

ÜNİVERSİTE KÜTÜPHANESİ
DOKÜMANLAMA VE ARAMA BÖLÜMÜ

**DIETİL NİTROZAMİN'İN SIÇAN (*Rattus norvegicus*)
KARACİĞER MİKROZOMAL NADH-SİTOKROM b₅
REDÜKTAZ'A İN VİTRO ETKİSİ**

FERDA CANDAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

1995

39991

**DIETİLNİTROZAMİN'İN SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACIĞER
MİKROZOMAL NADH-SİTOKROM b₅ REDÜKTAZ'A**

İN VİTRO ETKİSİ

FERDA CANDAN

DOKTORA TEZİ

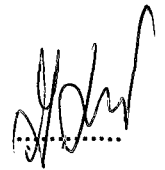
KİMYA ANABİLİM DALI

Atilla ATALAY


Danışman

Biyokimya - Profesör

Bölümü - Ünvanı



İmzası



Bu tez, Cumhuriyet üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

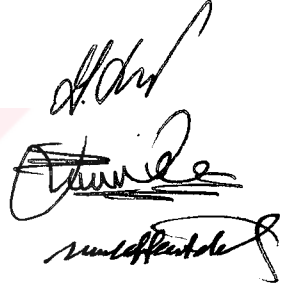
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Atilla ATALAY

Üye : Prof. Dr. Engin GÖZÜKARA

Üye : Prof. Dr. Muzaffer ÜSTDAL



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

10.10.1995

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Fuat ÖNDER



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
SUMMARY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZGELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nitrozaminler	2
1.1.1. N-Nitrozodietilamin (Dietilnitrozamin)	5
1.2. NADH-Sitokrom b ₅ Redüktaz	6
1.3. Sitokrom b ₅	8
1.4. NADH - Sitokrom b ₅ Redüktaz ve Sitokrom b ₅ 'in Fizyolojik Önemi	10
2. YÖNTEM ve TEKNİKLER	12
2.1. Deneyin Yapıldığı Yer ve Tarih	12
2.2. Kullanılan Maddeler ve Gereçler	12
2.3. NADH - Sitokrom b ₅ Redüktaz'ın Saflaştırılması	12
2.3.1. Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması	12
2.3.2. NADH - Sitokrom b ₅ Redüktaz'ın Çözünürleştirilmesi	13
2.3.3. Amonyum Sülfat ile Fraksiyonlama	13
2.3.4. Sephadex G-100 Jel Filtrasyonu	13
2.3.5. DEAE Selüloz Kolon Kromatografisi	13
2.4. NADH - Sitokrom b ₅ Redüktaz Aktivitesinin Saptanması	14
2.4.1. Ferrisiyanit ile Saptanan Enzim Aktivitesi	14
2.4.2. Sitokrom b ₅ ile Saptanan Enzim Aktivitesi	14
2.5. Sitokrom b ₅ 'in Saflaştırılması	15
2.5.1. Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması	15
2.5.2. Tripsin Parçalaması	15
2.5.3. Sephadex G- 100 Kolon Kromatografisi	15
2.5.4. DEAE Selüloz Kolon Kromatografisi	16

2.5.5. Safılaştırılan Sitokrom b ₅ 'in Spektral Özellikleri ve Miktarının Saptanması	16
2.6. Protein Miktarının Saptanması	16
2.7. Enzim-DENA Etkileşimleri	17
2.7.1. NADH-Sitokrom b ₅ Redüktaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	17
2.7.2. DENA Derişiminin Ferrisiyanit ile Ölçülen Enzim Aktivitesine Etkisi	17
2.7.3. DENA Derişiminin Sitokrom b ₅ ile Ölçülen Enzim Aktivitesine Etkisi	17
2.7.4. Enzim-DENA Bağlanmasının İncelenmesi	18
2.8. DENA Sitokrom b ₅ 'in Etkileşimi	18
2.8.1. Zamanın Etkisi	18
2.8.2. DENA Derişiminin Etkisi	18
3. BULGULAR	19
3.1. Sıçan Karaciğer Mikrozomlarından NADH-Sitokrom b ₅ Redüktaz'ın Safılaştırılması	19
3.2. NADH-Sitokrom b ₅ Redüktaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	23
3.3. NADH-Sitokrom b ₅ Redüktaz ile Dietilnitrozaminin Etkileşimi	24
3.3.1. Etkileşimin Ferrisiyanit Yöntemi ile İncelenmesi	24
3.3.2. Etkileşimin Sitokrom b ₅ Yöntemi ile İncelenmesi	29
3.3.3. Enzim DENA Bağlanmasının İncelenmesi	33
3.4. Safılaştırılan Sitokrom b ₅ 'e Ait Bulgular	34
3.5. Sitokrom b ₅ 'in DENA ile Etkileşimi	38
3.5.1. Zamanın Etkisi	38
3.5.2. DENA Derişiminin Etkisi	39
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
5. KAYNAKLAR	49
6. ÖZGEÇMİŞ	56

ÖZET

Doktora Tezi

**DIETİLNİTROZAMİN'İN SIÇAN KARACİĞER MİKROZOMAL
NADH-SİTOKROM b₅ REDÜKTAZ'A İN VİTRO ETKİSİ****FERDA CANDAN**

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: **Prof.Dr. Atilla ATALAY**

Bu çalışmada, kanserojenik ve mutajenik bir bileşik olan Dietilnitrozamin'inin (DENA), saflaştırılan NADH-Sitokrom b₅ redüktaz ve onun substratı Sitokrom b₅ üzerine etkisi in vitro olarak incelendi.

Enzim ve sitokrom b₅ sıçan karaciğer mikrozomlarından Sephadex G-100 ve DEAE Selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim aktivitesi, ferrisiyanit ve sitokrom b₅'in indirgenme hızı ile ölçüldü. Saflaştırma sonunda, enzim mikrozomlara oranla ortalama 300 kez saflaştırılıp, % 38 verimle elde edildi.

Enzim aktivitesi ferrisiyanit ile ölçüldüğünde, enzimi % 50 inhibe eden DENA derişimi (I₅₀), 6.6×10^{-4} M ; enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0.221 mM ve $899.78 \mu\text{mol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ bulundu. Enzim aktivitesi sitokrom b₅ ile ölçüldüğünde ise I₅₀ , Km ve Vmax değerleri sırasıyla 5.7×10^{-4} M , 426 nmol L^{-1} ve $262.57 \text{ nmol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ şeklinde bulundu.

NADH-Sitokrom b₅ redüktaz farklı DENA derişimleri ile inkübe edildiğinde Km değerlerinin sabit kaldığı, Vmax değerlerinin değiştiği bulundu. Dolayısı ile inhibisyonun nonkompetitif olduğu saptandı.

Enzim substratı olan sitokrom b₅ , DENA ile inkübe edildiğinde ise DENA'nın indirgenmiş yapıdaki sitokrom b₅'i yükselttiği bulundu.

Anahtar Kelimeler: Dietilnitrozamin, NADH-Sitokrom b₅ Redüktaz,
Sitokrom b₅

SUMMARY
PhD Thesis

**IN VITRO EFFECTS OF DIETHYLNITROSAMINE ON THE RAT HEPATIC
MICROSOMAL NADH-CYTOCHROME b₅ REDUCTASE**

FERDA CANDAN

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

Supervisor: **Prof.Dr. Atilla ATALAY**

In this study, in vitro effects of Diethylnitrosamine, a cancerogenic and mutagenic compound, on the purified NADH-cytochrome b₅ reductase and its substrate of cytochrome b₅, have been investigated.

Enzyme and cytochrome b₅ were purified from rat liver microsomes by using Sephadex G-100 and DEAE-cellulose column chromatographies. Enzyme activity was assayed by measuring the rate of reduction of cytochrome b₅ and ferricyanide. At the end of the purification, NADH-cytochrome b₅ reductase was purified about 300 fold with a yield of 38 % with respect to microsomes.

When the enzyme activity measured with ferricyanide, the DENA concentration which inhibits enzyme activity of 50 % (I₅₀) was 6.6×10^{-4} M ; The K_m and V_{max} values of enzyme were 0.221 mM and 899.78 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, respectively. Also, in measuring enzyme activity with cytochrome b₅; I₅₀, K_m and V_{max} values were found as follows: 5.7×10^{-4} M, 426 nmol L^{-1} and 262.57 $\text{nmol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, respectively.

When the enzyme was incubated with varying DENA concentrations, it was seen that K_m values remained constant, whereas V_{max} values varied. Therefore, inhibition of the enzyme was found as noncompetitive.

It was found also that reduced form of cytochrome b₅, a substrate of the enzyme, has been oxidized when it was incubated with DENA.

Key Words : Diethylnitrosamine, NADH-Cytochrome b₅ Reductase,
Cytochrome b₅.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik çalışmalarımın her aşamasında sürekli yardımlarını gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Atilla ATALAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Üniversitede öğrencilik yıllarımdan bugüne dek bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Nursevin ÖZTOP'a ve tüm diğer hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca destek ve yardımlarını hiç bir zaman unutamayacağım Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı akademik ve idari çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Bugüne dek yaptıkları değerli katkılarından dolayı aileme ve bu tezin yazımında büyük bir özen gösteren Bilim Grafik & Dizgi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ferda CANDAN

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1 - N-nitrozlu bileşiklerin biyoaktivasyonu	4
Şekil 2- Mikrozomlar içinde elektron taşınım zinciri	9
Şekil 3- Mikrozomlardaki sitokrom b ₅ bağımlı elektron taşıyıcı sistemin yer aldığı metalik yollar	11
Şekil 4- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın Sephadex G-100 kolon kromatografisi	21
Şekil 5- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın DEAE-Selüloz kolon kromatografisi	21
Şekil 6- Saflaştırılan sıçan karaciğer NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın soğurum spektrumu	22
Şekil 7- Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	23
Şekil 8- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın DENA ile inhibisyonunda zamanın etkisi	24
Şekil 9- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz için Michaelis-Menten eğrisi (Ferrisiyanit ile)	26
Şekil 10- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde Lineweaver - Burk grafiği (Ferrisiyanit ile)	27
Şekil 11- DENA derişimine karşı 1/V _{max} (göz.) grafiği (Ferrisiyanit ile)	28
Şekil 12- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz için Michaelis-Menten eğrisi (Sitokrom b ₅ ile)	30
Şekil 13- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde Lineweaver - Burk grafiği (Sitokrom b ₅ ile)	31
Şekil 14- DENA derişimine karşı 1/V _{max} (göz.) grafiği (sitokrom b ₅ ile)	32
Şekil 15- Enzim, DENA, Enzim + DENA'nın UV-VIS soğurum spektrumu	33
Şekil 16- Sıçan karaciğeri mikrozomal sitokrom b ₅ 'in Sephadex G-100 kolon kromatografisi	35
Şekil 17- Sıçan karaciğeri mikrozomal sitokrom b ₅ 'in DEAE - Selüloz kolon kromatografisi	36
Şekil 18- Saflaştırılmış sıçan karaciğeri sitokrom b ₅ 'in soğurum spektrumu	37
Şekil 19- Sitokrom b ₅ 'in DENA ile etkileşimine zamanın etkisi	38
Şekil 20- İndirgenmiş sitokrom b ₅ ile DENA'nın etkileşiminde soğurum spektrumu	39
Şekil 21- Yükseltgenmiş sitokrom b ₅ ile DENA'nın etkileşiminde soğurum spektrumu	40
Şekil 22- Sitokrom b ₅ ile DENA'nın etkileşiminde DENA derişimine karşı sitokrom b ₅ miktarları	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması	20
Çizelge 2- DENA derişiminin NADH-sitokrom b ₅ redüktaz aktivitesine etkisi	25
Çizelge 3- NADH - sitokrom b ₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde Km ve Vmax değerleri (Ferrisiyanit için)	28
Çizelge 4- DENA derişiminin NADH - sitokrom b ₅ redüktaz aktivitesine etkisi	29
Çizelge 5- NADH-sitokrom b ₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde Km ve Vmax değerleri (Sitokrom b ₅ için)	32
Çizelge 6- Sitokrom b ₅ 'in sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması	34
Çizelge 7- DENA ile etkileşen sitokrom b ₅ 'in zamanla değişen miktarları	38
Çizelge 8- DENA derişimine bağlı olarak değişen sitokrom b ₅ miktarları	41

1. GİRİŞ

Karaciğer mikrozomları en az iki temel elektron taşınım sistemi içerir. Bu sistemlerden biri NADPH bağımlı karışık fonksiyonlu oksidaz sistemi olup, ksenobiyotiklerin ve endojen maddelerin metabolizmasını katalizlemektedir. Bu sistem flavoprotein NADPH-sitokrom P-450 redüktaz, hem proteini sitokrom P-450 ve fosfolipid içermektedir. İkinci sistem ise NADH'ten yağ asiti metabolizmasıyla ilgili terminal oksidazlara elektron taşınımını sağlamaktadır. NADH-sitokrom b₅ redüktaz, sitokrom b₅ ve terminal elektron alıcısı desatüraz enziminin oluştuğu bu sistemin en önemli görevi yağ asitlerinin desatürasyonudur (West, 1977).

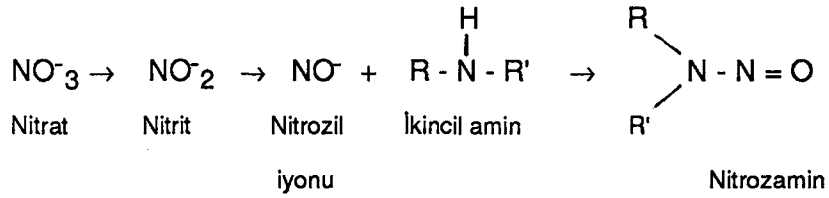
NADH-sitokrom b₅ redüktaz amfipatik yapıya sahip bir flavoprotein olup, prostetik grup olarak FAD içermekte ve sitokrom b₅'in indirgenmesini katalizlemektedir. Sitokrom b₅ 'de amfipatik yapıya sahip olup, NADH bağımlı sistemlerde elektron taşıyıcı olduğu gibi NADPH bağımlı sistemlerde sitokrom P-450'ye ikinci elektronu sağlayarak her iki elektron taşınım sisteminde merkezi rol oynamaktadır (Holloway ve Wakil, 1970; Oshino ve Ark, 1971; Hildebrandt ve Estabrook, 1971).

Bu çalışmanın konusunu oluşturan ve dialkilnitrozaminlerden biri olan Dietilnitrozamin (DNA) ise doğada oldukça yaygın olarak bulunan mutajenik ve kanserojenik bir bileşiktir. DNA'nın çeşitli besin maddelerindeki oluşum mekanizması ve değişik canlı türlerindeki metabolizması incelenmiştir (IARC, 1974; Scanlan, 1975). DNA'nın dokularda mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından mutajenik ara ürünlere çevrilerek (Weeks, 1974), DNA ve RNA'yı alkilediği ve protein sentezini inhibe ettiği bilinmektedir (Witsch, 1973; Pegg, 1977).

Bu çalışmada, pek çok metabolik yolda önemli fizyolojik rol oynayan NADH-sitokrom b₅ redüktaz ile onun elektron alıcısı olan sitokrom b₅'in saflaştırılması ve DNA ile in vitro olarak etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. NİTROZAMİNLER

Kanserojen ve hepatotoksik bileşenlerin en güçlü bir grubu olan N-Nitrozaminler, ikincil ve üçüncül aminlerin nitrit ile tepkimesi sonucu oluşan bileşiklerdir (Deeb, 1975).



Nitrozaminlerin öncüllerinden biri olan nitrat, insan tükürüğünde doğal olarak bulunduğu (Tenovuo, 1986) gibi sebzeler ve içme suyu ile de vücuda alınmaktadır. Nitratlı gübrelerin ve zirai ilaçların kullanımının artması sebzelerde nitrat birikimini yükseltir. Yeşil sebzelerde özellikle ıspanak, kereviz, marul, turp ve pancarda nitrat derişimi yüksek bulunmuştur (Lijinsky, 1975). Suyun saflaştırılmasında nitratlı süzme uygulanması sonucu içme suyu nitrat düzeyide artmaktadır (Forman, 1985). Ayrıca nitrat ve nitrit et, balık, peynir, sucuk gibi besinler ve konservelerde renk, tat verici ve koruyucu olarak sodyum tuzu halinde de kullanılmaktadır (Lijinsky, 1975; Özdemir, 1984).

Vücuda alınan nitratların, ağız ve bağırsak florasındaki bakteriler tarafından nitritlere ve dolayısı ile nitrozaminlere dönüştüğü saptanmıştır (Kayaalp, 1981; Tenovuo, 1986). Nitrat ve nitritle korunmuş gıdaların pişirilmesi veya uzun süre beklemesi durumunda da çeşitli nitrozaminlerin oluştuğu saptanmıştır (Özdemir, 1984).

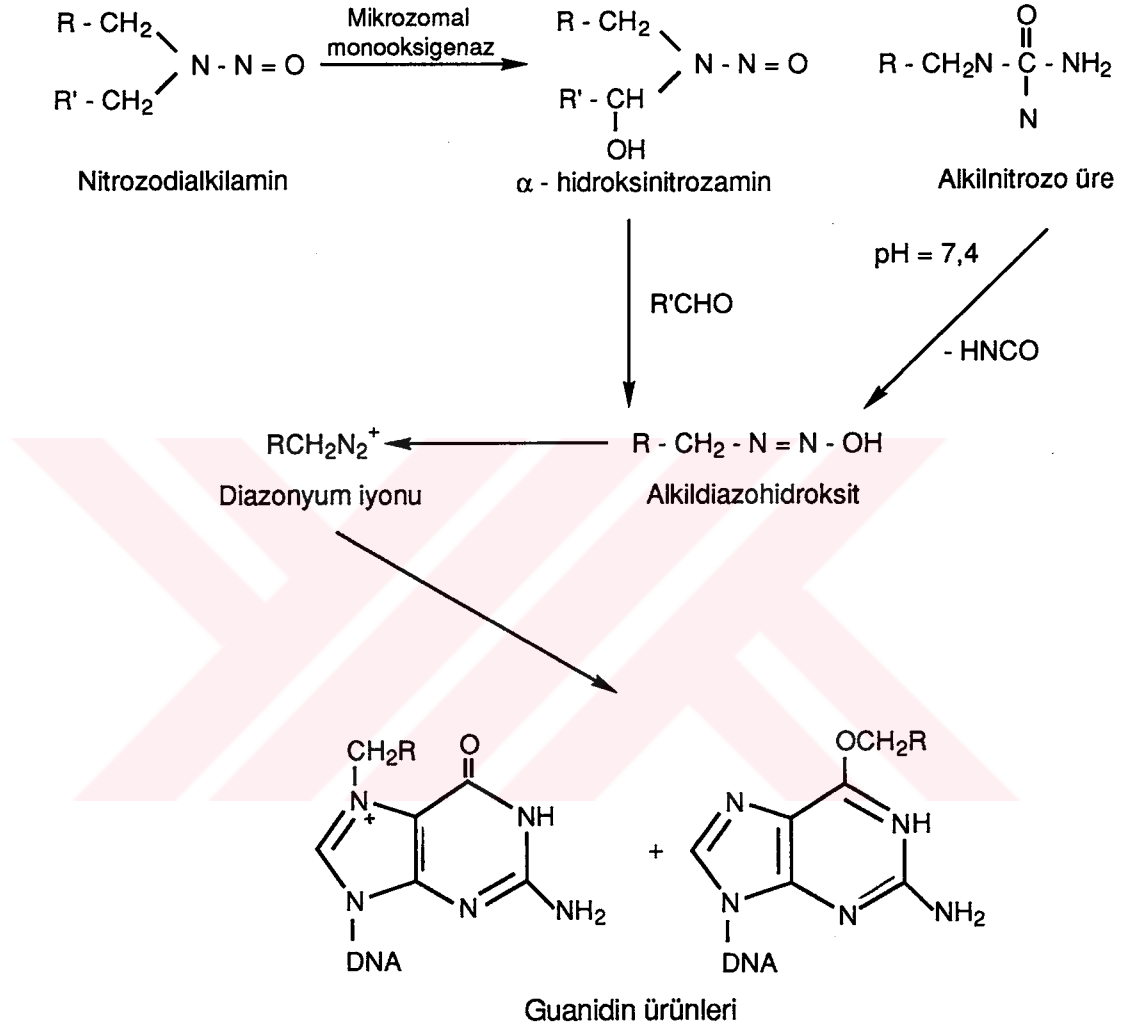
Nitrozaminlerin oluşumunda nitrit dışındaki diğer bir öncül olan ikincil aminler ise balık, balık ürünleri, çay, tahıl, sigara ve sigara dumanında bulunmaktadır (Lijinsky, 1975). Deney hayvanlarında ve insanlarda ikincil ve üçüncül amin yapılı ilaçların, midenin asit ortamında nitrit ile etkileşerek nitrozamin türevlerini oluşturduğu bulunmuştur (Andrews, 1984).

Antioksidan bileşiklerden biri olan C vitamininin (askorbik asit) midede veya saklanan besinlerde, aminlerle tepkimeye giren nitratların kanserojen nitrozaminlere dönüşümünü bloke ettiği bildirilmiştir (Mirvis ve Ark., 1972).

Nitrozaminlerin deney hayvanlarında karaciğer, böbrek, akciğer, mide ve mesanede kanser yaptığı bulunmuştur (Kayaalp, 1981).

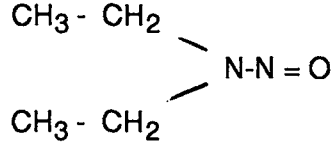
Doğrudan yiyeceklerle alınan veya asidik ortamda ikincil aminlerin değişik nitrozolama ajanları ile etkileşimi sonunda oluşan nitrozaminlerin kanserojenik ve sitotoksik etki göstermeleri için metabolik aktivasyonları gereklidir (Casado, 1986). Nitrozaminlerin oksidatif dealkilasyonu (metabolik aktivasyon) ve reduktif denitrozasyonu (deaktivasyon) sitokrom P-450 bağımlı monooksijenazlar tarafından NADPH ve O₂ varlığında yürütülür (Appel ve Ark., 1985). Aktivasyon işlemi genellikle sitokrom P-450 bağımlı tepkimelerde α karbonun oksitlenmesi ile gerçekleşir (Tu, 1983; Yang, 1985). Aktivasyon sonucu nitrozaminler kuvvetli reaktif metabolitlerine çevrilirler. Alifatik dialkilnitrozaminler kolayca alkildiazohidrokside metabolize olurlar ve bunlarda bozunarak alkildiazonyum iyonu oluşur. Alifatik dialkilnitrozaminler, alkildiazohidrokside metabolize olurken açığa çıkan aldehit de oksitlenerek CO₂ halinde dışarı atılmaktadır. Aktivasyon sonucu oluşan elektrofilik metabolitler genellikle DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik gruplarla tepkimeye girmektedir. Nitrozo bileşiklerin biyoaktivasyonu Şekil -1'de gösterilmiştir (Michael, 1989).

Elektrofilik metabolitler DNA yapısındaki bazlar ile birleşerek DNA'da hasar oluşturabildikleri gibi, DNA tamirini inaktive etmekte ve hücre kültürlerinde mutajenik etki göstermektedirler (Bartsch, 1988). Ayrıca nitrozlu bileşiklerin enzim aktivitelerinde de bazı değişiklikler yaptığı bulunmuş ve çalışılan enzimleri nonkompetitif olarak inhibe ettikleri gözlenmiştir (Atalay, 1989; Öztop ve Ark., 1993).



Şekil-1. N-Nitrozolu bileşiklerin biyoaktivasyonu

1.1.1. N-Nitrozodietilamin (Dietilnitrozamin, DENA):



Alifatik dialkilnitrozaminlerden birisi olan DENA, ilk kez Geuther ve Kreutzhage tarafından dietilamin ve nitroz asidin tepkimesi ile üretilmiştir (IARC, 1978).

Endüstride kullanım alanı oldukça yaygın olan DENA, 1.1. dietilhidrazinin sentezinde, elektrik kondansatörlerinin dielektrik (yalıtkanlık) sabitinin artırılmasında, lif endüstrisinde çözücü, kopolimerler için yumuşatıcı ve yağ sanayisinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (IARC, 1971; Adler, 1980).

DENA'nın değişik çalışmalarla, aşırı pişirilmiş unlu gıdalarda olduğu, peynir, süt, buğday, et ve balık ürünleri gibi doğal besinlerde bulunmasının yanında sigara dumanı ve alkollü içkilerde de bulunduğu saptanmıştır (IARC, 1971). Daha önce yaptığımız bir çalışmada yerli sigaraların dumanından elde edilen DENA düzeyleri Maltepe'de 21.0, Filtresiz Bafra'da 13.9, Filtreli Bafra'da 6.2, Lüks Bitlis'te 5.5, Tokat'ta 3.4 μg (sigara)⁻¹ olarak bulunmuştur (Candan, 1989).

DENA'nın karsinojenik ve toksik etkilerini gösterebilmesi metabolik aktivasyonuna bağlıdır (Montesano, 1976; IARC, 1978). Sitokrom P-450 II E 1 izoenzimi, DENA'nın metabolik aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Yoo ve Ark., 1990)

DENA'dan karaciğer karışık işlevli oksidazlarıyla oluşturulan radikaller, DNA'yı alkilemekte ve böylece mutajenik ve kanserojenik etki göstermektedir (Pegg, 1979). Ayrıca DENA'nın fare karaciğer ve akciğerinde RNA ve protein sentezini de inhibe ettiği ve bu inhibisyonun karaciğerde daha fazla olduğu gösterilmiştir (Witsch, 1973).

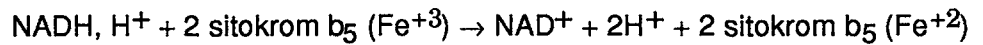
DENA'nın metabolik aktivasyonu sonucu oluşan alkilleyici ara ürünler DNA'daki pürin bazlarından guanini alkilleyerek O₆ ve N₇- etil guanin oluşumuna neden olmaktadır (Pegg ve Balog, 1979). Ayrıca Dyroff tarafından yapılan çalışmalar sonucunda uzun süre DENA'ya maruz kalan hayvanlarda O₄-etiliminin olduğu, bununda önemli lezyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir (Michael, 1989).

DENA'nın karaciğer, akciğer, böbrek, yemek ve soluk borusu ile burun boşluğunda tümör oluşturan kuvvetli bir nitrozamin olduğu saptanmıştır (IARC, 1971; Dahl, 1986).

Yapılan çalışmalarla DENA'nın hücre bölünmesini durdurduğu (İlhan ve Atalay 1985), Laktat Dehidrogenaz aktivitesini azalttığı, Malat Dehidrogenaz, Maya Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (Atalay 1981;1985; 1987) ve Glutatyon S-Transferaz enzimini (Tüken, 1993) inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca DENA'nın sıçan karaciğerinde amino asit metabolizması enzimlerinden, Triptofan oksijenaz, Tirozin ve Ornitin Aminotransferaz, Serin Dehidrataz ve Histidaz'ı da inhibe ettiği gözlenmiştir (Kitaqawa, 1975).

1.2. NADH SİTOKROM b₅ REDÜKTAZ

NADH-sitokrom b₅ redüktaz (NADH: sitokrom b₅ oksidorekdüktaz, E.C. 1.6.2.2) endoplazmik retikulum zarına bağlı olarak bulunan amfipatik yapıya sahip bir flavoprotein olup, sitokrom b₅'in indirgenmesini katalizlemektedir (Holloway 1970; 1971; Oshino ve Ark, 1971).



300 amino asitten oluşan enzimin, karboksil ucundaki FAD içeren hidrofilik peptidi sitosolde bulunmaktadır (Spatz ve Strittmatter 1973; Ozols ve Ark 1985). 36 amino asitten oluşan hidrofobik peptit parçası ise enzimin endoplazmik retikulum zarına bağlanmasını sağlamaktadır (Mihara ve Sato 1975;

Ozols ve Ark 1984). Enzimin N-terminal amino asiti serbest olmayıp (Kensil ve Ark 1983) miristil (n-tetradekanoik asit) grubuna bağlı olduğu bulunmuştur (Ozols ve Ark. 1984).

Sığır karaciğerinden enzimin tüm amino asit sırası saptanarak monomer mol kütlesi (FAD grubu hariç) 34 110 olarak bulunmuştur (Ozols ve Ark, 1985). Enzimin polimerik formu ise yaklaşık 400 000 civarındadır (Mihara ve Sato, 1975).

NADH-Sitokrom b₅ redüktaz'ın aminoasit sırasının bulunmasından sonra yapılan çalışmalarda enzimin ikincil yapısı incelenmiş ve yapısal olarak % 25 α -helix, % 30 β - tabakaları içerdii bulunmuştur (Ozols ve Ark, 1985).

Enzimin aktif bölgesindeki fonksiyonel amino asit gruplarının saptanması için yapılan çalışmalardan, enzimde flavin grubunun enzime bağlanması için gerekli bir tirozin kalıntısının bulunduğu kanıtlanmıştır (Strittmatter, 1961). Enzimin katalitik aktivitesi içinde üç çeşit lizin kalıntısı olduğu saptanmıştır. Lizinlerden biri enzimin NADH'ye bağlanmasında, ikincisi enzimin doğal elektron alıcısı olarak sitokrom b₅ ile iletişimini sağlamada, diğerinin ise enzimin stabil haloenzim yapısını sağlaması için gerekli olduğu bulunmuştur. Enzimin ayrıca dört sistin kalıntısı olduğu belirlenmiştir. Ancak bu sistin kalıntılarında sadece bir tanesinin, 283. sistin'in NADH'ye bağlanmada kullanıldığı saptanmıştır (Hacket ve Ark, 1986).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sadece sığır karaciğer dokusundan tam olarak karakterize edilen (Ozols ve Ark, 1985) enzim, sıçan (Takeuse ve Omura, 1970), domuz (İyanagi ve Ark, 1984) ve tavşan (Mihara ve Sato, 1975) gibi hayvanların karaciğer dokularından da saflaştırılarak kısmen karakterize edilmiştir.

Karaciğer dokusu dışında diğer dokularla yapılan çalışmalarda, mide de aynı tip enzimin bulunduğu saptanmıştır. Domuz mide mikrozomlarından kısmen saflaştırılan enzimin aktivitesinin karaciğer enzimine oranla düşük olduğu, ancak pH optimum değerlerinin karaciğer enzimi ile aynı olduğu gösterilmiştir (Ghesquier ve Ark., 1985).

Sığır beyininde de enzimin NH₂-terminal sırası tespit edilerek karaciğer enzimi ile karşılaştırıldığında karaciğer enziminin, beyin enziminin NH₂-terminalindeki üçüncü arjinin veya dördüncü serin ile başladığı diğer amino asit sıralarının ise benzer olduğu bulunmuştur (Tamura ve Ark, 1987).

NADH sitokrom b₅ redüktaz, koyun akciğer mikrozomlarından da saflaştırılmış ve kısmen karakterize edilerek karaciğer enzimine benzediği bulunmuştur. Ancak karaciğer enziminden farklı olarak daha dayanıksız bir yapıya sahip olduğu kanıtlanmıştır (Güray ve Arınç, 1990).

Enzimin, endoplasmik retikulum zarından başka, sıçan karaciğer mitokondrisinin dış zarında (Sottocasa ve Ark, 1967), insan eritrositlerinde (Yubisui ve Ark, 1986; Tamura ve Ark, 1987) ve nötrofillerinde de (Tauber ve Ark, 1985) bulunduğu saptanmıştır.

1.3. SİTOKROM b₅

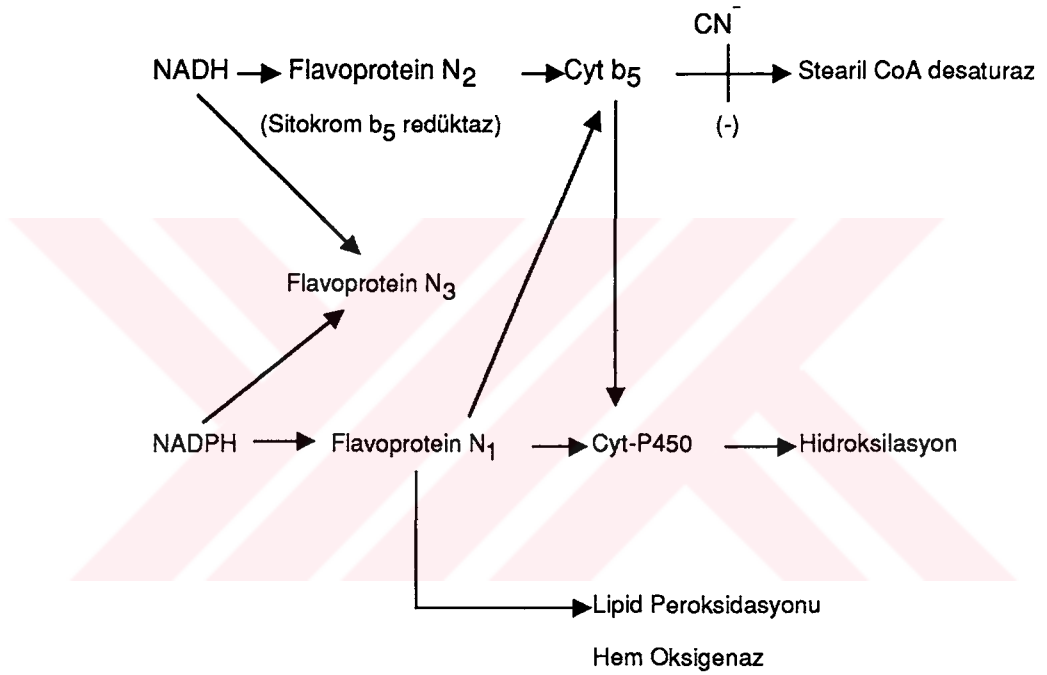
Sitokrom b₅, endoplazmik retikulum zarına sıkı bağlı, 133 amino asit içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşmuş amfipatik bir proteindir (MA: 16500). Protein, COOH-ucunda yaklaşık 40 amino asitli ve molekülün membrana bağlanmasını sağlayan hidrofobik bölge ile NH₂ ucunda 80 amino asitli ve hem'e kovalent olarak bağlı hidrofilik bölge içerir. N-Terminal amino grubu asetil grup ile bloke edilmiştir. Sitokrom b₅'in bu iki bölgesi ılımlı proteolizle birbirinden ayrılabilir. Üç boyutlu yapı, 2 histidin artığının azot atomlarına hem demirinin eksensel olarak ayarlandığını göstermektedir. Aynı koordinasyon sitokrom b'de de vardır (Smith ve Ark, 1985; Arınç, 1993).

Sitokrom b₅'in membran bağlı kısmının amino asit dizisi yapılan çeşitli çalışmalarla domuz, at, rat, dana, tavşan, tavuk gibi hayvanların dokularında ve insan eritrositlerinde saptanmıştır (Ozols, 1989).

Sitokrom b₅'in amino asit sırasının bulunmasından sonra yapılan çalışmalarda proteinin ikincil yapısı incelenmiştir. Yapısal olarak, hidrofobik bölgenin büyük bir bölümünün α -heliks yapısında (% 43 α -heliks, % 33 β -tabakası)

olduğu, hidrofilik bölge ise helikal olduğu halde hepsinin α - heliks olmadığı (% 25 α -heliks, % 35 3_{10} heliks, % 26 β tabakaları) saptanmıştır (Holloway ve Mantsch, 1989) .

Elektronlar sitokrom b_5 'e NADH ve NADPH'tan değişik redüktazlarla aktarılabilir. Şekil 2'de karaciğer mikrozomal sitokrom b_5 yoluyla elektron akışı gösterilmiştir (Menteş ve Ersöz, 1993).



Şekil - 2 Mikrozomlar içinde elektron taşınım zinciri

Sitokrom b_5 'e doğal elektron verici NADH-sitokrom b_5 redüktazdır. Sitokrom b_5 için elektron alıcı, demir atomu içeren, membrana sıkı bağlı bir oksidaz olan Stearyl-CoA desaturazdır.

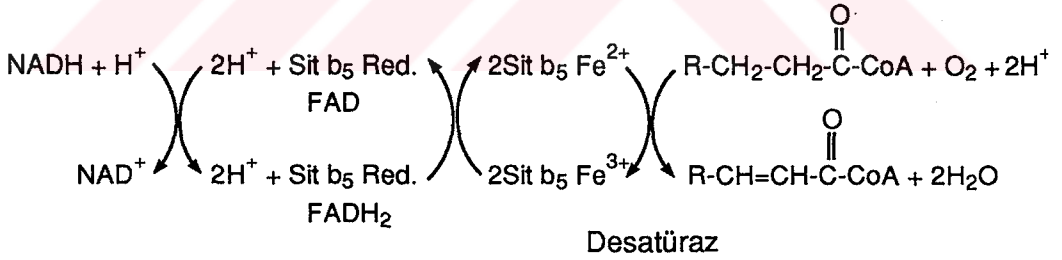
Ayrıca sitokrom b_5 , NADPH sitokrom P450 redüktazdan aldığı elektronları sitokrom P450'in bazı izoenzimlerine aktarmaktadır (Jansson ve Ark, 1985).

Sitokrom b_5 ile yapılan çalışmalar, NADH - sitokrom b_5 redüktaz ve sitokrom b_5 ilişkisine açıklık getirmiştir. Sitokrom b_5 üzerindeki glutamik asit grupları (Glu 47, Glu 48, Glu 52 ve Glu 60), sitokrom b_5 redüktazdaki 3 Lizin'in

(Lizin 41, 125 ve 163) ϵ - amino gruplarına bağlanmakta rol oynamaktadır (Strittmater ve Ark, 1990). Daha önce yapılan bir çalışmada enzimlerin glutamik asit ile lizin grupları arasında amid bağı ile oluşturulan kompleksin yapısı incelenmiştir. Bu komplekste enzimlerin yüzeyde, yan yana toplandıkları saptanmış ve aynı serbest protein elektron transferi sırasında yaptıkları türde bir protein-protein etkileşimi ile elektron transferi yaptıkları gözlenmiştir (Hackett ve Strittmatter, 1984).

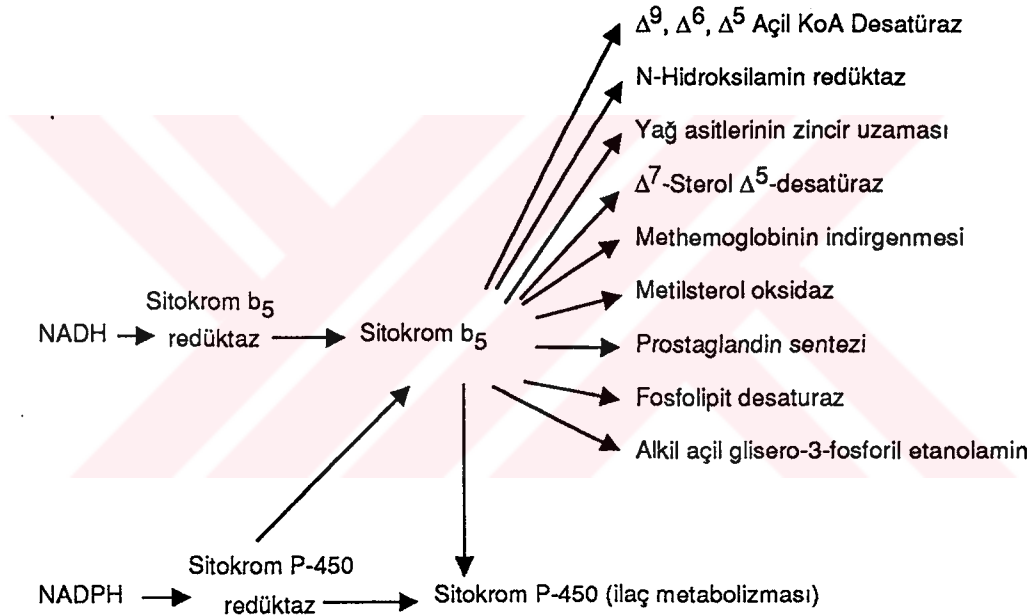
1.4. NADH-SİTOKROM b_5 REDÜKTAZ ve SİTOKROM b_5 'İN FİZYOLOJİK ÖNEMİ

Sitokrom b_5 redüktaz ve sitokrom b_5 , desatüraz ile birlikte Açıl KoA Desatüraz enzim sisteminin üyesidirler (Holloway ve Wakil, 1970; Oshino ve Ark, 1971). Sistemin en önemli görevi yağ asitlerinin desatürasyonudur. Sistemin $\Delta 9$, $\Delta 6$ ve $\Delta 5$ -Açıl KoA desatüraz ile $\Delta 7$ -sterol $\Delta 5$ -desatüraz enzimlerine katıldığı kanıtlanmıştır (Holloway, 1970, 1971; Oshino ve Ark, 1971).



Mikrozomal elektron taşıyıcı sistemin desatürasyon haricinde diğer lipid metabolizması tepkimeleri olan ; yağ asidi zincir uzaması, N-Hidroksilaminlerin indirgenmesi (Keyes ve Ark, 1979), kolesterol (Reddy ve Ark, 1977; Grinstead ve Gaylor, 1982), plazmalojen (Wykle ve Ark, 1972) ve prostaglandin biyosentezi (Vatsis ve Ark, 1982) ile eritrositlerde methemoglobinin indirgenmesini (Yubisui ve Ark, 1986) katalizlediği gösterilmiştir. Bu sistem, ayrıca Şekil 3'de görüldüğü gibi pek çok metabolik yolda önemli fizyolojik rol oynamasının yanısıra

ayrıca bazı sitokrom P-450 bağımlı hidroksilasyon tepkimelerinde gerekli ikinci elektronuda sağlamaktadır (Hildebrandt ve Estabrook, 1971; Peterson ve Prough, 1986). Son yıllarda sitokrom b₅'in sitokrom P-450 redüktaz enzimi gibi etki ettiği ve bu etkinin kullanılan substratlara dolayısıyla ilaç metabolizmasında rol oynayan bazı sitokrom P-450 izozimlerine özgün olduğu bulunmuştur (İmai, 1981, Jansson ve Ark., 1985)



Şekil-3 Mikrozomlardaki sitokrom b₅ bağımlı elektron taşıyıcı sistemin yer aldığı metabolik yollar (Arınç, E., 1991).

NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın ve sitokrom b₅'in desatürasyon veya sitokrom P-450 bağımlı reaksiyonlarda görev alabilmeleri için , zara bağlı amfi-patik yapıda olmaları gerekmektedir. Hem enzimin hem de sitokrom b₅'in hidro-fobik peptid parçaları bu tip tepkimeleri katalize etmeleri için gereklidir (Spatz ve Strittmatter, 1973; Mihara ve Sato, 1975).

2.YÖNTEM ve TEKNİKLER

2.1. Deneyin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarında Eylül 1992-Eylül 1994 tarihleri arasında yapılmıştır.

2.2 Kullanılan Maddeler ve Gereçler

Deneyde kullanılan DEAE-Selüloz, Sephadex G-100, Tripsin (sığır pankreasından EC 3.4.21.4), Redükte β -Nikotinamidadeninükleotid (NADH), sığır serum Albumini (BSA), Comassie Blue (CB-6250) ve Dietilnitrozamin (DE-NA) Sigma firmasından, diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup Merck firmasından sağlandı.

Çalışmalarda kullanılan Rattus Norvegicus (Wistear Albino) türü sıçanlar, Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlandı.

Deneylerde, doku homojenizasyon işleminde B.Braun Potter Elvehjen doku homojenizatörü, çöktürme işlemlerinde Beckman L-5-70 Ultrasantrifüj ile Beckman J.2.21 Soğutmalı santrifüj kullanıldı. Enzim aktivite ölçümlerinde ve spektrum analizlerinde ise Hitachi Model 220 spektrofotometre kullanıldı.

2.3. NADH-SİTOKROM b₅ REDÜKTAZ'IN SAFLAŞTIRILMASI

Sıçan karaciğeri NADH-sitokrom b₅ redüktaz enzimi Takesue ve Omura'nın (1970) yöntemine göre saflaştırılmıştır.

2.3.1. Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması

Ortalama ağırlıkları 120 g olan erkek sıçanlar, boyunları kırılarak öldürüldü. Çıkarılan karaciğerler (170 g), soğuk 0.25 M sukroz ile yıkandı. Karaciğer ağırlığının dört katı hacimdeki 1 mM EDTA (pH: 7.5) içeren 0.25 M sukroz çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenat 7 000 g 'de 10 dakika santrifüjlendi. Dökeltinin 78 000 g'de 90 dakika santrifüjlenmesi ile lizozom ve mikrozomlar

çöktürüldü. Çökelti, orjinal hacminin yarısı olacak şekilde 1 mM EDTA (pH: 7.5) içeren 0.15 M KCl ile bir kez yıkandı. Lizozom-mikrozom fraksiyonu, 1 gram karaciğere 0.3 mL çözelti olacak şekilde 1 mM EDTA içeren Tris-malat tamponu (pH: 5.7) içinde süspanse edildi.

2.3.2. NADH - Sitokrom b₅ Redüktaz'ın Çözünürleştirilmesi

Birinci basamakta elde edilen lizozom - mikrozom fraksiyonuna antiseptik olarak penisilin (10 U mL⁻¹) ile streptomisin (10 µg mL⁻¹) eklenerek, fraksiyon 37°C de 6 saat hafif çalkalanarak inkübe edildi. Süspansiyon 78 000 g' de 90 dakika santrifüjlendi ve dökelti 1 N NaOH ile pH: 7'de nötralize edildi.

2.3.3. Amonyum Sülfat ile Fraksiyonlama

Amonyum sülfatın % 50 doygunluğa ulaşmasıyla oluşan çökelti santrifüjle ayrıldıktan sonra, dökelti amonyum sülfat ile % 75 doygunluğa getirildi. 1 N NaOH eklenmesi ile çözelti pH'ı yaklaşık 7 civarında tutuldu. 8 000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek oluşan çökelti, pH'ı 8.5 olan 30 mL 20 mM Tris-HCl'de çözüldü.

2.3.4. Sephadex G-100 Jel Filtrasyonu

Enzim çözeltisi 20 mM Tris - HCl tamponu (pH: 8.5) ile dengelenmiş Sephadex G-100 kolonuna (2,5x40 cm) uygulandı. Kolon, aynı tampon ile akış hızı saatte 60 mL olacak şekilde yıkandı. Toplanan 5 mL'lik fraksiyonlarda protein ve enzim aktivitesi saptandı.

2.3.5. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Sephadex kolonundan elde edilen yüksek enzim aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirilerek 20mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.5) ile dengelenmiş DEAE-Selüloz kolonuna (2,5x18 cm) uygulandı. Kolon 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.5) ile yıkandıktan sonra 75 mL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.5) ve 0.1 M KCl içeren 75 mL aynı tampon ile doğrusal gradient oluşturuldu. Toplanan 4 mL'lik fraksiyonlarda protein ve enzim aktivitesi saptandı. Yüksek enzim aktivitesi içeren sarı renkli fraksiyonlar toplanarak, diyaliz torbasına dolduruldu.

Diyaliz torbası içindeki enzim çözeltisi, buzdolabında katı Sephadex içinde deriştirildi. Derişik enzim çözeltisi daha sonra 1 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna (pH: 7.5) karşı bir gece diyaliz edildi. Diyaliz edilmiş enzim çözeltisi, küçük hacimlerde tüplere yerleştirilerek -20°C de saklandı.

2.4. NADH-SİTOKROM b₅ REDÜKTAZ AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

NADH-sitokrom b₅ redüktaz aktivitesi, spektrofotometrik yöntemle, gerek sentetik elektron alıcısı ferrisiyanit ve gerekse doğal elektron alıcısı sitokrom b₅'in indirgenme hızına göre saptandı. Enzimin aktivite ölçümlerinde ferrisiyanit kullanıldığında enzime NADH-ferrisiyanit redüktaz adı da verilmektedir.

2.4.1. Ferrisiyanit ile Saptanan Enzim Aktivitesi (NADH-Ferrisiyanit Redüktaz Aktivitesi)

Tepkime ortamı, 1.5 mL'lık küvet içinde 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH: 7.5), 2.25×10^{-4} M NADH, 1.25×10^{-3} M potasyum ferrisiyanit ve yeterli miktarda enzim çözeltisi içermektedir. Enzim tepkimesi NADH eklenmesi ile başlatıldı ve 1 dakika aralıklarla 420 nm'deki absorbans düşüşü, spektrofotometre ile izlendi. Hesaplamalarda, molar soğurum katsayısı olarak $1.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alındı (Strittmatter ve Velick, 1957). Potasyum ferrisiyanit, enzim olmadan sadece NADH ile de indirgendiği için, bu değer enzim tepkimesinden çıkartıldı.

1 ünite redüktaz aktivitesi, yukarıda verilen koşullarda, 1 µmol potasyum ferrisiyaniti, 1 dakikada indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.4.2. Sitokrom b₅ ile Saptanan Enzim Aktivitesi

Tepkime ortamı, 1.5 mL'lik küvet içinde 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH: 6.8), 0.168 mM NADH, 1.5 nmol sitokrom b₅ ve yeterli miktarda enzim çözeltisi içermektedir. Tepkime, 423 nm'deki absorbans artışı ile izlendi ve aktivite hesaplarında molar soğurum katsayısı olarak $100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanıldı (Strittmatter ve Velick, 1957).

1 ünite redüktaz aktivitesi, yukarıda verilen koşullarda, 1 nmol sitokrom b₅'i 1 dakikada indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.5. SİTOKROM b₅'İN SAFLAŞTIRILMASI

NADH-sitokrom b₅ redüktaz aktivitesinin saptanması için gerekli olan sitokrom b₅, Omura ve Takesue (1970)'nin yöntemi ile saflaştırılmıştır.

2.5.1. Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması

Sığırcılar boyunları kırılarak öldürüldü ve çıkarılan karaciğerler (120 g), soğuk 0.15 M KCl ile yıkandı. Karaciğerler, ağırlığının 4 katı 0.15 M KCl ile homojenizatörde 4 vuruşta homojenize edilerek homojenat 10 000 g 'de 15 dakika santrifüjlendi. Dökeltinin 78 000 g 'de 90 dakika santrifüjlenmesi ile mikrozomlar çöktürüldü. Mikrozomal çökelti hafif homojenizasyon ile 10 mM EDTA içeren (pH: 7) 100 mL 0.15 M KCl ile karıştırılıp 78 000 g 'de 60 dakika santrifüjlendi. Buradan elde edilen çökelti 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.5) ile karıştırılıp aynı şekilde çöktürüldü. Son çökelti 50 mL 0.1 M fosfat tamponu ile karıştırıldı ve bu yıkanmış mikrozomlarda protein ve sitokrom b₅ miktarları saptandı.

2.5.2. Tripsin Parçalaması

Yıkanmış mikrozoma, 1/10 oranında 2 mM HCl'de hazırlanan tripsin çözeltisi (3 mg mL⁻¹) eklendi. Karışım 0°C de 16 saat bekletilerek 78 000 g 'de 120 dakika santrifüjlendi. Dökeltide protein ve sitokrom b₅ miktarları saptandı.

2.5.3. Sephadex G-100 Kolon Kromatografisi

Dökeltiye, 15 mL 10 mM fosfat tampon (pH: 7.5) eklendi. Bu çözelti aynı tamponla dengeye getirilmiş Sephadex G-100 (2,5x40 cm) kolonundan 30 mL saat⁻¹ akış hızıyla geçirildi. Toplanan 6 mL'lik fraksiyonlarda protein ve sitokrom b₅ miktarı saptanarak sitokrom b₅'ce zengin fraksiyonlar birleştirildi.

2.5.4. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Sitokrom b₅'ce zengin fraksiyon karışımı, 10 mM fosfat tamponuyla (pH: 7.5) dengelenmiş ve basınç uygulanarak paketlenirilmiş DEAE-Selüloz kolonuna (2,5x18 cm) uygulandı. Sitokrom b₅ kolonun üst kısmında koyu kırmızı bir bant oluşturdu. Kolon aynı pH'ta 25 mL 50 mM fosfat tampon ile yıkandı. Daha sonra kolona 0.35 M KCl içeren 100 mL 50 mM fosfat tamponu ile 100 mL 50 mM fosfat tamponuyla hazırlanmış tuz gradienti uygulandı. Akış hızı saat de 30 mL olacak şekilde ayarlanarak 4 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Sitokrom b₅'ce zengin fraksiyonlar birleştirildi ve 0.2 mL damıtık su eklendikten sonra 10 mM fosfat tamponuyla dengelenmiş DEAE-Selüloz kolonuna (2x3 cm) uygulandı. Kolonun üst kısmında sitokrom b₅'ten dolayı kırmızı dar bir bant oluştu. Daha sonra kolon 20 mL 10 mM fosfat tampon ile yıkandı. Sitokrom b₅, 0.2 M KCl içeren 50 mM fosfat tamponu ile kolondan alınarak 10 mM fosfat tamponuna (pH: 7.5) karşı 12 saat diyalizlendi.

2.5.5. Saflaştırılan Sitokrom b₅ 'in Spektral Özellikleri ve Miktarının Saptanması

Mikrozom ve tripsin ile çözünürleştirilmiş dökeltideki sitokrom b₅ içeriği, indirgenmiş ve yükseltgenmiş örneklerin spektrumundan 424-409 nm dalga boyunda molar soğurum katsayısı $185 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ alınarak saptandı. Tripsinde çözüldürülmüş dökelti ditiyonit ile indirgendi. Sephadex kromatografisinden sonra sitokrom b₅ miktarı ditiyonit ile indirgenmiş örneklerin 423 nm'deki soğurumu ölçülerek hesaplandı. Molar soğurum katsayısı olarak $171 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ alındı.

2.6. PROTEİN MİKTARININ SAPTANMASI

60 mg Comassie Brilliant Blue G-250 [C.I. Nr. 42655] 1 L % 3'lük perklorik asitte çözüldü. Değişik derişimlerde bir seri albümin çözeltisi hazırlandı. 1 mL boya ile 1 mL albümin karıştırılarak 595 nm'de ışın soğurumu ölçüldü. Aynı işlemler enzim çözeltileri ile tekrarlanarak standart çalışma grafiği yardımı ile protein derişimi saptandı (Scopes, 1984).

2.7. ENZİM-DENA ETKİLEŞİMLERİ

2.7.1. NADH-Sitokrom b₅ Redüktaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Ferrisiyanit'in indirgenme hızına göre saptanan enzim aktivite ölçümleri, 25, 30, 35, 37, 39 ve 40°C sıcaklıklarda yapılarak deney ortamı için en uygun sıcaklık saptandı.

2.7.2. DENA Derişiminin Ferrisiyanit ile Ölçülen Enzim Aktivitesine Etkisi

Deney ortamındaki 3.1×10^{-4} M, 4.7×10^{-4} M ve 6.2×10^{-4} M DENA, NADH-sitokrom b₅ redüktaz ile eşit hacimlerde karıştırılarak 37°C de inkübe edildi. 5,10,15 ve 20. dakikalarda ferrisiyanit yöntemi ile enzim aktivitesi ölçülerek zamana karşı inhibisyon saptandı.

2.0×10^{-4} M, 3.0×10^{-4} M, 4.0×10^{-4} M, 5.0×10^{-4} M, 10.0×10^{-4} M ve 12.5×10^{-4} M Ferrisiyanit çözeltileri hazırlanarak değişen substrat miktarına göre aktivite ölçümü yapıldı. Aynı substrat derişimlerinin bulunduğu deney ortamına 3.1×10^{-4} M, 4.7×10^{-4} M, 6.2×10^{-4} M ve 7.8×10^{-4} M DENA çözeltileri eklenecek enzim aktivitesine etkileri araştırıldı.

2.7.3. DENA Derişiminin Sitokrom b₅ ile Ölçülen Enzim Aktivitesine Etkisi

Deney ortamındaki 3.1×10^{-4} M, 4.7×10^{-4} M, ve 6.2×10^{-4} M DENA çözeltileri, NADH-sitokrom b₅ redüktaz ile eşit hacimlerde karıştırılarak 37°C'de 15 dakika inkübe edilmesiyle inhibisyon saptandı.

0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 ve 1.75 nmol sitokrom b₅ içeren deney ortamında, DENA'sız ve 3.1×10^{-4} M, 4.7×10^{-4} M, 6.2×10^{-4} M DENA ilavesi ile enzim aktivite ölçümü yapıldı.

2.7.4. Enzim - DENA Bağlanması'nın İncelenmesi

Tampona karşı ayrı ayrı NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın, Dietilnitrozaminin ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilen enzim-DENA karışımının soğurum grafikleri çizilerek, NADH -sitokrom b₅ redüktaz'a nitrozamin bağlanması araştırıldı.

2.8. DENA İLE SİTOKROM b₅ ETKİLEŞİMİ

DENA'nın NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ın substratı olan sitokrom b₅'e etkisinin olup olmadığını araştırmak için bir dizi çalışmalar yapıldı.

2.8.1. Zamanın Etkisi

Toplam hacim 1 mL olacak şekilde 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) içinde ditiyonitle indirgenmiş 51.66 nmol (mg protein)⁻¹ sitokrom b₅ ve 4x10⁻³M DENA karıştırıldı. Bu örneklerin oda sıcaklığında değişik zaman aralıklarında soğurum spekturumu alındı. 423 ve 413 nm dalga boylarındaki soğurum değişimlerinden indirgenmiş ve yükseltgenmiş yapıdaki sitokrom b₅ miktarları hesaplandı.

2.8.2. DENA Derişiminin Etkisi

91.62 nmol (mg protein)⁻¹ sitokrom b₅, 1.11x10⁻⁴M, 2.16x10⁻⁴M ve 3.17x10⁻⁴ M DENA ile oda sıcaklığında 15 dakika süre ile etkileştirilerek spekturumları alındı. Ayrıca 423 ve 413 nm dalga boylarındaki soğurum değişimleri okunarak indirgenmiş ve yükseltgenmiş sitokrom b₅ miktarları hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Sıçan Karaciğer Mikrozomlarından NADH-Sitokrom b₅ Redüktaz'ın Saflaştırılması

NADH- sitokrom b₅ redüktaz'ın sıçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması sırasında elde edilen fraksiyonlardaki toplam redüktaz miktarı, enzimin özgül aktivitesi, mikrozomlardan başlayarak elde edilen saflaşma katsayısı ve verimi, enzimin iki farklı elektron alıcısı ferrisiyanit ve sitokrom b₅ ile saptanarak Çizelge 1'de gösterilmiştir.

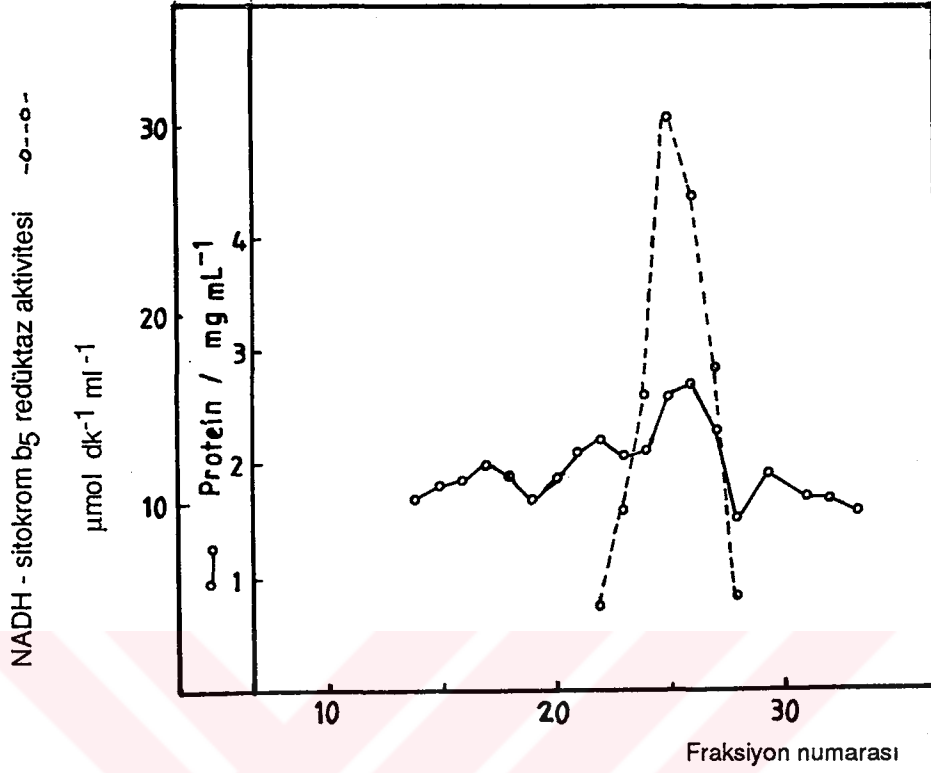
Mikrozomlarda bulunan NADH- sitokrom b₅ redüktaz, lizozomla çözümlenmiş kısımda ferrisiyanit ile %88.3, sitokrom b₅ ile %93.1 verimle elde edilmiştir. NADH-sitokrom b₅ redüktaz amonyum sülfat çöktürmesinde ferrisiyanit ile %69.1, sitokrom b₅ ile %86.4 verimle elde edilirken mikrozomlara göre ise sırasıyla 29.1 ve 35.6 kez saflaştırıldı.

Şekil 4 ve 5'de görülen jel filtrasyonu (Sephadex G-100 kolonu) ve DEAE-Selüloz kromatografisinden elde edilen fraksiyonlarda sadece potasyum ferrisiyanit ile NADH- sitokrom b₅ redüktaz aktivitesine bakıldı. Sephadex G-100 filtrasyonu sonucu enzim aktivitesi içeren fraksiyonlar toplandığında miligram protein başına 367.1 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ enzim içerdiği saptandı. Bu basamakta enzim %62.7 verimle, mikrozomlara göre 122.4 kez saflaştırıldı (Çizelge 1). Sitokrom b₅ ile yapılan aktivite ölçümünden enzimin bu basamakta %71 verimle, mikrozomlara göre 135.6 kez saflaşmış olduğu bulundu.

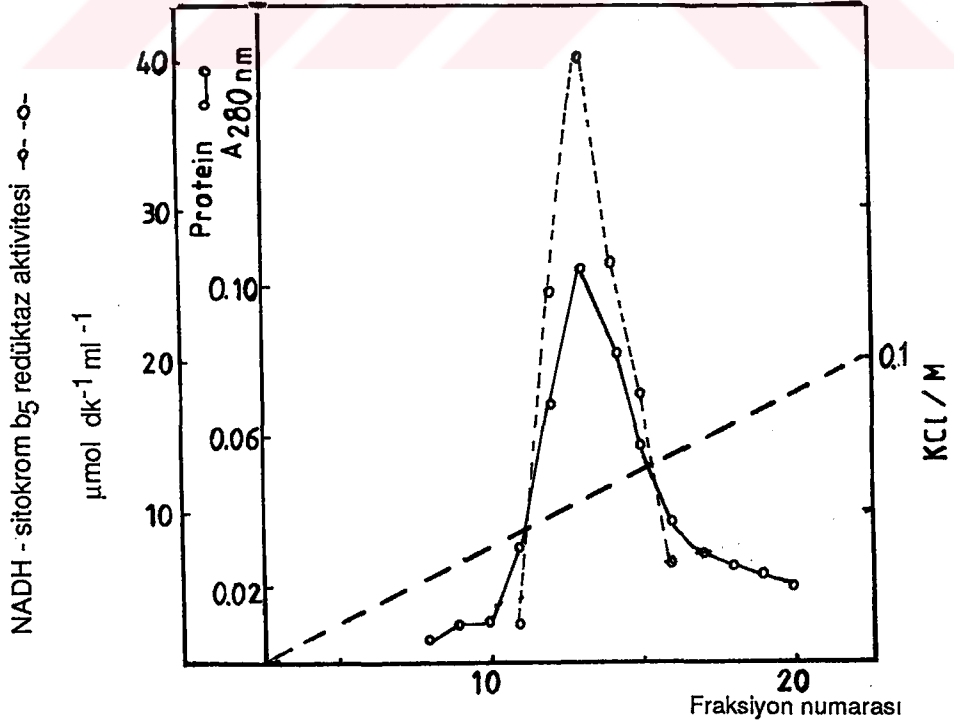
NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ın DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonunda elde edilen profili şekil 5'de görülmektedir. Enzim tuz gradienti ile kolondan sıvri bir tepecik halinde alındı. Katı Sephadex içinde konsantre edilen enzim, diyaliz edildikten sonra Çizelge 1'de görüldüğü gibi elektron alıcısı ferrisiyanit ile mikrozomlara oranla 299.3 kez saflaştırılmış olarak %35.5 verimle elde edildi. Enzim sitokrom b₅ ile mikrozomlara göre 332.2 kez saflaştırılmış ve %40.3 verimle elde edilmiştir. Diyaliz edilen enzim çözeltisi aktivitesini kaybetmeksizin haftalarca -20°C'de saklandı.

Çizelge 1: NADH sitokrom b₅ redüktaz'ın siçan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması

Saflaştırma adımları	Enzim Aktivitesi									
	Toplam		Sitokrom b ₅ ile				Ferrisiyanit ile			
	Protein (mg)	Toplam Aktivite (nmol/dak)	Özgül Aktivite (nmol/dak/mg)	Verim %	Saflaştırma	Toplam Aktivite (μmol/dak)	Özgül Aktivite (μmol/dak/mg)	Verim %	Saflaştırma	
1. Mikrozomlar	1574	1861.5	0.55	100	1	4799.3	3.0	100	1	
2. Lizozomla Çözünür- leştirilmiş Mikrozomlar	210.8	802.2	3.81	93.1	6.9	4237.1	20.1	88.3	6.7	
3. Amonyum Sülfat ile Fraksiyonlama	38	744.6	19.59	86.4	35.6	3314.6	872	69.1	29.1	
4. Sephadex G-100 Kromatografisi	8.2	611.4	74.56	71	135.6	3010.1	367.1	62.7	122.4	
5. DEAE- Selüloz Kromatografisi ve Diyaliz	1.9	347.2	182.7	40.3	332.2	1705.9	897.8	35.5	299.3	

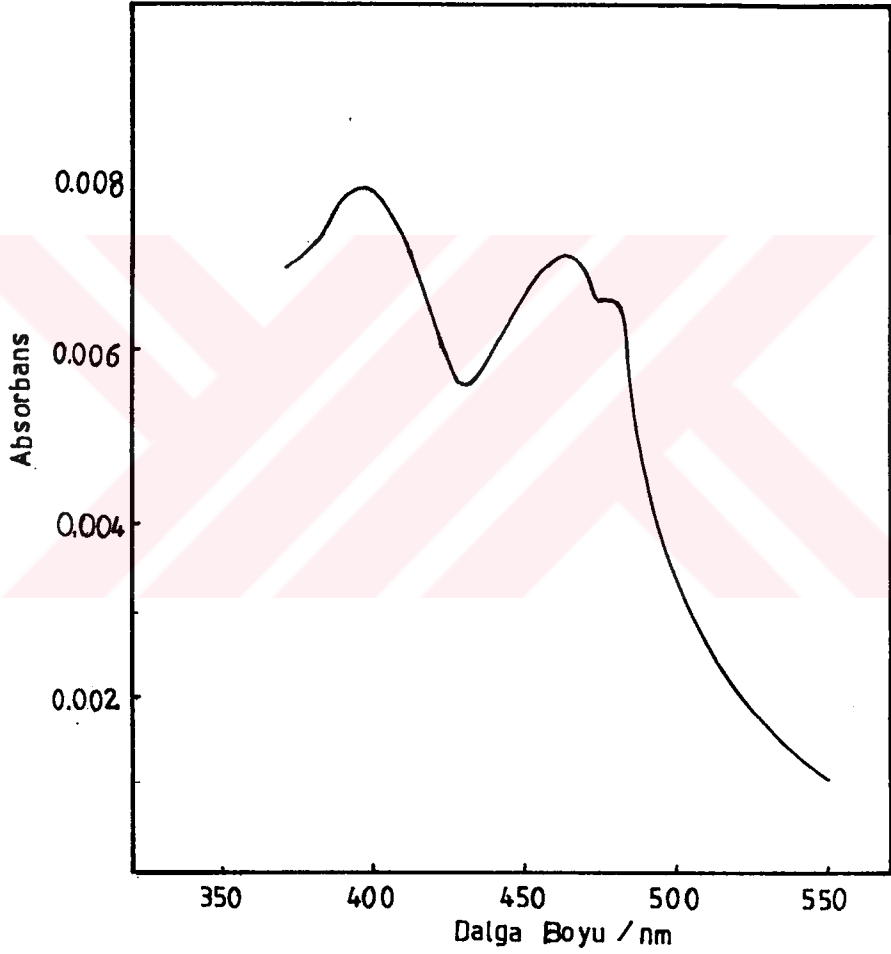


Şekil 4. NADH -sitokrom b₅ redüktaz'ın Sephadex G-100 kolon kromatografisi



Şekil 5. NADH -sitokrom b₅ redüktaz DEAE-Selüloz kolon kromatografisi

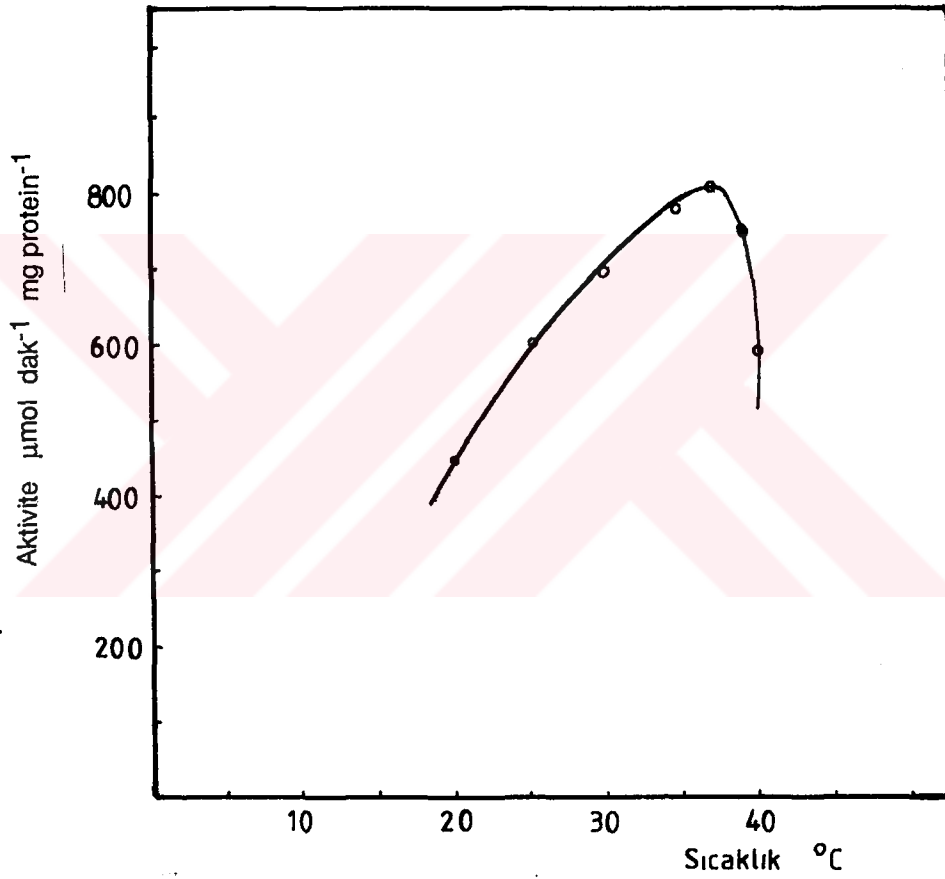
Şekil 6'da saflaştırılmış NADH-sitokrom b_5 redüktaz'ın soğurum spektrumu gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi enzimin, flavin prostetik grubunun 485 nm'deki küçük bir omuzu ile 460 nm ve 390 nm'de iki tepecik içeren bir spektrum verdiği gözlemlendi.



Şekil 6. Saflaştırılan siçan karaciğer NADH-sitokrom b_5 redüktaz'ın soğurum spektrumu

3.2. NADH - Sitokrom b₅ Redüktaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın, NADH -sitokrom b₅ redüktaz aktivitesine etkisini araştırmak için yaptığımız çalışmalar sonucunda, enzimin en fazla aktif olduğu sıcaklığın Şekil 7'de görüldüğü gibi 37°C olduğu gözlemlendi .

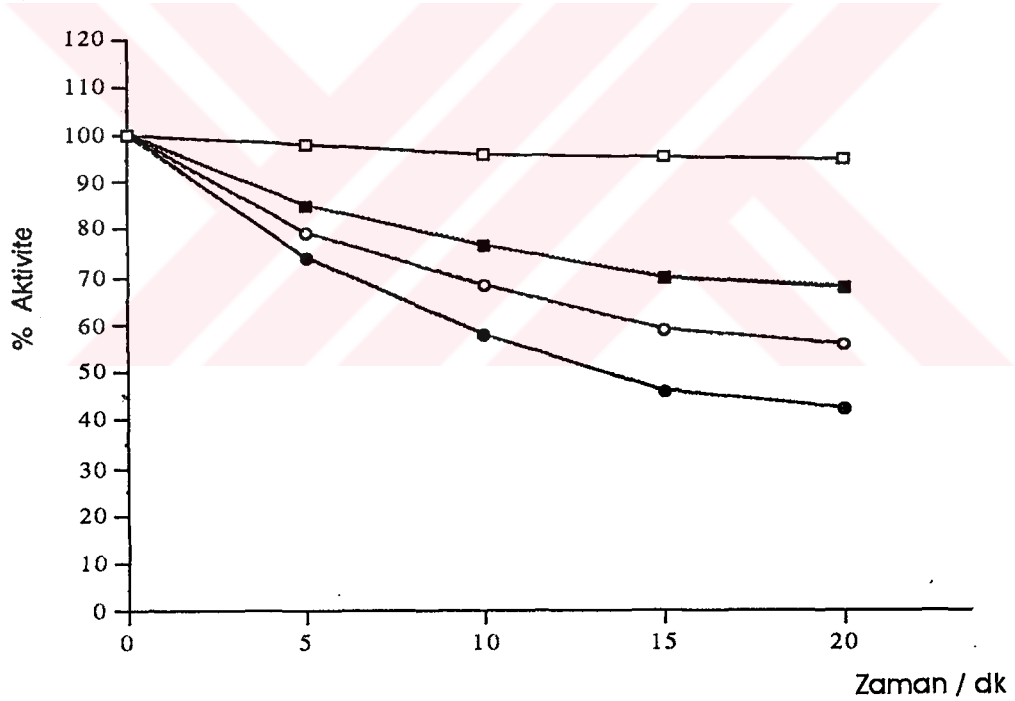


Şekil 7. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi (enzim aktivitesine potasyum ferrisiyanit ile bakıldı)

3.3. NADH-Sitokrom b₅ Redüktaz İle Dietilnitrozaminin Etkileşimi

3.3.1. Etkileşimin Ferrisiyanit Yöntemi İle İncelenmesi

DENA'nın NADH-sitokrom b₅ redüktaz'a etkisi araştırıldı ve inhibisyon saptandı. Farklı derişimlerdeki DENA ile enzimin, 37°C de değişik zaman aralıklarında etkileşimi sonunda inhibisyonun zamanla ve DENA derişimi ile arttığı gözlemlendi (Şekil 8). İlk 15 dakikada aktivite hızla azaldığı için en fazla inhibisyonun 15 dakikada olduğu kabul edildi. Diğer deneyler de enzim ile DENA'nın 37°C de 15 dakika inkübe edilmesiyle yapıldı.



Şekil 8. NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ın DENA ile inhibisyonunda zamanın etkisi

□ Enzim; ■ 3.1x10⁻⁴M DENA; ○ 4.7x10⁻⁴ M DENA; ● 6.2x10⁻⁴M DENA

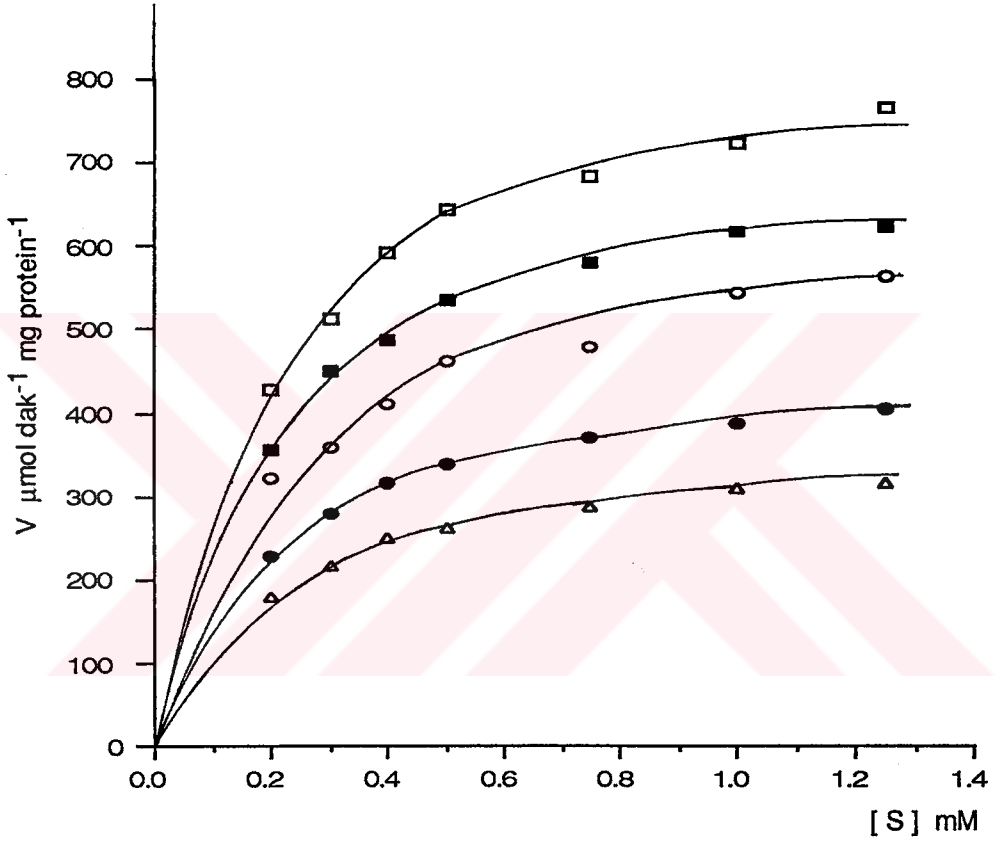
Substrat olarak potasyum ferrisiyanit kullanıldığında NADH-sitokrom b₅ redüktaz için hesaplanan % aktivite ve % inhibisyon değerleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. DENA derişiminin NADH -Sitokrom b₅ Redüktaz aktivitesine etkisi

	%Aktivite	% İnhibisyon
Enzim	100	0.00
3.1x10 ⁻⁴ M DENA	84.6	15.0
4.7x10 ⁻⁴ M DENA	71.9	28.1
6.2x10 ⁻⁴ M DENA	53.3	46.7
6.6x10 ⁻⁴ M DENA	50.0	50.0
7.8x10 ⁻⁴ M DENA	41.5	58.5

Çizelge 2'de görüldüğü gibi enzimin inhibisyonu, DENA derişiminin artması ile artmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda ise NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ı % 50 inhibe eden DENA derişimi [I₅₀] 6.6x10⁻⁴ M olarak saptandı.

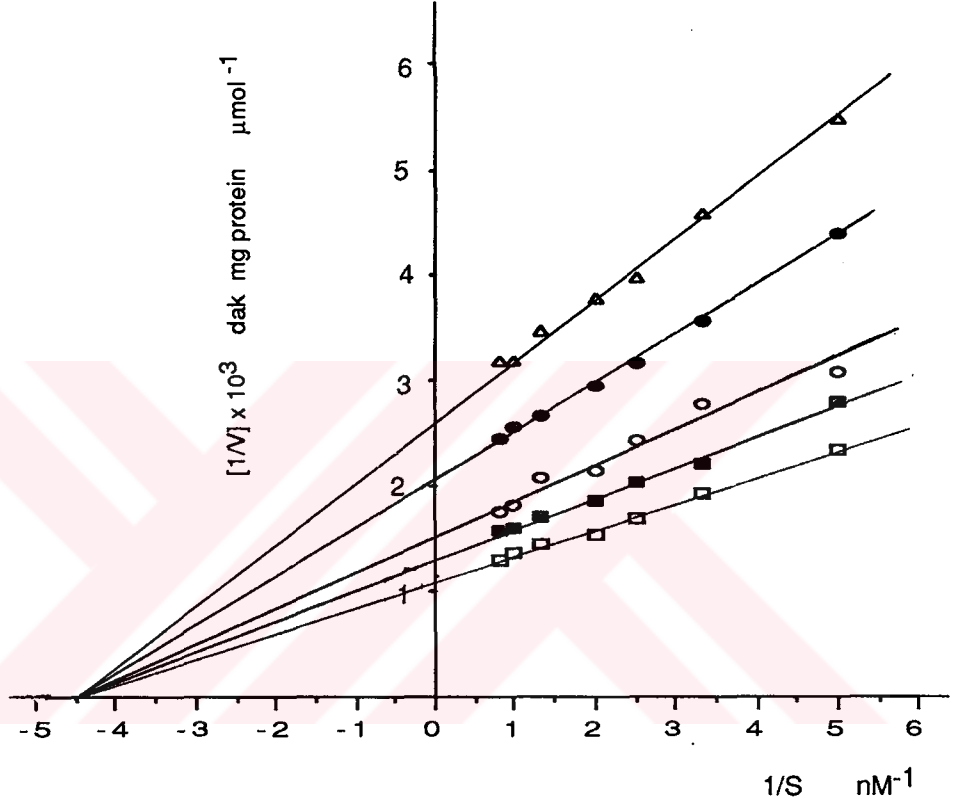
NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın, potasyum ferrisiyanit için substrat doymuşluk eğrisi çalışıldı ve Şekil 9'da görüldüğü gibi artan substrat derişimi ile hızın artması sonucu enzimin Michaelis Menten Kinetiğine uyduğu bulundu.



Şekil 9. NADH-sitokrom b_5 redüktaz için Michaelis Menten eğrisi

- Enzim için substrat (Ferrisiyanit) doymuşluk eğrisi;
- 3.1×10^{-4} M DENA; ○ 4.7×10^{-4} M DENA; ● 6.2×10^{-4} M DENA
- △ 7.8×10^{-4} M DENA

Bu çalışma için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 10) ve bu grafikten bulunan K_m ve V_{max} değerleri Çizelge 3'de gösterildi.



Şekil 10. NADH-sitokrom b_5 redüktaz enziminin DENA ile etkileşiminde Lineweaver - Burk grafiği.

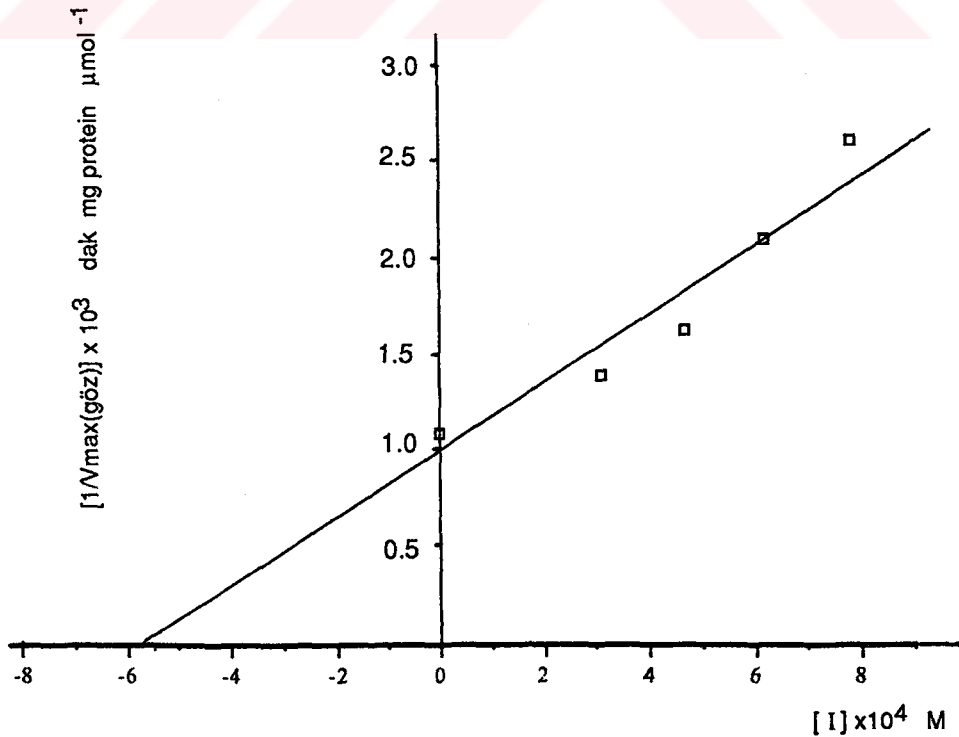
□ Enzim, ■ 3.1×10^{-4} M DENA, ○ 4.7×10^{-4} M DENA,

● 6.2×10^{-4} M DENA Δ 7.8×10^{-4} M DENA

Çizelge 3 . NADH -sitokrom b₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde
Km ve Vmax değerleri

Enzim	Km (mM)	Vmax μmol (dk mg protein) ⁻¹
Enzim	0.221	899.78
3.1x10 ⁻⁴ M DENA	0.222	761.26
4.7x10 ⁻⁴ M DENA	0.215	645.55
6.2x10 ⁻⁴ M DENA	0.219	480.03
7.8x10 ⁻⁴ M DENA	0.213	373.73

Çizelge 3'de görüldüğü gibi yapılan çalışmalar sonunda Km 'in sabit, Vmax 'ın artan DENA derişimi ile azaldığı bulunmuştur. Bu bulgulardan NADH-sitokrom b₅ redüktaz enziminin DENA tarafından nonkompetitif olarak inhibe edildiği saptanmıştır. Nonkompetitif inhibisyon için 1/Vmax (gözlenen) değerleri inhibitör derişimine karşı "En Küçük Kareler Yöntemi" ile grafiğe geçirildiğinde I₅₀ derişimi (K_i) 5.8x10⁻⁴ M olarak bulundu (Şekil 11).



Şekil 11. DENA derişimine karşı 1/Vmax (gözlenen) grafiği

3.3.2 Etkileşimin Sitokrom b₅ Yöntemi İle İncelenmesi

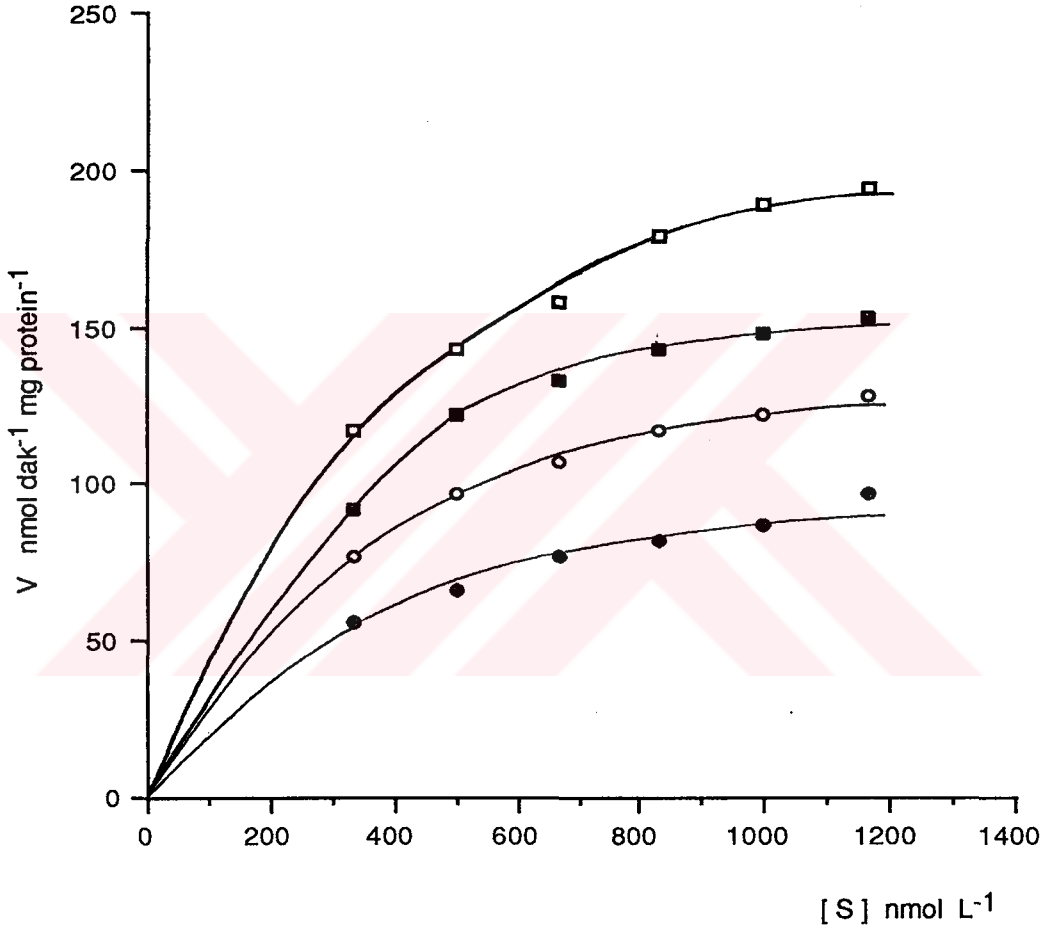
Dietilnitrozamin'in NADH-sitokrom b₅ redüktaz'a etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda, enzim DENA ile 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Enzim substratı olarak sitokrom b₅ kullanıldığında NADH - sitokrom b₅ redüktaz için hesaplanan % aktivite ve % inhibisyon değerleri Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4 . DENA derişiminin NADH -Sitokrom b₅ Redüktaz Aktivitesine Etkisi

	% Aktivite	% İnhibisyon
Enzim	100	000
3.1x10 ⁻⁴ M DENA	82.1	17.9
4.7x10 ⁻⁴ M DENA	67.0	33.0
5.7x10 ⁻⁴ M DENA	50.0	50.0
6.2x10 ⁻⁴ M DENA	47.6	52.4

Çizelge 4'de görüldüğü gibi artan DENA derişimi ile enziminin aktivitesinin azaldığı, inhibisyonunun ise arttığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonunda NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ı % 50 inhibe eden DENA derişimi (I₅₀) 5.7x10⁻⁴M olarak saptandı.

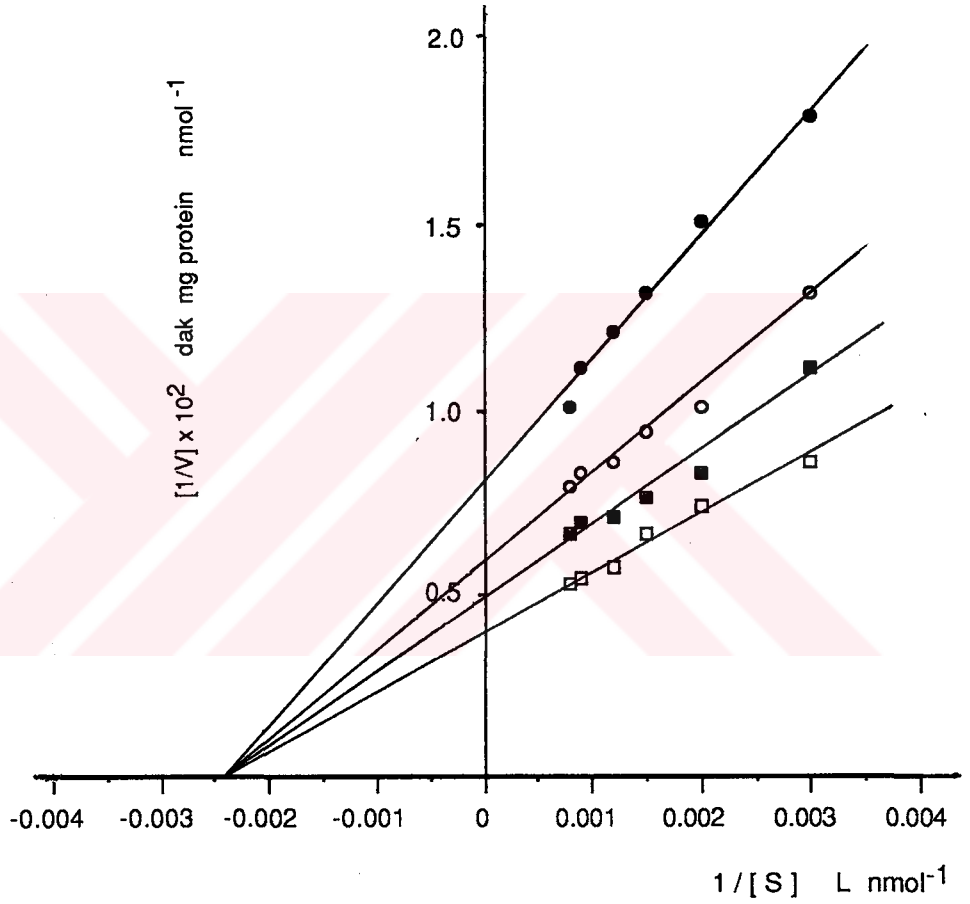
NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın, sitokrom b₅ için substrat doymuşluk eğrisi çalışıldı. Şekil 12'de görüldüğü gibi NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın substratı olan sitokrom b₅'in derişimi artırıldığında hızın hiperbolik olarak arttığı ve enzimin Michaels Menten Kinetiğine uyduğu bulundu.



Şekil 12. NADH-sitokrom b₅ redüktaz için Michaelis Menten eğrisi

- Enzim için substrat (sitokrom b₅) doymuşluk eğrisi,
- 3.1x10⁻⁴ M DENA, ○ 4.7x10⁻⁴ M DENA, ● 6.2x10⁻⁴ M DENA

Bu çalışma için Lineweaver - Burk grafiği çizildi (Şekil 13). Bu grafikten bulunan K_m ve V_{max} değerleri çizelge 5'de gösterildi.



Şekil 13. NADH-sitokrom b_5 redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde

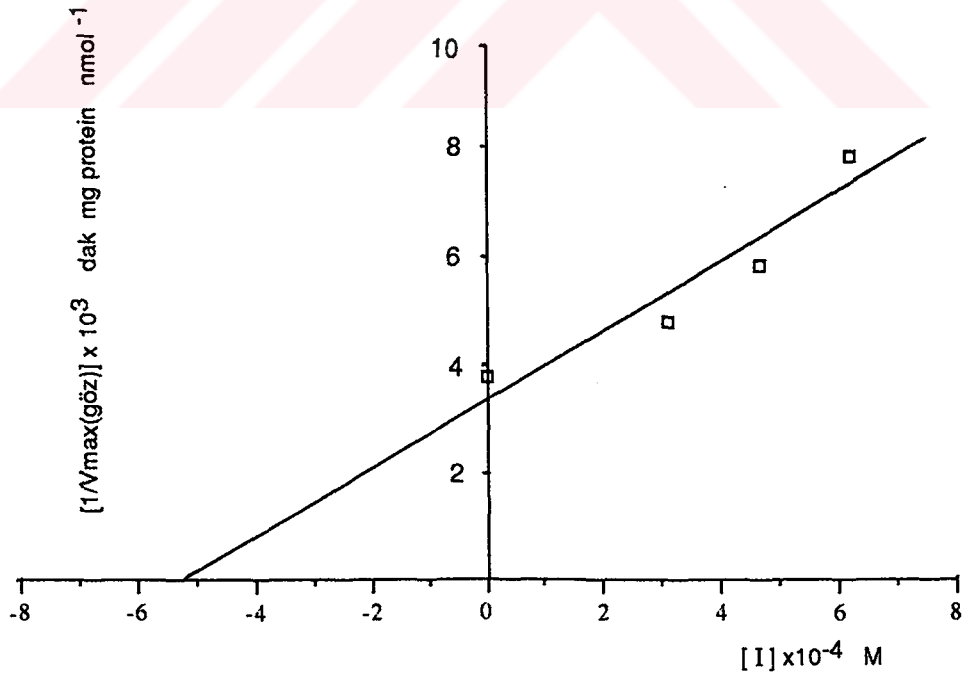
Lineweaver - Burk grafiği.

- Enzim, ■ 3.1×10^{-4} M DENA, ○ 4.7×10^{-4} M DENA,
● 6.2×10^{-4} M DENA

Çizelge 5 . NADH -Sitokrom b₅ redüktaz'ın DENA ile etkileşiminde Km ve Vmax değerleri

	Km (nmol L ⁻¹)	Vmax nmol (dk mg protein) ⁻¹
Enzim	426.27	262.57
3.1x10 ⁻⁴ M DENA	429.08	215.46
4.7x10 ⁻⁴ M DENA	426.12	175.97
6.2x10 ⁻⁴ M DENA	425.80	125.07

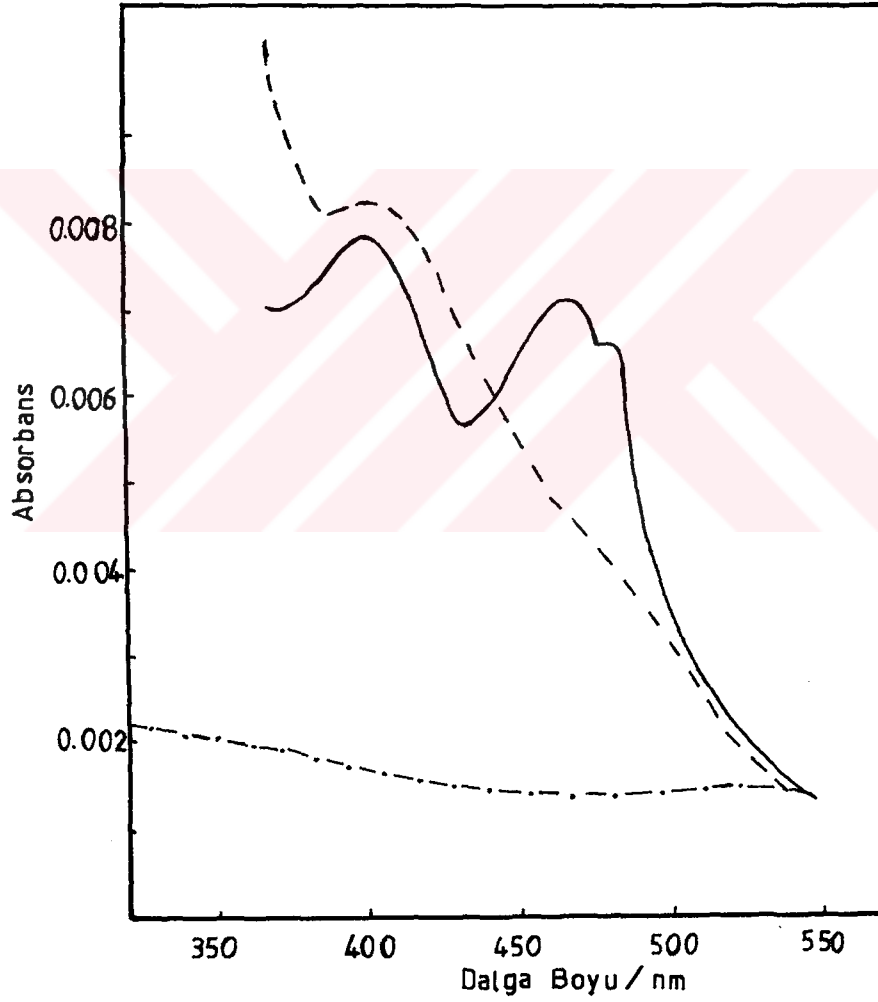
Substrat olarak kullanılan sitokrom b₅ ile yapılan çalışmalar sonunda elde edilen bu bulgulardan da DENA'nın NADH sitokrom b₅ redüktaz için nonkompetitif inhibitör olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Şekil 14'de görüldüğü gibi "En Küçük Kareler Yöntemi" ile çizilen inhibitör derişimine karşı 1/Vmax (gözlenen) grafiğinden K_i değeri 5.2x10⁻⁴ M olarak bulundu.



Şekil 14. DENA derişimine karşı 1/Vmax (gözlenen) grafiği.

3.3.3. Enzim - DENA Bağlanmasının İncelenmesi

NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın, DENA'nın ve enzim -DENA karışımının soğurum spektrumları Şekil 15'de görölmektedir. DENA ile bağlı enzimin soğurum spektrumu, DENA ve enzimin soğurum spektrumunda farklı olarak bulundu.



Şekil 15. Enzim (—), DENA (---) ve Enzim + DENA (-.-)'nin UV -VIS soğurum spektrumu

3.4. Safılaştırılan Sitokrom b₅ 'e Alt Bulgular

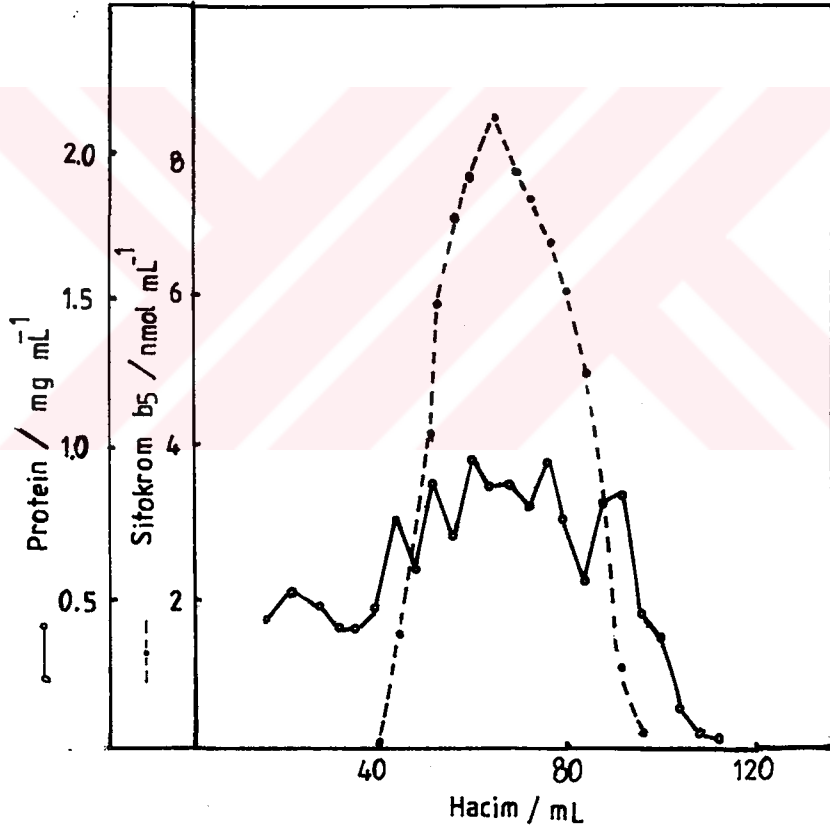
NADH - sitokrom b₅ redüktaz'ın aktivite ölçümü için gerekli olan sitokrom b₅'in sıçan karaciğer mikrozomlarından safılaştırılması sırasında elde edilen fraksiyonlardaki toplam sitokrom b₅ miktarı, özgül sitokrom b₅ miktarı, safılaştırma katsayı ve verimi Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6: Sitokrom b₅'in sıçan karaciğer mikrozomlarından safılaştırılması

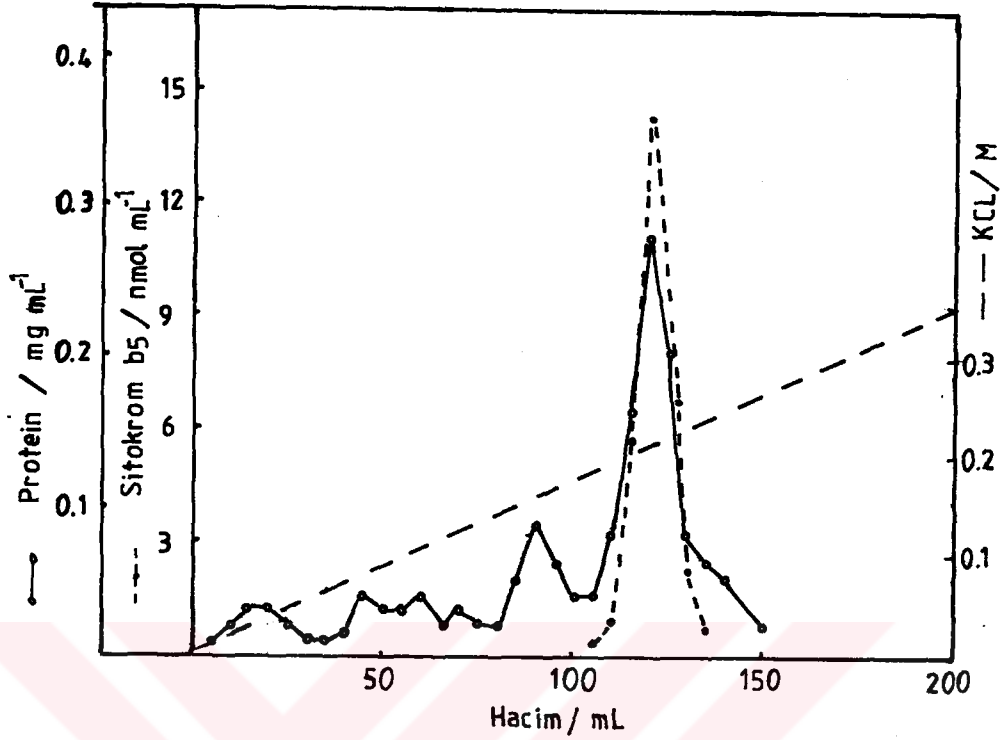
Safılaştırma Adımları	Toplam Protein mg	Toplam Sitokrom b ₅ nmol	Özgül Miktar nmol(mg) ⁻¹	Verim %	Safılaştırma
1. Mikrozomlar	625	367.56	0.588	100.0	1.0
2. Çözünürleştirilmiş Mikrozomlar	120	248.60	2.070	67.6	3.52
3. Sephadex G-100 Kromatografisi	9.6	191.81	19.98	52.2	33.97
4. DEAE-Selüloz Kromatografisi ve Diyaliz	1.8	94.05	81.87	25.6	139.2

Sitokrom b₅'in sıçan karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesinde tripsin kullanıldı ve sitokrom b₅'in % 67.6'sı çözünürleştirilmiş kısımda elde edildi. Sephadex G-100 kolon kromatografisinden elde edilen sitokrom b₅ fraksiyonunun miligram protein başına 10.98 nmol b₅ içerdiği bulundu. Bu basamakta, sitokrom b₅ % 52.2 verimle, mikrozomlara göre 33.97 kez safılaştırıldı. Sephadex G-100 kolonundan derişik olarak alınan sitokrom b₅, DEAE Selüloz kolonuna uygulandıktan sonra diyaliz edildi. Bu safılaştırma basamağında Çizelge 2'de görüldüğü gibi sıçan karaciğer sitokrom b₅'in özgül miktarı miligram protein başına 65.79 nmol b₅ ve mikrozomlara göre 111.9 kez safılaştırılmış olarak, % 42.6 gibi bir verimle elde edildi.

Sitokrom b₅'in saflaştırılma işlemi sırasında jel filtrasyonu (Sephadex G-100 kolonu) ve DEAE-Selüloz kromatografisi kullanılmıştır. Çözünürleştirilmiş Sitokrom b₅'in Sephadex G-100 kolon kromatografisinin profili Şekil 16'da gösterilmiştir. Sitokrom b₅'in DEAE - Selüloz kolon kromatografisi sonunda elde edilen profili ise Şekil 17'de görülmektedir. Sitokrom b₅, tuz gradienti ile DEAE Selüloz kolonundan sivri bir tepecik halinde alındı.

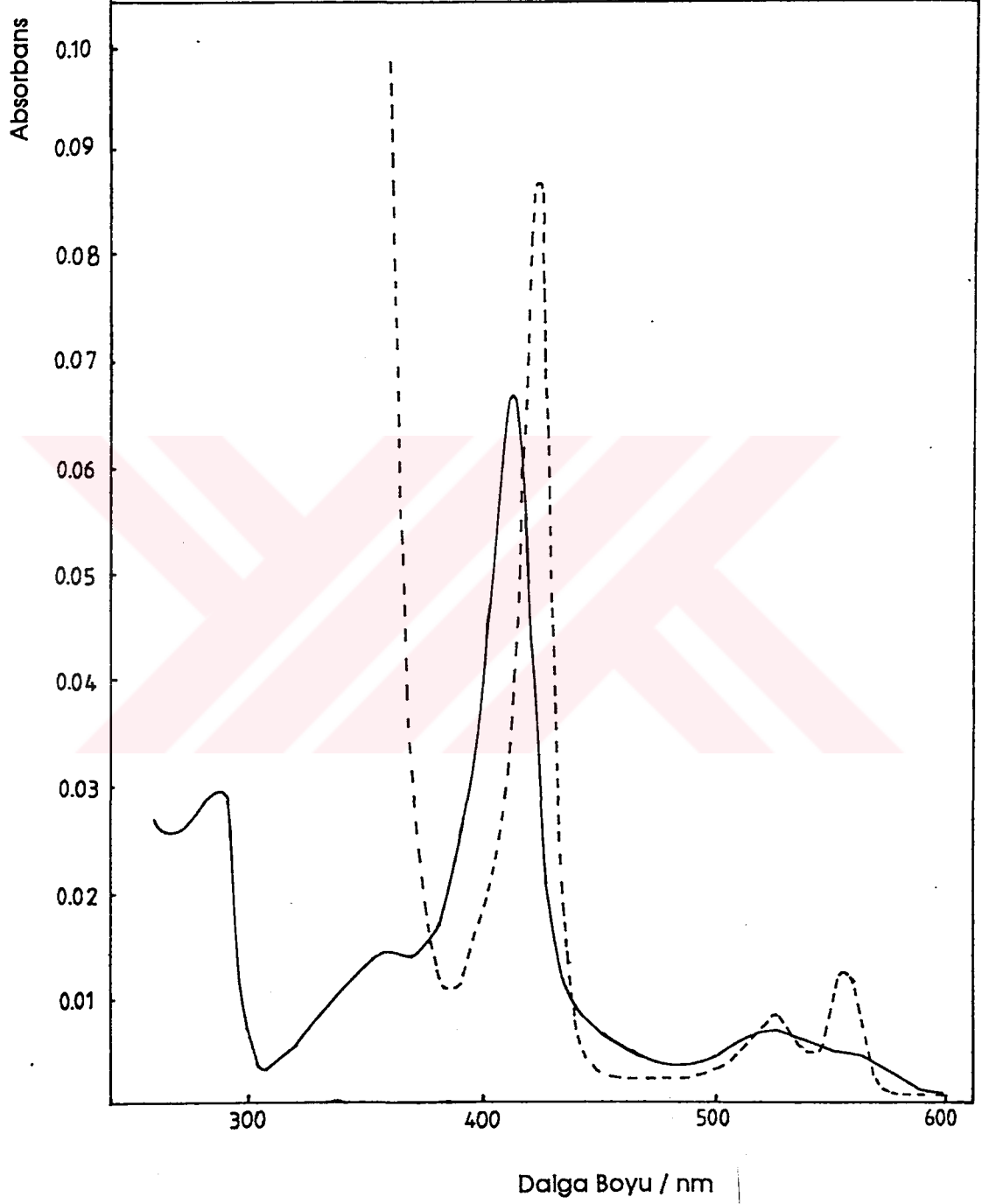


Şekil 16. Sığan karaciğeri mikrozomal Sitokrom b₅'in Sephadex G-100 kolon (2.5x40 cm) kromatografisi



Şekil 17. Sığan karaciğeri mikrozomal Sitokrom b₅'in DEAE-Sellüloz kolon (2.5x18 cm) kromatografisi

Saflaştırılmış sitokrom b₅'in soğurum spektrumu Şekil 18'de gösterilmiştir. Buradan görüldüğü gibi sitokrom b₅ 'in 413 nm'de maksimum soğurumu vardır. Bunun yanında hemproteinlerinin karakteristik özelliği olan "hem" grubunun 358 nm'deki tepeciği ve 280 nm'de de aromatik amino asitlerin soğurumundan dolayı bir protein tepeciği gözlenmektedir. Yine şekil 18'de görüldüğü gibi Ditiyonitle indirgenmiş sitokrom b₅'in soğurum spektrumunda maksimum tepelik 423 nm'ye kaymıştır.



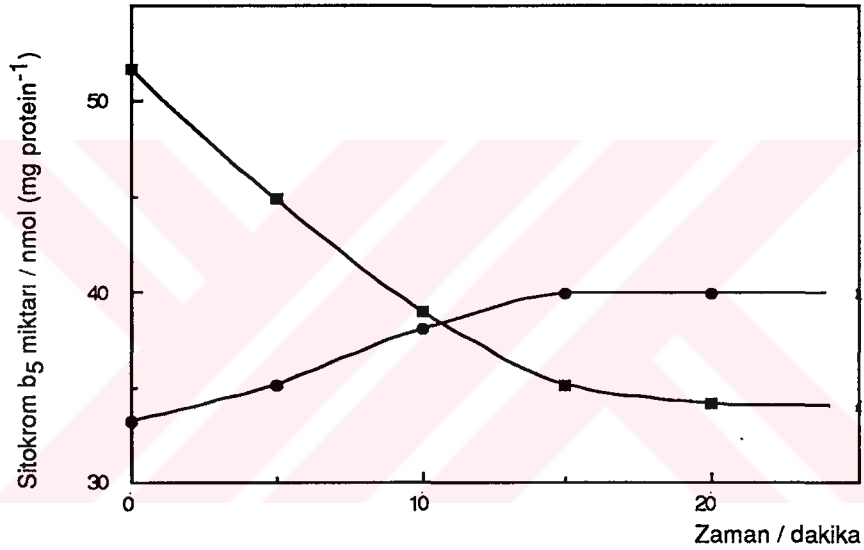
Şekil 18. Safaştırılmış sıçan karaciğer sitokrom b₅'in soğurum spektrumu

(Örnek 1.93 nmol sitokrom b₅ içermektedir)

(— yükseltgenmiş, indirgenmiş)

3.5 Sitokrom b₅'in DENA ile Etkileşimi

3.5.1. Zamanın Etkisi: DENA ile etkileştirilen sitokrom b₅'in zamana karşı değişen miktarlarını gösteren grafik Şekil 19'da, hesaplanan sitokrom b₅ miktarları Çizelge 7'de gösterilmiştir. Bu bulgular deney koşullarında 15 dakikalık bir etkileşimden sonra sitokrom b₅'in yükseltgendiğini göstermiştir. Bu nedenle etkileşim süresi 15 dakika olarak seçilmiştir.



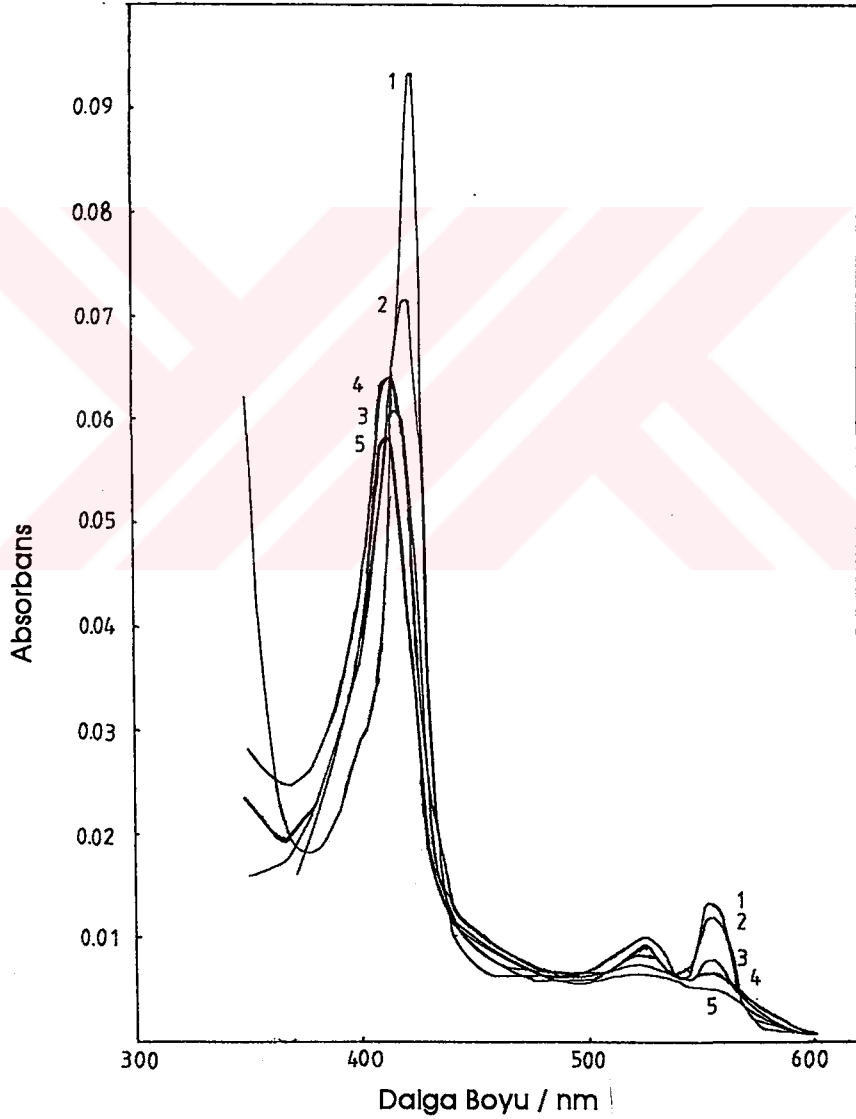
Şekil 19. Sitokrom b₅'in DENA ile etkileşimine zamanın etkisi

(● Yükseltgenmiş, ■ indirgenmiş sitokrom b₅)

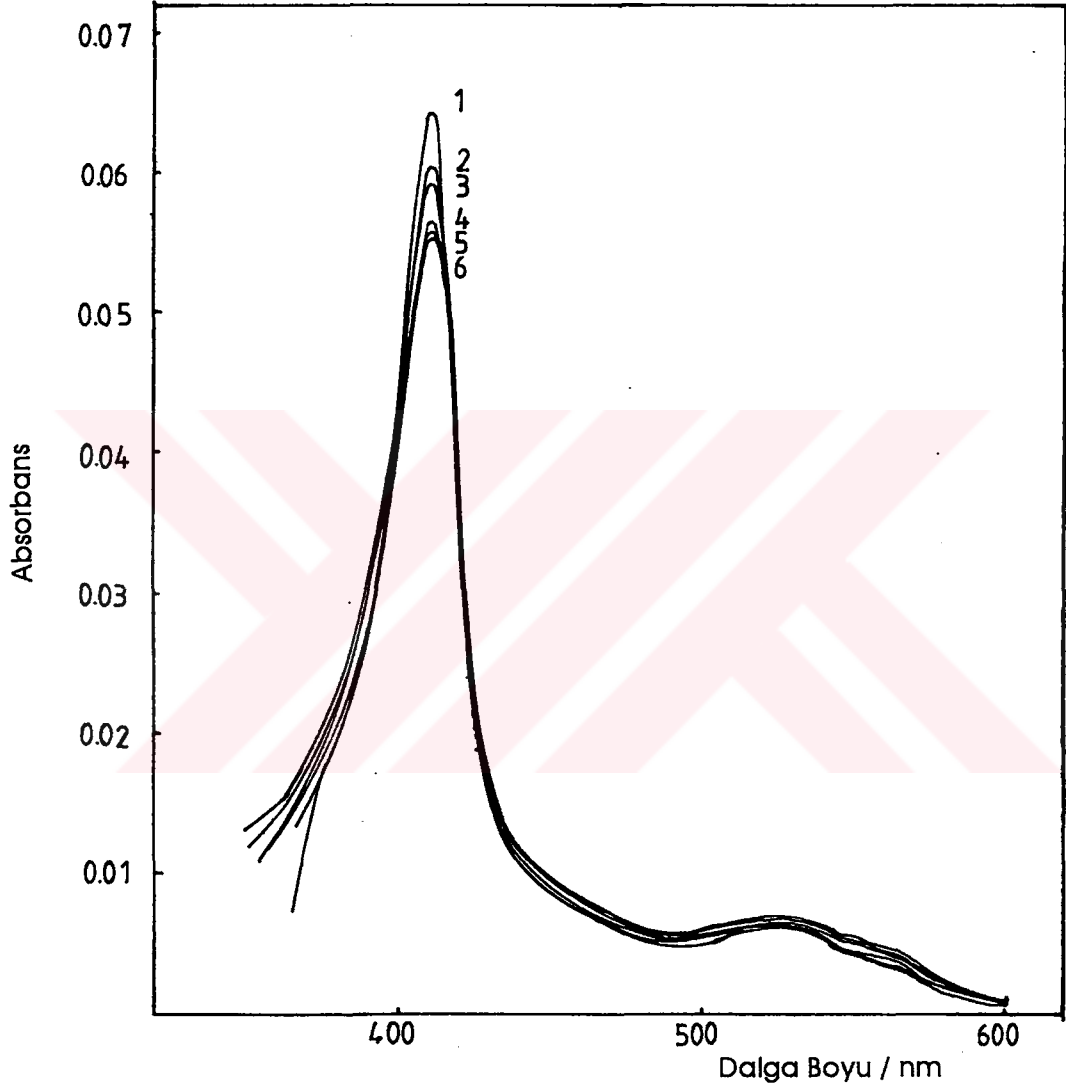
Çizelge 7. DENA ile etkileşen sitokrom b₅'in zamanla değişen miktarları

Zaman/ dakika	İndirgenmiş sitokrom b ₅ miktarı/ nmol(mg protein) ⁻¹	Yükseltgenmiş sitokrom b ₅ miktarı/ nmol(mg protein) ⁻¹
0	51.66	32.14
5	44.83	35.09
10	38.99	38.01
15	35.09	39.96
20	34.11	39.96

3.5.2. DENA Derişiminin Etkisi: Ditiyonitle indirgenmiş ve yükseltgenmiş durumdaki sitokrom b₅'in değişik derişimlerdeki DENA çözeltileri ile etkileşimi sonunda elde edilen soğurum spektrumları Şekil 20 ve Şekil 21'de, ayrıca hesaplanan yükseltgenmiş ve indirgenmiş sitokrom b₅ miktarları Şekil 22 ve Çizelge 8'de gösterilmiştir. Sonuç olarak indirgenmiş sitokrom b₅ 'in artan DENA derişimi ile yükseltgendiği ve yükseltgenmiş sitokrom b₅ 'in miktarının da artan DENA derişimi ile azaldığı bulunmuştur.



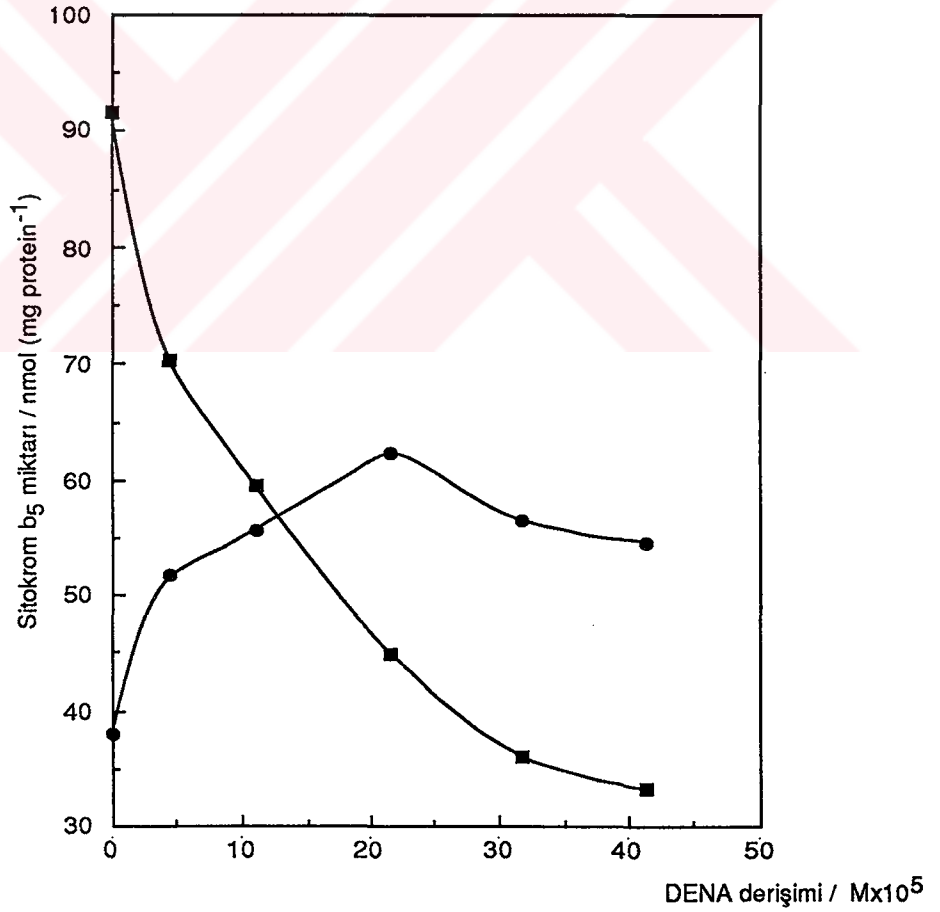
Şekil 20. İndirgenmiş sitokrom b₅ ile DENA'nın etkileşiminde soğurum spektrumu (Örnekte 1.93 nmol sitokrom b₅, 1) 0.0, 2) 4.49×10^{-5} M 3) 1.11×10^{-4} M, 4) 2.16×10^{-4} M, 5) 3.17×10^{-4} M DENA bulunmaktadır.



Şekil 21. Yükseltgenmiş sitokrom b₅ ile DENA'nın etkileşiminde soğurum spektrumu (Örnekte 1.93 nmol sitokrom b₅, 1) 0.0, 2) 4.49×10^{-5} M, 3) 1.11×10^{-4} M, 4) 2.16×10^{-4} M, 5) 3.17×10^{-4} M, 6) 4.13×10^{-4} M DENA bulunmaktadır.)

Çizelge 8. DENA derişimlerine bağlı olarak değişen sitokrom b₅ miktarı

DENA Derişim/ M	İndirgenmiş sitokrom b ₅ miktarı / nmol (mg protein) ⁻¹	Yükseltgenmiş sitokrom b ₅ miktarı / nmol (mg protein) ⁻¹
---	91.618	38.012
4.49x10 ⁻⁵	70.175	51.657
1.11x10 ⁻⁴	59.454	55.556
2.16x10 ⁻⁴	44.834	62.378
3.17x10 ⁻⁴	36.062	56.530
4.13x10 ⁻⁴	33.138	54.581

Şekil 22. Sitokrom b₅ ile DENA'nın etkileşiminde DENA derişimine karşı sitokrom b₅ miktarları (●- Yükseltgenmiş, ■- indirgenmiş)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz insanı, besinlerdeki doğal veya katkı maddeleri, ilaçlar ve çevre kirleticileri gibi çeşitli yabancı kimyasal maddelerden gün geçtikçe daha fazla etkilenmektedir. Bu kimyasal maddeler içinde en sık karşılaşılanı ve en zararlı olanları nitrozamin grubudur. Nitrozaminler önemli mutajen ve kanserojen maddelerdir. Çalışmamızda DENA'nın NADH- sitokrom b₅ redüktaz ve onun doğal substratı olan sitokrom b₅ üzerine etkisi in vitro olarak incelendi.

NADH bağımlı sitokrom b₅ redüktaz ve sitokrom b₅, stearyl CoA'nın oleil CoA'ya dönüşümünü katalizleyen $\Delta 9$ -stearyl CoA desatüráz enzim sisteminin önemli bir üyesi olduğu gibi, pek çok metabolik yolda önemli fizyolojik rol oynadıkları ortaya konmuştur (Keyes ve Ark., 1979). Son yıllarda yapılan çalışmalarda sitokrom b₅'in sitokrom P-450 izozimleri tarafından katalizlenen organik maddelerin oksidatif hidroksilasyon (ilaç metabolizması, kolesterol metabolizması gibi) tepkimelerinde de görev aldığı bulunmuştur (İmai, 1981; Jansson ve Ark., 1985).

Amfipatik yapıya sahip bir flavoprotein olan NADH-sitokrom b₅ redüktaz, birçok hayvanın karaciğer mikrozomlarından lizozomlar veya deterjanlarla çözünürleştirilerek saflaştırılmıştır. Deterjanlarla çözünürleştirilmiş enzimin lizozomlarla çözünürleştirilen enzime yapısal olarak çok benzediği bulunmuştur. Ancak deterjanlarla çözünürleştirilmiş enzimin sitokrom b₅ aktivitesinin çok daha yüksek olduğu ve daha fazla hidrofobik bölgeye sahip olduğu gözlenmiştir (Takesue ve Omura, 1970; Spatz ve Strittmatter, 1973; Mihara ve Sato, 1975).

NADH- sitokrom b₅ redüktaz enzim aktivitesi spektrofotometrik yollarla, gerek sentetik elektron alıcıları; potasyum ferrisiyanit, Diklorofenolin dofenol (DCIP), sitokrom c gibi, gerekse doğal elektron alıcısı sitokrom b₅ kullanılarak

saptanabilmektedir (Strittmatter, 1961; İyanagi, 1977).

Çalışmamızda, sıçan karaciğer mikrozomlarından saflandırılan NADH-sitokrom b₅ redüktaz aktivitesi ferrisiyanit ve sitokrom b₅ 'in indirgenme hızına göre ölçüldü. NADH- Sitokrom b₅ redüktaz'ın bu iki farklı substratı ile hesaplanan özgül aktivitesi Çizelge 1'de görüldüğü gibi saflaştırma işleminin her basamağında paralel olarak arttı. Ferrisiyanit ile ölçülen enzim aktivitesinden, enzimin çoğu lizozomal sindirme ile mikrozomlardan çözdürüldü. Her iki substrat ile ölçülen enzim aktivitesi saflaştırma oranı tüm basamaklarda benzer olduğu görüldü. NADH-sitokrom b₅ redüktaz aktivitesi sitokrom b₅ ile ölçüldüğünde enzimin özgül aktivitesi 182.7 nmol/dak/mg protein olarak bulundu. Enzim karaciğer mikrozomlarından 332 kez saflaştırılarak, mikrozomlara göre %40 verimle elde edildi. Enzimin özgül aktivitesi ferrisiyanit ile 897.8 µmol/dak/mg protein olarak ölçüldü ve NADH-sitokrom b₅ redüktaz, mikrozomlardan 299 kez saflaştırılarak, mikrozomlara göre %35 verimle elde edildi.

Sıçan karaciğer NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ın soğurum spektrumu, Şekil 5'de görüldüğü gibi 390 nm ve 460 nm de oluşan iki tepecik ile flavoproteinlere özgü bir spektrum verdi. 420 nm'de bir tepeceğin olmaması saflaştırılan enzimin sitokrom b₅'den tamamen arındırıldığını göstermektedir.

Çalışmamızda, NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ı lizozomlarla çözünürleştirerek saflaştırdığımız da elde ettiğimiz veriler ve enzimin soğurum spektrumunun daha önceki çalışmaların sonuçları (Takesue ve Omura, 1970) ile benzer olduğu gözlenmiştir.

NADH-sitokrom b₅ redüktaz aktivite ölçümlerinde enzim substratı olarak kullanılan sitokrom b₅ 'de NADH-sitokrom b₅ redüktaz gibi sıçan karaciğer mikrozomlarından Sephadex G-100 ve DEAE-Selüloz kolon kromatografileri uygulanarak saflaştırıldı.

Çizelge 6'da görüldüğü gibi sitokrom b₅ özgül miktarı 81.87 nmol (mg protein)⁻¹, çalışmanın verimi % 25.6 olarak bulunmuştur. Sitokrom b₅ mikro-

zomlara göre 139.2 kez saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sitokrom b₅ 'in soğurum spektrumu Şekil 15'de verilmiştir. Şekilden görülebileceği gibi yükseltgenmiş yapıdaki sitokrom b₅'in (Fe⁺³) 413 nm'de maksimum soğurum piki, 530 ve 560 nm'lerde iki ufak soğurum piki vermekte ve bunun yanında hemproteinlerin karakteristik özelliği olan "hem" grubunun 358 nm'deki tepesi ve 280 nm'deki aromatik amino asitlerin soğurumunda dolayı bir protein tepesi görülmektedir. 413 nm'deki "hem" grubuna bağlı demir tarafından verilen soğurum değerinin 280 nm'deki aromatik aminoasitlerden dolayı okunan soğurum değerine oranı 2,3 olarak hesaplanmıştır. Bu oranda, yüksek özgül sitokrom b₅ miktarı ve saflaştırma verimi ile birlikte sitokrom b₅'in saflığının bir göstergesidir. Saflaştırılmış karaciğer sitokrom b₅'i benzer özgül miktarlar ve oran diğer araştırmacılar tarafından da verilmektedir (Omura ve Takesue, 1970; Adalı ve Ark., 1992). Omura ve Takesue, sıçan karaciğer mikrozoamlarından % 45'lik verimle saflaştırılmış olarak elde ettikleri sitokrom b₅ için de özgül miktarı 80 nmol (mg protein)⁻¹ olarak bulmuşlardır (Omura ve Takesue, 1970). Yine Şekil 15'de görüldüğü gibi ditiyonitle indirgenmiş sitokrom b₅'in (Fe⁺²) ise 423 nm'de maksimum pik, 527 ve 556 nm'lerde ise ufak soğurum pikleri verdiği gözlemlendi.

NADH-sitokrom b₅ redüktaz'ın farklı substratları ile yapılan aktivite ölçümlerinde enzim substratının derişimin artırılması ile hızın hiperbolik olarak arttığı ve Michaelis Menten kinetiğine uyduğu saptanmıştır. Enzimin sentetik substratı ferrisiyanit ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğine göre Km=0.221 mM, Vmax= 899.78 µmol dk⁻¹ mg protein⁻¹ ; doğal substratı sitokrom b₅ 'e göre ise Km= 426 nmol L⁻¹, Vmax= 262.57 nmol dk⁻¹ mg protein⁻¹ olarak bulunmuştur. Aynı çalışma farklı DENA derişimleri ile yapıldığında Çizelge 3 ve 5'de görüldüğü gibi ferrisiyanit varlığında enzim için Km= 0.218 mM iken, sitokrom b₅ varlığında ise Km= 426.81 nmol L⁻¹ olarak bulundu. Vmax'lar ise inhibitörsüz enzimin Vmax değerlerine göre azalmıştır. Bu sonuçlar, DENA'nın NADH- sitokrom b₅ redüktazı nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir.

Yapılan çeşitli araştırmalar nitrozolu bileşiklerin mikrozomal sistem tarafından metabolik aktivasyona uğratıldıktan sonra oluşan aktif ara ürünlerin nükleik asit ve proteinleri alkileyerek, protein sentezini ve bazı enzim aktivitelerini inhibe ettiği göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda NADH- sitokrom b₅ redüktaz'ı nonkompetitif olarak inhibe eden DENA, ayrıca sıçan karaciğerinde aminoasit metabolizması enzimlerinden Triptofan oksijenaz, Tirozin ve Ornitin Aminotransferaz , Serin Dehidrataz ve Histidaz'ı, Karbohidrat metabolizması enzimlerinden de Glukoz-6-fosfataz, Glukokinaz ve Malat Dehidrogenaz'ı inhibe ettiği bildirilmiştir (Kitagawa ve Ark., 1975).

NADH- sitokrom b₅ redüktaz'ı %50 inhibe eden DENA derişimi yapılan çalışmalar sonunda, substrat olarak ferrisiyanit kullanıldığında 6.6×10^{-4} M iken sitokrom b₅ kullanıldığında ise 5.7×10^{-4} M olarak bulunmuştur. Grafikselsel olarak Ki değerleri (enzimin % 50 inhibe eden DENA derişimi) ise sırasıyla 5.8×10^{-4} M ile 5.2×10^{-4} M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar enzimin, doğal substratı sitokrom b₅ varlığında daha düşük DENA derişimlerinde inhibe olduğunu göstermektedir. Bu I₅₀ derişiminin düşük olması DENA ile birlikte aynı tepkime ortamında bulunan sitokrom b₅'in yapısında meydana gelebilen değişiklikten dolayı olabilir. Çünkü proteinlerin nükleofilik yani elektronca zengin kısımları, nitrozaminlerin hedefi olmaktadır (Miller ve Miller, 1976).

Bunun üzerine DENA'nın sitokrom b₅ ile de etkileşmiş olabileceği düşünülerek bazı çalışmalar yapıldı. Saflaştırılan sitokrom b₅, DENA ile etkileştirilerek zamanın etkisi araştırıldı. şekil 16 ile Çizelge 7'de görüldüğü gibi 15 dakikalık etkileşim sonunda indirgenmiş yapıdaki sitokrom b₅, yükseltgenmiş yapıya dönüşmektedir. şekil 17'de değişik derişimlerde DENA ile etkileştirilen indirgenmiş yapıdaki sitokrom b₅ 'in soğurum spektrumundan artan DENA miktarı ile gözlenen dalga boyu kayması, indirgenmiş yapının yükseltgenmiş yapıya dönüştüğünü göstermiştir. Çizelge 8'de ise hesaplanan sitokrom b₅ miktarları verilmiştir. Deney ortamındaki $91.618 \text{ nmol (mg protein)}^{-1}$ olan indirgenmiş sitokrom b₅, 4.13×10^{-4} M DENA ile

33.138 nmol (mg protein)⁻¹'e azalmış, 38.012 nmol (mg protein)⁻¹ olan yükseltgenmiş sitokrom b₅, 2.16x10⁻⁴ M DENA ile 62.378 nmol (mg protein)⁻¹'e artarken 4.13x10⁻⁴ M DENA ile 54.581 nmol (mg protein)⁻¹'e azalmıştır. Şekil 19'da görüldüğü gibi artan DENA derişimleri ile yükseltgenmiş yapıdaki sitokrom b₅'in miktarında azalma olmaktadır. Bu sonuçlar nitrozaminlerin sitokrom b₅ ile elektron alışverişinde bulunduğunu göstermektedir.

Sitokrom b₅ hidrofilik ve hidrofobik yapıda iki kısımdan oluşur. Katalitik hem grubu nonkovalent olarak hidrofilik bölgeye bağlıdır. Sitokrom b₅'in üç boyutlu yapısı iki histidin amino asitinin azot atomlarına hem demirinin eksensel olarak ayarlandığını göstermektedir (Smith ve Ark., 1985). Nükleik asitlerin ve proteinlerin nükleofilik kısımları kimyasal kanserojenlerin hedefidir. Bu hedefler, nükleik asitlerde Adenin N-1, N-3 ve N-7 atomu, Sitozinin N-3 atomu, Guanin N-3, N-7 ve O-6 atomu ile proteinlerde sistein ve metiyoninin S, histidin N-1 ve N-3, tirozinin ise C-3 atomu olarak saptanmıştır (Miller ve Miller, 1976). Bu yüzden sitokrom b₅ 'in hem demirini bulduran hidrofilik bölgedeki demire bağlı iki histidin artığı nitrozaminin hedef bölgesi olmaktadır. Bu da nitrozaminlerin sitokrom b₅'in amino asitlerine bağlanarak yapısal değişimine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce yapılan bir çalışmada da kanserojen maddelerin varlığında sıçan karaciğerindeki sitokromların spektrofotometrik analizlerinden, mikrozoomal sitokrom b₅ ve P-450 içeriğinin hepatomada birden bire azaldığı bulunmuştur (Oyanagui ve Ark., 1974).

Çalışmamızda DENA ile sitokrom b₅'in indirgenmiş formunun yükseltgenmesi ve yükseltgenmiş formunun miktarının azalmasından dolayı inkübasyon ortamında NADH- sitokrom b₅ redüktaz enziminin substrat miktarında azalma olacak ve enzimin aktif bölgesine nitrozaminlerin bağlanması artacaktır. Dolayısı ile de NADH- sitokrom b₅ redüktaz enziminin doğal substratı sitokrom b₅ varlığındaki enzim inhibisyonu sentetik substratı ferrisiyanite göre daha düşük DENA derişimlerinde gerçekleşecektir.

DENA' nın proteinleri denatüre etme gücü ovalbumin üzerinde incelenmiş ve inhibitör ile protein fonksiyonel grupları arasında hidrojen bağlanması olduğu gözlenmiştir. Bağlanma, nitrozo oksijen atomu ile proteinlerin karboksil ve fenolik hidroksil grubu arasında olmaktadır. (Bemis ve Ark., 1966). Hem NADH- sitokrom b₅ redüktaz'ın hem de sitokrom b₅ 'in soğurum spektrumlarından elde ettiğimiz değişmeler, muhtemelen bu tip bağlanma ile fonksiyonel grupların değişimi sonucu ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak vücuda dışarıdan alınan veya vücutta oluşan nitrozaminler ile NADH- sitokrom b₅ redüktaz'ın inhibe olmasıyla, elektron taşınım sistemlerinde merkezi rol oynayan sitokrom b₅ 'in indirgenmesi katalizlenemeyecektir. DENA varlığında da indirgenmiş sitokrom b₅ yükseltgeneceği için mikrozomlardaki NADPH ve NADH bağımlı elektron taşınım zincirlerinde elektron akışı duracaktır. Dolayısı ile de eritrositlerde methemoglobinin indirgenmesi, sitokrom P-450 tarafından katalize edilen hidroksilasyon tepkimeleri, yağ asitlerinin desatürasyonu, yağ asitlerinin ve prostaglandinlerin sentezi gibi pek çok metabolik yolun gerçekleşmesi engellenecektir.

5.KAYNAKLAR

- 1- Adalı, O., Başaran, N., Arınç, E., 1992, Tavşan karaciğer mikrozoamlarından sitokrom b₅'in saflaştırılmasında değişik bir yaklaşım. **Doğa-Tr.J of Medical Sciences.** 16, 443-453.
- 2- Adler, I.D., 1980, Review of the coordinated research effort on the comparison of test systems for the detection of mutagenic effects: **Mutation Research.** 74, 77-93.
- 3- Andrews, A.W., Lijinsky, W., Synder, S.W., 1984, Mutagenicity of amino drugs and their products of nitrosation: **Mutation Research.** 135, 105-108.
- 4- Appel, K.E., Christian, E.R., Hildebrandt G.A., 1985, Oxidative dealkylation and Reductive denitrosation of Nitrosomethylalaniline in vitro. **Chem. Biol. Interact.** 53, 69-76.
- 5- Arınç, E., Schenkman, J.B., Hodgson, E., 1991, In molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds. 149-170, Plenum Press, New York.
- 6- Arınç, E., 1993, General aspects of NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b₅: **Nato Advanced study instute an molecular aspects of oxidative durg metabolizing enzymes; Their significance in environmental toxicology chemical carcinogenesis and health.** June 20- July 2, s: 42-49 Kuşadası, Aydın-Turkey
- 7- Atalay, A., 1981, In vitro effects of nitroso compounds on rat liver LDH: **C.Ü. Tıp Fak. Derg.** 7, 1, 28-34.
- 8- Atalay, A., 1985, Fare karaciğer Malat Dehidrogenaz Enziminin DENA tarafından İnhibisyonu: **Biyokımya Dergisi.**, 10, 22-28.
- 9- Atalay, A., Aker A., 1987, Maya Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenazın Dietilnitrozamin tarafından inhibisyon: **Doğa, Tu. Tıp ve Ecz. Derg.** 11, 8-12.
- 10- Atalay, A., 1989. Nitrozaminlerin proteinlerle Etkileşimi: **Biyokımya Derg. Kongre Özel Sayısı.** 3,30-33.

- 11- Bartsch, H., O'Neill, I.K., 1988, Report of the ninth international meeting on N-Nitroso Compounds: Exposures, mechanism and relevance to human cancer: **Cancer Research**. 48, 4711-4714.
- 12- Bemis J., Argus M., Arcos, J., 1966, Studies on the denaturation of biological macromolecules by chemical carcinogenes: **Biochem. Biophys Acta**. 126,274-285.
- 13- Candan F., 1989, Sigara nitrozamin fraksiyonlarının bazı mitokondri sitokromlarına etkisi. **Yüksek Lisans Tezi**.
- 14- Casado. J., Castro, A., Lorenzo, M.F., Mejjide, F., 1986, Kinetic studies on the formatin of N-nitroso compounds **XI. Monatshefte für Chemie**, 117, 335-344.
- 15- Dahl, A.R., 1986, Activation of nitrosamines to mutagens by rat and rabbit nasal, lung and liver S-9 homogenates: **Adv. Exp. Med. Biol.**, 97, 367-372.
- 16- Deeb, B.S., Sloan, K.W. 1975, Nitrates, Nitrites and Health Bulletin 750. **Agricultural Experiment Station**. Urbana Champaign, s. 32-33.
- 17- Forman, D., Al-Dabbagh, S., Doll, R., 1985, Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain: *Nature*, 313, 620-625.
- 18- Grinstead, G.F., Gaylor, J.L., 1982, Total enzymic syntethesis of cholesterol from 4,4,14 α - Trimethyl -5 α - cholesta-8,24 dien -3 β -ol: **J. Biol Chem**. 257, 13937-13944.
- 19- Ghesquier, D., Robert, J.C., Sourmarmon, A., Abastado, M., Grelac, F., and Lewin, M.J.M., 1985, Gastric microsomal NADH-cytochrome b₅ reductase: characterization and solubilization. **Comp. Biochem. Physiol.** 80B, 165-169.
- 20- Güray , T., Arınç, E., 1990, Purification of NADH - cytochrome b₅ redüktase from sheep lung and its electrophoretic, spectral and some other properties. **Int. J., Biochem.** 22, 1029 - 1037.

- 21- Hackett, G.S, Strittmatter P., 1984, Covalent cross -linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b₅ and NADH-cytochrome b₅ reductase: **J.Biol. Chem.** 259, 3275-3282.
- 22- Hackett, C.S., Novoa, W.B., Ozols, J., Strittmatter, P., 1986, Identification of the essential cysteine residue of NADH - cytochrome b₅ reductase: **J. Biol. Chem.** 261, 9854-9857.
- 23- Hildebrandt, A., Estabrook, R.W., 1971, Evidence for the participation of cytochrome b₅ in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions: **Arch Biochem Biophys.** 143, 66-79.
- 24- Holloway, P.W., Wakil S.J., 1970, Requirement for reduced diphosphopyridine nucleotide cytochrome b₅ reductase in stearly coenzyme A desaturation; **J. Biol. Chem.** 245, 1862-1865.
- 25- Holloway, P.W., 1971, A requirement for three protein components in microsomal stearly coenzyme A desaturation; **Biochem.** 10, 1556-1560.
- 26- Holloway, P.W., Mantsch, H.H., 1989, Structure of cytochrome b₅ in solution by fourier-transform infrared spectroscopy: **Biochem,** 28, 931-935.
- 27- **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man.** 1971, Agency for Res on Cancer, Lyon, 1, 95-123.
- 28- **IARC Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man.** 1974 Scientific Publ., 10, Lyon 39-56.
- 29- **IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans.** Some N-Nitroso Compounds, 1978, 17, 83-125.
- 30- İlhan, S., Atalay, A. 1985, Dietilnitrosamin'in insan kromozomları üzerine etkileri: **C.Ü. Tıp Fak. Derg.** 7,28-32.
- 31- İmai, Y., 1981, The roles of cytochrome b₅ in reconstituted monooxygenase systems containing various form of hepatic microsomal cytochrome P-450: **J. Biochem,** 89, 351-362.

- 32- Iyanagi, T., Watanabe, S., Anan, K.F., 1984, One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome b₅ Reductase: **Biochem**, 23, 1418-1425.
- 33- Jansson, I., Tamburini, P.P., Favreau, L.V., Schenkman, J. B., 1985, The interaction of cytochrome b₅ with four cytochrome P-450 enzymes from the untreated rat: **Drug Metab. Dispos**, 13, 453-458.
- 34- Kayaalp, O., 1981, **Tıbbi Farmakoloji**, Nüve Matbaası, Ankara, 1981.
- 35- Kensil, C.R., Hediger, M.A., Ozola, J., Strittmatter, P., 1983, Isolation and partial characterization of the NH₂-terminal membrane-binding domain of NADH-cytochrome b₅ reductase: **J. Biol. Chem.** 258, 14656-14663.
- 36- Keyes, S.R., Alfano, J.A., Jansson, I., Cinti, D.L., 1979, Rat liver microsomal elongation of fatty acids. Possible involvement of cytochrome b₅: **J. Biol. Chem.** 254, 7778-7784.
- 37- Kitagawa, T., Pitat, H.C., 1975, The regulation of Serin Dehydratase and Glucose-6- Phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during DENA and N-2-Fluorenylacetamide feeding. **Can. Res.**, 35, 1075-1084.
- 38- Lijinsky, W., Epstein, S.S., 1975, Nitrosamines as Enviromental Carcinogens. **Nature**. 225, 21-23.
- 39- Menteş, G., Ersöz, B., 1993, Harper'in Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, s. 140.
- 40- Mirvis, S.S., Wallcave, L., Eagen, M., Shubik, P., 1972, Ascorbate-Nitrite Reaction: Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-Nitroso Compounds. **Science**, 177,65-68.
- 41- Michael, C.A., 1989, Mechanisms of action of N-nitrosocompounds: **Cancer Surveys**, 8, 241-249.
- 42- Mihara, K., Sato, R., 1975, Purification and properties of the intact form of NADH cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes: **J. Biochem**, 78, 1057-1073.

- 43- Miller, E.C., Miller, J.A., 1976, The metabolism of chemical carcinogenes to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis: **ACS Monograph 173**, Am. Chem. Soc. Washington, D.C., s. 737-762.
- 44- Montesano, R., Bartsch, H., 1976, Mutagenic and Carcinogenic N-nitroso compounds; Possible Environmental Hazards, **Mut. Res.**, 32, 179-228.
- 45- Omura, T., Takesue, S., 1970, A New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-Cytochrome C Reductase from rat liver microsomes: **J. Biochem**, 67, 249-257.
- 46- Oshino, N., Imai, Y., Sato, R., 1971, A Function of cytochrome b₅ in fatty acid desaturation by rat liver microsomes: **J. Biochem.** 69, 155-167.
- 47- Oyanagui, Y., Sato, N., Hagihara, B., 1974, Spectrophotometric Analysis of Cytochromes in rat liver during carcinogenesis: **Cancer Research**, 34, 458-462.
- 48- Ozols, J., Carr, S.A., Strittmatter, P., 1984, identification of the NH₂- terminal blocking group of NADH - cytochrome b₅ reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane- binding domain: **J. Biol. Chem.** 259, 13349-13354.
- 49- Ozols, J., Korza, G., Heinemann, F.S., Hediger, M.A., Strittmatter, P., 1985, Complete amino acid sequence of steer liver microsomal NADH-cytochrome b₅ reductase, **J. Biol. Chem.** 260, 11953-11961.
- 50- Ozols, J., 1989, Structure of cytochrome b₅ and its topology in the microsomal membrane; **Biochim. Biophys. Acta.** 997, 121-130.
- 51- Özdemir, M., Bati, B., Gökalp, Y., 1984, Nitrate, Nitrite and Nitrosamine contents of Turkish soudjouks. **Flischwirtschaft.** 64, 1476-1477, 1497-1498.
- 52- Öztop, N., Çetinkaya, Ö., Candan, F., Saraydın, D., 1993, Sigara nitrosaminlerinin NADH Dehidrogenaz enzim aktivitesine in vitro etkisi; **Biyokimya Derg.** 18,11-16.

- 53- Pegg, E.A., Balog, B., 1979, Formation and subsequent excision of O⁶-Ethylguanine from DNA of rat liver following administration of Diethylnitrosamine. **Cancer Research**. 39, 5003-5009.
- 54- Peterson, J.A., Prough, R.A., 1986. "Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b₅ in cytochrome P-450 catalysis", in cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry, Ed. P.R. Ortiz de Montellano, Plenum Press, New York, U.S.A. s. 89-117.
- 55- Reddy, V.V.R., Kupfer, D., Caspi, E., 1977. Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes-Evidence for the participation of microsomal cytochrome b₅: **J. Biol. Chem.** 252, 5442-5447.
- 56- Scalan, R.A., 1975, N-Nitrosamines in foods: **Crit. Rev Food Technol.** 5, 357-359.
- 57- Scopes, K.R., 1984, **Protein purification principles and pratise**: springer Verlag, New York, U.S.A.
- 58- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Hadler, P., White, A., 1985, **Principles of Biochemistry General Aspects**. Mc Graw-Hill Book Comp. Singapore. s. 373-374.
- 59- Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrant, A., 1967,, An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. **The Journal of Cell Biology**, 32, 415-438.
- 60- Spatz, L., Strittmatter, P., 1973, A from of reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome b₅ reductase containing both the catalytic site and an additional membrane binding segment: **J. Biol. Chem.** 248, 793-799.
- 61- Strittmatter, P., Velick, S.F., 1956, A microsomal cytochrome reductase specific for diphosphopyridine nucleotide. **J. Biol. Chem.** 221, 277-286.
- 62- Strittmatter, P., Velick, S.F., 1957, The purification and properties of microsomal cytochrome reductase; **J. Biol. Chem.** 228, 785-799.
- 63- Strittmatter, P., 1961, The nature of the flavin binding in microsomal cytochrome b₅ reductase: **J. Biol. Chem.** 236, 2329-2335.

- 64- Strittmatter, P., Hackett, C.S., Korza, G., Ozols, J., 1990, Characterization of the covalent cross-Links of the active sites of amidinated cytochrome b₅ and NADH: Cytochrome b₅ reductase: **J. Biol. Chem.** 265, 21709-21713.
- 65- Takeseu, S., Omura, T., 1970, Purification and properties of NADH - cytochrome b₅ reductase solubilized by lysosomes from rat liver microsomes: **J. Biochem.** 67, 267-276.
- 66- Tamura, M., Yubisui, T., Takeshita, M., Kawabata, S., Miyata, T., Iwanaga, S., 1987, Structural comparison of Bovine Erythrocyte, Brain, Liver NADH-cytochrome b₅ reductase by HPLC, Mapping: **J. Biochem.** 101, 1147-1159.
- 67- Tauber, A.I., Wright, J., Higson, F.K., Edelman, S.A., Waxman, D.J., 1985, Purification and characterization of the human neutrophil NADH-Cytochrome b₅ reductase; **Blood** 66, 673-678.
- 68- Tenovou, J., 1986, The biochemistry of nitrates, nitrites, nitrosamines and other potential carcinogens in human saliva: **Oral. Pathol.** 15, 303-307.
- 69- Tu, Y.Y., Yang, S.C., 1983, Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. **Arch. Biochem. Biophys.** 242, 32-40, 1985.
- 70- Tüken, F., 1993, Bazı nitrozaminlerin Glutatyon S-transferaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. **Doktora Tezi.**
- 71- Vatsis, K.P., Theoharides, A.D., Kupfer, D., Coon, M.J., 1982, Hydroxylation of prostaglandins by inducible isoenzymes of rabbit liver microsomal Cytochrome P-450: **J. Biol. Chem.** 257, 11221-11229.
- 72- Weeks, U., Gletten, F., Brusick, D., 1974, Conversion of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine to mutagenic metabolites by microsome fractions from liver, lung and kidney tissue of the mouse strains: **Mut. Res. Sect. Environ. Mutagenesis Relat. Subj.** 26, 453-455.
- 73- West, S.B., Lu, A.Y.H., 1977, Liver microsomal electron transport systems: **Arch. Biochem. and Biophys.** 182, 369-378.

- 74- Witsch, H., 1973, The effects of diethylnitrosamine on ribonucleic acid and protein synthesis in the liver and Lung of the Syrian Golden Hamster. **J. Biochem.** 136, 789-794.
- 75- Wykle, R.L., Blank, M. L., Malone, B., Snyder, F., 1972, Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-sn- glycerol-3-phosphorylethanolamine: **J. Biol. Chem.** 247, 5442-5447.
- 76- Yang, S.C., Koop, D.R., Wang, T., Coon, M.J., 1985, Immunochemical studies on the metabolism of nitrosamines by ethanol-inducible cytochrome P-450: **Biochem. Biophys. Res. Commun** 128, 1007-1013.
- 77- Yoo, J.S., Ishizaki, H., Yang, S.C., 1990, Roles of cytochrome P450IIE 1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. **Carcinogenesis.** 11, 2239-2243.
- 78- Yubisui, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Tamura, S., Takeshita, M., 1986, Complete amino acid sequence of NADH-cytochrome b₅ reductase purified from human erythrocytes: **J. Biochem.** 99, 407-422.

6. ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Balıkesir'in Bandırma ilçesinde doğdu. 1982 yılında Sivas Lisesi'ni, 1986 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü bitirdi. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 1989 yılında C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. Halen aynı üniversitede araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

Evli ve bir çocuk annesidir.