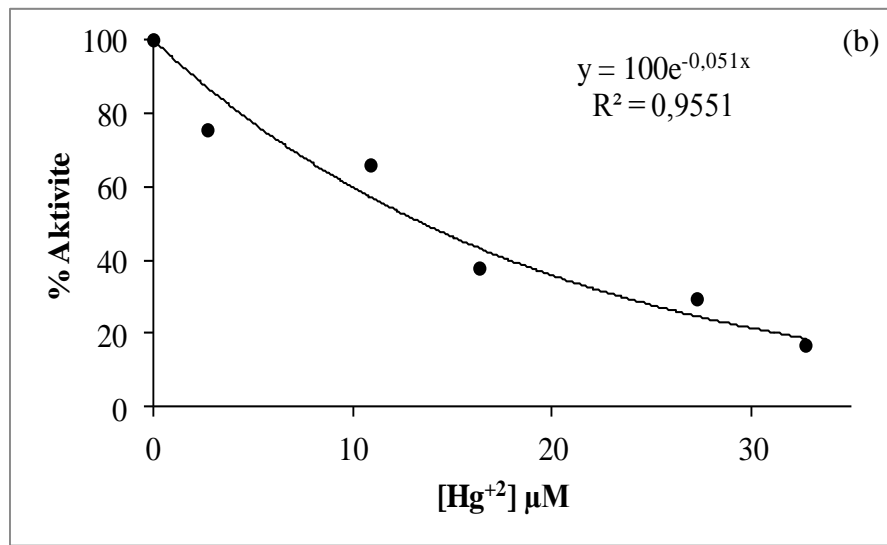
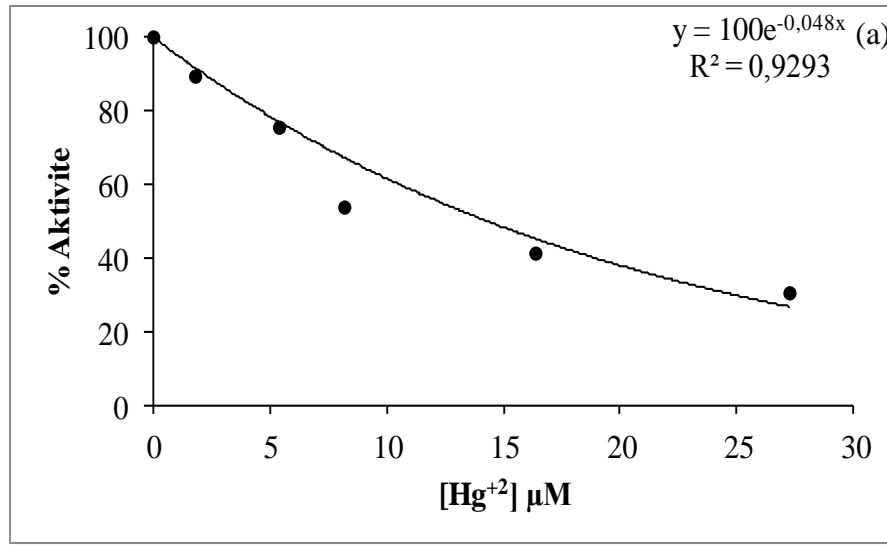
K-fosfat tamponu		Hepes Tamponu	
% Aktivite	$[Ag^+]\mu M$	% Aktivite	$[Ag^+]\mu M$
100	0	100	0
95,83	4,5	80,76	0,227
78,33	6,81	69,73	0,454
63,33	9,1	61,53	1,14
25	13,6	19,23	3,4
17,5	18,2	16,66	14,54



Şekil 4.19. Ag^+ 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.10. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Hg^{+2} 'nin etkisi

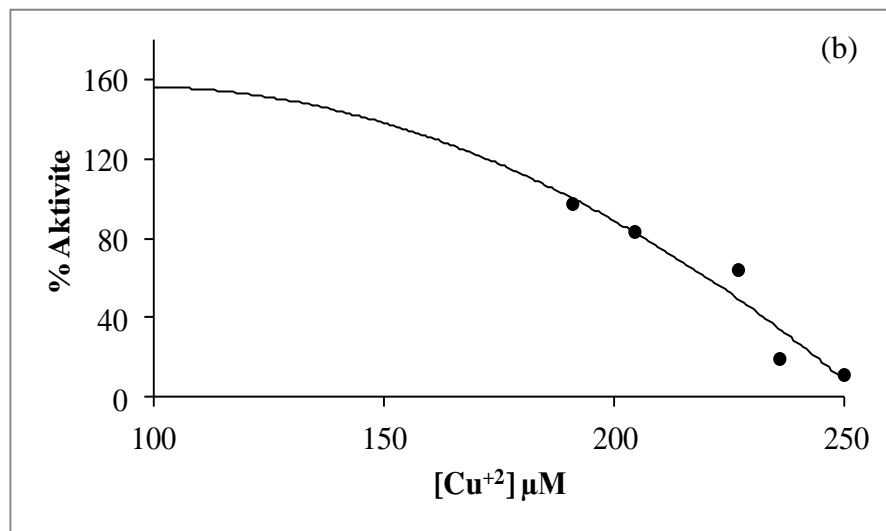
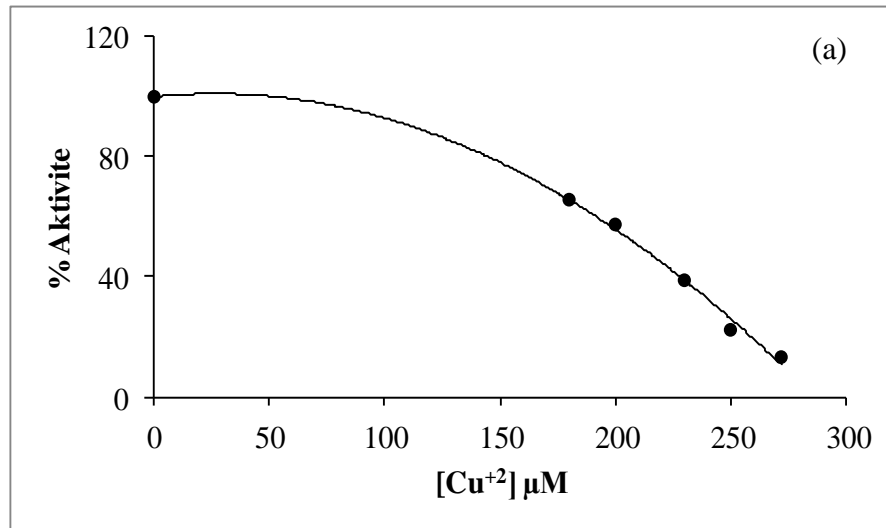
K-fosfat tamponu		Hepes tamponunda	
% Aktivite	$[\text{Hg}^{+2}] \mu\text{M}$	% Aktivite	$[\text{Hg}^{+2}] \mu\text{M}$
100	0	100	0
89,34	1,8	75,45	2,72
75,41	5,4	65,86	10,9
53,68	8,2	32,72	16,36
41,14	16,4	29,34	27,27
30,33	27,3	16,7	32,72



Şekil 4.20. Hg^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)

Çizelge 4.11. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'nin etkisi

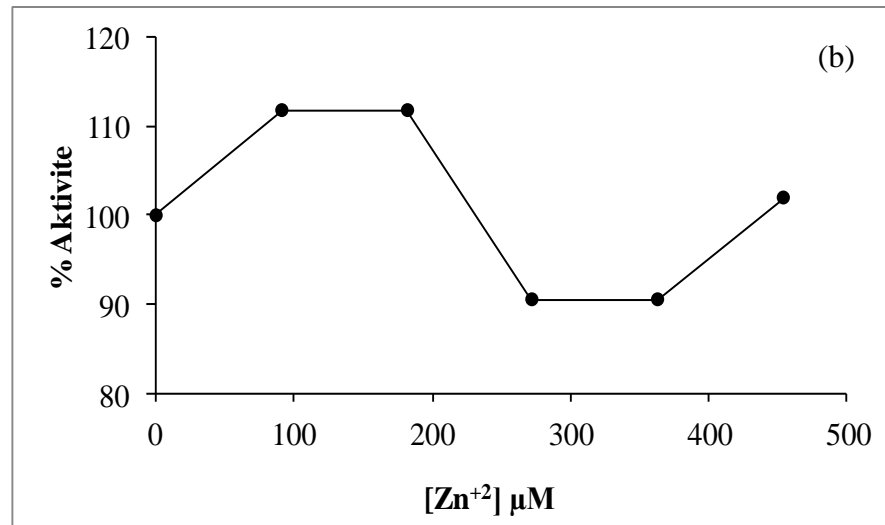
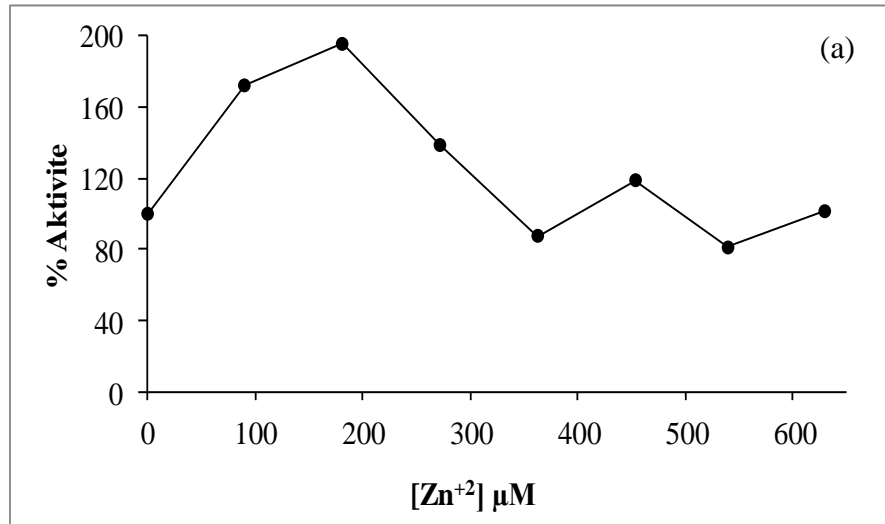
K-fosfat tamponu		Hepes tamponu	
% Aktivite	$[\text{Cu}^{+2}] \mu\text{M}$	% Aktivite	$[\text{Cu}^{+2}] \mu\text{M}$
100	0	100	0
65,7	180	97,43	191
57,44	200	83,33	204,5
38,84	230	64,1	227
22,31	250	19,23	236
13,22	272	11,15	250



Şekil 4.21. Cu^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) HEPES Tamponunda)

Çizelge 4.12. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi

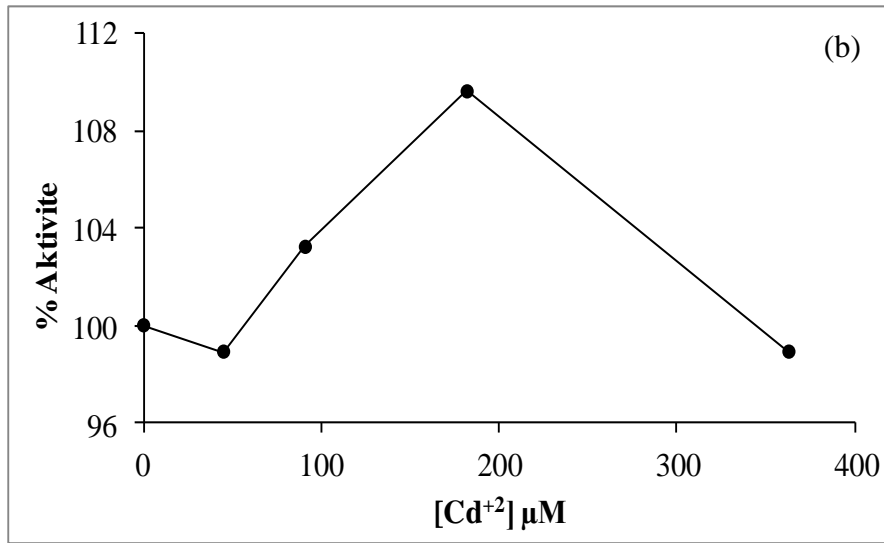
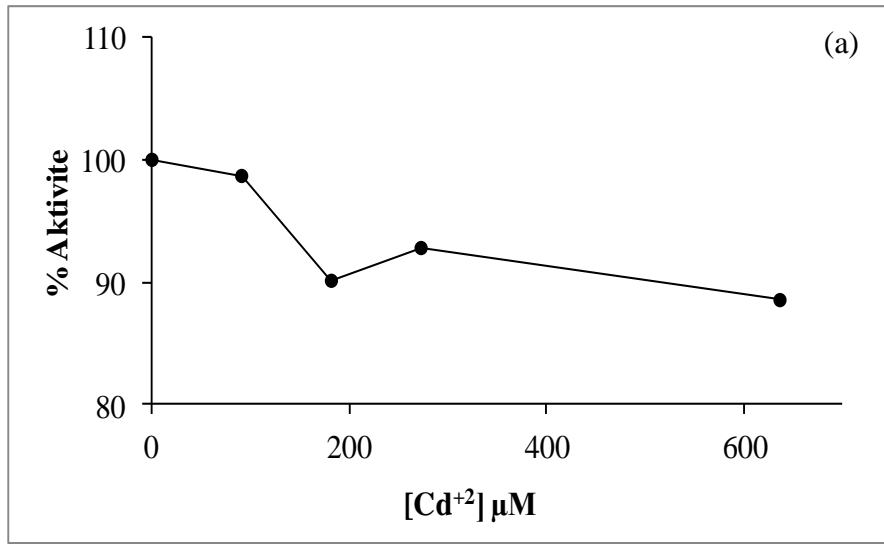
K-fosfat tamponu		Hepes Tamponu	
% Aktivite	$[Zn^{+2}] \mu M$	% Aktivite	$[Zn^{+2}] mM$
100	0	100	0
172,26	90	111,84	91
195,6	181	111,84	182
138,68	272	90,54	272
87,59	363	90,54	363
118,9	454	102	454
81,02	540	-	-
101,45	630	-	-



Şekil 4.22. Zn^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.13. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Cd^{+2} 'nin etkisi

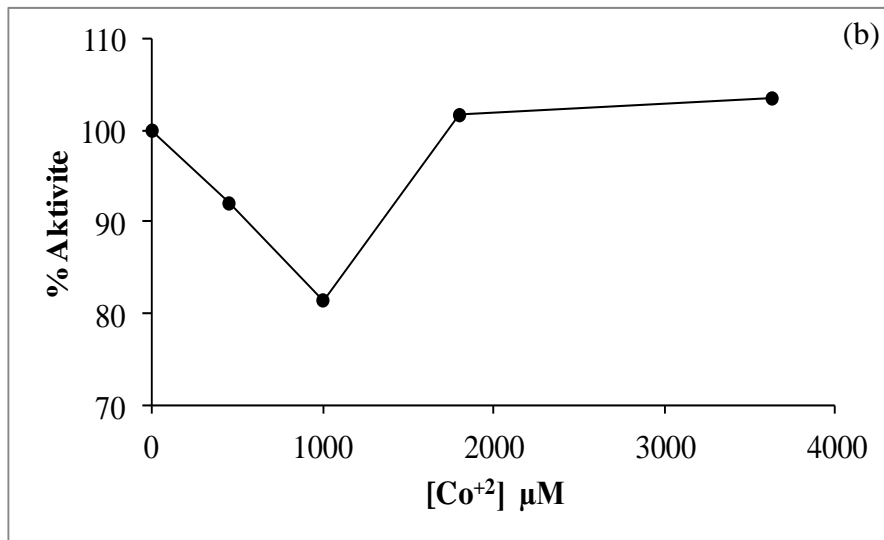
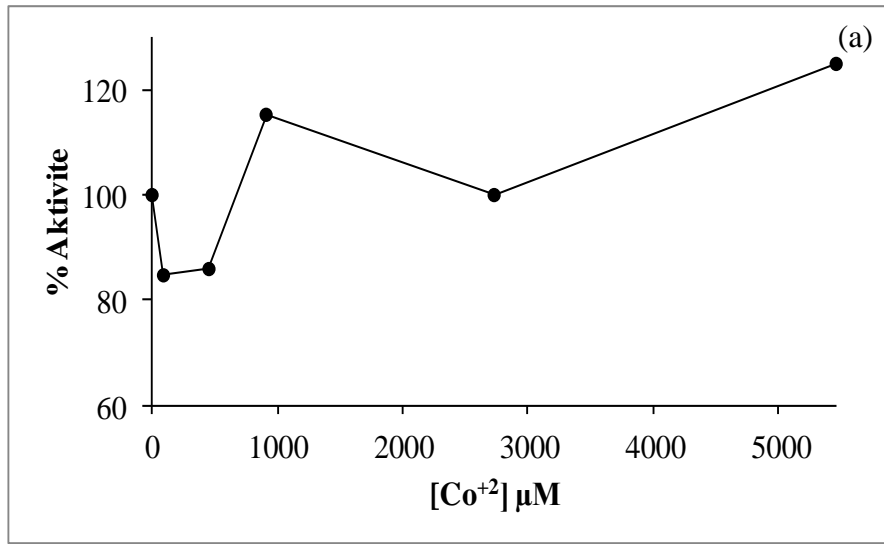
K-Fosfat Tamponunda		Hepes Tamponunda	
% Aktivite	$[Cd^{+2}] \mu M$	% Aktivite	$[Cd^{+2}] \mu M$
100	0	100	0
98,68	91	98,92	45
90,1	182	103,22	91
92,78	273	109,6	182
88,52	637	98,92	363



Şekil 4.23. Cd^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) K-Fosfat (b) Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.14. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Co^{+2} 'nin etkisi

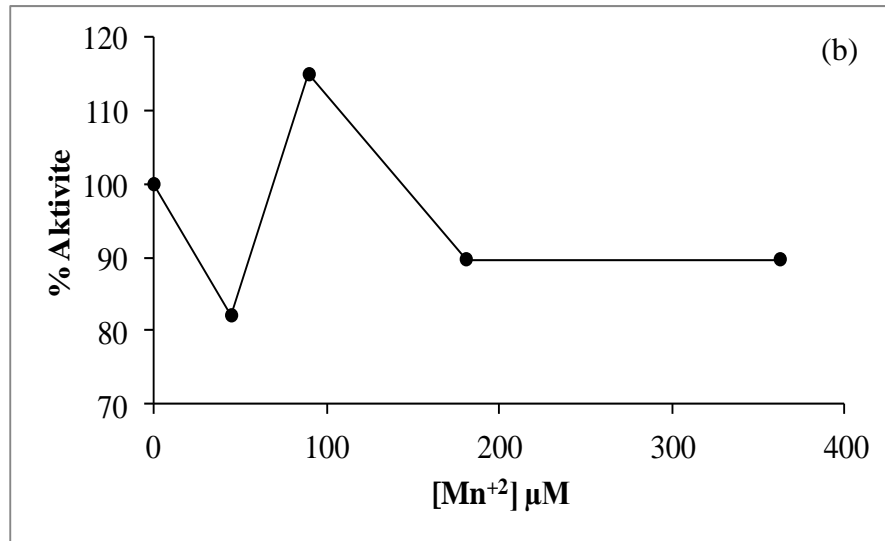
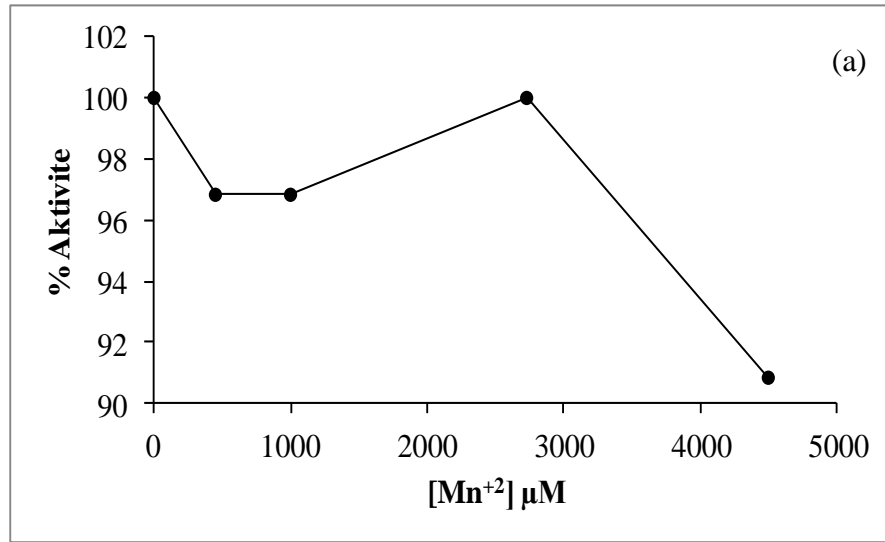
K-Fosfat Tamponunda		Hepes Tamponunda	
% Aktivite	$[\text{Co}^{+2}] \mu\text{M}$	% Aktivite	$[\text{Co}^{+2}] \mu\text{M}$
100	0	100	0
84,7	91	92,03	450
85,9	454	81,41	1000
115,3	910	101,7	1800
100	2730	103,53	3630
125	5460	-	-



Şekil 4.24. Co^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-Fosfat (b) Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.15. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

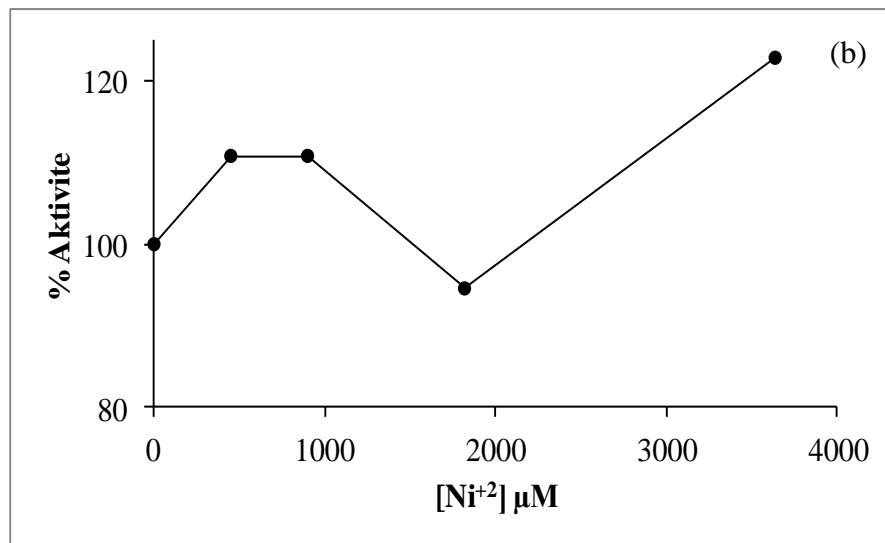
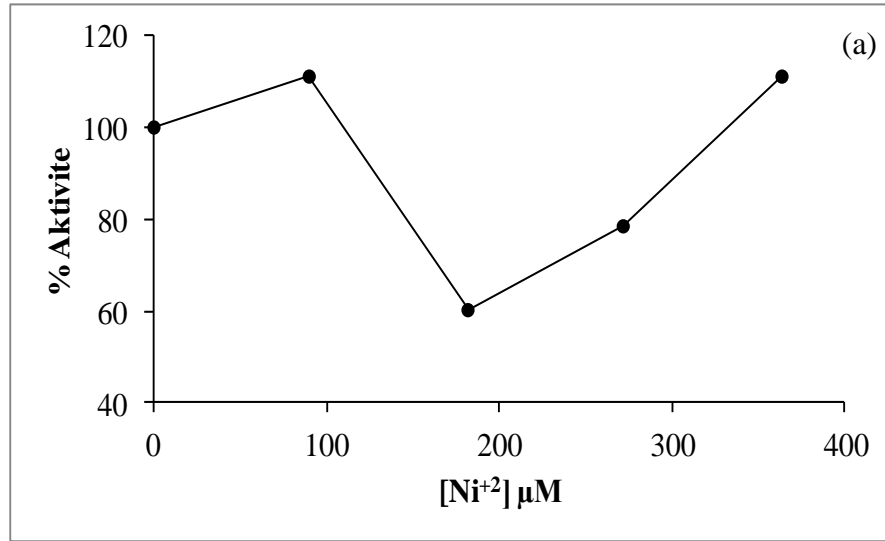
K-Fosfat Tamponunda		Hepes Tamponunda	
% Aktivite	$[Mn^{+2}] \mu M$	% Aktivite	$[Mn^{+2}] \mu M$
100	0	100	0
96,83	450	82,11	45
96,83	1000	115	90
100	2730	89,76	181
90,84	4500	89,76	363



Şekil 4.25. Mn^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-fosfat (b) Hepes Tamponu)

Çizelge 4.16. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Ni^{+2} 'nin etkisi

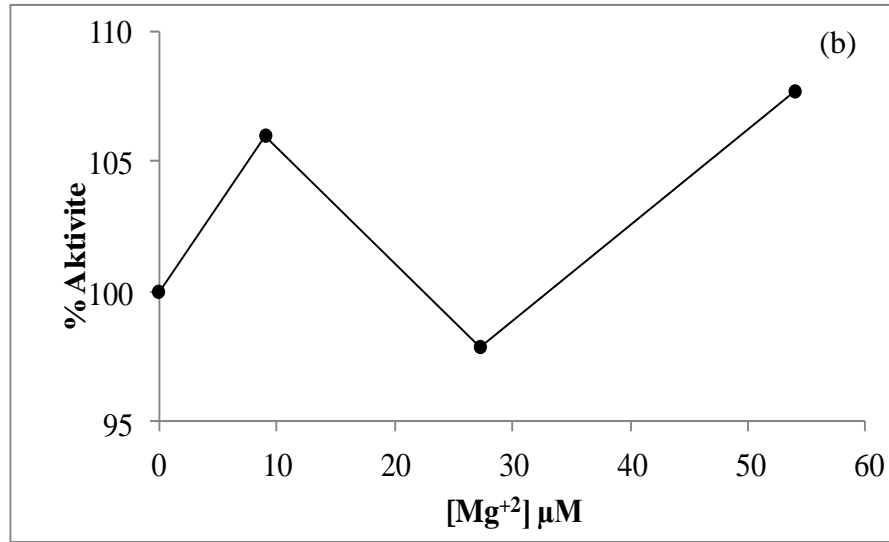
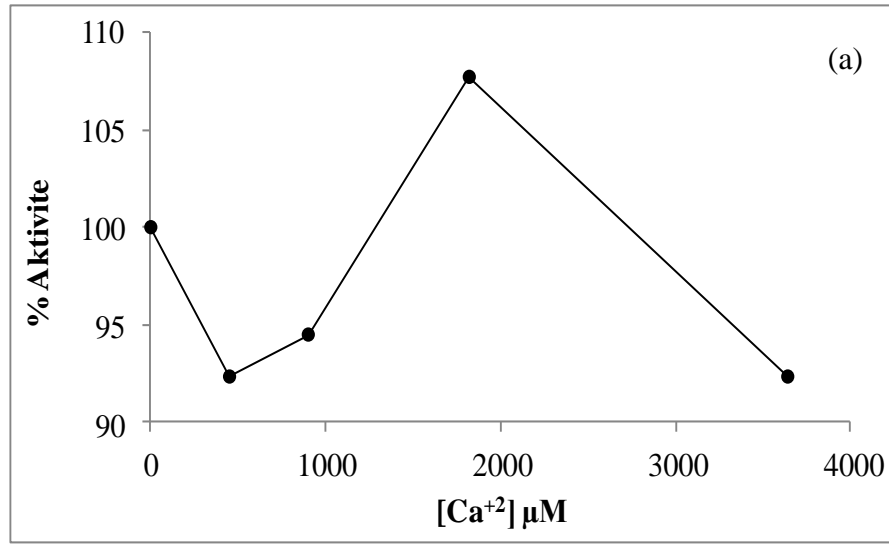
K-Fosfat Tamponunda		Hepes Tamponunda	
% Aktivite	$[\text{Ni}^{+2}] \mu\text{M}$	% Aktivite	$[\text{Ni}^{+2}] \mu\text{M}$
100	0	100	0
111,11	90	110,84	450
60,13	182	110,84	900
78,43	272	94,57	1820
111,11	364	122,89	3640



Şekil 4.26. Ni^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a)K-fosfat (b) Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.17. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine a) Ca^{+2} ve b) Mg^{+2} 'nin etkisi

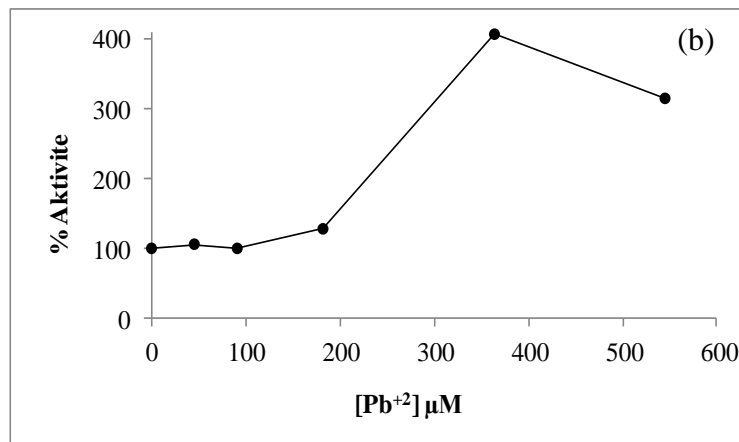
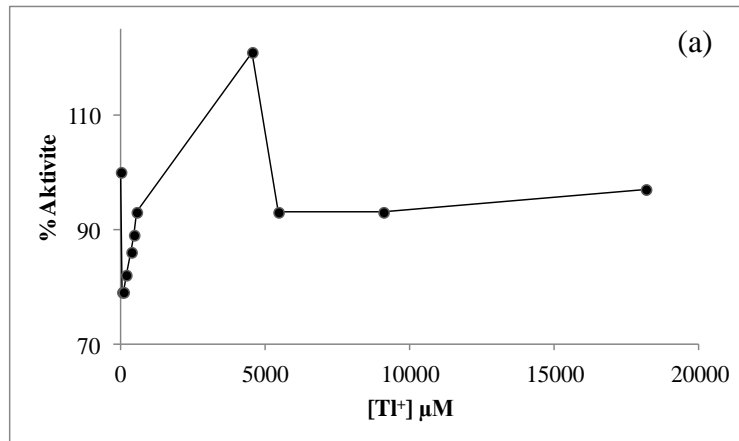
Hepes Tamponunda		K-Fosfat Tamponunda	
% Aktivite	$[\text{Ca}^{+2}] \mu\text{M}$	% Aktivite	$[\text{Mg}^{+2}] \mu\text{M}$
100	0	100	0
92,35	450	106	9,1
94,5	900	97,88	27,3
107,7	1820	107,7	54
92,35	3640	-	-



Şekil 4.27. (a) Ca^{+2} ve (b) Mg^{+2} hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi ((a) Hepes (b) K-Fosfat Tamponunda)

Çizelge 4.18. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine a) Tl^+ ve b) Pb^{+2} 'nin etkisi

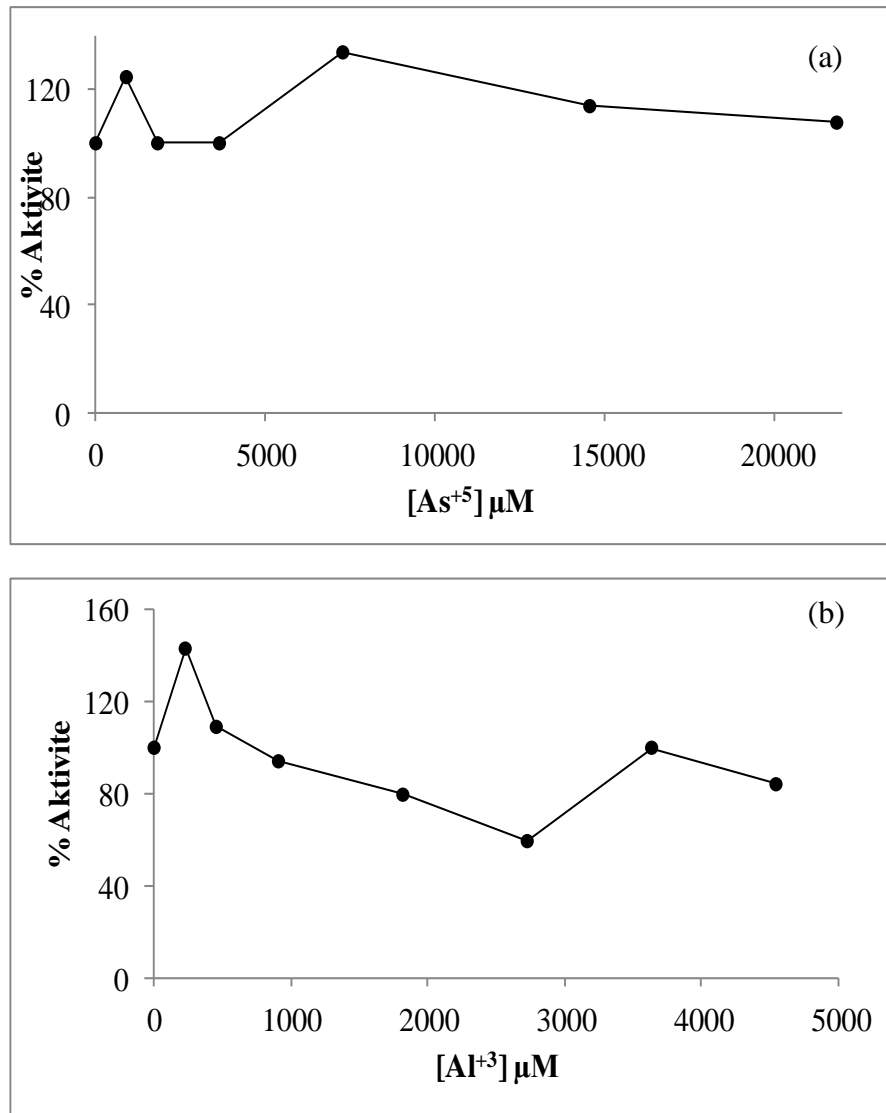
Hepes Tamponunda		Hepes Tamponunda	
% Aktivite	$[Tl^+] \mu M$	% Aktivite	$[Pb^{+2}] \mu M$
100	0	100	0
79	45,45	106	45,45
79	90,90	100	91
82	181,82	128	182
86	363,64	407	364
89	454,54	315	545,45
93	545,45		
121	4545,45		
93	5454,54		
93	9090,9		
97	18181,82		



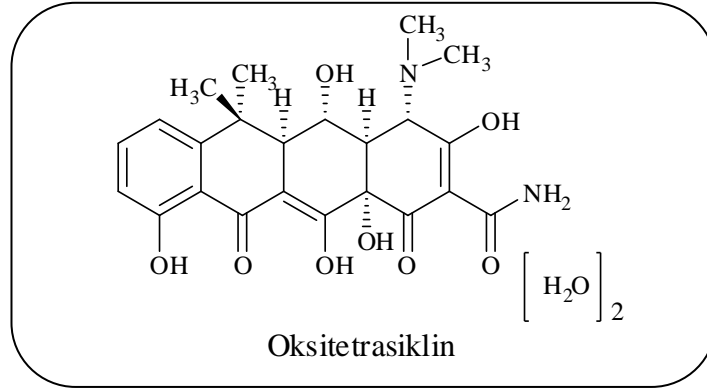
Şekil 4.28. a) Tl^+ ve b) Pb^{+2} 'nin hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

Çizelge 4.19. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine As^{+5} ve b) Al^{+3} 'ün etkisi (Hepes Tamponunda)

% Aktivite	$[As^{+5}] \mu M$	% Aktivite	$[Al^{+3}] \mu M$
100	0	100	0
124,6	900	143,2	227,3
100	1820	109,1	454,54
100	3640	94,1	909,1
133,8	7270	79,54	1818,2
113,8	14540	59,31	2727,3
107,69	21810	-	-

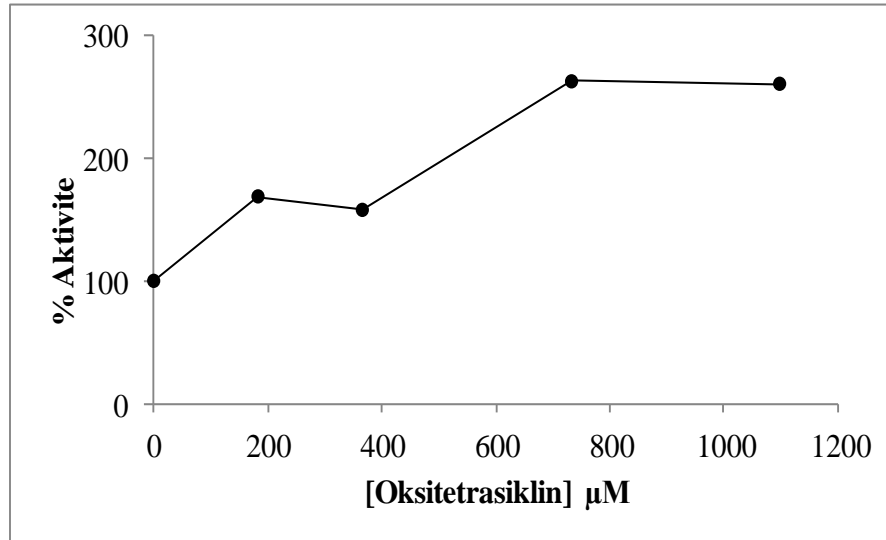


Şekil 4.29. a) As^{+5} ve b) Al^{+3} 'ün hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

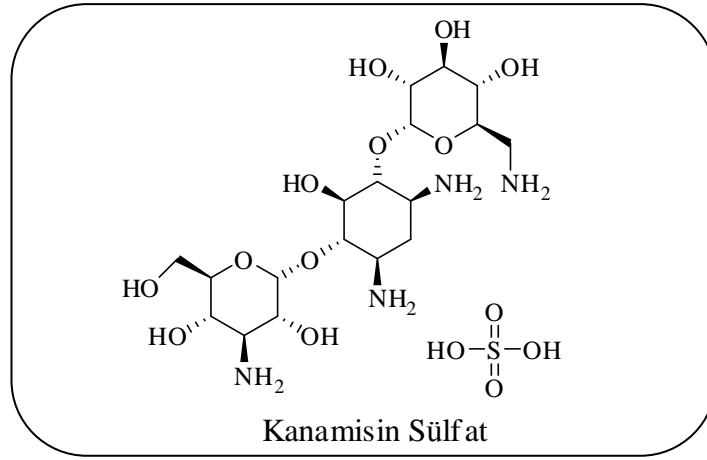


Çizelge 4.20. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Oksitetrasiklin'in etkisi

% Aktivite	[Oksitetrasiklin] μM
100	0
169	183
158	366
263	733
261	1098

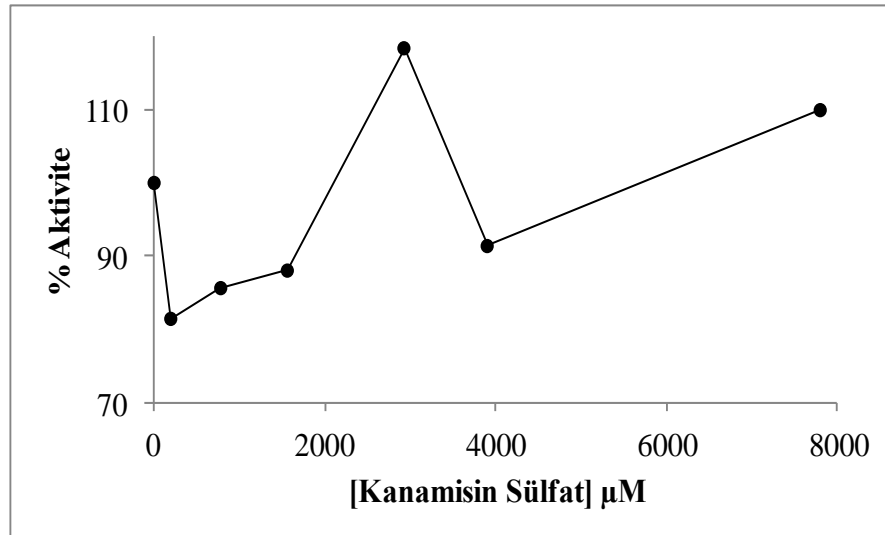


Şekil 4.30. Oksitetrasiklin'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

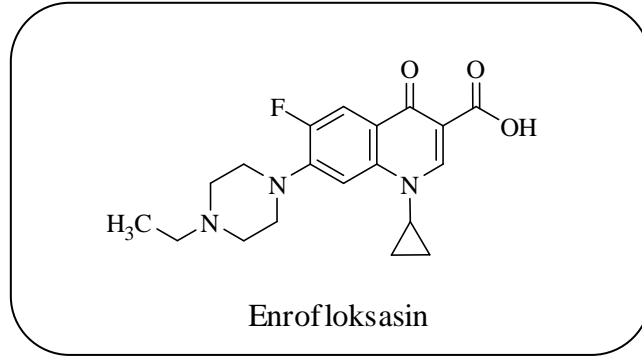


Çizelge 4.21. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Kanamisin Sulfat'ın etkisi

% Aktivite	[Kanamisin Sulfat] μM
100	0
81,39	195
85,6	780
88	1560
118,44	2925
91,36	3900
109,97	7800

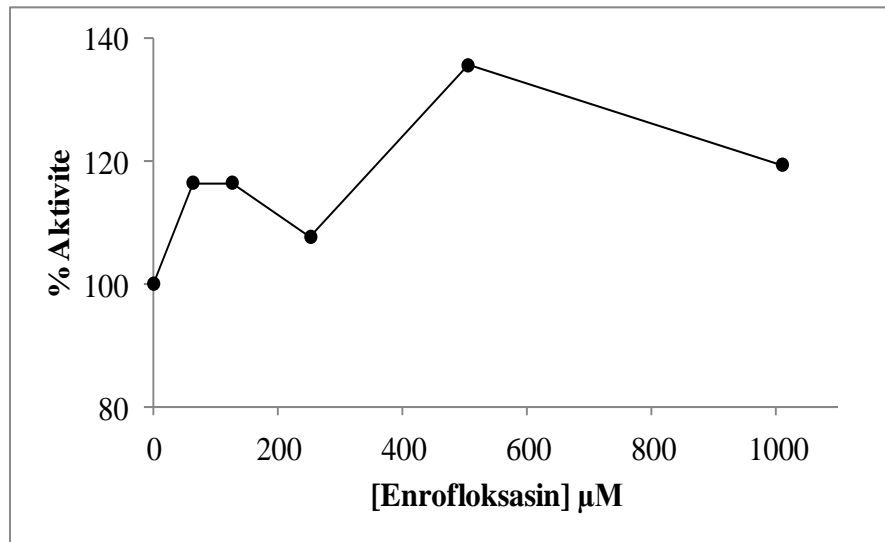


Şekil 4.31. Kanamisin Sulfat'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

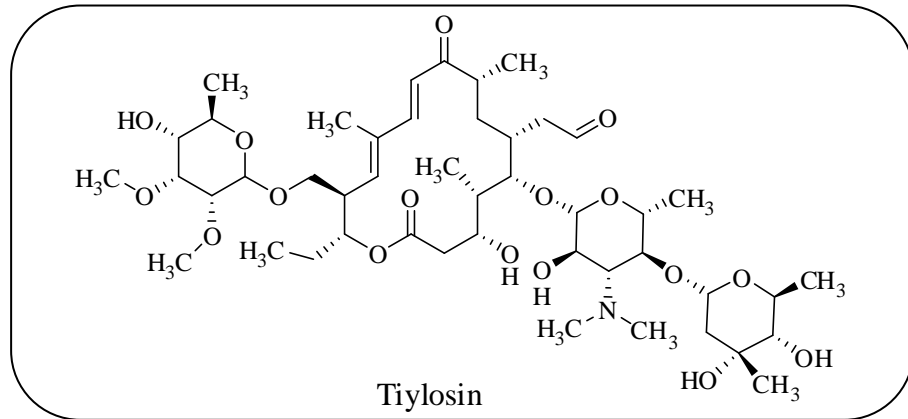


Çizelge 4.23. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Enrofloksasin'in etkisi

% Aktivite	[Enrofloksasin] μM
100	0
116,5	63,18
116,5	126,36
107,65	252,72
135,67	505,45
119,44	1011

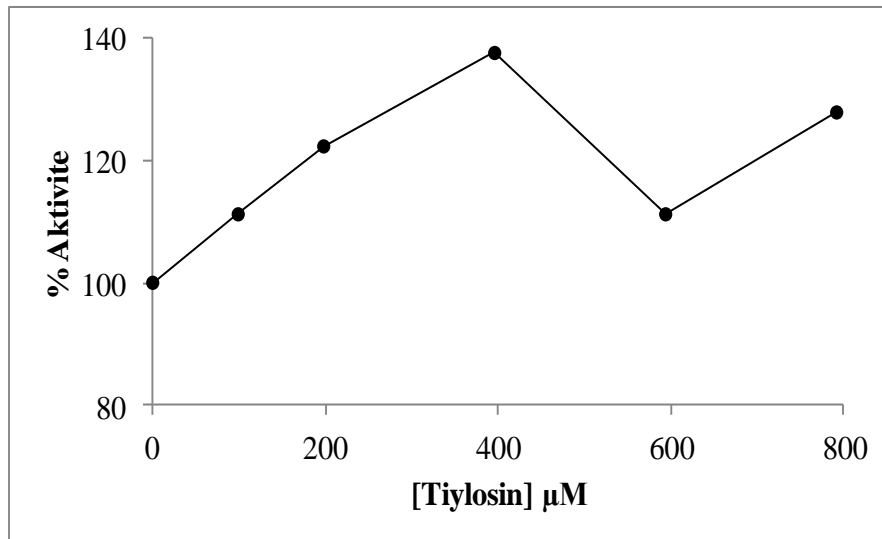


Şekil 4.33. Enrofloksasin'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

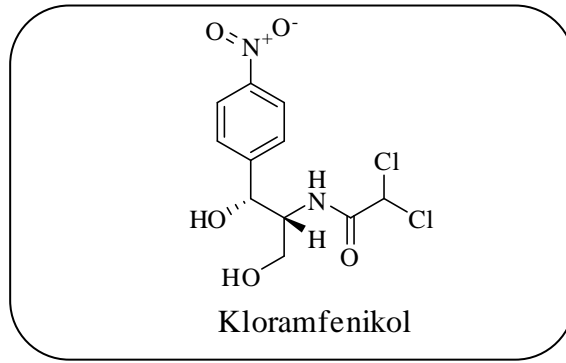


Çizelge 4.24. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Tiylosin'in etkisi

% Aktivite	[Tiylosin] μM
100	0
116,5	99,09
116,5	198,18
107,65	396,36
135,67	594,54
119,44	792,72

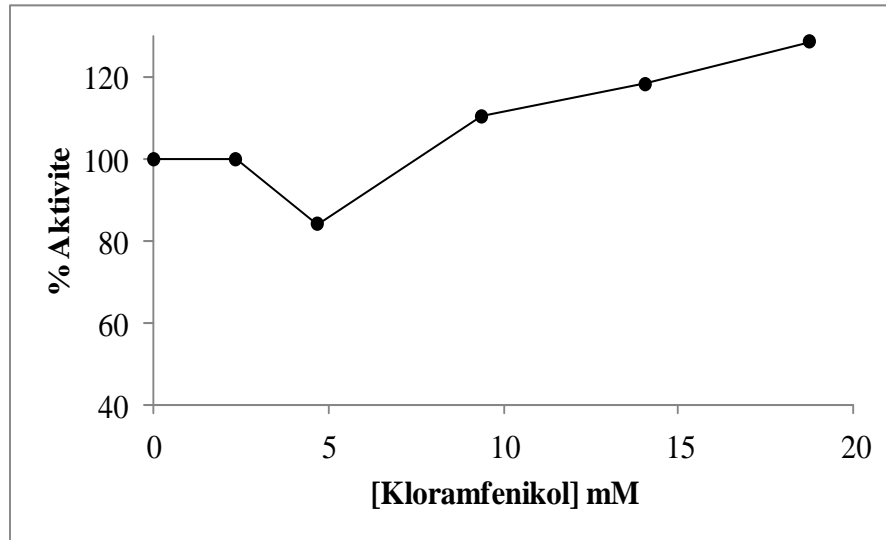


Şekil 4.34. Tiylosin'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (Hepes Tamponunda)

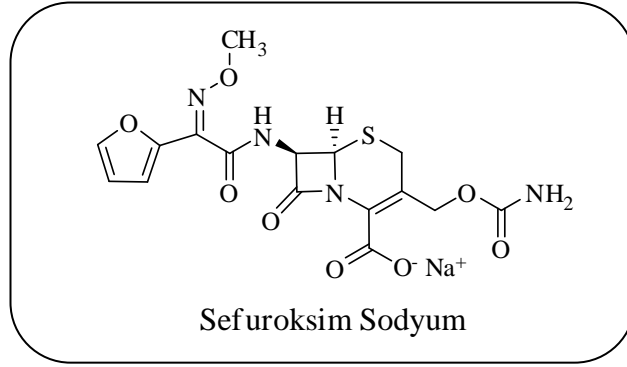


Çizelge 4.25. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Kloramfenikol'ün etkisi

% Aktivite	[Kloramfenikol] mM
100	0
100	2,34
84,21	4,68
110,5	9,378
118,4	14,06
128,9	18,756

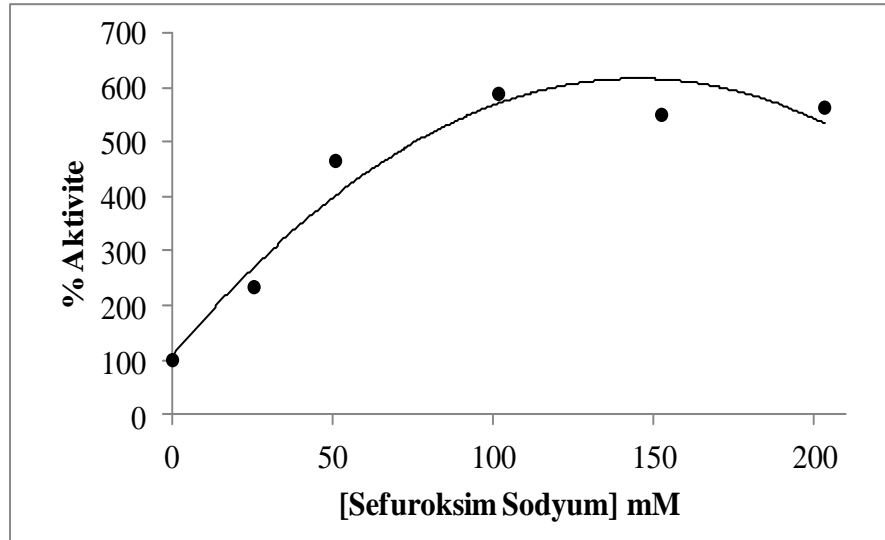


Şekil 4.35. Kloramfenikol'ün hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

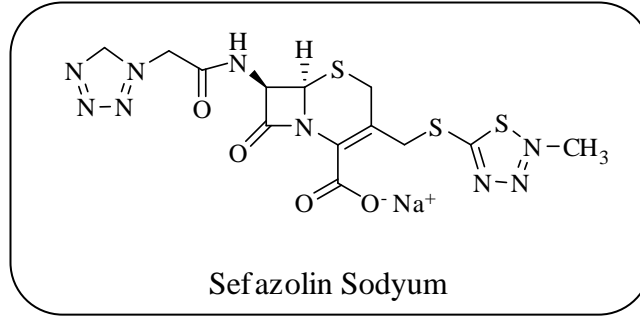


Çizelge 4.26. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi

% Aktivite	[Sefuroksim Sodyum] mM
100	0
233,7	25,46
465	50,92
587,9	101,83
549,4	152,74
562,6	203,66

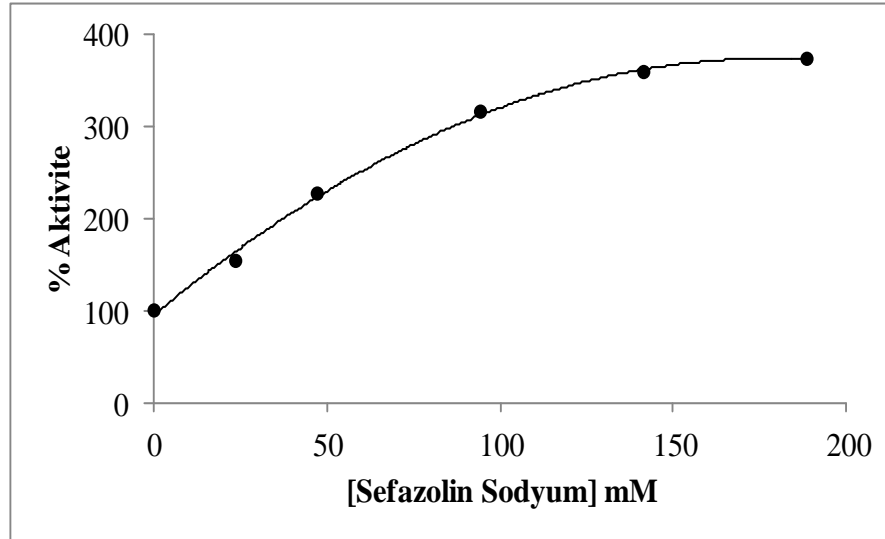


Şekil 4.36. Sefuroksim Sodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

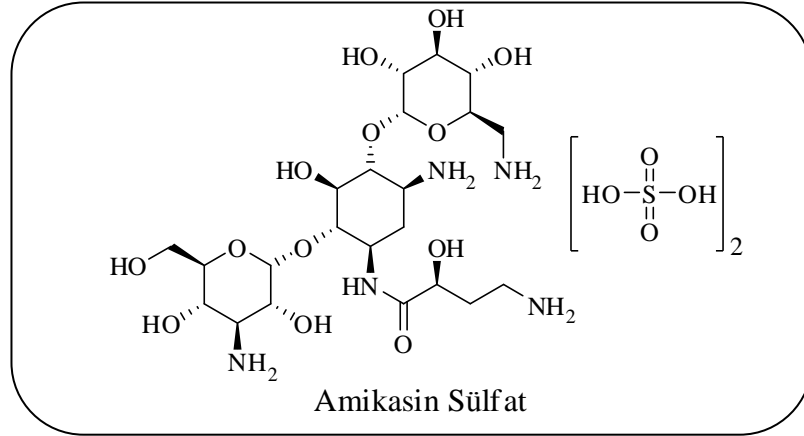


Çizelge 4.27. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Sefazolin Sodyum'un etkisi

% Aktivite	[Sefazolin Sodyum] mM
100	0
154	23,6
227,33	47,2
316,54	94,4
359,7	141,6
374,1	519,2

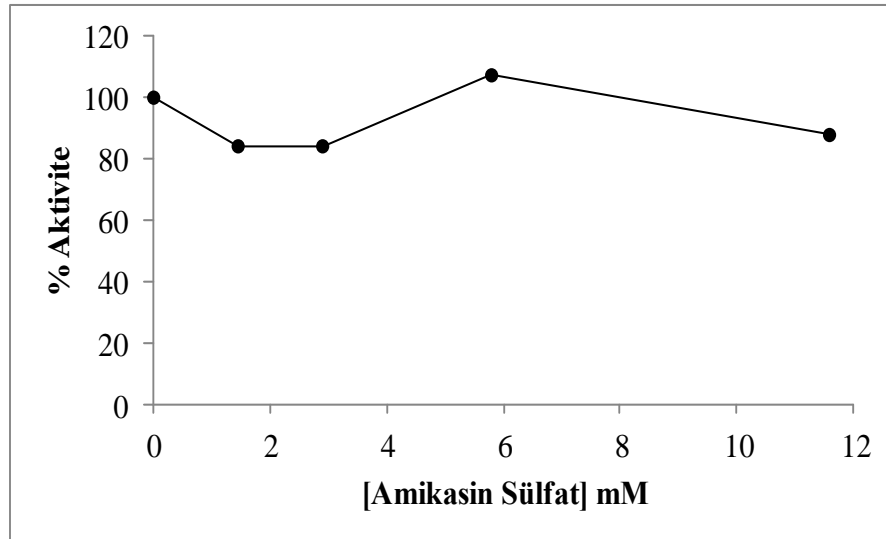


Şekil 4.37. Sefazolin Sodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

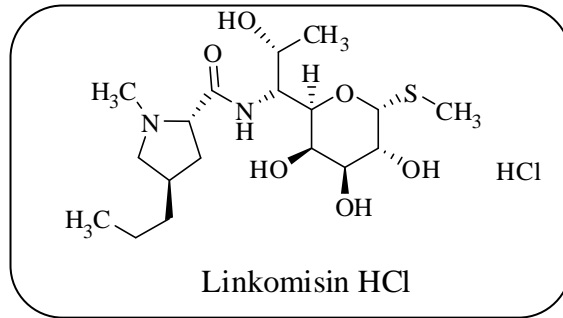


Çizelge 4.28. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi

% Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
84,1	14,5
84,1	29
107,3	58
87,80	116

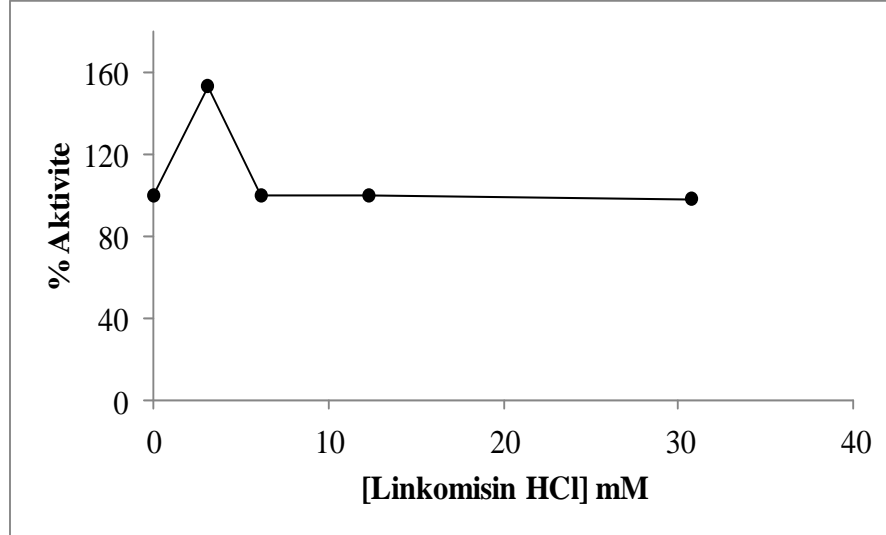


Şekil 4.38. Amikasin Sülfat'ın hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

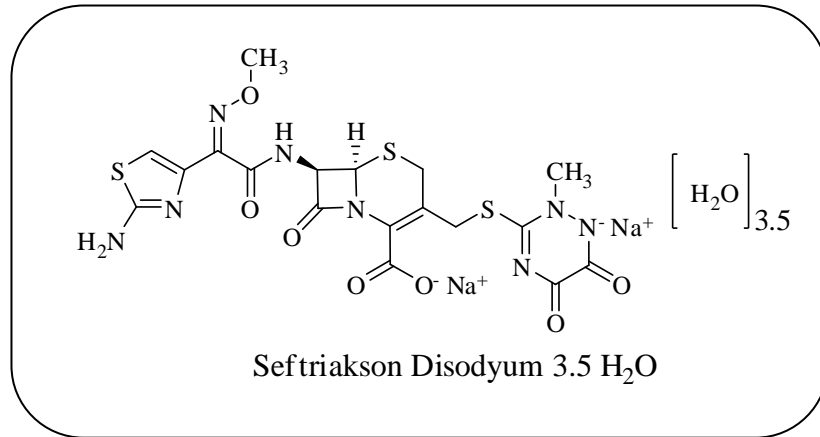


Çizelge 4.29. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Linkomisin HCl'in etkisi

% Aktivite	[Linkomisin HCl] mM
100	0
153,65	3,077
100	6,155
100	12,312
98,41	30,77

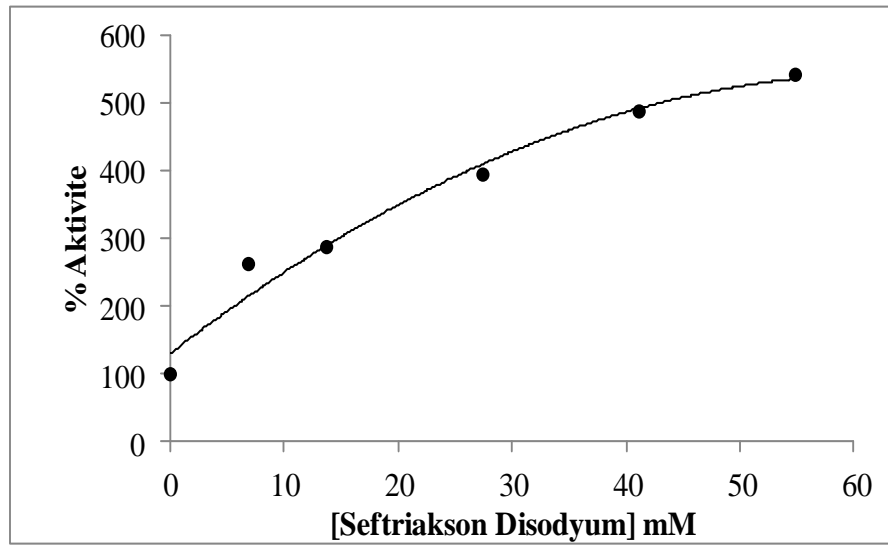


Şekil 4.39. Linkomisin HCl'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

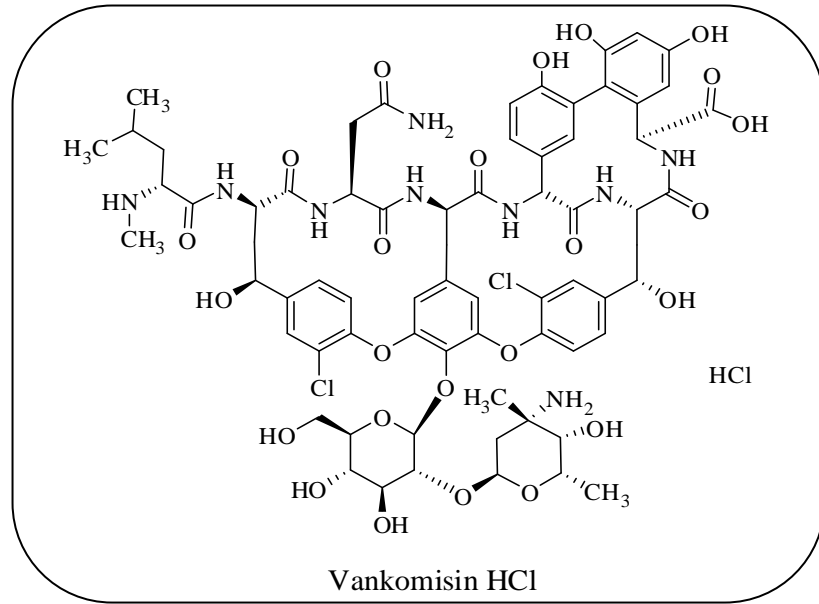


Çizelge 4.30. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Seftriakson Disodyum'un etkisi

% Aktivite	[Seftriakson Disodyum] mM
100	0
262,5	6,86
287,5	13,72
394,4	27,44
487,5	41,16
541,6	54,88

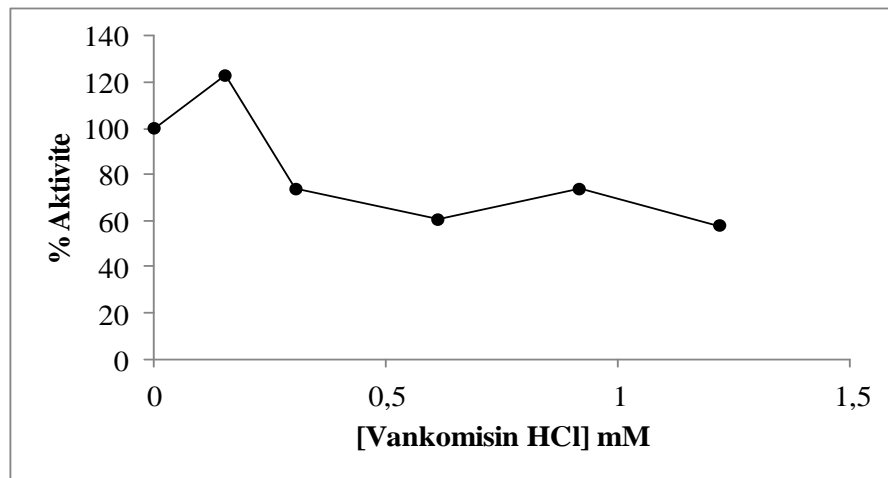


Şekil 4.40. Seftriakson Disodyum'un hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

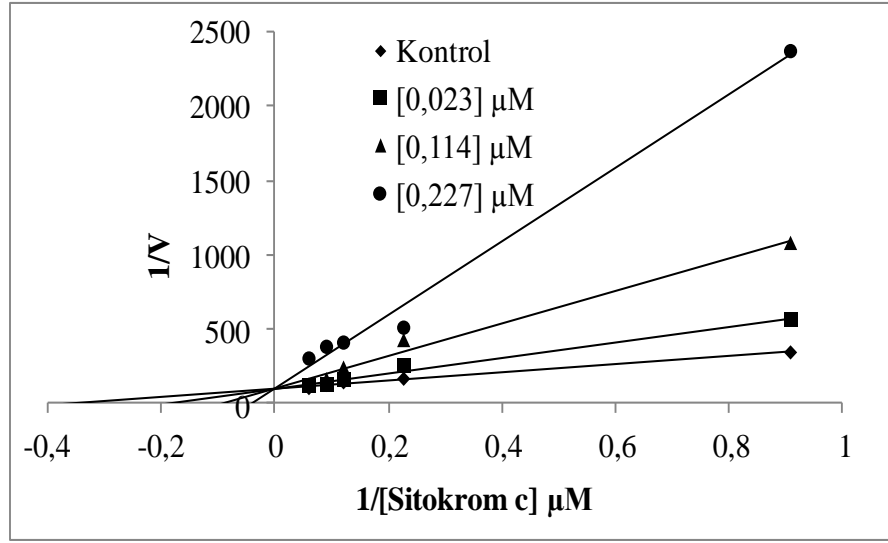


Çizelge 4.31. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Vankomisin HCl'in etkisi

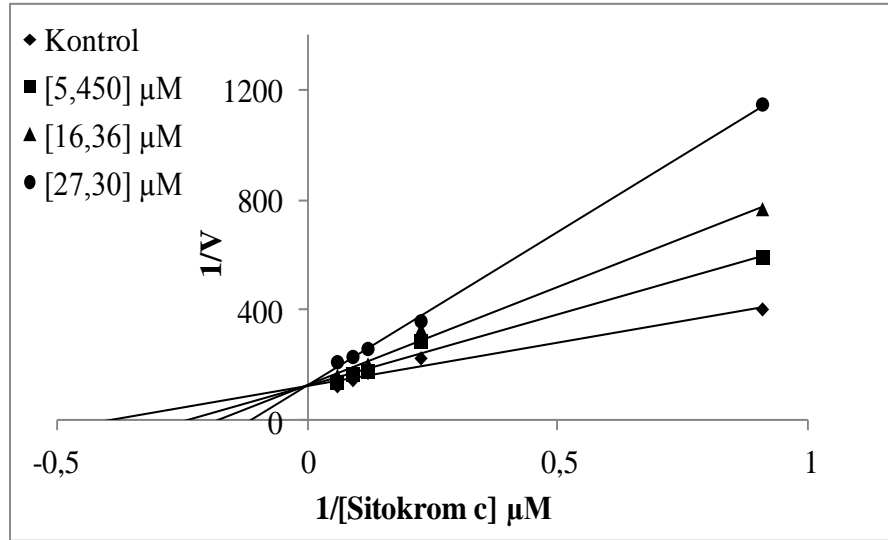
% Aktivite	[Vankomisin HCl] mM
100	0
122,89	0,153
73,61	0,306
60,36	0,612
73,61	0,917
57,83	1,220



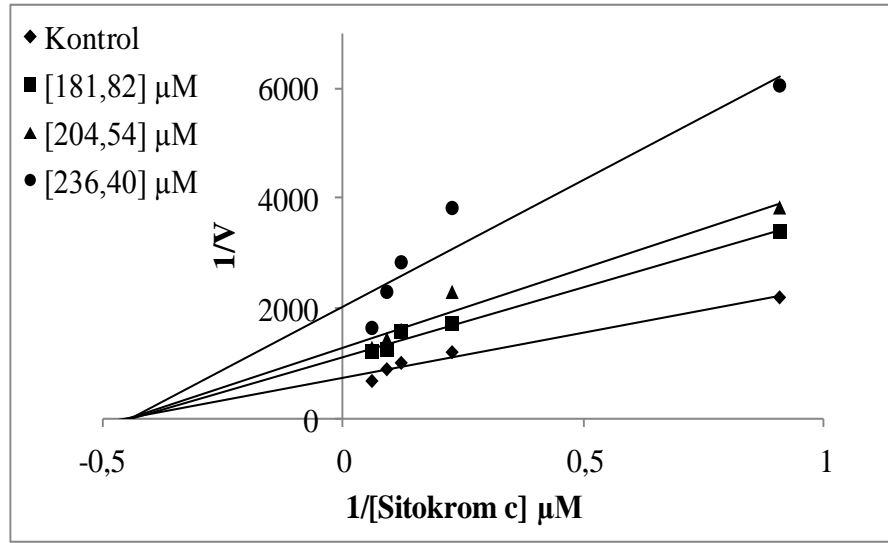
Şekil 4.41. Vankomisin HCl'in hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.42. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit $[Ag^+]$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.43. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit $[Hg^{+2}]$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.44. Hindi karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için 3 sabit $[Cu^{+2}]$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.32. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metallerin IC_{50} değerleri (K-Fosfat Tamponu)

Metaller	Ag^+	Hg^{+2}	Cu^{+2}
IC_{50}	8,11 μM	14,24 μM	211 μM

Çizelge 4.33. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metallerin IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve İnhibisyon Tipleri (Hepes Tamponu)

İnhibitör	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	K_i Ort (μM)	İnhibisyon Tipi
Ag^+	1,60	0,024	0,029±0,0067	Yarışmalı
		0,037		
		0,028		
Hg^{+2}	13,52	8,059	10,37±2,2435	Yarışmalı
		12,54		
		10,50		
Cu^{+2}	227	345,9	251±108,6247	Yarışmasız
		274,4		
		132,5		

5. TARIŞMA ve SONUÇ

NADPH-sitokrom P450 redüktaz (E.C 1.6.2.4, (CPR)) hem FAD hem de FMN flovo proteinlerini içeren dört memeli enziminden biridir (Porter and Kasper 1986). CPR ökaryotik hücrelerin birçoğundaki endoplazmik retikulum üzerinde bulunan birkaç enzim için elektron verici bir proteindir. Enzim NADPH'tan sitokrom P450 türlerine elektrom transferinden sorumludur. Monooksijenaz sisteminin vazgeçilmez bir parçası olan CPR terapötik olarak çok önemli antitümör ilaçları, antibiyotikler, aromatik nitro bileşikler, böcek öldürücüler ve diğer çevre kirleticilerini içeren çeşitli kimyasalların indirgenme reaksiyonlarını katalizleme fonksiyonu da vardır (Aoi *et al.*1981; Kappus 1986; Sinha 1989).

Yukarıda belirtilen nedenlerin doğrultusunda CPR biyokimyasal çalışmalarda özellikle tercih edilen bir enzimi olmuştur. Bugüne kadar çeşitli dokulardan enzimin amino asit sekans analizi yapılmış, enzimin yapısı aydınlatılmaya çalışılmış ayrıca enzim saflaştırılarak karakterize edilmeye çalışılmıştır.

Wang *et al.* (1997) göre parçalanmış sıçan karaciğer CPR'ın kristal yapısı FMN bağlama bölgesi, iletişim bölgesi, FAD bağlama bölgesi ve NADPH bağlama bölgesi olmak üzere dört yapısal domain (N terminalden C terminale kadar) içermektedir. CPR'ın komple amino asit sekans analizi sıçan karaciğeri (Porter and Kasper 1985), insan karaciğeri (Haniu *et al.* 1989; Yamano *et al.* 1989) domuz karaciğeri (Haniu *et al.* 1986; Vogel and Lumper 1986), tavşan karaciğeri (Katagiri *et al.* 1986) ve alabalık karaciğeri (Urenjak *et al.* 1987) için belirlenmiştir. Sıçan karaciğer CPR, alabalık CPR ile %79 luk bir homoloji gösterirken diğer memeli dokuları ile %90'lık bir homoloji göstermektedir bunun yanı sıra maya ve bakteri redüktazlar ile %33 ten az bir homolji gösterdiği belirtilmiştir (Shen and Kasper 1993). Afrika kurbağası CPR'ın amino asit sekans homolojisi insanla %80, sıçanla %78 ve tavşanla %81 oranında olduğu belirtilmiştir (Mori *et al.* 2006). Görüldüğü gibi maya ve bakteri redüktazlar hariç diğer türlerle CPR enziminin an az %80'lik bir homoloji göstermektedir. Bunun neticesinde

de hindi karaciğer CPR'ın karakteristik özelliklerinin belirlenmesi yeni araştırmacılara çalışmalarını yönlendirmeleri açısından büyük bir avantaj sağlayacaktır.

Memeli NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi (aynı zamanda NADPH bağlı sitokrom c redüktaz olarak da adlandırılır) ilk olarak Horecker tarafından 1950 yılında domuz karaciğerlerinin tripsin ve aseton tozu ile işleme tabi tutulması sonucunda yüksek saflıkta izole edilmiştir (Horecker 1950). Yapılan ilk çalışmalarda enzimin karaciğer mitokondrilerinde lokalize olduğu düşünülürken (Phillips and Logdon 1962) daha sonra lipaz ve tripsin tarafından membrana bağlı redüktazın çözündürülmesiyle karaciğer mikrozomlarında bulunduğu belirtilmiştir. Hidrofobik özellikleri yüzünden membrana bağlı proteinlerin saflaştırılması sitozolik proteinlerin aksine çok daha zordur. Bu nedenle ilk saflaştırma yöntemleri, çalışmalar sırasında deterjanın kullanılmasıyla gelişmiştir. Amfipatik yapısı nedeniyle hem deterjan hem de hidrolitik enzimlerin etkisi ile saflaştırılan CPR, iyonik ve noniyonik deterjanların beraber kullanılması ile birlikte multi (5 ve üstü) kromatografik yöntemlerle saflaştırılmaya çalışılmıştır (Iyanagi and Mason 1973).

Deterjanla çözündürülen redüktazın saflaştırma prosedürün de afinite kromatografisinin kullanılmaya başlaması ile bir önemli adım daha atılmıştır. CPR'ın saflaştırılması için kullanılan afinite kolonunda ligand olarak 2', 5'-ADP (Yasukochi and Masters 1976) ve NADP⁺ (Dignam and Strobel 1977) kullanılmıştır. Afinite kromatografisi yönteminin yaygın olarak kullanılması ile CPR enzimi çeşitli memeli dokularından ve memeli olmayan türlerden saflaştırılmıştır.

Örneğin tavşan karaciğeri (Iyanagi and Mason 1973; French and Coon 1979), sıçan karaciğeri (Vermilion and Coon 1974; Dignam and Strobel 1977), domuz karaciğeri (Yasukochi and Masters 1976), tavşan akciğeri (Serabjit-Singh *et al.* 1979), ev sineği (Mayer and Durrant 1979), insan karaciğeri (kısmi saflaştırma) (Kamataki *et al.* 1979), sınırit balığı karaciğeri (Klotz *et al.* 1983), kobay faresi karaciğeri (Kobayashi and Rikans 1984), koyun karaciğeri ve akciğeri (Iscan and Arinc 1986; 1988), sığır karaciğeri (Arinc and Çelik 2002), gökkuşacağı alabalığı karaciğeri (Williams *et al.* 1983)

ve sıçrayan kefal balığı karaciğeri (Sen and Arinc 1998) mikrozomlarından saflaştırılan sitokrom P450 redüktazın fonksiyonel ve yapısal özellikleri detayları ile tespit edilmiş ve bazı kinetik yapısal ve fonksiyonel farklılıkları belirlenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarıda CPR enziminin hindi karaciğerinden saflaştırılması ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada hindi karaciğer CPR enziminin farklı kromatografik metotlar denenerek saflaştırılması, saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotik ve metal iyonlarının *in vitro* etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında CPR enziminin hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması için iki farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntemde hindi karaciğer dokusundan elde edilen mikrozomal pelet emulgen kullanılarak çözündürülüp 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Enzim kolondan 2' AMP'nin (0,5-2,5 mM) gradienti uygulanarak tek kademede elüe edildi (Şekil 4.2) Bu yöntem neticesinde enzim %23,43 verimle 114,15 kat saflaştırıldı. İkinci yöntemde ise hazırlanan homojenat (deterjanla çözündürülmüş mikrozomal çözelti) DE52-anyon değişim kolonuna yüklendi. Kolona 50 mM-300 mM arası KCl içeren Tampon A gradienti uygulandı. 150 mM KCl içeren Tampon A ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz keskin bir şekilde elüe edildi (Şekil 4.3). DE52-selüloz sonrası elde ettiğimiz fraksiyonlar 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Tampon A'nın içine 0,5-2,5 mM 2'-AMP ilave edilerek gradientli elüsyon yapıldı (Şekil 4.4) Böylece enzim üç aşamada %8 verimle 124 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1).

Yapmış olduğumuz çalışma sırasında CPR'ın saflaştırma prosedürleri aşamalarında protein miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen Lowry yöntemi kullanıldı. Yöntemin esası fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu^{+2} arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino

asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleks 600-800 nm aralığında absorpsiyon piki verir. Bu yöntemin hassasiyeti 30-150 µg/ml civarındadır. Lowry yöntemi, hassasiyetinin iyi olması ve kolaylığı açısından protein biyokimyası işlemlerinde çok fazla kullanılır. Lowry yöntemine birçok bozucu faktör mevcuttur ancak bu etkilerin önlenmesi için, yöntemin her bir faktör etkisi için farklı modifikasyonları bulunmaktadır (Şekil 4.1).

CPR enzimi hemstir karaciğerinden iki farklı yöntem kullanarak saflaştırmıştır. İlkinde deterjan ekstraksiyonu ve 2', 5'-ADP agaroz afinite kromatografisi kullanılarak hızlı ve basit bir yöntemle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan CPR enzimi sitokrom c elektron akseptörü olarak kullanıldığı zaman 26,400 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu yöntem ile CPR enzimi %58 verimle 59,5 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE de yapıldığında 76 kDa civarlarında tek bant elde edildiği belirtilmiştir. Aynı grup ikinci metotta ise mikrozomları Triton N101 uygulamasına tabi tutmuş ardından uygun prosedür ve santrifüj yöntemleri kullanılarak elde edilen CPR ekstraktını direkt olarak DEAE-Sephadex A-25 kolonuna tatbik etmişlerdir. 80-400 mM KCl gradientinin ardından elde edilen elüat 2', 5'-ADP agaroz afinite kromatografisine yüklenmiş bu işlem sonucunda enzim %63 verimle 58,7 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesinin 26,700 EÜ/mg olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Ardies *et al.* 1987). Her iki çalışmada CPR enziminin saflaştırılmasında benzer yöntemler tercih edilmiştir. Ancak mikrozomların çözündürülmesi aşamasında farklı deterjanlardan yararlanılmıştır. Hemstir karaciğer CPR kullanılan her iki yöntemde de yüksek bir verimle elde edilirken saflaştırma katsayısı hindi karaciğer CPR'la kıyaslandığında oldukça düşüktür.

CPR enziminin sıçrayan kefal (İlanya) balığı karaciğer mikrozomlarına emülgen 913 ve kolat deterjanlarının uygulaması ile çözündürüldüğü ve daha sonra elde edilen örneğin sırasıyla DEAE-selüloz 1, DEAE-selüloz 2, 2', 5'-ADP-Sepharoz 4B ve Hidroksilapatit kromatografik yöntemlerine tabi tutularak %17,5 verimle 438 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Sen and Arınç 1998). Yapılan çalışmada multikromatografik yöntemler kullanılarak CPR enzimi saflaştırılmıştır. Hindi karaciğer dokusundan CPR enziminin

saflaştırılması sırasında ise elde edilen mikrozomal pelet deterjan ile çözündürülerek 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Bu yöntem neticesinde enzim %23,43 verimle 114,15 kat saflaştırıldı. Tek kromatografik yöntemin kullanılması araştırmacıya hem zaman hem de ihtiyacı olan pratikliği kazandıracaktır. Peş peşe çeşitli kromatografik yöntemlerin kullanılması saflaştırma sürecini uzatacaktır bunun neticesinde de stabil olamayan yapısıyla CPR aktivitesini kaybedecektir.

CPR enzimi afrika kurbağasından DE-52, 2', 5'-ADP-Sepharoz 4B ve DEAE-SPW (HPLC) kromatografik teknikleri kullanılarak saflaştırıldığı belirtilmiştir. Saflaştırılan CPR'ın elektron transfer aktivitesi substrat olarak sitokrom c kullanıldığında 23,8 Ü/min/mg olarak belirlendiği ifade edilmiştir (Mori *et al.* 2006). CPR enziminin afrika kurbağasından saflaştırılması sırasında iyon değişim kolonunu ve 2', 5'-ADP-Sepharoz 4B afinite kolonuna ek olarak HPLC kullanılmıştır. Bu da spesifik aktivitenin hindi karaciğer CPR'a göre daha yüksek çıkmasına neden olmuştur.

CPR sığır karaciğer mikrozomlarından elektroforetik homojeniti yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma prosedürü mikrozomların deterjanla çözündürülmesinin ardından peş peşe iki tane DEAE selüloz anyon değişim kolonuna uygulanmasını ve anyon değişimden alınan fraksiyonların son olarak 2', 5'-ADP sepharoz 4B afinite kolonuna uygulanmasını içermektedir. Daha sonra enzimin konsantre hale getirilmesi, 2' AMP ve Emulgen 913'ün ortamdan uzaklaştırılması için afinite sonucu elde edilen enzim çözeltisi hidroksiapatite kolon kromatografisine tatbik edilmiştir. Enzim bu prosedür vasıtası ile 239 kat %13,5 verimle saflaştırılmıştır (Çelik 2002). Her iki çalışmadaki sonuçlar karşılaştırıldığında CPR enzimi hindi karaciğer mikrozomlarından tek kromatografik yöntem kullanılarak saflaştırıldığında daha iyi bir verim ve benzer bir saflaştırma katsayısı ile elde edilmiştir.

CPR deterjanla çözündürülen sıçan ve domuz karaciğer mikrozomlarından 2', 5'-ADP sepharoz 4B afinite kromatografisi ortak olmak üzere sırasıyla üç ve dört kromatografik adımla saflaştırılmıştır. Mikrozomlardan saflaştırılan enzim %30 verimden daha büyük bir sonuç ile elde edilmiştir. Her iki enzimin afiniteden saflaştırılması sırasında 0-5 mM

2' AMP gradienti uygulanmıştır. İki enzimde farklı konsantrasyonlarda elüe edilmiştir. Ayrıca NADH'ın da enzim elüsyonu sırasında etkisiz olduğu ayrıca 5' AMP sıçan karaciğer CPR enzimde kısmen etkili olurken domuz karaciğer CPR da etkili olmadığı belirtilmiş bunun sonucunda enzimlerin afiniteye biospesifik olarak tutunduğunu iddia edilmiştir (Yasukochi and Master 1976). Benzer şekilde CPR enziminin hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması sırasında kullanılan her iki yöntemde de CPR enziminin afinite kolonundan saflaştırılması sırasında 2'AMP (0,5-2,5 mM) gradienti uygulandı. Litaratürde belirtilen konsantrasyondan farklı bir aralıkta gelmesi biospesifiklik fikrini desteklemektedir.

CPR koyun akciğer mikrozomlarından deterjanla çözündürüldükten sonra DEAE selüloz, ultrafiltrasyon PM-30 filter, 2', 5'-ADP sepharoz 4B, Sephadex G-25, Propak Q ve hidrosilatit olmak üzere sekiz adımda %50 verimle 285 kat saflaştırılmıştır. (Iscan and Arınç 1986). Toplam altı kromatografik adımı içeren saflaştırma prosedürü oldukça fazla zaman almaktadır. Oysa hindi karaciğer mikrozomlarından CPR enziminin saflaştırılması sırasında kullanılan her iki prosedür de kromatografik adımların azlığı nedeniyle daha kısa sürmüştür.

Fenobarbitalle muamele edilen sıçanların karaciğerlerinden CPR enzimi iki farklı yöntemle saflaştırılmıştır. Birinci yöntemde uygun tampon çözelti ve işlemlere tabi tutularak elde edilen çözündürülmüş mikrozomal çözelti direkt olarak 2', 5'-ADP Agaroz afinite kolonuna tatbik edilmiş ve 5 mM 2' AMP ile elüe edilmiştir. İşlem sonunda enzim %91 verimle 188 kat saflaştırılmıştır. İkinci yöntemde ise elde edilen mikrozamal çözelti ilk olarak n-oktylamino sepharose 4B'ye ardından 2', 5'-ADP Agaroz kolonuna tatbik edilmiştir. Bu yöntem sonucunda ise enzim %80 verimle 182 kat saflaştırılmıştır. Her iki yöntem sonucunda elde edilen enzim örnekleri SDS-PAGE'ye yüklenmiş 76 kDa da tek bant elde edilmiştir. Bunun üzerine Shephard *et al.* (1983) birinci yöntemin daha hızlı ve çabuk bir yöntem olduğunu belirterek çalışmanın tek kademede gerçekleşmesinin önemini vurgulamıştır. Bahsi geçen çalışmada CPR'ın indüklenmesi için sıçanların fenobarbitalle muamele edilmesi dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Bu nedenle araştırmacının tercih ettiği her iki yöntemde de CPR oldukça

yüksek bir verimle elde edilmiştir. Oysa yapmış olduğumuz çalışmada fenobarbitalle muamele edilmemiş hindilerin karaciğerlerinden saflaştırılan CPR enzimi nispeten daha düşük bir verimle elde edilirken hemen hemen aynı saflaştırma katsayısına sahiptir.

Hindi karaciğer dokusundan iki farklı yöntemle saflaştırılan CPR sodyum dodesil sülfat varlığında denatüre edici şartlar altında poliakril amid jel elktforezine tabi tutulduğunda ve bir major band bir de minor band elde edildi (Şekil 4.7) Bu minor bandın (69 kDa) proteaz enzimleri vasıtası ile CPR'ın yarılması sonucu oluştuğu varsayılmaktadır. Eğer örneklerin protein miktarı az olursa elktforezde bu minor bandın ortaya çıkmadığı gözlemlendi (Şekil 4.6) CPR'ın monomer molekül kütlesi 81,3 kDa olarak hesaplandı (Şekil 4.8).

Bu flavoprotein bu güne kadar çalışılan tüm memeli dokularından tek bir gen tarafından kodlanmıştır. Hayvan türleri arasında monomer molekül kütlesi 74-80 kDa olarak ifade edilmiştir (Arınç 1995). Sıçrayan kefal (ilanya) balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan CPR'ın monomer molekül kütlesi SDS-PAGE'de 77 kDa olarak tespit edildiği belirtilmiştir. (Sen and Arınç 1998). Benzer şekilde gökkuşağı ablalık karaciğer CPR ve sıçan karaciğer CPR'n monomer molekül kütlesi 77 kDa olduğu, koyun akciğer ve karaciğer CPR ve domuz karaciğer CPR'ın 78 kDa, sınırit karaciğer mikrozomal CPR 82,6 kDa, sığır karaciğer ve hemstir karaciğer CPR 76 kDa, tırtıl sürüsü midgut membranından 70,04 kDa, ipliksi mantar (*Rhizopus nigricans*) parçalarındaki redüktaz 79 kDa, insan notrofil membranına 68 kDa olduğu belirtilmiştir (Yasukochi and Masters 1976; Crankshaw *et al.* 1979; Williams *et al.* 1983; Klotz *et al.* 1983; Kobayashi and Rikans 1984; M. Y. Iscan and E. Arinc 1986, 1988; Ardies *et al.* 1987; Nisimoto *et al.* 1994; Sen and Arınç 1998; Makovec and Breskvar 1998; Çelik 2002). Çalışmalar incelendiğinde hindi karaciğer CPR enziminin tespit edilen molekül kütlesinin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

CPR'ın immunoreaktif bantları küçük kanguru ve sıçan için 79 kDa belirlenirken insan için 76 kDa olarak belirlenmiştir. Ancak koala CPR'ın immunoreaktif bandı yaklaşık 82 kDa olarak belirlenmiştir (Kong *et al.* 2009). Çoğu memeli CPR enzim molekül kütlesi

72-79 kDa arasında iken bazı bitki CPR enzimlerinin molekül kütlesi SDS-PAGE'de daha büyük bulunmuştur. Örneğin tatlı patates 81 kDa (Fujita and Asahi 1985), nane 82 kDa (Ponnam peruma and Crteauna 1996), petunya 84 kDa (Menting *et al.* 1994) ve yer almasında 80, 82 ve 84 kDa (Benveniste *et al.* 1991) olarak tespit edilmiştir.

Koala CPR eksprese edilen proteinin nükleotid sekansından yola çıkılarak amino asit sekansı sonucu hesaplanan molekül kütlesinin 77 kDa olduğu ifade edilirken SDS-PAGE'de 82 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu durum maş fasulyesi CPR içinde geçerlidir. Shet *et al.* (1993) aradaki bu 4 kDa farkı glikozidasyon ile açıklamaktadır. Oysa memeli türlerinin herhangi biri için herhangi bir CPR'da glikozidasyon rapor edilmemiştir. Farz edilen glikozidasyon durumunun koala CPR için yeterli olmadığı belirtiliyor. Mutajenik çalışmalarla yer belirleme durumunun koala CPR için daha olası bir durum olduğu belirtiliyor. Şöyle ki amino asit yapısındaki tek bir değişim SDS-PAGE jel elektroforezinde sıçan CPR proteinin elektrostatik davranışını değiştirmektedir (Shen *et al.* 1989). Aspartik asit ile 140. tirozin amino asiti yer değiştirdiğinde 78 kDa olarak hesaplanan molekül kütlesinin yerine 84-85 kDa proteinin varlığı gözlemlenmiştir. Hindi karaciğer CPR'ın sekans uzunluğu 670 amino asit olarak bulunurken enzimin molekül kütlesinin yaklaşık 76 kDa olarak hesaplanmıştır (Dalloul *et al.* 2010). Oysa yapmış olduğumuz çalışmada hindi karaciğer CPR SDS-PAGE'de 81,3 kDa olarak belirlenmiştir. Bu durumda mutajenik çalışmalarla yer belirlemeden kaynaklı bir durum olduğunu düşünmekteyiz.

Bilindiği gibi CPR proteolitik yarılmalara karşı son derece dayanıksızdır ve kolaylıkla hücredeki proteaz varlığı nedeniyle mikrozomların çözündürülmesi sırasında ya da saflaştırma prosedürü sırasında kolaylıkla yarılabilmektedir. Koyun karaciğer redüktazın proteolitik yarılmalara karşı koyun akciğer redüktazdan daha dayanıksız olduğu belirtilmiştir (İşcan and Arınç 1998). Bu yarılan protein sitokrom c redüktaz aktivitesine sahiptir fakat yeniden oluşma sisteminde biyokatalitik aktiviteden yoksundur. Saflaştırma prosedürleri boyunca kullanılan tüm tamponlarda proteaz inhibitörleri kullanılmasına rağmen CPR'ın elde edilen son örneğinde bir yarıma söz konusu olduğu ve bir minor birde majör bant elde edildiği rapor edilmiştir (Sen and

Arınç 1998). Proteolitiklerin değişik miktarlarda varlığı sonucu inaktif redüktazın küçük molekül kütlelerine yarıldığı tavşan karaciğeri (French and Coon 1979), domuz karaciğeri (Yasukochi *et al.* 1980), kobay faresi karaciğeri (Kobayashi and Rikans 1984) ve sıçrayan kefal balığı karaciğerinden (Sen and Arınç 1998) saflaştırılan CPR için rapor edilmiştir.

Tavşan akciğer mikrozomalarından saflaştırılan CPR'ın monomer molekül kütlelerinin Guengerich (1977) ve Serabjit-Singh *et al.* (1979) tarafından belirlenmiş sırasıyla 79 kDa ve 72 kDa olarak rapor edilmiştir. Guengerich (1977) ikinci bir polipeptid varlığından söz etmezken Serabjit-Singh *et al.* (1979) deterjanla çözündürülen ve taze saflaştırılan akciğer CPR preparatlarında biokatalitik açıdan inaktif olan CPR'ın değişik miktarlarda 68 kDa da bir bant içerdiğini belirtmiştir (Iscan and Arınç 1986). Aynı şekilde Sen and Arınç (1998)'da SDS-PAGE'de sıçrayan kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan CPR'da bir major band bir de minor band oluştuğunu ifade etmişlerdir. Bu minor bandın (70 kDa) proteaz enzimleri vasıtası ile CPR'ın yarılması sonucu oluştuğunu söyleyerek eğer örnekler elektroforeze az miktarda yüklenirse bu minor bandın ortaya çıkmadığı belirtilmiştir. CPR'ın monomer molekül kütlelerinin 77 kDa olarak tespit edilmiştir. Hindi karaciğer CPR'ın da saflaştırma prosedürü boyunca ortamda proteaz inhibitörü olmasına rağmen kullanılan ikinci yöntemde bir minor birde major band elde edildi.

Çalışmamızda jel filtrasyon yöntemi kullanılarak hindi karaciğer CPR enziminin tabii halinin molekül kütlesi hesaplanılmaya çalışıldı. Ancak enzimin saflaştırılması çalışmaları sırasında deterjan kullanıldığı için bir protein deterjan miseli söz konusu olmuş ve enzim olduğundan daha büyük bir kütlede agregat oluşturarak geldiği tespit edildi (Şekil 4.9-4.10-4.11).

Jel filtrasyon diğer membran proteinleri gibi sitokrom P450 proteinlerinin içinde deterjan varlığında ya da yokluğunda çok etkili bir yöntem olmadığı belirtilmiştir. İlave olarak deterjan varlığında, protein-deterjan boyut kompleksinin deterjan miselleri tarafından baskılandığı ifade edilmiştir (Guengerich and Martin 1998).

Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'nin aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri K-fosfat tamponunda 7,6 olarak belirlendi (Çizelge 4.2/Şekil 4.12). Benzer şekilde petunya CPR ferrisitokrom c'nin indirgenmesi için optimum pH 7,4 bulunmuştur (Menting *et al.* 1994). Sıçrayan kefal (İlanya) balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CPR enzimi için ise optimum pH'nın 7,4-7,6 arasında olduğu belirtilmiştir (Sen and Arınç 1998). Sığır karaciğer CPR enzimin optimum pH değeri ise pH 7,4-7,8 arasında olduğu pH 7,8 üzerinde enzimin aktivite kaybettiği belirtilmiştir (Çelik 2002).

Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'nin aktivitesinin en yüksek olduğu iyonik şiddet değeri K-fosfat tamponunda 400 mM (335 mM küvet içi) olarak tespit edildi (Çizelge 4.3/Şekil 4.13). Sıçrayan kefal (İlanya) balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CPR'nin optimum iyonik şiddet değeri ise 600 mM olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Sen and Arınç 1998). Çelik (2002) sığır karaciğer CPR enzim aktivitesinin maksimum olduğu iyonik şiddet değerinin 300 mM K-fosfat olarak bulunduğu belirtilmiştir. Tespit edilen optimum iyonik şiddet değeri sıçan karaciğer CPR ile benzerken sıçrayan kefal balığı karaciğer CPR optimum iyonik şiddetinden farklıdır. Yüksek tuz konsantrasyonunda sinarit balığı karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'nin yapısındaki FMN'nin bir miktarını kaybetmiş olabileceği rapor edilerek, yüksek tuz konsantrasyonunda enzimin aktivitesinin azalması bu şekilde izah edilmiştir (Klotz *et al.* 1983). Benzer bir durumun hindi karaciğer CPR içinde söz konusu olduğunu düşünmekteyiz.

Hindi karaciğer mikrozomal CPR'nin stabil olduğu pH'yı belirlemek için K-fosfat tamponunda beş gün boyunca pH 6,6-7,0-7,4-7,6-7,8-8,2 aralığında 4°C enzim aktivitesi bakıldı. Beşinci günün sonunda pH 7,0'de enzim %55,8'lik aktivitesini koruyabilmiştir. Bu nedenle enzimin stabil olduğu pH 7,0 olarak belirlendi (Çizelge 4.4-Şekil 4.14). Benzer bir çalışma sığır karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan CPR içinde yapılmıştır. Bu çalışma da ise 37 ve 25°C sıcaklıklarda %20 gliserol varlığında ve yokluğunda CPR aktivitesinin stabilitesine bakılmıştır. Gliserol varlığında her iki sıcaklıkta enzimin aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. 25°C de 100 saatlik bir zaman diliminde enzimin ilk bir saatte %75 yedinci saatte ise %83'lük bir aktivite kaybı

yaşanırken aynı sıcaklıkta gliserollüde enzimin gliserolsüze nazaran daha az aktivite kaybettiği belirtilmiştir. Yani yüz saatin sonunda %75'lik bir aktivite kaybı gerçekleşmiştir. 37°C ise yedi saatlik bir inkübasyon süresi içinde enzim gliserolsüzde %85'lik aktivite kaybına uğrarken gliserollüde %77'lik bir aktivite kaybına uğradığı belirtilmiştir (Çelik 2002). Hemen hemen aynı zaman diliminde 4°C'de yapmış olduğumuz çalışmada enzimin 25 ve 37°C'dekine nazaran aktivitesini korumasına ilave olarak en iyi sonucun pH 7,0'de olduğunu görmekteyiz.

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere belirlenen optimum şartlarda 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de ve Çizelge 4.5'de gösterildi. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 50°C olarak tespit edildi. Optimum sıcaklıkta elde edilen veriler kullanılarak E_a ve Q_{10} değerleri hesaplandı. Bunun için; optimum sıcaklıktaki aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak $\log k-1/T \times 1000K^{-1}$ grafikleri çizildi. Bu grafiklerden faydalanılarak Arheniüs eğrisi elde edildi ve hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için E_a (3,505 kal/mol) ve Q_{10} (1,56) değerleri hesaplandı (Şekil 4.16) (Çizelge 4.6). Ayrıca Tırtıl sürüsünün midgut membranından saflaştırılan CPR enzimin aktivasyon enerjisinin 31,65 kJ/mol bulunduğu sıçan karaciğerinde ise bu değer 60,16 kJ/mol olarak bulunmuştur. Neredeyse iki katı oranında bir fark oluşu enzimin aktif bölgesin de türlere göre farklı olduğu düşüncesini desteklemiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için K_M değeri 3,44 μM ve V_{max} değeri 0,014 EÜ/ml olarak; sitokrom c için ise, K_M değeri 7,44 μM ve V_{max} değeri 0,021EÜ/ml olarak tespit edildi. Daha sonra bulunan K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin sitokrom c substratı için turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti V_0 tespit edildi. Bu değerler Çizelge 4.9.'de verildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7-4.8 ve Şekil 4.17-4.18'da görülmektedir. Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan CPR enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için K_M değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1). Bu

değerler karşılaştırıldığında domuz karaciğeri, tırtıl sürüsü midgut ve koyun akciğeri CPR'ın NADPH'a olan ilgisinin sitokrom c den daha fazla olduğunu görüyoruz (Crankshaw *et al.* 1979; Master 1980; Iscan and Arınç 1986). Hindi karaciğeri CPR içinde benzer bir sonuç elde edildi.

Çizelge 5. 1. Farklı kaynaklı CPR enzimleri için K_M

Enzim kaynağı	$K_M(\mu M)$		Kaynaklar
	NADPH	Sit c	
Domuz karaciğeri	3,8	5,4	Williams and Kamin 1962
Domuz karaciğeri	3,4	2,6	Phillips and Langdon 1962
Domuz karaciğeri	14	28	Master 1980
Kobay faresi karaciğeri	15,7	10,7	Kobayashi and Rikan 1984
Sıçrayan kefal balığı karaciğeri	-	7,69	Sen and Arınç 1998
Sığır karaciğeri	-	47,7	Çelik 2002
Ev sineği	23,5	16,6	Mayer and Prough 1977
Tırtıl sürüsü midgut	32,5	46,6	Crankshaw <i>et al.</i> 1979
Koyun akciğeri	11,1	20,0	Iscan and Arınç 1986

Sıçrayan kefal balığı karaciğeri mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'ın sitokrom c substratı için K_M değerinin 7,69 μM olduğu belirtilmiştir bu değer literatürde belirtilen değerlerden oldukça düşüktür. Ancak hindi karaciğeri mikrozoamlarından saflaştırılan CPR sitokrom c substratı için belirlenen K_M değeri (7,44 μM) ile uyumludur. Koyun akciğeri ve karaciğeri, domuz karaciğeri ve sinarit balığı karaciğerilerinden saflaştırılan CPR'ın sitokrom c substratı için K_M değeri 20-28 μM arasında olduğu belirtilmiştir (Klotz *et al.* 1983; Kobayashi and Rikans 1984; Iscan and Arinc 1986; Sen and Arınç 1998). Hindi karaciğeri mikrozoamlarından saflaştırılan CPR'ın NADPH substratı için belirlenen K_M değerinin domuz karaciğeri CPR'ın NADPH substratı için belirlenen değerle uyumlu olduğu tespit edildi. Aynı zamanda NADPH ve sitokrom c'nin K_M değerleri karşılaştırıldığında CPR'ın NADPH'a olan ilgisinin sitokrom c den daha fazla olduğu belirlendi.

Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ag^+ , Tl^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Co^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} ve As^{+5} metal iyonlarının inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda hem K-fosfat hemde hepes tamponlarında araştırıldı ancak tampon ortamların farklılığının önemli bir değişikliğe yol açmadığı görüldü. (Çizelge 4.9-19-Şekil 4.19-29). Ag^+ , Hg^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.19-21). İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,60, 13,52 ve 227 μM K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla $0,02967 \pm 0,0067$; yarışmalı, $10,37 \pm 2,24350$; yarışmalı ve $251 \pm 108,6247$; yarışmasız olarak tespit edildi (Şekil 4.42,43,44-Çizelge 4. 33). K-fosfat tamponunda da yine aynı metaller enzim aktivitesini yarıya düşürecek bir etkiye sebep olurken IC_{50} (sırasıyla 8,11, 14,24 ve 211 μM) değerlerinin hepes tamponunda belirlenen değerlerle benzer olduğu görüldü (Şekil 4.19-21-Çizelge 4.9-4.11-4.32).

Bozcaarmutlu *et al.* (2011) sığır karaciğerinden saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} ,nin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkisini araştırmış üç metal iyonununda enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona sebep olduğunu belirterek IC_{50} değerlerinin sırasıyla 0,027, 0,059 ve 2,9 mM olduğunu ifade etmişlerdir. K_i sabitini ve inhibisyon tipini belirlemek için Lineweaver-Burk ve Dixon eğrileri çizilmiştir. Çalışılan metal iyonlarının K_i sabitleri ise sırasıyla 0,03, 0,04 ve 2 mM bulunurken üçününde yarışmasız inhibisyon sergilediği belirtilmiştir. Hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} yanı sıra Ag^+ , Tl^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} ve As^{+5} metal iyonlarının da inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırıldı. Ancak bahsi geçen çalışmayla ortak olan metallerin hindi karaciğer CPR'nin aktivitesi üzerinde bir inhibisyon göstermediği tespit edildi. Bu da enzimin üç boyutlu yapısında türlere özgü farklılıklar ve etkileşmeler olabileceği düşüncesini aklımıza getirmektedir. Dahası çalışılan on dört metal içinden sadece Ag^+ , Hg^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonları yüksek bir inhibisyon etkisi gösterdi. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,60, 13,52 ve 227 μM K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla $0,02967 \pm 0,0067$; yarışmalı, $10,37 \pm 2,24350$; yarışmalı ve $251 \pm 108,6247$; yarışmasız

olarak tespit edildi (Şekil 4.42,43,44-Çizelge 4. 33). Al^{+3} 'de %39'luk bir inhibisyon gözlemlenirken inhibitör ($[Al^{+3}]$) konsantrasyonu arttıkça inhibisyon etkisinin ortadan kalktığı görüldü (Çizelge 4.19-Şekil 4.29 b).

Sıçrayan kefal balığının karaciğerinden saflaştırılan CPR enziminin aktivitesi üzerine Hg^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cr^{+3} ve Zn^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Zn^{+2} hariç diğer metal iyonlarının tamamının inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir. 50 μM metal iyonu konsantrasyonunda Hg^{+2} CPR aktivitesinde %100'lük bir inhibisyon gösterirken aynı konsantrasyonda Cd^{+2} , Ni^{+2} ve Cr^{+3} metal iyonları ise %66, %65 ve %37'lik bir inhibisyona sebep olmuştur. IC_{50} değerleri Hg^{+2} , Cr^{+3} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} için sırasıyla 0,07 μM , 24 μM , 33 μM ve 143 μM olarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk ve Dixon grafiği ile dört metalinde yarışmasız inhibisyon sergilediği belirtilmiştir. K_i sabitleri Dixon grafiğinden sırasıyla 0,048 μM , 18 μM , 73 μM ve 329 μM olarak belirlenmiştir (Bozcaarmutlu and Arinç 2007). Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine yukarıda belirtilen çalışma ile ortak olan metallere sadece Hg^{+2} yüksek bir inhibisyon sergiledi. IC_{50} değeri 13,52 μM olan Hg^{+2} 'nin Lineweaver-Burk grafiği ile K_i sabiti ve inhibisyon tipi $10,37 \pm 2,24350 \mu M$; yarışmalı olarak belirlendi. Çalışmalar kıyaslandığında sıçrayan kefal balığına göre hindi karaciğer CPR yaklaşık olarak 280 kat daha yüksek bir Hg^{+2} konsantrasyonda inhibe olmuştur.

Sıçrayan kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine Al^{+3} ve Tl^{+3} inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmış her iki metalinde enzim aktivitesinde güçlü bir inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla 34 μM ve 3 μM olduğu belirtilmiştir. Lineweaver-Burk ve Dixon grafiği ile her iki metalin yarışmasız inhibisyon sergilediği ve K_i sabitlerinin ise sırasıyla 8,3 ve 5,6 μM olduğu belirtilmiştir. 1 mM EDTA varlığında CPR enzim aktivitesi üzerinde Al^{+3} ve Tl^{+3} 'ün inhibisyon etkisi kısmen kurtarıldığı belirtilmiştir. İlaveten kalay ve magnezyumun saflaştırılan CPR'in aktivitesinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği belirtilmiştir (Bozcaarmutlu 2007). Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada da Tl^{+} , Al^{+3} ve Mg^{+2} 'nin inhibisyon etkisi hindi karaciğer CPR için araştırıldı. Al^{+3} %40 bir

inhibisyon gösterirken Tl^+ ve Mg^{+2} inhibisyon etkisi göstermedi. Mg^{+2} her iki çalışmada ortak olarak inhibisyon etkisi göstermemiştir. Diğer çalışmada Tl^{+3} kullanılırken bizim çalışmamızda Tl^+ kullanıldı böylece bir değerlikli üç değerlikli talyum iyonu karşılaştırılmış oldu. Sonuç olarak üç değerlikli talyum iyonunun inhibisyon etkisi gösterdiği ama bir değerlikli talyumun inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiş oldu.

Kim *et al.* (2002) yapmış olduğu çalışmada Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının sıçan karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini araştırılmıştır. Bu çalışma neticesinde sadece Cu^{+2} 'nin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değerinin de $5,8 \mu M$ olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda ortamda EDTA olduğunda Cu^{+2} 'nin sebep olduğu inhibisyonda %25 oranında enzim aktivitesi üzerinde bir azalma gözlenmiştir. Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} 'nin hindi karaciğer CPR için inhibisyon etkisi araştırıldı ve Kim *et al.* (2002)'nin belirlediği sonuçla benzer sonuçlar elde edildi. Ancak Cu^{+2} hindi karaciğer CPR da belirlenen IC_{50} değeri $227 \mu M$ iken sıçan karaciğer CPR için bu değer $5,8 \mu M$ 'dir. Neredeyse 40 kat gibi bir oran söz konusudur. Bu da hindi karaciğer CPR'ın yapı olarak daha dayanıklı bir enzim olduğunu göstermektedir.

Sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan CPR enzim aktivitesi üzerine bir, iki ve üç değerlikli katyonların etkileri araştırılmıştır. Çoğu iki değerlikli katyonların (ağır metaller hariç) CPR'ı uyardığı bir ve üç değerlikli katyonların CPR aktivitesi üzerinde az bir etki ya da inhibisyon etkisi göstermiş olduğu belirtilmiştir (Fouts and Pohl 1971). Yapmış olduğumuz çalışma yaklaşık kırk bir yıl öncesinin çalışmasını doğrular niteliktedir. Çünkü Ag^+ hindi karaciğer CPR üzerinde en yüksek inhibisyona sebep olmuştur. Bu güne kadar CPR enzim aktivitesi üzerinde gümüşün inhibisyon etkisi araştırılmamıştır. Hindi karaciğer CPR'ın diğer türlere göre daha dayanıklı olduğu göz önüne alındığında CPR'ın gümüş ile inhibisyonu oldukça önemlidir. Aynı zamanda Hg^{+2} ve Cu^{+2} dışında çalışılan diğer iki değerlikli katyonlar enzimi ya aktive etmiştir ya da etkilememiştir. Al^{+3} ise enzim aktivitesinde %40'luk bir inhibisyon göstermiştir.

Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Al^{+3} dışındaki Zn^{+2} (hepes), Tl^+ , Cd^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} , Mg^{+2} metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde belli bir etki göstermezken, Co^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} (hepes) ve As^{+5} hindi karaciğer CPR üzerinde aktivasyon etkisi göstermişlerdir. CPR enziminin aktivasyonunda son derece tehlikelidir Çünkü NADPH bağlı indirgenme reaksiyonlarında reaktif oksijen türleri, karbon merkezli serbest radikaller ve reaktif metabolitler oluşturulabilir. Örneğin kinonlar redüktaz tarafından bir elektron basamağı ile nükleik asid ve aktive proteinlere kovalent olarak bağlı olan semikinon radikallerine indirgenebilir ve bu da genotoksisite ve sitotoksisiteyle sonuçlanabilir. Alternatif olarak semikinonlar hidroksil radikalinin yanı sıra hidrojen peroksit meydana getiren süperoksit anyon radikalini oluşturmak için bir elektronu moleküler oksijene transfer edebilir. Hidroksil radikali en reaktif oksijen türüdür ve inanılır ki hidroksil radikali DNA iplikçiklerinin bozulmasından, lipid peroksidasyonundan, ve kinon redoks çevrimi süresince enzimlerin inaktivasyonundan sorumludur (Halliwell and Auroma 1991; Lu 1991; Kappus 1986).

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi ve TİHUD 2. Başkanı Prof. Dr. Serhat Ünal'ın verdiği bilgiye göre Türkiye'de kullanılan her 100 ilaçtan 20 si antibiyotiktir ve gelişmiş ülkelerde 5'inci sırada yer alırken Türkiye antibiyotik kullanımında 1'inci sıradadır (Anonim 2012). Bu nedenle hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, amikasin sülfat, linkomisin HCl, seftriakson disodyum ve vankomisin HCl antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda 3.2.6'da anlatıldığı şekilde araştırıldı (Çizelge 4.20-31-Şekil 4.30-41). Oksitetrasiklin dihidrat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve seftriakson disodyum hindi karaciğer CPR'ı aktive ederken amikasin sülfat, linkomisin HCl ve kanamisin sülfat etki etmediği vankomisin HCl %42'lik bir inhibisyon, gentamisin sülfat ise %33'lük bir inhibisyon sergilediği belirlendi.

Bu güne kadar çeşitli kimyasalların farklı türlerdeki CPR aktivitesi üzerine çeşitli etkileri araştırılmıştır. CPR üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılmasının yanı sıra enzimin kimyasal direkt olarak indirgeyip indirgemediğinde bakılarak aktivite yöntemi oluşturmaya çalışmışlardır ancak enzimin antibiyotikleri indirgediği bilinmesine rağmen *in vitro* şartlarda söz konusu enzim için etkileri incelenmemiştir.

Tannik asidin insan ve sıçan karaciğer mikrozomal CPR enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış söz konusu enzim için inhibisyona sebep olduğu belirlenerek IC₅₀ değerleri sırasıyla 17,4 µM ve 11,8 µM olarak tespit edilmiştir (Yao *et al.* 2008). Çalışmış olduğumuz antibiyotiklerin hiçbiri enzim aktivitesini yarıya düşürecek etkiye sahip değildir ancak vankomisin HCl ve gentamisin sülfat yaklaşık %40'lık bir inhibisyon sergilemiştir.

Sülfür musturad içeren vesikantların solunmasının üst solunum yollarında ciddi zarara neden olabileceği belirtilerek yapılan bir çalışmada bir sülfür musturad analogu olan 2-kloroetil etil sülfid (CEES), tip II akciğer epitel hücrelerindeki ve β-naftiloflavin ve salin uygulanmış sıçanların karaciğer mikrozomlarında doğal CPR'ın yanı sıra insan rekombinant CPR için potansiyel bir inhibitör olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada CEES'in CPR için seçici bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (Gray *et al.* 2010).

Sanazol ile metronidazolun ksantin/ksantin oksidaz ve CPR üzerinde sitokrom c nin indirgenme etkisi araştırılmış her iki enzimde de sanazol ilavesinde sitokrom c⁺³'ün indirgenmesinde önemli derecede artış gösterdiği ancak metronidazolün göstermediği belirtilmiştir. Bunun sonucunda da her iki enziminde sanazolün biyoaktivasyonunda ve tümör idikal aktivitesinde görev alan enzimler olabileceği belirtilmiştir (Schepetkin *et al.* 2001). Benzer şekilde amikasin sülfat, linkomisin HCl ve kanamisin sülfat hindi karaciğer CPR aktivitesi üzerinde etki göstermezken oksitetrasiklin dihidrat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve seftriakson disodyum hindi karaciğer CPR'ın sitokrom c indirgenme aktivitesinde önemli derecede artış göstermektedir. Bunun sonucunda da CPR'ın sözkonusu antibiyotiklerin biyoaktivasyonunda rol alabileceğini düşünmekteyiz.

NADPH'tan sitokrom P450 türlerine ve diğer birkaç mikrozomal enzime elektron transfer eden CPR aynı zamanda birçok kimyasal ve ilacın bir elektronla indirgenmesini de katalizlemektedir. CPR tarafından 5-siyano-2,3-ditiol tetrazolum kloride (CTC)'in indirgenmesi CPR aktivitesinin incelenmesi için bir metot olarak önerilmiştir. CPR tarafından NADPH'tan salınan elektronlar CTC'nin reaksiyon ortamına transfer edilmiş ve CTC indirgenme aktivitesi spektrometrik ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Michaelis–Menten ile CTC'nin reaksiyon kinetiği incelenmiştir. Buna göre $K_M=50 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}=2,520 \text{ dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu metot CPR'ın enzimatik aktivitesi için devamlı kullanılacak bir ölçüm olarak sunulmuştur (Kim *et al.* 2009).

Sonuç olarak;

1. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırılmasında iki farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntemde hindi karaciğer mikrozomlarından elde edilen NADPH sitokrom P450 redüktaz 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisine uygulanarak tek basamakta %23,43 verimle 114,15 kat saflaştırıldı. İkinci yöntemde hindi karaciğer mikrozomlarından elde edilen NADPH sitokrom P450 redüktaz DE52 anyon değişim kromatografisine ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak %8 verimle 124 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1).
2. Hindi karaciğer mikrozomal NADPH–sitokrom c redüktaz enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Enzimin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile 81 kDa olarak belirlendi.
3. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH 7,6 optimum iyonik şiddeti kuvet içi 334 mM olarak belirlendi.
4. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık 50 °C, E_a 3,505 kal/mol ve Q_{10} 1,56 olarak belirlendi.
5. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için K_M 7,44 μM , V_{max} 0,021 EÜ/ml, k_{cat} 2258,06 s^{-1} ve V_0 303,5 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ve NADPH için K_M 3,44 μM , V_{max} 0,014 EÜ/ml, k_{cat} 1854,83 ve V_0 539,2 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak belirlendi.

6. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının (Ag^+ , Tl^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} , ve As^{+5}) ve bazı antibiyotiklerin (oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, amikasin sülfat, linkomisin HCl, seftriakson disodyum ve vankomisin HCl) inhibisyon etkileri *in vitro* şartlarda araştırıldı (Şekil 3.20-46). Ag^+ , Hg^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.20-25). İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,60, 13,52 ve 227 μM K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla $0,02967 \pm 0,0067$; yarışmalı, $10,37 \pm 2,24350$; yarışmalı ve $251 \pm 108,6247$; yarışmasız olarak tespit edildi (Şekil 4.47,48,49-Çizelge 4.38). Oksitetrasiklin dihidrat, enrofloksasin, tiylosin, kloramfenikol, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve seftriakson disodyum hindi karaciğer CPR'ı aktive ederken amikasin sülfat, linkomisin HCl ve kanamisin sülfat etki etmedi. Vankomisin HCl %42'lik bir inhibisyon, gentamisin sülfat ise %33'lük bir inhibisyon sergiledi.

KAYNAKLAR

- Aigrain, L., Pompon, D., Truana, G. and Morerab, S., 2009. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a chimeric NADPH-cytochrome P450 reductase. *Acta Cryst*, F65, 210–212.
- Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H. and Ciftci, M., 2012. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. In Press, Corrected Proof.
- Anonim 2012 <http://saglik.milliyet.com.tr/Saglik/HaberDetay.aspx?aType=HaberDetay&ArticleID=1018031&Date=20.11.2008&b=Ne%20zaman%20antibiyotik%20kullanmaliyiz>
- Aoi, K., Fujii-Kuryama, Y. and Tashiro, Y., 1981. Intracellular Distribution of NADPH- Cytochrome C Reductase In Rat Hepatocytes Studied By Direct Ferritin-Immuno-electro Microscopy. *J. Cell Set*, (50) 181-198.
- Ardies, C.M., Lasker, J.M., Bloswick, B.P. and Lieber, A.S., 1987. Purification of NADPH: Cytochrome c (Cytochrome P-450) Reductase from Hamster Liver Microsomes by Detergent Extraction and Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 162, 39-46.
- Arınç, E., 1995. General aspects of NADPH- cytochrome P450 Reductase and cytochrome b5 in Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds. Plenum Press, 135-147.
- Arinc, E. and Celik H., 2002. Biochemical Characteristics of Purified Beef Liver NADPH- cytochrome P450 Reductase. *J. Biochem Molecular Toxicology*, 16, (6), 286-297.
- Arinc, E., 1991. Essential features of NADH dependent cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 of liver and lung microsomes. In: Molecular aspects of monooxygenases and Bioactivation of toxic compounds, (Arinc, E., Schenkman, J.B., and Hodgson, E., eds.), Plenum Press, New York. pp. 149-170,
- Arınç, E. and Çakir, D., 1999. Simultaneous purification and characterization of cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 from sheep liver, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 345-362.
- Azevedo, R.A. and Lea, P.J., 2005. Toxic metals in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 1-17.
- Barra, D., Martini. F., Montarani. G., Doonan. S. and Bossa. F., 1979. Primary structure of mitochondrial aspartate aminotransferase from turkey liver. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 108(1), 103-106.
- Benveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M., Kochs, G. and Durst, F., 1991. Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 reductase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 105–112.
- Bilgili, A., 1990: Kanatlı üretiminde gelişmeyi hızlandırıcı ve koruyucu amaçla kullanılan antibakteriyel maddeler. *Türk Veterinerlik. Birl. Derg*, 2 (7.8): 31.36.
- Bilgili, A., 1994: Kanatlılarda Antibakteriyel İlaç Kullanım Seçenekleri ve Sakıncaları. *A.Ü Veterinerlik. Fakültesi Derg*, 41 (2): 243-253.
- Black, S.D. and Coon, M.J., 1982. Structural Features of Liver Microsomal NADPH cytochrome P-450 Reductase Hydrophobic Domain, Hydrophilic Domain, and

- Connecting Region. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 257, No. 10, 25, 5929-5938.
- Booth, N.H., McDonald, L.E. (eds.). 1982. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 5th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 1005
- Bozcaarmutlu, A. and Arinc, E., 2007. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Liza saliens*). *Toxicology in Vitro*, 21 408–416.
- Bozcaarmutlu, A., 2007. Mechanism of Inhibition of Purified Leaping Mullet (*Liza saliens*) NADPH-Cytochrome P450 Reductase by Toxic Metals: Aluminum and Thallium. *J Biochem Molecular Toxicology*, Volume 21, Number 6,340-347.
- Bozcaarmutlu, A., Celik, H. and Arinc, E., 2011. Inhibition mechanisms of lead, cadmium and nickel for the purified bovine liver NADPH-cytochrome P450 reductase. *Toxicology Letters*, Volume 205, Pages S192.
- Brekken, A. and Steinnes, E., 2004. Seasonal concentrations of cadmium and zinc in native pasture plants: consequences for grazing animals. *Science of the Total Environment*, 326, 181–195.
- Cawley, G.F., Batie, C.J. and Backes, W.L., 1995. Substrate-dependent competition of different P450 isozymes for limiting NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 34(4):1244-7.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. and Ferrier, D.R., 2007. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry* 3rd. edition Capa Istanbul Millet Cad. Nobel Medical Publisher.143-154.
- Charvat, K.A., Hornstein, L. and Oestreich, A.E., 1991. "Radio-ulnar synostosis in Williams syndrome. A frequently associated anomaly". *Pediatr Radiol* 21 (7): 508–10. PMID 1771116.
- Cherif, S., Miled, N., Kammoun, M., Mejdoub, H. and Gargouri, Y., 2006. Purification and biochemical characterization of a turkey preduodenal esterase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 358-364.
- Cleere, W.F. and Cuoghlan, M.P., 1974. Avian xanthine dehydrogenases-I. Isolation and characterization of the turkey liver enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 50, 311-322.
- Cleland, W.W., 1977. Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalysed reactions by kinetic studies. *Advanced Enzymology*, 45; 273-387.
- Crankshaw, D.L., Hetnarski, K. and Wilkinson C.F. 1979. Purification and Characterization of NADPH-Cytochrome c Reductase from the Midgut of the Southern Armyworm (*Spodoptera eridania*). *Biochem. J*, 181, 593-605.
- Çelik, H., 2002, *Biochemical and Immunological Characterization of Beef Liver NADPH-cytochrome P450 Reductase*, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Degree of Master.
- Çetin, M., 1999. Drug Interactions Psychiatric Practice. *Bull. Clin. Psychopharmacol*; 9(2), 78-92.
- Çoban, T.A., Senturk, M. And Ciftci, M., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an *in vitro* study. *Protein Pept Lett*. 14:1027–1030.
- Dalloul, R.A., Long, J.A., Zimin, V.A., Aslam, L., Bea, K., Blomberg, A.L., Bouffard, P., Burt, D.W., Crasta, O., Crooijmans, R.P.M.A., Cooper, K., Coulombe, R.A., De, S., Delany, M.E., Dodgson, J.B., Dong, J.J., Evans, C., Frederickson, K.M.,

- Flicek, P., Florea, L., Folkerts, O., Groenen, M.A.M., Harkins, T.T., Herrero, J., Hoffmann, S., Megens, H.J., Jiang, A., Jong, P.D., Kaiser, P., Kim, H., Kim, K.W., Kim, S., Langenberger, D., Lee, M.K., Lee, T., Mane, S., Marçais, G., Marz, M., McElroy, A.P., Modise, T., Nefedov, M., Notredame, C., Paton, I.R., Payne, W.S., Pertea, G., Prickett, D., Puiu, D., Qioa, D., Raineri, E., Ruffier, M., Salzberg, S.L., Schatz, M.C., Scheuring, C., Schmidt, C.J., Schroeder, S., Searle, S.M.J., Smith, E.J., Smith, J., Sonstegard, T.S., Stadler, P.F., Tafer, H., Tu, Z.J., Tassell, C.P.V., Vilella, A.J., Williams, K.P., Yorke, J.A., Zhang, L., Zhang, H.B., Zhang, X., Zhang, Y. and Reed, K.M., 2010. Multi-Platform Next-Generation Sequencing of the Domestic Turkey (*Meleagris gallopavo*): Genome Assembly and Analysis. *Plos Biol*, 8(9): e1000475. doi:10.1371/journal.pbio.1000475.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Öğüs, I.H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Dee, A., Carlson, G., Smith, C., Masters, B.S. and Waterman, M.R., 1985. Regulation of synthesis and activity of bovine adrenocortical NADPH-cytochrome P-450 reductase by ACTH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(2), 650-656.
- Dignam, J.D. and Strobel, H.W., 1977. NADPH-Cytochrome P-450 reductase from rat liver: Purification by affinity chromatography and characterization. *Biochemistry*, 16, 1116-1123.
- Dippenaar, N., Booyens, J., Fabbri, D. and Katzeff, I.E., 1982. The reversibility of cancer: evidence that malignancy in melanoma cells is gamma-linolenic acid deficiency-dependent. *S Afr Med J*, 62(15):505-509.
- Durham, C.R., Zhu, H., Masters, B.S., Simpson, E.R. and Mendelson, C.R., 1985. Regulation of aromatase activity of rat granulosa cells: induction of synthesis of NADPH-cytochrome P-450 reductase by FSH and dibutyryl cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol*, 40(2-3):211-219.
- Ekinci, D., Beydemir, S. and Kufrevioglu, O.I., 2007. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:745-750.
- Ercal, N., Gurer, H., Aykin, O., Aykin, N. and Burns., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal Induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1;529-539.
- Fan, L.L. and Masters, B.S.S., 1974. Properties of purified kidney microsomal NADPH-cytochrome c reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 165, Issue 2, Pages 665–671.
- Fouts, J.R. and Pohl, R.J., 1971. Further studies on the effects of metal ions on rat liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase. *J Pharmacol Exp Ther*, 179(1):91-100.
- French, J.S. and Coon, M.J. 1979. Properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase purified from rabbit liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys*, 195, 565-577.
- Fujita, M., Asahi, T., 1985. Purification and properties of sweet potato NADPHcytochrome c (P-450) reductase. *Plant Cell Physiol*. 26, 397–405.
- Gherzi-Egea, J.F., Minn, A., Daval, J. L., Jayyosi, Z., Arnould, V., Souhaili-El Amri, H. and Siest, G., 1989. NADPH:cytochrome P450(c) reductase: biochemical and

- characterization in rat brain and cultured neurons evolution of activity during development. *Neurochem, Res*, 14-883-888.
- Gray, J.P., Mishin, V., Heck, D.E., Laskin, D.L. and Laskin, J.D., 2010. Inhibition of NADPH cytochrome P450 reductase by the model sulfur mustard vesicant 2-chloroethyl ethyl sulfide is associated with increased production of reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247, 76–82.
- Guengerich, F.P. and Martin, M.V., 1998. Cytochrome P450 Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Edited by Ian R Philips and Elizabeth A Shephard. Humana pres inc. 999 Riverview Drive, Suite 208.Totowa, New Jersey. Volume 107. Chepter 4. Page:35-53.
- Guengerich, F.P., 1977. Preparation and Properties of Highly Purified Cytochrome P-450 and NADPH-Cytochrome P-450 Reductase from Pulmonary Microsomes of Untreated Rabbits. *Mol Pharmacol*, 13,911-923.
- Halliwell, B. and Auroma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281, 9–19.
- Han, P.F., Owen, G.S. and Johnson, J., 1974. Purification and properties of fructose 1,6-bisphosphatase from turkey liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 168(1), 171-179.
- Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T.D., and Shievely, J.E., 1986. Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry*, 25, 7906-7911.
- Haniu, M., McManus, M.E., Birkett, D.J., Lee, T.D., and Shivelys, J.E., 1989. Structural and Functional Analysis of NADPH-Cytochrome P-450 Reductase from Human Liver: Complete Sequence of Human Enzyme and NADPH-Binding Sites, *Biochemistry*, 28, 8639-8645.
- Horecker, B.L., 1950. Triphosphopyridine nucleotide-cytocrome c reductase in liver. *J. Biol. Chem.* 183, 593-605.
- Iscan, M. Y. and Arinc E., 1986. Kinetic and structural properties of biocatalytically active sheep lung microsomal NADPH-cytocrome c reductase. *Int. J. Biochem*, 18,731-741.
- Iscan, M.Y. and Arinc, E., 1988. Comparison of highly purified sheep liver and lung NADPH-cytochrome P450 reductases by the analysis of kinetic and catalytic properties. *Int. J. Biochem*, 20, 1189–1196.
- Iyanagi, T. and Mason, H.S., 1973. Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochemistry*, 12, 2297-2308.
- Iyanagi, T., Makino, N. and Mason, H.S., 1974. Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductases. *Biochemistry*, 13(8):1701-1710.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur S., 2001. Metallerin çevresel etkileri - 1. İTÜ, Metalürji ve Malzeme Müh. Bölümü Metalürji Dergisi, 136-47-53.
- Kamatagi, T., Sugiura, M., Yamozone, Y. and Kato, R., 1979. Purification and properties of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome c (P450) reductase from human liver microsomes. *Biochem, Pharmac*, 28 1993-2000.
- Kappus, H., 1986. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol*, 35, 1.

- Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yamano, T., and Ohkawa, H., 1986. Molecular cloning and sequence analysis of full length cDNA for rabbit liver NADPH-cytochrome P450 reductase mRNA. *J. Biochem.*, 100, 945–954.
- Kaya, S. ve Şahal, M., 1989. Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri. ilaç verilmiş hayvanlarda uygulama sonrası gerekli kesim öncesi bekletme veya Sütün kullanılmama süreleri, A,U. Yet. Fak. Derg. 36 (2): 390.403.
- Kayaalp, O., (2002). İlaçların biyotransformasyonu; Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, 7. baskı, 1.cilt, 92-129.
- Keha, E., Küfrevioğlu Ö.İ. 2009. Biyokimya. Aktif yayınevi, Erzurum.
- Kim, D.H., Yim, S.K., Kim, K.H., Ahn, T. and Yun, C.H., 2009. Continuous spectrofluorometric and spectrophotometric assays for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Biotechnol Lett*, 31, 271–275.
- Kim, J.S., Ahn, T., Yim, S.K. and Yun, C.H., 2002. Differential Effect of Copper (II) on the Cytochrome P450 Enzymes and NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Inhibition of Cytochrome P450-Catalyzed Reactions by Copper (II) Ion. *Biochemistry*, 41, 9438-9447.
- Klotz, A.V., Stegeman, J.J. and Walsh, C., 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 578–592.
- Kobayashi, S. and Rikans L.E., 1984. Kinetic Properties of guinea pig liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, 313–318.
- Kong, S., Ngo, S.N.T., McKinnon R.A. and Stupans, I., 2009. Cloning and expression of koala (*Phascolarctos cinereus*) liver cytochrome P450 reductase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150,1–9.
- Kulkoski, J.A., Weber, J.L. and Ghazarian, J.G., 1979. NADPH-cytochrome c reductase in outer membrane of kidney mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 192, 539-547.
- Kurzban, G.P. and Strobel, H.W., 1986. Preparation and characterization of FAD-dependent NADPH-cytochrome P450 reductase, *J. Biol. Chem.* 261,7824-7830.
- Laden, B. P., Tang, Y. and Porter, T.D., 2000. Cloning, Heterologous Expression, and Enzymological Characterization of Human Squalene Monooxygenase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374, 381-388.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature, London*, 227,680.
- Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H.Q., Rommens, J.M., Scherer, S.W., Rosenblatt, D.S. and Gravel, R.A., 1998. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria, *Proc. Natl. Acad.*, 95, 3059–3064.
- Li, H.C., Liu, D. and Waxman, D.J., 2001. Transcriptional Induction of Hepatic NADPH: Cytochrome P450 Oxidoreductase by Thyroid Hormone, *Molecular Pharmacology*, 59(5), 987-995.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685 1934

- Lu A. Y.H. 1991. NADPH-dependent cytochrome P450n reductase. In *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*, E. Arinc, J. B. Schenkman, and E. Hodgson, eds. Plenum Press, New York. pp. 135–147.
- Makovec, T. and Breskvar, K., 1998. Purification and Characterization of NADPH–Cytochrome P450 Reductase from Filamentous Fungus *Rhizopus nigricans*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357, 310-316.
- Masters, B.S., Bilimoria, M.H., Kamin, H. and Gibson, Q.H., 1965. The mechanism of 1- and 2-electron transfers catalyzed by reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J Biol Chem*, 240(10):4081-8.
- Masters, B.S.S. 1980. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby, W. B., Ed.), Vol. 1, pp.183-200, Academic Press, New York.
- Masters, B.S.S., Williams, C.H. and Kamin, H., 1967. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. In *Methods in Enzymology* (Edited by Colowick S. P. And Kaplan N. O.), Vol. 10, pp. 565-573. Academic Press, New York.
- Mayer, R.T. and Durrant, J.L., Preparation of homogeneous NADPH cytochrome c (P-450) reductase from house flies using affinity chromatography techniques. *J. Biol. Chem*, 254(3):756-761. 1979.
- Mayer, R.T. and Prough, R.L., 1977. Purification and characterisation of NADPH-cytochrome c (P450) reductase from the house fly *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 57B; 81-87.
- McGuire, J.J., Anderson, D.J., McDonald, B.J., Narayanasami, R. and Bennett, B.M., 1998. Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleonium sulfate. *Biochem Pharmacol* 1;56(7):881-93.
- McMillan, K., Bredt, D.S., Hirsch, D.J., Snyder, S.H., Clark, J.E. and Masters, B.S., 1992. Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 89, 11141-11145.
- Menting, J.G.T., Cornish, E., Scopes, R.K., 1994. Purification and partial characterization of NADPH-cytochrome c reductase from *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiol*, 106, 643–650.
- Merla, G., Howald, C., Henrichsen, C.N., Lyle, R., Wyss, C., Zobot, M.T., Antonarakis, S.E. and Reymond, A., 2006. "Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes". *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2): 332–41.
- Meunier, B., Visser, S.P. and Shaik, S., 2004. "Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes". *Chemical Reviews* 104 (9): 3947-3980.
- Montellano, O.P.R., 1995. *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*, 2nd ed. New York: Plenum.
- Mori, T., Yamazaki, A., Kinoshita, T. and Imaoka, S., 2006. Purification of NADPH-P450 reductase (NPR) from *Xenopus laevis* and the developmental change in NPR expression. *Life Sciences*, Volume 79, Issue 3, Pages 247–251.
- Murataliev, M.B., Ariño, A., Guzov, V.M. and Feyereisen, R., 1999. Kinetic mechanism of cytochrome P450 reductase from the house fly (*Musca domestica*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29; 233-242.

- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and Rodwell V.W., 2004. Harper'ın Biyokimyası, Nobel Tıp Kitapevleri 25. Baskı
- Narhi, L.O. and Fulco, A.J., 1986. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem*, 261, 7160-7169.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (Çeviren: N. KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Nemeroff, C.B., De Vane, C.L. and Pollack, B.V., 1996. Newer Antidepressants and the Cytochrom P450 System *Am. J. Psychiatry*, 153, 311-320.
- Nisimoto, Y., Otsuka-Murakami, H. and Iwata, S., 1994. NADPH-cytochrome c reductase from human neutrophil membranes: purification, characterization and localization. *Biochem. J.* 297, 585-593.
- Oehlschlöger, J., 2000. Identifying Heavy Metals in Fish (H.A. Bremner editör). Safety and Quality Issues in Fish Processing, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, pp.95-108.
- Ohkawa, H., Imaishi, H., Shiota, N., Yamada, T., Inui, H., and Ohkawa, Y., 1998. Molecular mechanisms of herbicide resistance with special emphasis on cytochrome P450 monooxygenases. *Plant Biotechnology*. 15: 173-176.
- Onganer, Y., Şakiroglu, H. and Küfrevioğlu, O.I., 1998. Temperature effect on polyphenol oxidase and investigation of thermodynamic functions. *Chim. Acta Turcica*, 26, 41-46.
- Oprian, D.D. and Coon, M.J., 1982. Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J Biol Chem*, 257:8935–8944.
- Ostrowski, J., M.J. Barber, D.C. Rueger, B.E. Miller, L.M. Siegel, and N.M. Kredich 1989. Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 264, 15796-15808.
- Özerol, E., 1996. Cytochrom P 450 containing monooksigenase enzym systems, *Journal of Tugut Özal Medical Center*; 3(33), 257-275.
- Paine, M.J., A.P Garner, D. Powell, J. Sibbald, M., Sales, Pratt, N., 2000. Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J. Biol. Chem.* 275, 1471-1478.
- Parikh, A. and Guengerich, F.P., 1997. Expression, Purification, and Characterization of aCatalytically Active Human Cytochrome P450 1A2:Rat NADPH-Cytochrome P450 Reductase Fusion Protein. *Protein Expression And Purification*, 9, 346–354.
- Phillips, A.H., and Langdon, R.G. 1962. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem*, 237, 2652-2660.
- Ponnamperuma, K. and Croteau, R., 1996. Purification and characterisation of an NADPHcytochrome P450 (cytochrome c) reductase from spearmint (*Mentha spicata*) glandular trichomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 329, 9–16.

- Porter, T.D. and Kasper, C.B. 1986. NADPHcytochrome P-450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, 25,1682-1687.
- Porter, T.D. and Kasper, C.B., 1985. Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 973-977.
- Porter, T.D., Beck, T.V. and Kasper, C.B., 1990. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene organization correlates with structural domains of protein. *Biochemistry*, 29, 1682-1687.
- Poulos T:L, Barry C. Howard, F. and Howard, A.J., 1987. "High-resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}". *Journal of Molecular Biology*, 195 (3): 687-700.
- Ram, A. and Waxman, D.J., 1992. Thyroid Hormone Stimulation of NADPH P450 Reductase Expression in Liver and Extrahepatic Tissues, *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3294-3301.
- Reed, C. J., Lock, E. A., and De Matteis, F., 1986. NADPH:cytochrome P-450 reductase in olfactory epithelium. Relevance to cytochrome P450-dependent reactions, *Biochem. J.*, 240, 585-592.
- Robyt, J.F. and White, B.J., 1987. *Biochemical Techniques Theory and Practice* Brooks/Cole Publishing Company, California, page 235-236.
- Rock, D., Rock, D. and Jones, J.P., 2001. Inexpensive purification of P450 reductase and other proteins using 2', 5'-adenosine diphosphate agarose affinity columns. *Protein Expr Purif.* (1):82-3.
- Sağlam, N. ve Cihangir N., 1995. Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbisyonu Çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi 11-157-161.
- Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., and Masters, B.S.S., 1972. Immunochemical Evidence for an Association of Heme Oxygenase with the Microsomal Electron Transport System, *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3601-3607.
- Schepetkin, I.A., Cherdyntseva, N.V. and Kagiya, V.T. 2001. Sanazole as substrate of xanthine oxidase and microsomal NADPH/cytochrome P450 reductase. *Pathophysiology*, 8, 119–127.
- Segel I. H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, P:403.
- Segel, I.H., Wiley C.J. and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sen, A. and Arinc, E., 1998. Purification and Characterization of Cytochrome P450 Reductase from Liver Microsomes of Feral Leaping Mullet (*Liza saliens*), *J. Biochem Molecular Toxicology*, 12, 103-113.
- Serabjit-Singh, C.J., Wolf, R.J., and Philpot, R.M., 1979. The rabbit pulmonary monooxygenase system. Immunological and biochemical characterization of enzyme components. *J. Biol. Chem*, 254, 9901–9907.
- Sevanian, A., Nordenbrand, K., Kim, E., Ernster, L. and Hochstein, P., 1990. Microsomal Lipid Peroxidation: The Role of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome P450, *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 145-152.
- Shen, A.L. and Kasper, C.B., 1993. Protein and gene structure and regulation of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. In: SchenkmanJB, GreimH, editors. *Cytochrome P450*. Berlin:Springer-Verlag, p 35–59

- Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E., Kasper, C.B., 1989. Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 265, 7584–7589.
- Shephard, E.A., Phillips, I.R., Santisteban, I., West, L.F., Palmer, C.N., Ashworth, A. and Povey, S., 1989. Isolation of a human cytochrome P-450 reductase cDNA clone and localization of the corresponding gene to chromosome 7q11.2. *Ann Hum Genet.*, 53(Pt 4):291-301.
- Shephard, E.A., Pike, S.F., Rabin, B.R., and Phillips, I.R., 1983. A Rapid One-Step Purification of NADPH-Cytochrome c (P-450) Reductase from Rat Liver Microsomes. *Analytical Biochemistry*, 129, 430-433.
- Shet, M.S., Sathasiva, K., Arlotto, M.A., Mehdy, M.C., Estabrook, R.W., 1993. Purification, characterization and cDNA cloning of an NADPH-cytochrome P450 reductase from mung bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 2890–2894.
- Silig, Y. and Çetinkaya, O., 1998. Cyrocrome P450 Reductase Activities in the Liver Microsomes of Diabetic Rats Induced With Some Chemical Solvents, *Tr. J. of Medical Siciences*, (28) 343-346.
- Simmons, D.L., Lalley, P.A. and Kasper, C.B., 1985. Chromosomal assignments of genes coding for components of the mixed-function oxidase system in mice. Genetic localization of the cytochrome P-450PCN and P-450PB gene families and the nadph-cytochrome P-450 oxidoreductase and epoxide hydratase genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 515-521.
- Sinha, B.K., 1989. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem.-Biol.Interactions*, (69), 293.
- Sligar, S.G., Cinti, D.L., Gibson, G.G. and Schenkman, J.B., 1979. "Spin state control of the hepatic cytochrome P450 redox potential". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90 (3): 925-932.
- Somers, E., 1974. The Toxic Potential of Trace Metals in Foods. A Review, 39-215-217.
- Stoilovl, I., Jansson, I., Sarfarazil M.,and Schenkman, J.B. 2001. Roles of cytochrom P450 in development. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 18(1),33-55.
- Şanlı, Y. ve Kaya, S. 1993: *Veieriner ilaç Rehbeeri ve Uygulamalı Bilgiler El Kitabı*, Medisan Yayınları NO:6., s:395.423.
- Taşer, P., 2010. Glutasyon Redüktaz Enziminin Hindi Karaciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi Kimya Anabilim Dalı Atatürk Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü. Sayfa 72 Erzurum.
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M. and Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comp Biochem Physiol C*, 148,117–121.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve uygulamalı Enzimoloji. Ege üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der), 59 s, zmir.
- Temel, B.D., 2006. Doğal Ve Sentetik Biomateryallerde, Osteogenic (Rhbmp-7) Ve Angiogenic (Bfgf) Büyüme Faktörleri İle İnsan Osteoblast Hücrelerinin Gelişiminin İncelenmesi Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Turgut, S., Ercan, M., Turgut, G., Zincir, M., Genç, O., 2000. Yüksek Bakır ile Çinkonun Böbrek ve Kalp Üzerine Etkileri, *SDU Tıp Fakültesi Dergisi*, 7(3).

- Urenjak, J., Linder, D. and Lumper, L., 1987. Structural comparison between the trout and mammalian hydrophilic domain of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Chromatogr*, 397, 123-136.
- Vermilion, J.L. and Coon, M.J., 1974. Highly purified detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase from phenobarbital-induced rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 60(4), 1315-1322.
- Vermilion, J.L. and Coon, M.J., 1978. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase *J Biol Chem*, 253 pp. 8812–8819.
- Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. and Coon, M.J., 1981. Separate Roles for FMN and FAD in Catalysis by Liver Microsomal NADPH-cytochrome P-450 Reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 266-277.
- Vogel, F. and Lumper, L., 1986. Complete structure of the hydrophilic domain in the porcine NADPH-cytochrome P-450 reductase, *Biochem. J.*, 236, 871-878.
- Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S.S. and Kim, J.J.P 1997. Three-Dimensional Structure of NADPH–Cytochrome P450 Reductase: Prototype For FMN-And FAD-Containing Enzymes. *Biochemistry*, Vol. 94, Pp. 8411–8416.
- Wang, Y., Gray, J.P., Mishin, V., Heck, D.E., Laskin, D.L., Laskin, J.D., 2008. Role of cytochrome P450 reductase in nitrofurantoin-induced redox cycling and cytotoxicity, *Free Radic Biol Med*, 44(6), 1169-79.
- Waxman, D.J., Morrissey, J.J. and Leblanc, G.A., 1989. Hypophysectomy differentially alters P-450 protein levels and enzyme activities in rat liver: pituitary control of hepatic NADPH cytochrome P-450 reductase. *Molecular Pharmacology*, Vol. 35 no.4, 519-525.
- Widdowson, P., 2010. Biochemical and Biophysical Characterisation of *Anopheles Gambiae* NADPH-Cytochrome P450 Reductase. Doctor in Philosophy, University of Liverpool, Liverpool.
- Williams, C.H., Jr, and Kamin, H., 1962. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem*, 237:587–595
- Williams, D. E., Becker, R.R., Potter, D.W., Guengerich, F.P. and Buhler, D.R., 1983. Purification and comparative properties of NADPH-cytochrome P450 reductase from rat and rainbow trout: difference in Temperature optima between reconstituted and micsomal trout enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 55-66.
- Wilson, T.G. and Hodgson, E. 1971. Microsomal NADPH-cytochrome c reductase from the house fly, *Musca domestica*: properties of the purified enzyme, *Insect Biochemistry*. 1; 171-180.
- Wohlover, M.L., 2008. Altering the electron transfer mechanism of cytochrome P450 reductase trough a single point mutation, A Senior Honors Thesis, The Ohio State University.
- Yamano, S., Aoyama, T., McBribe, O.W., Hardwick, J.P., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J., 1989. Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. *Mol. Pharmacol*, 35, 83–88.
- Yao, H.T., Chang, Y.W., Lan, S.J. and Yeh, T.K., 2008. The inhibitory effect of tannic acid on cytochrome P450 enzymes and NADPH-CYP reductase in rat and human liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 645–653.

- Yasukochi, Y. and Masters, B.S.S., 1976. Some properties of a detergent solubilized NADPH-cytochrome P450 reductase from pig liver and kidney. Immunochemical, kinetic and reconstitutive properties. Arch. Biochem. Biophys, 202, 491-498.
- Yasukochi, Y., Okita, R. T. and Masters, B.S.S., 1980. Comparison of properties of detergent solubilized NADPH-cytochrome P450 reductase from pig liver and kidney: Immunological, kinetic and reconstitutive properties. Arch. Biochem. Biophys. 202, 491-498.
- Yazkan, M., Özdemir, F. Ve Gölükçü, M., 2002. Antalya Körfezinde Avlanan Bazı Balık Türlerinde Cu, Zn, Pb ve Cd İçeriği. Turk J Vet Anim Sci., 26: 1309-1313.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2006 yılında tamamladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Yüksek Lisans öğrenimini, Temmuz 2009'da tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Doktora öğrenimini, 2012 yılında tamamladı.