

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (SALMO GAIRDNERİ) KARACİĞER
MİKROZOMLARINDA ANİLİN HİDROKSİLİZ AKTİVİTESİNİN
KARAKTERİZASYONU

Kimyager Ahmet ÇOLAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Yüksek Lisans (Kimya)"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 3.07.1995

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 28.07.1995

Tezin Danışmanı : Doç.Dr.H.Basri ŞENTÜRK

Juri Üyesi : Prof.Dr.Edip KEHA

Juri Üyesi : Prof.Dr. Mustafa ÖZDEMİR

Enstitü Müdürü : Prof.Dr.Temel SAVAŞKAN

Temmuz 1995

TRABZON

ÖNSÖZ

Gökkuşığı alabalığı, Salmo gairdneri, karaciğeri mikrozomal anilin hidroksilaz aktivitesinin, aktiviteyi etkileyen parametrelerin ve optimal şartların araştırıldığı bu çalışma, KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarım boyunca ilgisini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. H. Basri ŞENTÜRK 'e ayrıca manevi desteklerinden dolayı da teşekkürü bir borç bilirim.

Gerek konu seçimi, gerekse çalışmalarımın yürütülmesi ve yönlendirilmesi sırasında, madde ve malzeme temininde her türlü imkanı sağlayan, ilgisini eksik etmeyen, manevi olarak güç ve destek veren sayın hocam Y. Doç. Dr. Saadettin GÜNER 'e ayrıca teşekkür etmeyi zevkli bir görev bilirim.

Tez çalışmalarımın değişik aşamalarında yardım ve desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Edip KEHA, Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU, Y. Doç. Dr. Mehmet TÜFEKÇİ, Y. Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ, Arş. Gör. A. Faik AYAZ, Arş. Gör. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU, Arş. Gör. Tevfik ÖZEN ve Arş. Gör. Simla ÖZDEMİR 'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca, tez çalışmama konu seçtiğimiz balık örneklerinin temin edilmesinde, her türlü kolaylığı sağlayan, Trabzon Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü' ne de en derin şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca iyi ve kötü anlarımda her zaman yanımda olan, maddi ve manevi her türlü imkanı sağlayan çok sevgili aileme ve tüm zorluklara benimle göğüs geren, bana destek olan çok sevgili nişanlıma derin anlayışından dolayı minnettarım.

Trabzon, Temmuz 1995

Ahmet ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ	VIII
SEMBOL LİSTESİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar	3
1.2.1. Sınıflandırılmaları	6
1.2.2. Mekanizmaları	7
1.2.3. Regülasyonları	9
1.2.4. Fonksiyonları	9
1.3. Anilin Hidroksilaz Aktivitesi	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	14
2.1. Materyal	14
2.2. Metod	14
2.2.1. Balık Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması	14
2.2.2. Analitik İşlemler	15
2.2.2.1. Protein Tayini	15
2.2.2.2. Sitokrom P450 Tayini	15
2.2.2.3. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini	16
3. BULGULAR	19
3.1. Protein Tayini	19
3.2. Sitokrom P450 Tayini	19
3.3. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozoamları Anilin Hidroksilaz Aktivitesi	19
3.4. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Anilin Hidroksilaz Enziminin Özellikleri	21
3.4.1. Anilin Hidroksilazın Kofaktör İhtiyacı	21
3.4.2. Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Mikrozoomal Protein İçeriğinin Etkisi	21

3.4.3.	Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Anilin Substratı Konsantrasyonu Etkisi	24
3.4.4.	Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine <i>In Vitro</i> Metal İyonlarının Etkisi	28
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	31
5.	KAYNAKLAR	33
6.	ÖZGEÇMİŞ	36



ÖZET

Bu çalışmadaki amaç, Doğu Karadeniz 'de yetiştirilen bir alabalık türü olan Salmo gairdneri karaciğer mikrozomlarının anilini metabolize etme yeteneklerini araştırmaktır. Santrifüjleme ile hazırlanan mikrozomların anilinin *p*-aminofenole hidroksilasyonunu katalizlemede çok yüksek yeteneğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Anilin substratı için spesifik aktivite 0.0686 nmol/dak/mg protein olarak bulunmuştur. Mikrozomlarda toplam protein 28.85 mg/mL olarak tayin edilmiştir. Bu enzim sisteminin en uygun aktivitesi 25 °C de potasyum fosfat tamponu, pH 7.4 te gözlenmiştir. Anilin'in hidroksilasyon hızı, 1.80 mg mikrozomal protein üzerindeki mikrozomal protein konsantrasyonları ile lineer bulunmuştur. Karışık fonksiyonlu oksidaz bileşenlerinden olan cyt. P450 içeriği, 91 mM⁻¹cm⁻¹ lik bir molar absorblama katsayısı kullanılarak ditiyonit-indirgenmiş mikrozomların CO spektrumları ile 0.1122 nmol P450/mg protein olarak bulunmuştur. NADPH, karaciğer mikrozomlarında maksimum anilin hidroksilaz aktivitesi için gerekli görülmüştür. NADPH ve NADH birlikte kullanıldıklarında %7.7 lik küçük bir aktivite artışı gözlenmiştir. Ayrıca, bir NADPH üreten sistemle NADPH ile elde edilen aktivite değerine yakın aktiviteler elde edilmiştir. Anilin hidroksilasyon hızı, 0.5 mM anilin konsantrasyonları üzerinde, 5.30 U/mg protein lik V_{max} değerine ulaşmıştır. Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri, Michaelis-Menten kinetiği ile uyumlu olan benzer V_{max} ve K_M değerlerini vermiştir. Bu sonuçlar, alabalık karaciğer mikrozomlarında anilinin hidroksilasyonundan sorumlu olan tek bir enzimin varlığını göstermektedir. Son olarak, birkaç metal iyonunun alabalık karaciğer anilin hidroksilaz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Mg⁺², Cd⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının 0.1 mM konsantrasyonları hemen hemen aynı derecede aktiviteyi arttırıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Cu⁺² iyonu ise aktiviteyi oldukça arttırmıştır. Aksine en toksik metal iyonlarından ikisi olan Ni⁺² ve Hg⁺², 1 mM konsantrasyonlarında, anilin hidroksilasyonunu %25 kadar inhibe etmiştir.

İleride yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, balığın enzimatik hidroksilasyon sistemlerinin mekanizma, yapı ve fonksiyonları konusunda daha detaylı bilgi elde edilmesinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Salmo gairdneri, Karaciğer Mikrozomları, Anilin Hidroksilaz, Sitokrom P450, Anilin, Aktivite, Karakterizasyon

SUMMARY

The Characterization of The Activity of Aniline Hydroxylase In Rainbow Trout "Salmo gairdneri" Liver Microsomes

The aim in this work is to investigate the ability of trout to metabolize aniline in liver microsomes of rainbow trout, Salmo gairdneri, cultured in the Eastern Blacksea. It was found that microsomes prepared by centrifugation were highly capable of catalyzing hydroxylation of aniline to *p*-aminophenol. A specific activity of 0.0686 nmol/min/mg protein was found for aniline substrate. Total protein in microsomes was determined to be 28.85 mg/mL. Optimum activity for the liver enzyme was observed in potassium phosphate buffer, pH 7.4, at 25 °C and the rate of aniline hydroxylation was linear with protein concentrations above 1.80 mg microsomal protein. The content of cytochrome P450, one of the mixed function oxidase components, was found as 0.1122 nmol P450/mg protein by carbonmonoxide spectra of dithionite-reduced microsomes using an extinction coefficient of 91 mM⁻¹cm⁻¹. It was seen that NADPH was essential for maximal activity of aniline hydroxylase in liver microsomes. When NADPH and NADH were used together, a little higher activity, 7.7%, was observed with microsomes. In addition a NADPH-generating system almost competes for NADPH. It was observed that the rate of aniline hydroxylation was reached to a V_{max} value of 5.30 U /mg protein above 0.5 mM aniline concentrations. Lineweaver-Burk and Eadie-Hofstee plots gave almost identical K_M and V_{max} values which are consistent with Michaelis-Menten kinetics. These results also show that a single enzyme is responsible for hydroxylation of aniline in trout liver microsomes. Finally, the effects of several metal ions on trout liver aniline hydroxylase were investigated, 0.1 mM concentrations of Mg⁺², Cd⁺² and Fe⁺³ had almost similar stimulatory effect on the activity. Cu⁺² dramatically increased the activity of the enzyme. In contrast, Ni⁺² and Hg⁺² being two of the most toxic metal ions inhibited the rate of aniline hydroxylation by 25% at 1 mM concentrations.

Further *in vitro* and *in vivo* experiments should be done in order to get more detailed information on the mechanism, structure and function of enzymatic hydroxylation systems of fish.

Key Words: Salmo gairdneri, Liver Microsomes, Aniline Hydroxylase, Cytochrome P450, Aniline, Activity, Characterization

SEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Endoplazmik Retikulum Lümeni Cyt. P450 Sistemi Bileşenleri	5
Şekil 2. Mitokondri Cyt. P450 Sistemi Bileşenleri	6
Şekil 3. Bir Substratın Cyt. P450 Enzimi ile Çevrimsel Oksijenasyon Mekanizması	8
Şekil 4. <i>p</i> -aminofenol Kalibrasyon Eğrisi	20
Şekil 5. Sabit Kofaktör Konsantrasyonlarında Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi	22
Şekil 6. Mikrozomal Protein Miktarının Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	23
Şekil 7. Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Anilin Substratı Konsantrasyonu Etkisi	25
Şekil 8. Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi (Lineweaver-Burk Eğrisi)	26
Şekil 9. Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi (Eadie-Hofstee Eğrisi)	27
Şekil 10. Mg ⁺² İyonunun Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	29
Şekil 11. Çeşitli Metal İyonlarının Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	30

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Cyt. P450 Enzimleri Tarafından Çeşitli Kimyasal Reaksiyonlarla Katalizlenen Ksenobiyotikler	2
Tablo 2. Ksenobiyotik Metabolizleyen Enzimler	3
Tablo 3. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini İçin Reaksiyon Bileşenleri	16
Tablo 4. Reaksiyon Karışımlarının Kofaktör Muhteviyatı	17
Tablo 5. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomları Anilin Hidroksilaz Aktivitesinin Kofaktöre Bağımlılığı	21
Tablo 6. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Enzim Kinetiği ve Anilin Konsantrasyonunun Etkisi	24
Tablo 7. Mg ⁺² İyonunun Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	28
Tablo 8. Çeşitli Metal İyonlarının Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	30

SEMBOL LİSTESİ

- Cyt. P450 : Sitokrom P450
CO : Karbonmonoksit
NADPH : Dihidronikotinamid-adeninidinükleotit Fosfat
NADH : Dihidronikotinamid-adeninidinükleotit
 V_{max} : Maksimum Hız
 K_M : Michealis-Menten Sabiti
DNA : Deoksiribonükleik asit
mRNA : Mesajcı Ribonükleik asit
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
TCA : Trikloroasetik asit
NADP⁺ : Nikotinamid-adeninidinükleotit Fosfat

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bütün organizmalar buldukları ekosistemlerde çok çeşitli kimyasal etkilere maruz kalırlar. Bu maddelerin başında protein, yağ, karbohidrat, vitamin v.s. gibi besin kaynakları gelir. Bunun yanında her türlü ilaçlarla birlikte, toksinler, antioksidanlar, organik çözücüler ve çevre kirleticileri gibi birçok kimyasal maddeler canlı organizmaya olumlu ya da olumsuz yönde etki edebilmektedirler. Eksojen olan bütün bu kimyasallar, organizmalar tarafından alındıktan sonra mükemmel sayılabilecek biyokimyasal sistemlerle metabolize edilirler. Bir organizmanın varlığını devam ettirebilmesi bünyesine aldığı her bir molekülün kendisine yabancı olup olmadığını ayırt edebilmesi ve yabancı ise onu kendi sistemine uygun ya da tesirsiz hale getirip, dışarıya salgılamasına bağlıdır.

Çevreden herhangi bir yolla alınan kimyasal maddelerin organizmalar tarafından işlenmesi, organizmadaki iki farklı sistemle gerçekleştirilir. Bunlardan birisi, organizma tarafından alınan bu kimyasalları tanıyan ve olumsuz etkilerini yok eden hücrelerden oluşan bağışıklık sistemidir. Diğer savunma sistemi ise, ksenobiyotik olarak tanımlanan bu yabancı maddeleri alındıktan sonra değişikliğe uğratarak tesirsiz hale getiren ve hücrede böyle pek çok substratın kimyasal reaksiyonunu katalizleyen sitokrom P450 (cyt. P450) adı verilen enzim sistemidir.

Cyt. P450 enzim sistemi hemen hemen bütün canlıların hücrelerinde sentezlenir ve bu sistemin yaklaşık ellinin üzerinde alt türü mevcut olup, her bir enzim türü farklı bir substratın kimyasal reaksiyonunu enzimatik olarak katalizler. Cyt. P450 enzimleri, steroidler, vitaminler, safra asitleri, alkaloid ve hormonlar gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında da görev yaparlar. Bu enzimler sadece organizmayı çevre kirleticilere karşı korumakla kalmaz, aynı zamanda ilaçları detoksifiye eder ve birçok önemli sinyal molekülün sentezini gerçekleştirirler. Organizmalarda oldukça yaygın dağılım gösteren bu enzim sistemleri; Sigara dumanı, alkol, çevre kirleticileri, ilaçlar ve gıdalardaki katkı maddeleri tarafından kuvvetli bir şekilde uyarılırlar (Tablo 1.). Bu uyarıların bir çok sonucu olarak, organizma kendini savunacak bu enzimlerin daha fazlasını üretmiş olur. Ayrıca birçok endojen ve çevre faktörleri yanında, organizmanın yaşı, cinsiyeti, sıcaklık ve besin türü bu enzimlerin aktivitesini etkileyebilir.

Cyt.P450 enzimlerinin herbirinin değişik substratlara karşı farklı ilgilerinden dolayı bu enzim sistemi Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar olarak da bilinmektedir. Bu oksidazların esas fonksiyonu, organizma tarafından alınan ve oldukça az çözünür olan organik kimyasalları, daha az ya da çok toksik olabilen, suda çözünür metabolitleri haline dönüştürmektedir.

Tablo 1. Cyt. P450 Enzimleri Tarafından Çeşitli Kimyasal Reaksiyonlarla Katalizlenen Ksenobiyotikler

Reaksiyon	Ksenobiyotik
Alifatik hidroksilasyon	Pentobarbital
Aromatik hidroksilasyon	Asetanilid
Epoksidasyon	Benzen, benzo [a] piren
Dealkilasyon	Fenasetin, 6-metil tiyopürin
Oksidatif deaminasyon	Amfetamin
Azot ve kükürt oksidasyonu	2-Asetil aminofloren
Dehalojenasyon	Halotan
Alkol Oksidasyonu	Etanol

Omurgalılarda ksenobiyotik metabolizmasının gerçekleştiği esas organ karaciğerdir. Karaciğer hücrelerinde bulunan cyt. P450 enzimleri organizmaya alınan kimyasalları daha çözünür hale getirirler. Bu polar olmayan ve dolayısıyla lipofilik olan kimyasallar önce daha çok çözünebilen türevleri haline dönüştürülür ve sonra da vücuttan herhangi bir yolla uzaklaştırılırlar. Birçok cyt. P450 aracılı metabolik işlem, O₂ den kaynaklanan tek bir oksijen atomunun bir substrata bağlanmasıyla sonuçlanır. Reaksiyon türüne ve çeşitli kararsız ara ürünlerin tabiatına bağlı olarak farklı reaksiyonlar meydana gelebilir. Bunlar içerisinde oksidatif ve redüktif dehalojenizasyon; N-hidroksilasyon ve N-oksidasyon, oksidatif deaminasyon; S-, N- ve O-dealkilasyon ile alifatik ve aromatik hidroksilasyon reaksiyonları sayılabilir (Tablo 1.). Cyt. P450 enzimlerinin pek çok kimyasalı metabolize etme yetenekleri onların çokluğu, farklılıkları ve çakışan substrat spesifitelerinin net sonucundan ortaya çıkar. Bu metabolizasyon işlemleri; yükseltgenme, indirgenme, hidroliz ve konjugasyon şeklindeki enzimatik reaksiyonlarla gerçekleşmektedir. Birçok ksenobiyotiğin cyt. P450 ler ile yukarıdaki reaksiyon basamaklarını ihtiva eden oksidatif metabolizması büyük bir oranda karaciğer dokusunun endoplazmik retikulumunda gerçekleşir.

Omurgalılarda, ksenobiyotiklerin metabolize edildiği temel yer olan karaciğerde bu kimyasalları işleyebilen birçok enzim sınıfı mevcuttur. Oksijenazlar, hidrolazlar ve transferazlar bu sınıftan enzimlere birkaç örneği teşkil eder. Aşağıdaki tabloda da belirtilen bu enzimlerin birçoğu çok çeşitli organizmalardan izole edilip, saflaştırılmış ve molekül ağırlıkları, elektroforetik ve spektral özellikleri ile primer yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca bu enzimlerin özellikleri, yapıları ve regülasyonları bakımından, diğer ökaryotik ve prokaryotik organizmalardaki benzer enzimlerle karşılaştırılmışlardır.

Tablo 2. Ksenobiyotik Metabolizleyen Enzimler

Enzim	Reaksiyon Türü	Substrat
Sitokrom P450	Yükseltgenme	Toluen
Alkol dehidrojenaz		Etilalkol
Flavin içeren monooksijenaz		Dimetilamin
Keton redüktaz	İndirgenme	Metirapon
Epoksit hidrolaz	Hidrasyon	Piren-7,8-epoksit
Esteraz	Hidroliz	Prokain
UDP glukuronil transferaz	Konjugasyon	Asetaminofen
Sulfotransferaz		β -naftol
N-asetil transferaz		Sülfonilamid
Metil transferaz		Tiyourasil
Glutatiyon transferaz		Asetaminofen

1.2. Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar

Çok substratlı karışık fonksiyonlu oksijenaz sistemleri, son otuz yıldan beri oldukça ilgi toplamıştır ve bu konudaki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu enzim sistemi, organizmaların her gün maruz kaldığı yabancı kimyasallarla etkileşim halindedir. Bu sistemin anahtar enzimatik bileşeni sitokrom P450 (cyt. P450) olarak bilinen NAD(P)H-Cyt. P450 oksidoredüktazdır (1).

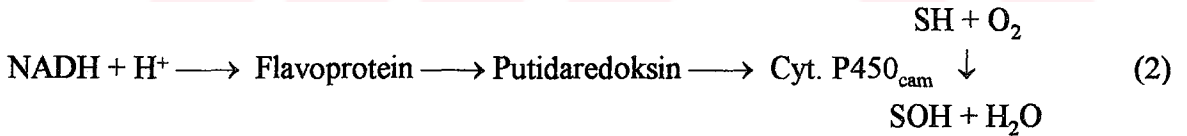
Cyt. P450 enzimleri, moleküler oksijen ihtiva eden, o zamana kadar alışılmamış bir sınıf reaksiyonların ortaya konması sırasında 1940 'larda keşfedilmişlerdir. Bu reaksiyonlarda, bir oksijen atomu su oluşturmak üzere NAD(P)H den salınan hidrojen atomu ile birleşir, ikinci oksijen atomu ise RH şeklinde ifade edilen bir substrat molekülüne bağlanır. Bu türden reaksiyonlar aşağıdaki stokiyometriye sahiptirler.



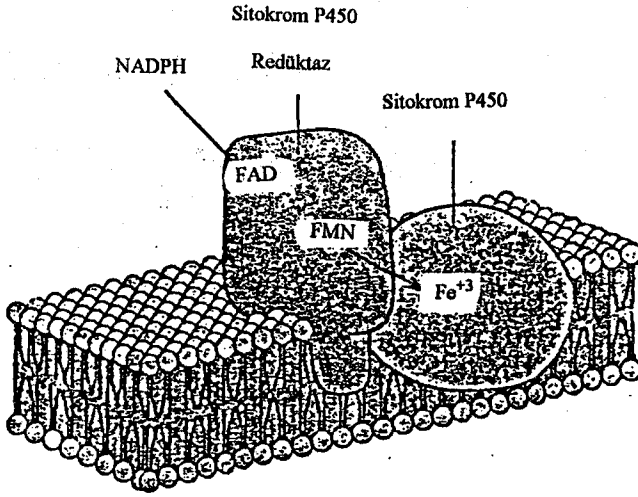
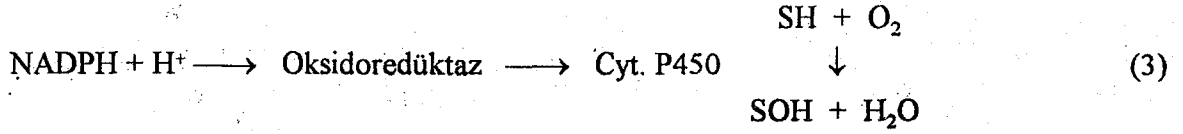
Karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonları ilk defa karaciğer ve belirli diğer dokuların özel olarak hazırlanmış ekstraktlarında gözlenmiştir. Bu dokuların hücreleri homojenizasyon ile parçalandığında; endoplazmik retikulum, mikrozom adı verilen küçük vesiküllere ayrılır. Endoplazmik retikulumdan elde edilen böyle karaciğer mikrozomları bu karışık fonksiyon reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Bu gözlemler, karaciğer hücrelerinin (hepatosit) birçok bileşiğin metabolizmasında önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Karışık fonksiyonlu oksidaz aktivitesine sahip mikrozomal bileşenleri belirlemede ilk adım, bir hem grubu taşıyan ve o zamana kadar alışılmamış bir proteinin keşfi ile başlamıştır. Bu hemoprotein, indirgenmiş halde iken, bir molekül karbonmonoksitide bağlandığında, 450 nm de bir absorpsiyon bandına sahip olduğunun ortaya konmasından sonra (2, 3), bu proteini ihtiva eden pigmentler, P450 hemoproteini olarak daha ileri derecede karakterize edilmiştir (4). R. Sato ve T. Omura gerçekte substratların oksidasyonunu katalize eden bir elektron transfer zincirinin sonundaki bileşen olarak bu pigmenti belirlemişlerdir (5, 6). Molekülün spektral özelliklerinden dolayı bu pigment sitokrom P450 (cyt. P450) olarak isimlendirilmiştir. Cyt. P450 nin mikrozomal karışık fonksiyonlu oksijenaz sistemindeki rolü bu tarihlerde ortaya konmuştur.

İki ayrı grubun yaptığı çalışmalarda, karışık fonksiyonlu oksidasyon sistemleri, bileşenlerine basamaklı olarak ayrılmıştır. Bu araştırmacıardan biri olan I. C. Gunsalus karbon kaynağı olarak kamfor üzerinde büyüme yeteneğine sahip Pseudomonas putida adlı bakterilerle yaptığı çalışmalarda, bakterinin kamfor üzerinde büyümesini sağlayan fonksiyonun karışık fonksiyonlu oksidasyon sisteminin yüksek seviyesinden kaynaklandığını gözlemiştir (7). Bu çalışmalarda, kamfor molekülüne bir hidroksil grubunun ilavesini sağlayan bu sistemin bir flavoprotein, putidaredoksin adlı bir demir-sülfür proteini ve Gunsalus'un P450_{cam} şeklinde ifade ettiği cyt. P450 den ibaret üç proteinden oluştuğu ortaya konmuştur. Gunsalus, bu proteinlerin indirgenmiş NADH formu ile başlayan, daha sonra flavoproteini ve takiben putidaredoksini ve son olarak cyt. P450 proteinini ihtiva eden bir elektron transport zinciri halinde bulduklarını delillerle göstermiştir.

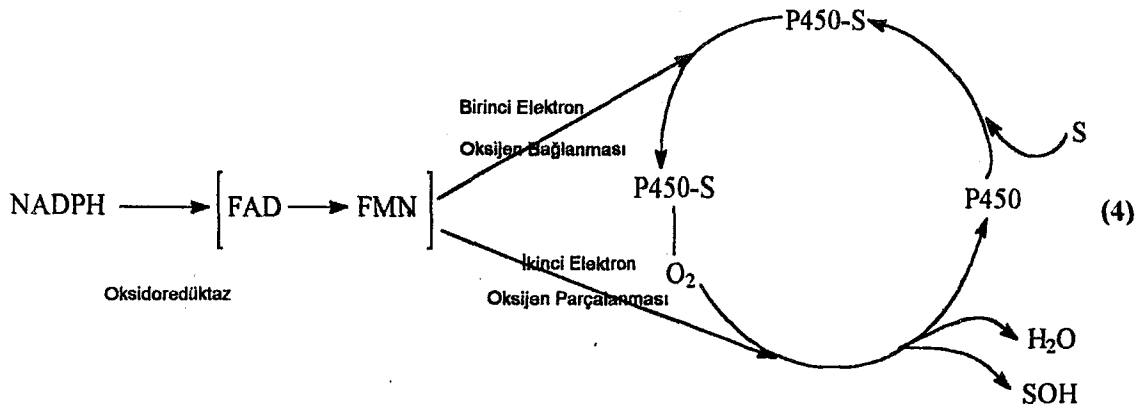


Aynı yıllarda tavşan karaciğer mikrozomlarında yapılan çalışmalarda, bu elektron transport sisteminin sadece iki proteinden ibaret olduğu ve bu sistemin aktivitesi için hücre membranının yapı taşı olan fosfolipidlerin varlığını da gerektirdiği bildirilmiştir (8). Endoplazmik retikulumda bulunan bu iki proteinli cyt. P450 enzim sistemleri, NADPH' den elektronları alıp cyt. P450 proteinine transfer edebilen, hem flavin adenin dinükleotid (FAD) ve hem de flavin mono nükleotid (FMN) ihtiva eden ve membrana bağlı bir protein olan NADPH-P450 oksidoredüktazı ihtiva eder. Bu enzimin prostetik gruplarından biri olan FAD, NADPH den gelen elektronlar için giriş noktası ve FMN ise elektronların birer birer cyt. P450 ye transferi için çıkış noktası gibi görev yapar.



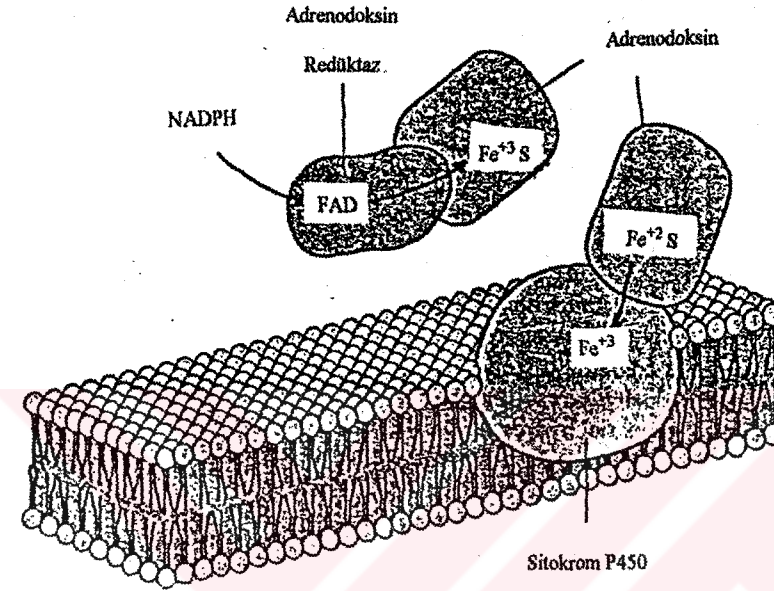
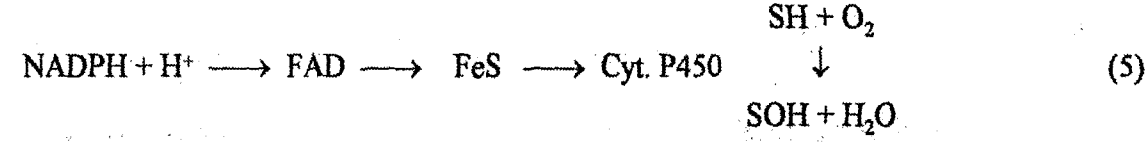
Şekil 1. Endoplazmik Retikulum Lümeni Cyt. P450 Sistemi Bileşenleri

Oksidoredüktazda iki farklı prostetik grubun bulunmasının çok önemli bir avantajı vardır. Bir hemoprotein olan cyt. P450 nin, substratı oksijenasyonu reaksiyonunda, taşıdığı hem demirinin indirgenmesi, oksijeni bağlayıp parçalayabilmesi için iki elektrona ihtiyaç duymasına rağmen, hem prostetik grubu her defasında ancak bir elektron kabul edebilmektedir. Bununla birlikte, oksidoredüktaz enzimi FAD yardımıyla NADPH den iki elektron kabul edip bu elektronların herbirini FMN aracılığı ile cyt. P450 ye aktarabilir.



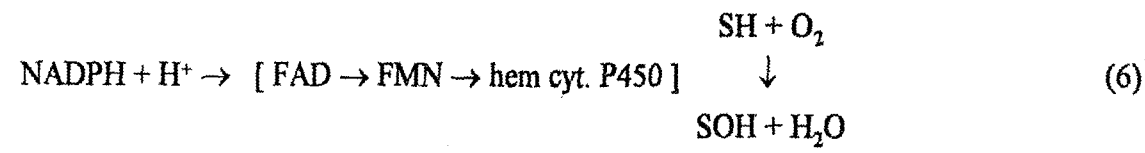
Benzeri karışık fonksiyonlu oksidasyon sistemleri mitokondrilerde de mevcuttur. Bu sistemler son yirmi yıldan beri çalışılmış olup cyt. P450 dışında ilk defa adrenal bezde tespit edildiğinden adrenodoksin redüktaz adlı bir enzim ile adrenodoksin adlı bir demir-kükürt proteinini de içerir. Mitokondri durumunda, redüktaz bileşeni mitokondri membranına bağlı

olmayıp mitokondri matriksinde bulunur ve sadece FAD prostetik grubunu ihtiva eder. Bu bileşen yine matrikste bulunan ve cyt. P450 ile temas halinde olan ve redüktaz ile cyt. P450 arasında elektron mekiği görevini yapan adrenodoksin ile etkileşim halindedir.



Şekil 2. Mitokondri Cyt. P450 Sistemi Bileşenleri

Son yıllarda, elektronları doğrudan NADPH den alabilen, FAD, FMN ve hem prostetik gruplarını bir molekülde ihtiva eden, tek proteinli bir cyt. P450 enzimi, *Bacillus megaterium* adlı bir bakteride karakterize edilmiştir (9).



1.2.1. Sınıflandırılmaları

Son yirmi yıldan bu yana, protein saflaştırma teknikleri yardımıyla, memelilerde ve diğer türlerde cyt. P450 nin oldukça çeşitli izoformları halinde bulunduğu delillerle ispatlanmıştır. Saflaştırılmış cyt. P450, lipid ve NADH-Cyt. P450 oksidoredüktaz bileşenleri ile rekonstitüye edilmiş sistemler üzerinde yapılan çalışmalar, her bir cyt. P450 formunun

çok çeşitli substratlara karşı farklı spesifite gösterdiklerini ortaya koymuştur. Mesela, bir cyt. P450 formu, halkalı bir substratı, bir ya da iki mevkiide hidroksile ederken, diğer bir cyt. P450 formu, diğer pozisyonlarda hidroksilasyona sebep olabilmektedir. Günümüzde, tek bir tür ökaryotta birkaç çeşit cyt. P450 molekülü bulunabileceği ortaya konmuştur. En fazla çalışılmış olan siçanlarda, kırk kadar farklı cyt. P450 geni olduğu ve her bir genin farklı bir cyt. P450 enzimini kodladığı gözlenmiştir. Bu genlerin çoğunun ekspresyonu, biyolojik olarak ilaçların dönüştürüldüğü yer olan karaciğer hücrelerinde gerçekleşir. Fakat cyt. P450 genleri, bu enzimlerin özel fonksiyonlarının olduğu diğer dokularda da olur. Mesela, steroid hormonlara hidroksil grubu ilave eden cyt. P450 enzimleri, adrenal bezde (böbrek üstü bezi) bulunurlar.

Yakın yıllarda, cyt. P450 genleri yapısal özellikler ve benzerlikler dikkate alınarak sınıflandırılmışlardır (10). DNA dizileri en azından % 40 benzerlik gösterenler, ailelere (1, 2, 3...v.s.) gruplandırılmışlardır. Böylece her bir cyt. P450 enzimine özel bir isim verilmiştir (cyt. P450 1A2 gibi). Cyt. P450 enzimlerinin fonksiyonel olarak çok iyi bilinen mitokondri elektron transport sisteminde bulunan sitokromlarla (cyt. a, b ve c gibi) akrabalıkları yoktur. Cyt. P450 enzimleri elektronları oksijene, halbuki solunum sitokromları ise elektronlarını diğer proteinlere aktarırlar.

1.2.2. Mekanizmaları

Çok çeşitli karışık fonksiyonlu oksidaz aktivitesine sahip moleküller olan cyt. P450 enzimlerinin tümü için a) yağ asitleri, prostaglandinler, steroidler, ketonlar gibi endojen bileşikler yanında b) polisiklik aromatik hidrokarbonları içine alan karsinojenler, nitrozoaminler, hidrazinler ve aril aminler ile c) nifedifin, mefenitoin, kodein, midazolam ve siklosporin v.b. eksojen bileşikler gibi sayıları binlere ulaşan bir çok substrat bilinmektedir.

Bu enzimlerin çok çeşitli substratlarla etkileşiminde, karışık fonksiyonlu oksidasyon mekanizmasının kullanıldığı birkaç reaksiyon ihtiva edilir. Genelde enzimlerin katalitik etkinliği birkaç basit kimyasal basamakla karakterize edilebilir. Karışık fonksiyonlu mekanizmanın gerçekleştiği işlem; substrat, cyt. P450 enziminin ferrik (Fe^{+3}) şekline bağlandığında başlar (11). Bir substratın, cyt. P450 enzimi ile oksijenasyonu için önerilen çevrimsel mekanizma birçok ana basamağı ihtiva eder. Substratın cyt. P450 enzimine bağlanmasından sonra, enzimdeki ferrik demir (Fe^{+3}) elektron salabilen NADH-Cyt. P450 redüktaz enziminden bir elektron transferi ile ferros (Fe^{+2}) demire indirgenir. Demir atomunun indirgenmesi moleküler oksijenin bağlanmasını sağlar. Bir su molekülünün kaybı ile $(FeO)^{+3}$ kompleksi oluşur ve takiben bu kompleksteki oksijen atomu substrata transfer edilir. Oksitlenmiş substrat ayrılır ve cyt. P450 enzimi çevrime tekrar girmek üzere serbest olur.

yer değiştirilmesi ile, enzim üzerindeki bazı önemli bölgeleri belirlemek mümkün olmaktadır. Benzer çalışmalar üç-boyutlu yapısı hakkında hiçbir bilgi olmayan ökaryotik cyt. P450 enzimlerine de uygulanmaktadır.

1.2.3. Regülasyonları

Cyt. P450 genlerinin ekspresyonunun regülasyonu konusundaki ilk bilgiler 1960' larda ortaya konmuş ve bu çalışmalarda bazı cyt. P450 enzimlerinin birçok kimyasal tarafından indüklenebilecekleri gösterilmiştir (13). Özellikle birçok ilaç, alkol, belirli yiyecek maddeleri ve sigara dumanında bulunan bazı kimyasalların bu cyt. P450 genlerinin aktivitesini arttırdığı ve ya azalttığı çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir.

Son yıllarda, bir cyt. P450 enzimi aktivitesinin akciğer kanseri ile bağlantısı olduğunun ortaya konması onun regülasyonu konusunda büyük ilgi toplamıştır. Enzimin bu oldukça yüksek indüklenebilen haline sahip bireylerin tümör oluşturmaya oldukça duyarlı oldukları çeşitli çalışmalarla gözlenmiştir. Bu regülasyon mekanizmasının ortaya konması, bir dioksin türevinin (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin) cyt. P450 enziminin en potansiyel indükleyicilerinden biri olduğunun keşfi ile başlamıştır (14). Daha sonra bu dioksin türevinin farelerde çok güçlü tümör oluşumunu sağlayıcı bir kimyasal olduğu ortaya çıkmıştır (15). Bu regülasyon mekanizmasında, dioksinin sitoplazmada bulunan bir aril hidrokarbon hidroksilaz reseptörüne bağlanması ile oluşan kompleks, bir hücre çekirdeğine bağlı transferaz enzimine bağlanır. Bu şekilde hücre çekirdeğine giren bu kompleks cyt. P450 geninin üzerinde bulunan ve ksenobiyotik düzenleyici bölge olarak bilinen spesifik bir bölgeye bağlanırlar. Böylece, bu işlem diğer bazı faktörlerin de etkisiyle, kalıp olan cyt. P450 mRNA 'sının sentezini aktive etmiş olur. İlaç ve diğer ksenobiyotik kimyasalların metabolizmasında rol alan diğer protein türlerinin de aynı mekanizmalarla kontrol edildiği bilinmektedir (1).

1.2.4. Fonksiyonları

Cyt. P450 enzimlerinin biyolojik fonksiyonlarını ilgilendiren iki görüş vardır. Biri, bu enzimler temel olarak endojen bileşiklerin metabolizmasında görev yapmaktadır. Diğeri ise, yabancı kimyasalları organizma bünyesinden uzaklaştırmaktır. Her iki görüşü de destekleyen örnekler mevcuttur. Bazı durumlarda, her iki fonksiyonunda tek bir enzim tarafından gerçekleştirilebildiği bilinmektedir. Fakat çoğu kez, bazı enzimler bir ya da diğer amaca yönelik görev yapar.

Bazı cyt. P450 enzimlerinin esas görevlerinden biri ilaçların metabolizmasıdır. Ayrıca cyt. P450 reaksiyonları karsinogenlerin metabolizmasında da oldukça önemlidir. Bu enzimlerin organizmada aktivitesi karsinogene bir cevap olarak tümör oluşumu ile

sonuçlanacak pozitif ya da negatif etkilere sebebiyet verebilir. Bazı durumlarda özel bir cyt. P450 enzimi var olmadıkça, karsinojenler biyolojik bir hasar oluşturmaz. Böyle durumlarda, enzimler karsinojenleri modifiye eder ve bu maddeler kimyasal olarak aktif ya da elektrofilik olur. Dolayısıyla aktiflenmiş karsinojenler bu enzimler vasıtasıyla mutasyonlar vermek üzere DNA ile kovalant olarak etkileşirler. Mesela, insan cyt. P450 1A2 enzimi kısmen yanmış yiyecek ve sigara dumanından kaynaklanan karsinojenik etkilerden sorumludur. Yiyecek maddelerinin yanması heterosiklik amin vermek üzere aminoasitleri ve karbohidratları değiştirir. Bununla birlikte, bu heterosiklik aminler cyt. P450 enzimi ile aktive edilmedikçe karsinojenik değildir.

İlaçları ve karsinojenleri modifiye etmenin yanında, cyt. P450 enzimleri, endojen bileşiklerin modifikasyonunda da görev yaparlar. En önemli fonksiyonlarından biri steroid, safra asitleri ile A ve D vitamini gibi maddelerin hidroksilasyonudur. Bu hidroksilasyonlar, bazı genetik hastalıkların tanısında önemlidir. Endojen alkaloidler de cyt. P450 enzimleri için birer substrattırlar. Bu alkaloidlerden ikisi olan kodein ve morfinin sentezinde cyt. P450 enzimleri rol oynar.

Özellikle karaciğerde bulunan mikrozomal cyt. P450 enzimleri, genelde hidrofobik maddeleri, vücuttan kolayca uzaklaştırılabilen daha hidrofilik türevleri haline dönüştürme fonksiyonunu yaparlar. Mesela, bir lipofilik bileşik, bir cyt. P450 enzimi tarafından hidroksile edilebilir ve ardından bir hidroksil grubu, bir sülfat ya da glukuronik asit ilave eden transferaz enzimleri için bir substrat olabilir. Konjuge olmuş hidrofilik madde daha sonra idrar ya da safra yoluyla organizmadan kolayca uzaklaştırılır. Bununla birlikte, organizmanın bu savunma mekanizması; bazı bileşiklerin oksijenasyonu sırasında oluşan yüksek enerjili ara ürünler; DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerle etkileşerek mutasyon, hücre transformasyonu ve ölümü ile toksiteye sebep olabilmektedir. Cyt. P450 lerin bu özelliği onların substrat spesifite ve regülasyonlarının tamamen anlaşılması gerekliliğini ortaya koyar.

1.3. Anilin Hidroksilaz Aktivitesi

Anilin, birçok hayvan türüne ve insana oldukça toksik olduğu tespit edilen önemli endüstriyel kimyasallardan biridir. Endüstride; bazı ilaçların sentezinde, azo boyaların üretiminde, bazı selülozik maddelerin elde edilmesinde, plastik endüstrisinde ve çözücü olarak laboratuvarlarda oldukça bol miktarda kullanılmaktadır.

20. yüzyılın başlarında anilin üretimi yapan bir fabrikadaki işçiler arasında mesane kanserinin görülmesinden sonra, anilin ve çeşitli türevlerinin mesane kanserine sebep olduğuna inanılmaktaydı. Epidemiyolojik ve toksikolojik çalışmalar, anilinın yüksek derecede kronik ve akut toksiteye sahip olduğunu göstermesine rağmen son yıllarda deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, anilin ya da bir anilin türevi olan asetanilidin

herhangi bir karsinojenik aktiviteye sahip olup olmadığı konusunda güvenilir deliller elde edilememiştir. Akut anilin zehirlenmesinde, esas semptom kanda kısmen methemoglobin oluşumu ile sonuçlanan siyanozdur. Methemoglobinemi dışında, anilin eritrositlerde morfolojik değişmelere de sebep olur.

İnsan, hayvan ve diğer organizmaların anilin ve anilin türevlerine doğrudan temas yoluyla maruz kaldığı birçok kaynak mevcuttur. Bu ksenobiyotiğin organizmaya çevreden alınışı solunum veya sindirim ile ya da organizmanın çevre ile etkileşimde olan vücut yüzeyleri ile gerçekleşir. Buna ilave olarak, anilinin bir türevi olan asetanilid şeklinde ve bazı ilaçların bir metaboliti olarak enzimatik yolla vücutta oluşturulabilir.

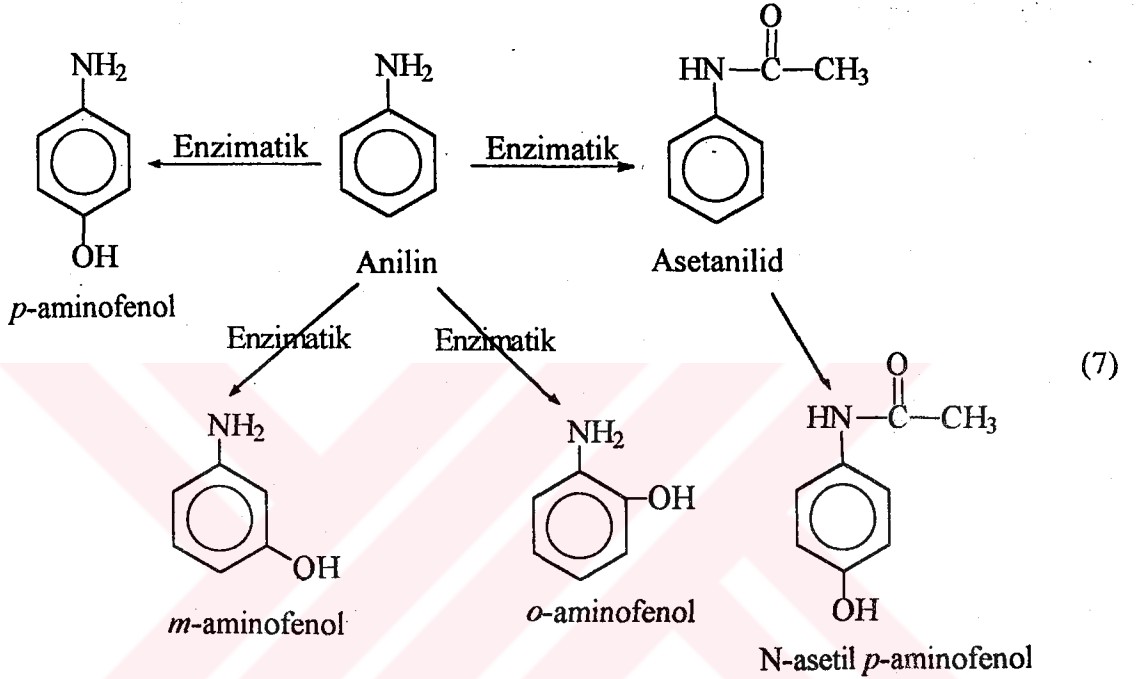
Son yıllarda, anilin ve türevlerinin üretiminden ziyade, bu kimyasalların çevre ve çevrede bulunan organizmalarla etkileşimleri ile ilgili problemler gittikçe daha açık olarak ortaya çıkmaktadır. Sonuçta, böyle kimyasalların üretim ve kullanım alanlarından çeşitli çevre ortamlarına yayıldığı gözlenmektedir. Bu şekilde, aşırı anilin ya da anilin türevleri nehir ve gölleri kirletebilmektedir. Kirletilmiş nehir ve göl suları yoluyla anilin ya denizlerde birikerek denizde yaşayan canlılara ya da bu suları içme suyu olarak kullanan canlılara doğrudan etki eder. Bu sebeplerle, anilin ve türevlerinin biyokimyasının, hem insana ve hem de insana besin kaynağı olabilen organizmaların besin zincirine girerek doğrudan ve bu besinlerle beslenenlere dolaylı olabilecek etkilerin ve problemlerin dikkate alınarak araştırılması zorunluluğu vardır. Aynı zamanda bu problemlerin ve etkilerin çözümlenmesi uygun bir ekolojik dengenin sağlanması ve korunması için de gereklidir.

Balığın besleyici değerinin oldukça yüksek olmasına ve insanlar tarafından bolca tüketilmesine rağmen çok sayıda ksenobiyotiğin ve özellikle anilin ve türevlerinin balık tarafından metabolize edilmesi konusunda literatürde çok sınırlı sayıda bilgi birikimi mevcuttur. Bu sebeple bu tür kimyasalların balık karaciğerinde hangi dereceye kadar metabolize edildiği oldukça fazla önem arz etmektedir.

Anilinin *in vivo* metabolizması memelilerde ve kuşlarda çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda, anilinin bu organizmaların yaşadığı değişik ekosistemlerdeki etkileri ve metabolizasyonu incelenmiş ve sonuç olarak anilinin orto ve para mevkiilerinden hidroksillendiği gözlenmiştir (16). Bu bulgular, iki bağımsız enzim sisteminin ihtiva edildiği ve anilin-2-hidroksilaz aktivitesinin karnivorlarda daha fazla olduğunu, diğer türlerde ise *p*-hidroksilasyonun baskın olduğunu öne sürmüşlerdir. Bazı türlerde ise, anilinin hemen hemen eşit derecede *o*- ve *p*-aminofenol oluşumu yoluyla metabolize edildiği ortaya konmuştur (16).

Bunula birlikte tavşanda anilinin *in vivo* metabolizması *o*-, *m*- ve *p*-aminofenollerin oluşumu ile sonuçlanmıştır. Fakat tavşan karaciğer mikrozomlarının anilini daha baskın olarak *p*-pozisyonunda hidroksile ettiği ve daha çok *p*-aminofenollerin oluştuğu gözlenmiştir. *m*-aminofenolün ise ihmal derecesinde az olduğu bildirilmiştir (16). Anilinin,

çeşitli çalışmalarla ortaya konan, *in vivo* metabolizması ve oluşan metabolitler aşağıda verilmiştir.



Anilin hidroksilaz aktivitesine sahip ekstraktlarda görülen aktivitenin cyt. P450 enzim sisteminin varlığına bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Koyun karaciğer mikrozomlarından deterjanla izole edilmiş cyt. P450 ile yapılan çalışmalarda karışık fonksiyonlu oksidazlara dahil olan anilin hidroksilazın aktivitesi rekonstitüye edilmiştir. Bu sonuçlar anilin hidroksilazın esasta, anilin substratını hidroksile eden bir cyt. P450 olduğunu ortaya koymuştur (17). Diğer bazı çalışmalarda anilin hidroksilaz enzimi aktivitesinin organizmanın türü, cinsiyeti, yaşı, beslenme durumuna ve aynı zamanda enzimin çalışıldığı doku, ortamın sıcaklığına ve hayvanın bir ön işleme tabii tutulup tutulmamasına bağlı olduğu gözlenmiştir (18-20). Bazı memeli türlerinde ise karaciğer anilin-4-hidroksilaz aktivitesi tespit edilmiş ve aktivite için NADPH ve oksijen gerektiği bildirilmiştir (21).

Karaciğer mikrozomal anilin-4-hidroksilaz tarafından, anilinden *p*-aminofenolün oluşumunun, bir detoksifikasyon işlemi olduğunu vurgulamak gerekir. Dolayısıyla, balık

karaciğer mikrozomları anilin-4-hidroksilaz enziminin özelliklerini bilmek oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca, bu enzimin rol aldığı elektron taşıma sistemi konusunda detaylı bilgilere ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı, gökkuşuğu alabalığı (*Salmo gairdneri*) karaciğer mikrozomlarında anilin hidroksilaz aktivitesinin karakterizasyonu, maksimum enzim aktivitesi için gerekli şartların optimizasyonu, enzim aktivitesinin kofaktör ihtiyacı ve metal iyon etkisinin araştırılmasını kapsamaktadır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Trikloroasetik asit, *p*-aminofenol, sodyum kolat, folin reaktifi, dihidronikotinamid-adenininükleotidfosfat (NADPH) tetra sodyum tuzu, dihidronikotinamid-adenininükleotid di sodyum tuzu, kalsiyum klorür, sığır serum albumini Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A. dan sağlandı. Sodyum hidroksit, sodyum karbonat, bakır sülfat, etilen diamin tetraasetikasit disodyum tuzu, monobazik potasyum fosfat ve dibazik potasyum fosfat, potasyum klorür, kadmiyum klorür, nikel klorür, magnezyum klorür, sodyum-potasyum tartarat, anilin, sodyumditiyonit ve fenol Merck A.G., Darmstadt, Germany firmasından satın alındı. Sitokrom P450 tayininde kullanılan %100 karbonmonoksit gazı Habaş, İstanbul firmasından temin edildi. Diğer bütün maddeler, analitik saflıkta olup diğer ticari firmalardan temin edildi.

2.2. Metod

2.2.1. Balık Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan gökkuşuğu alabalığı (*Salmo gairdneri*) Uysaç, Yomra ve Özbalkçılık, Rize Su ürünleri firmaları ile Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü, Yomra 'dan sağlandı. Balıkların denizden alındığı kafeslerin kıydan uzaklığı 250 ± 50 m ve balığın alındığı deniz suyu derinliği ise 2 ± 0.5 m idi. Balıkların alındığı andaki deniz suyu sıcaklıkları $18 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak kaydedildi. Gökkuşuğu alabalıklarının ağırlığı 0.66 ± 0.2 kg, boyu 32 ± 2.4 cm idi. Elde edilen değerler, ortalama değer \pm standart sapma olarak verildi.

Balıklar denizden çıkarılır çıkarılmaz dekapitasyonla öldürüldü. Karaciğerleri alınıp safra kesesi uzaklaştırıldıktan sonra plastik tüplere konup, sıvı azot içerisinde laboratuvara taşındı. Karaciğerler birkaç gün içerisinde kullanılmak üzere -29°C de derin dondurucuda saklandı.

Mikrozoamların hazırlanmasında 5 adet balık karaciğeri kullanıldı. Bütün adımlar $0-4^\circ\text{C}$ de homojen soğutma sistemine sahip soğuk odada gerçekleştirildi. Derin dondurucudan çıkarılan karaciğerler literatürde belirtildiği gibi 4°C de bir saat bekletilerek donmuş karaciğerler gevşemeye bırakıldı. Karaciğerler 4°C de önce saf su ile ve daha

sonra da birkaç kez % 1.15 lik KCl çözeltisi ile yıkandı. Islak karaciğer dokuları, süzgeç kağıdı üzerinde bekletilerek su uzaklaştırıldı ve 36.14 ± 0.10 g olarak tartıldı. Homojen bir karaciğer numunesi elde edebilmek için bu dokular 10 mM EDTA ihtiva eden % 1.15 lik KCl çözeltisinde ve buz banyosu üzerinde Braun marka el blendırı ile küçük parçalara ayrıldı ve Potter-Elvehjem teflon homojenizer ile buz banyosunda homojenize edildi. Bu homojenizasyon işlemi 8 kez tekrarlandı. Ele geçen homojenat mikrozomların hazırlanmasında kullanıldı (22). Mikrozomlar literatüre uygun şekilde elde edildi (23).

Homojenat çözeltisi, önce Heraus marka yüksek hızlı soğutmalı santrifüjde $3.000 \times g$ ve $0^\circ C$ de 10 dak santrifüj edildi. Pellet uzaklaştırıldıktan sonra ele geçen süpernatant $11.000 \times g$ de $0-4^\circ C$ de 20 dak kadar santrifüj edildi. Bu aşamada oluşan pellet, peroksizom, mitokondri, lizozom ve golgi cisimcikleri ihtiva ettiğinden uzaklaştırıldı ve mikrozomları ihtiva eden süpernatant alındı. Süpernatantın 9 mL sinde 1 mL olacak şekilde 80 mM $CaCl_2$ ilave edildi ve buz banyosunda yarım saat olgunlaşmaya bırakıldı. Bulanık çözelti $27.000 \times g$ de $0^\circ C$ de 25 dak santrifüj edildi. Mikrozomları ihtiva eden pellet yukarıda kullanılan homojenizasyon çözeltisinin eşit hacmi ile yıkandı ve $27.000 \times g$ de $0^\circ C$ de tekrar 30 dak santrifüj edildi. Ele geçen mikrozomal pellet %20 gliserin (v/v) ve 0.1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.4, ile karaciğer ağırlığının yarısına eşit hacmi ile homojenize edildi. Homojenat ya hemen çeşitli analizler için kullanıldı ya da $-29^\circ C$ de derin dondurucuda saklandı (23).

2.2.2. Analitik İşlemler

2.2.2.1. Protein Tayini

Mikrozomların protein içeriği Lowry metodu ile tayin edildi (24). Bu işlemde standart olarak kristal sığır serum albumini kullanıldı. Kalibrasyon için bir seri serum albumin çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere %1 $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ve %2 Na-K tartaratın 0.1 N NaOH ihtiva eden çözeltiye ilavesi ile hazırlanan çözeltiden, 2.5 mL ilave edilip, 10 dak oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 1:1 oranında seyreltilmiş folin reaktifinden 0.25 mL ilave edildi. Karanlıkta 30 dak kadar bekletildikten sonra 660 nm deki absorbanlar, standart serum albumin ve hazırlanan mikrozom örnekleri için okundu ve bu mikrozomal örneklerdeki protein miktarları $\mu g / mL$ olarak tayin edildi.

2.2.2.2. Sitokrom P450 Tayini

Cyt. P450 spektrofotometrik olarak Shimadzu model UV-120-01 uv-vis spektrofotometre ile ölçüldü (5, 25).

0.1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.4, içinde hazırlanmış mikrozomal çözeltiden, birer mL hem örnek hem de referans küvetlerine yerleştirildi. Örnek küvetinde bulunan çözeltiden 20 saniye kadar karbonmonoksit gazı dikkatlice geçirildi. Her iki küvetteki çözelti de sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ilavesi ile indirgeni. Örnek küvetindeki indirgenmiş çözeltiden tekrar 20 saniye kadar CO gazı geçirildi ve fark spektrumları alındı. Bütün spektrofotometrik ölçümler oda sıcaklığında yapıldı. Cyt. P450 içeriği $A_{450} - A_{490}$ farkı için molar absorblama katsayısı $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ alınarak hesaplandı (5, 25).

2.2.2.3. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini

Balık karaciğer mikrozomlarında anilin-4-hidroksilaz aktivitesi, denklem 7 de oluşan *p*-aminofenol miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi (17, 26).

İnkübasyon karışımının 1.0 mL si ; 0.1 M fosfat tamponu, pH 7.4, 10 mM anilin, 1.44 mg mikrozomal protein ve 10 mM NADPH içermektedir. Reaksiyon karışımı destile su ile 1.0 mL ye tamamlandı. NADPH ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve 37 °C de hava oksijeni altında hafif sallantılı su banyosunda 25 dak reaksiyona devam edildi. Reaksiyon süresi sonunda 0.5 mL %20 TCA ilavesiyle reaksiyon durduruldu. Bozunmuş proteinler 16.000 x g de 15 dak santrifüj edilerek ayrıldı. Son olarak alınan 1.0 mL lik çözeltilere, 0.5 mL %20 Na_2CO_3 çözeltisi ve %4 fenol ihtiva eden 0.4 N NaOH çözeltisinden 0.5 mL ilave edildi. Karışım 37 °C de 30 dak inkübe edildi. Oluşan mavi rengin yoğunluğu 630 nm de Shimadzu model UV-120-01 uv-vis spektrofotometre ile ölçüldü.

Bu denemede standart olarak *p*-aminofenol çözeltisi kullanıldı. Kalibrasyon için bir seri *p*-aminofenol çözeltisi hazırlandı. Reaksiyon karışımını 1.0 mL ye tamamlamak için destile su yerine, eşit hacimde kalibrasyon çözeltisi ilave edildi. Reaksiyonu başlatıp derhal durdurmak için 500 μL %20 TCA çözeltisi de başlangıçta ilave edildi. Böylece toplam hacmi 1.5 mL olan inkübasyon karışımının reaksiyonu, deneme ile aynı şartlarda gerçekleştirildi ve 630 nm de mavi rengin yoğunluğu ölçüldü.

Tablo 3. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini İçin Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Stok Çözelti	Hacim (mL)	Nihai Kons. (1 mL)
Fosfat tamponu, pH 7.40	200 mM	0.50	100 mM
Anilin	100 mM	0.10	10 mM
Mikrozom	5.76 mg protein /mL	0.25	1.44 mg protein
Su	-	0.10	-
NADPH	10 mM	0.05	0.5 mM

Anilin-4-hidroksilaz 'ın karakterizasyonu ise aşağıdaki denemelerle sağlandı.

A. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Kofaktör Etkisi

Bu işlemde kofaktör hariç, Tablo 3. te belirtilen diğer reaksiyon bileşenleri eşit hacim ve konsantrasyonda alındı. Kofaktör olarak her bir reaksiyon karışımında farklı olmak üzere NADPH, NADH, NADPH-NADH (1:1) ve NADPH üretim sistemi kullanıldı. Deneme anilin-4-hidroksilaz aktivitesi tayininde olduğu gibi aynı şartlarda ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4. Reaksiyon Karışımlarının Kofaktör Muhteviyatı

Kofaktör	Stok Çözelti	Hacim (mL)	1 mL reaksiyon karışımındaki kons.
Kontrol	-	0.050	-
NADH	10 mM	0.050	0.50mM
NADPH	10 mM	0.050	0.50 mM
NADH-NADPH (1:1)	10 mM-10 mM	0.025-0.025	0.25 mM-0.25mM
NADPH Üretim sistemi :			
<i>Glukoz-6-Fosfat</i>	50 mM	0.025	2.50 mM
<i>MgCl₂</i>	50 mM	0.025	2.50 mM
<i>Fosfat Tamponu, pH 7.4</i>	200 mM	0.071	14.2 mM
<i>NADP⁺</i>	10 mM	0.025	0.25 mM
<i>Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz</i>	140 ünite/mL	0.004	0.56 ünite

B. Mikrozomal Protein Miktarının Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu işlemde mililitresindeki mikrozomal protein miktarı birbirinden farklı olacak şekilde bir seri mikrozomal protein çözeltisi hazırlandı. Tablo 3. te belirtilen diğer reaksiyon bileşenleri eşit konsantrasyon ve hacimde alındı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mikrozomal protein çözeltileri de iştirak ettirilip reaksiyon başlatıldı. Reaksiyona 37 °C de 25 dak devam edildi. Deneme anilin-4-hidroksilaz aktivitesinin tayininde olduğu gibi gerçekleştirildi.

C. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonu Etkisi

Bu işlemde konsantrasyonu farklı bir seri anilin çözeltisi hazırlandı. 1 mL inkübasyon karışımını oluşturan diğer bileşenler 0.1 M fosfat tamponu, pH 7.4, 10 mM anilin, 0.5 mg mikrozomal protein, 0.5 mM NADPH olacak şekilde hazırlandı. Bileşenlerin hacmi Tablo 3. te belirtilen ile aynı idi. Reaksiyon anilin-4-hidroksilaz aktivitesi tayininde olduğu gibi aynı şekilde ve aynı şartlarda gerçekleştirildi.

D. Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine *In Vitro* Metal İyonlarının Etkisi

Bu denemede Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} ve Fe^{+3} olmak üzere toplam 6 ayrı metal iyonunun bir seri çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon karışımı, 1 mL sinde, 0.1 M Fosfat tamponu, pH 7.4, 10 mM anilin, 0.5 mg mikrozomal protein, 0.5 mM NADPH olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımlarını 1.0 mL ye tamamlamak için 0.1 mL destile su yerine farklı konsantrasyonlarda *in vitro* metal iyonu çözeltileri ilave edildi. Reaksiyon anilin-4-hidroksilaz aktivitesi tayininde olduğu gibi aynı şekilde ve aynı şartlarda gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Protein Tayini

Santrifüjleme ile elde edilen mikrozomların protein içeriği Lowry ve arkadaşları (24) tarafından belirtildiği gibi tayin edildi. Bu işlemlerde, standart olarak kristal bovine serum albumin kullanıldı ve protein içeriği 28.85 mg/mL olarak tespit edildi.

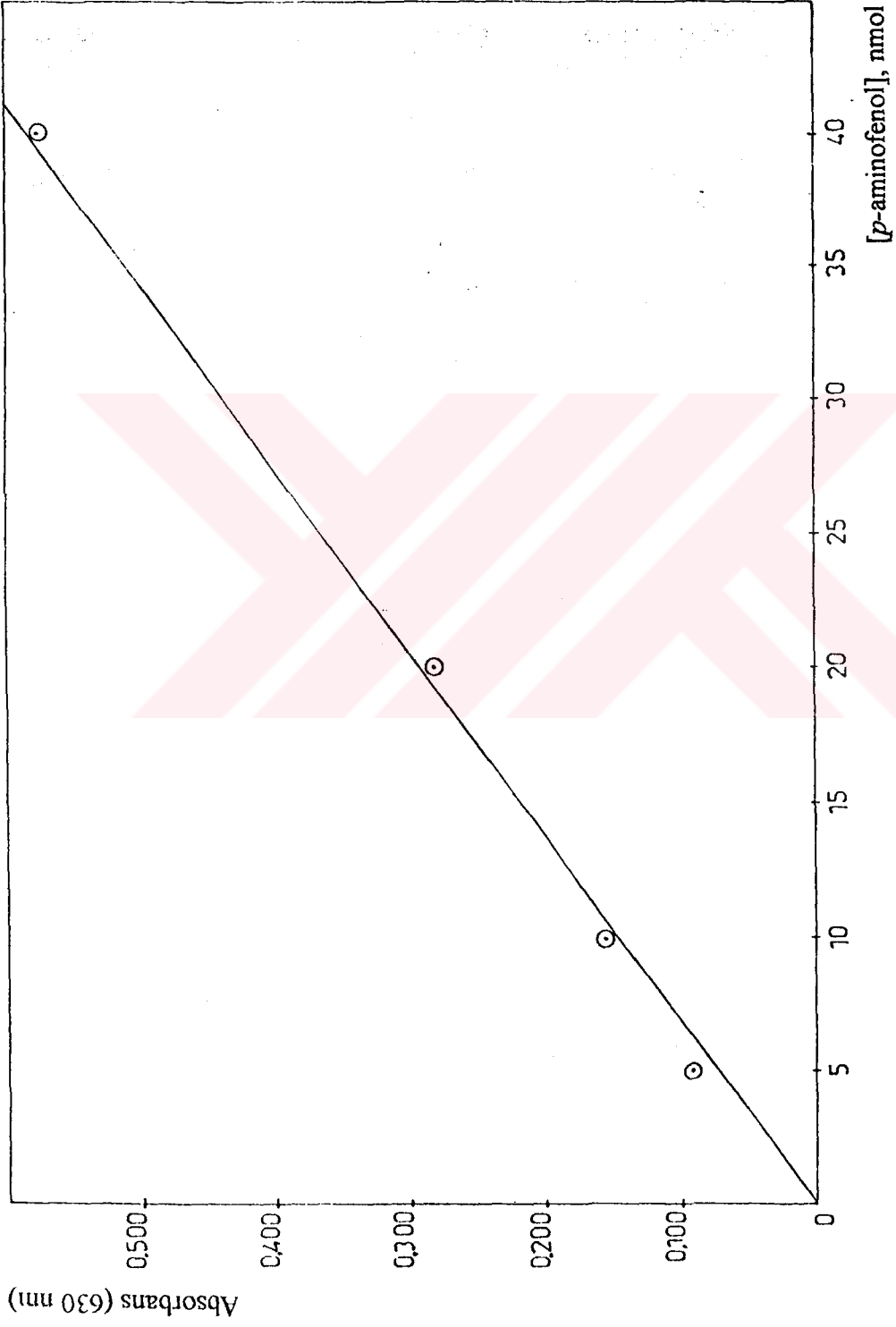
3.2. Sitokrom P450 Tayini

Sitokrom P450 konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ve molar absorblama katsayısı $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak tayin edildi (5, 25). 0.1 M Potasyum fosfat tamponunda, pH 7.4, hazırlanan mikrozomal fraksiyonları örnek ve referans küvetlerine konuldu. Karbonmonooksit gazı dikkatlice ve 20 sn süresince örnek küvetinden geçirildi. Her iki küvette bulunan fraksiyonlara sodyum ditiyonit ilave edilerek indirgendi. Tekrar örnek küvetindeki mikrozomal ekstraktan CO gazı 20 sn geçirildi. 450 nm deki absorbans farkı okunarak cyt. P450 içeriği 0.1122 nmol/mg protein olarak belirlendi.

3.3. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomları Anilin Hidroksilaz Aktivitesi

Doğu Karadeniz'deki belirli kafes istasyonlardan alınan gökkuşığı alabalığı karaciğerlerinden daha önce çalışmalarda belirtilen işlemlerle (23, 27) hazırlanan mikrozomlarda anilin hidroksilaz aktivitesinin varlığı araştırıldı. Bu enzimin aktivitesi, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan *p*-aminofenolün miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi (26). 630 nm deki absorbanslara karşı elde edilen *p*-aminofenol standart kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.) kullanılan deney şartları durumunda bir doğru vermiştir. Anilin hidroksilaz spesifik aktiviteleri birkaç defa çeşitli karaciğer mikrozomal ekstraktlarında ölçüldü ve spesifik aktiviteler, dakikada miligram mikrozomal protein başına oluşan nanomol *p*-aminofenol (ünite/mg protein) olarak ifade edildi. Ortalama spesifik aktivite 0.0686 U/mg mikrozomal protein olarak tespit edilmiştir.

Hazırlanan ekstraktlardaki anilin hidroksilaz aktivitesi, mikrozomlar derin dondurucuda saklandığında yaklaşık 1-2 ay çok fazla değişmeden kalmıştır.



Şekil 4. *p*-aminofenol Kalibrasyon Eğrisi

3.4. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Anilin Hidroksilaz Enziminin Özellikleri

3.4.1. Anilin Hidroksilazın Kofaktör İhtiyacı

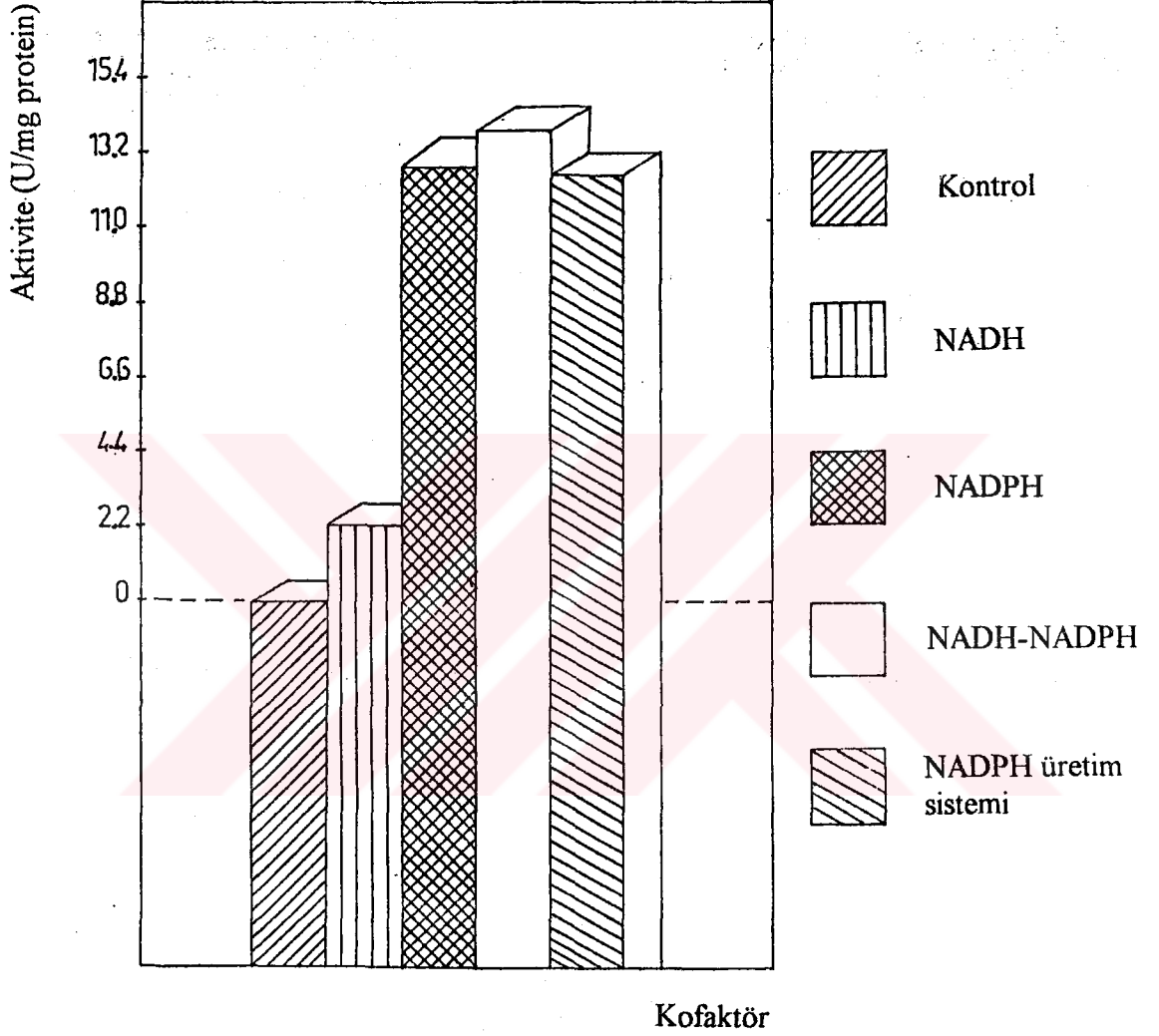
Çok çeşitli substratların hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyen ve cyt. P450 sistemini ihtiva eden enzimlerin NADH ve NADPH gibi bir kofaktöre ihtiyaç duyduğu sayısız çalışmalarla bildirilmiştir. Özellikle NADPH in maksimum anilin hidroksilaz aktivitesi için gerekli olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızda, karaciğer mikrozomal anilin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenen, anilinin hidroksilasyonu için kofaktör olarak NADH ve NADPH kullanıldı ve bu kofaktörlerin doygun konsantrasyonları (0.5 mM) varlığında aktivitedeki değişimler incelendi (Tablo 5.). Bu deneme şartlarında oldukça birbirine yakın fakat NADPH durumunda, NADH tan daha fazla anilin hidroksilaz aktivitesi tespit edildi. NADH ve NADPH birlikte kullanıldıklarında ise %8 daha fazla aktivite gözlemlendi. NADH (veya NADPH) yokluğunda ise ihmal edilebilir aktiviteler bulundu. Ayrıca NADPH üretim sistemi (Tablo 5.) varlığında aktivite %98 değerine ulaşmaktadır.

Tablo 5. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomları Anilin Hidroksilaz Aktivitesinin Kofaktöre Bağımlılığı

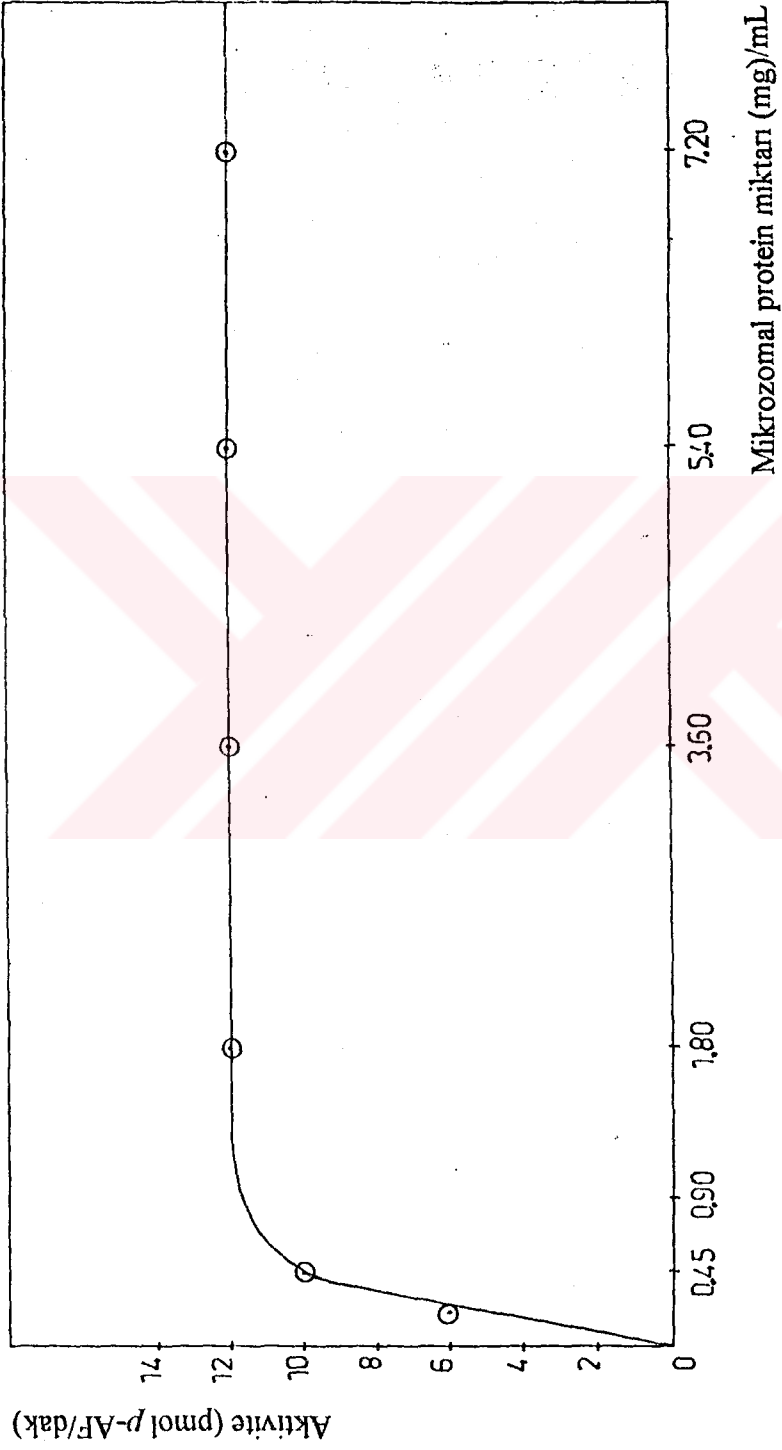
Koenzim	Nihai Konsantrasyon	Aktivite (pmol/dak/mg pro.)	% Aktivite
Kontrol	-	-	0
NADH	0.50 mM	2.2	17.0
NADPH	0.50 mM	12.9	100.0
NADH-NADPH (1:1)	0.25 mM-0.25 mM	13.8	107.7
NADPH üretim sistemi :		12.7	98.0
<i>Glukoz-6-Fosfat</i>	2.50 mM		
<i>MgCl₂</i>	2.50 mM		
<i>Fosfat tampomu, pH 7.4</i>	14.20 mM		
<i>NADP⁺</i>	0.25 mM		
<i>Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz</i>	0.56 ünite		

3.4.2. Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Mikrozomal Protein İçeriğinin Etkisi

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mikrozomlarında gözlenen anilin hidroksilaz aktivitesinin, mikrozomal protein içeriği ile değişimi Şekil 6. da gösterilmektedir. Çeşitli



Şekil 5. Sabit Kofaktör Konsantrasyonlarında Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi



Şekil 6. Mikrozoal Protein Miktarının Anilin-4-Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

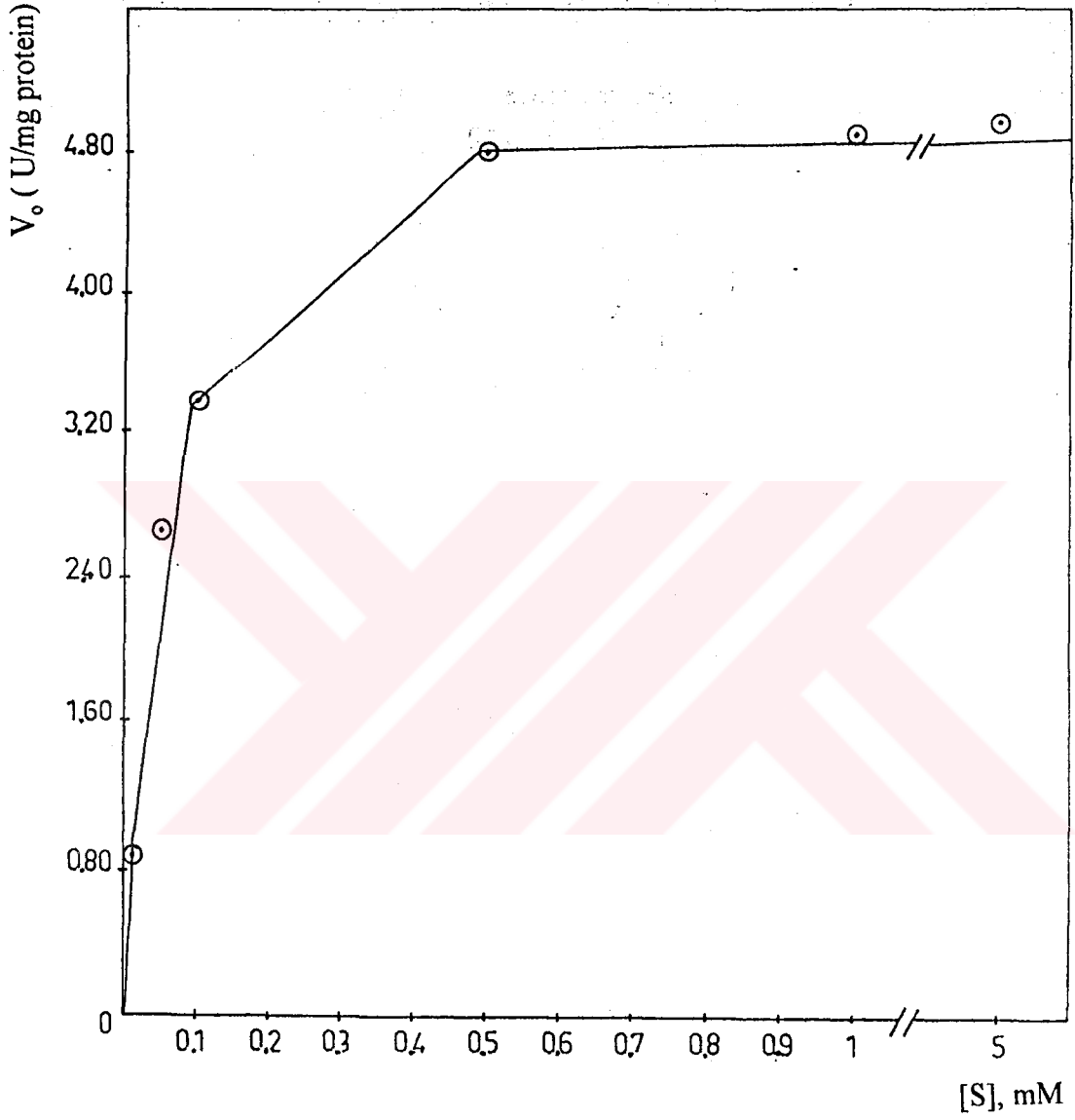
protein içerkli 1.0 mL lik mikrozoal karışımlarda, protein içeriğinin belirli miktarına kadar anilin hidroksilaz aktivitesinin lineer olarak değıştiğı gözlendi. Anilinin hidroksilasyon hızı, yaklaşık 0.5 mg mikrozoal protein içeriğine kadar düzgün bir şekilde arttığı ve 2 mg'ın üzerindeki protein konsantrasyonlarında ise anilin hidroksilaz aktivitesinin değışmediğı tespit edildi. Dolayısıyla bu çalışmada, yeterli aktivite elde edilebilecek şekilde 0.5 mg/mL mikrozoal protein konsantrasyonunu ihtiva eden mikrozoal inkübasyon karışımları kullanıldı.

3.4.3. Gökkuşuğı Alabalığı Karaciğer Mikrozoal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Anilin Substratı Konsantrasyonu Etkisi

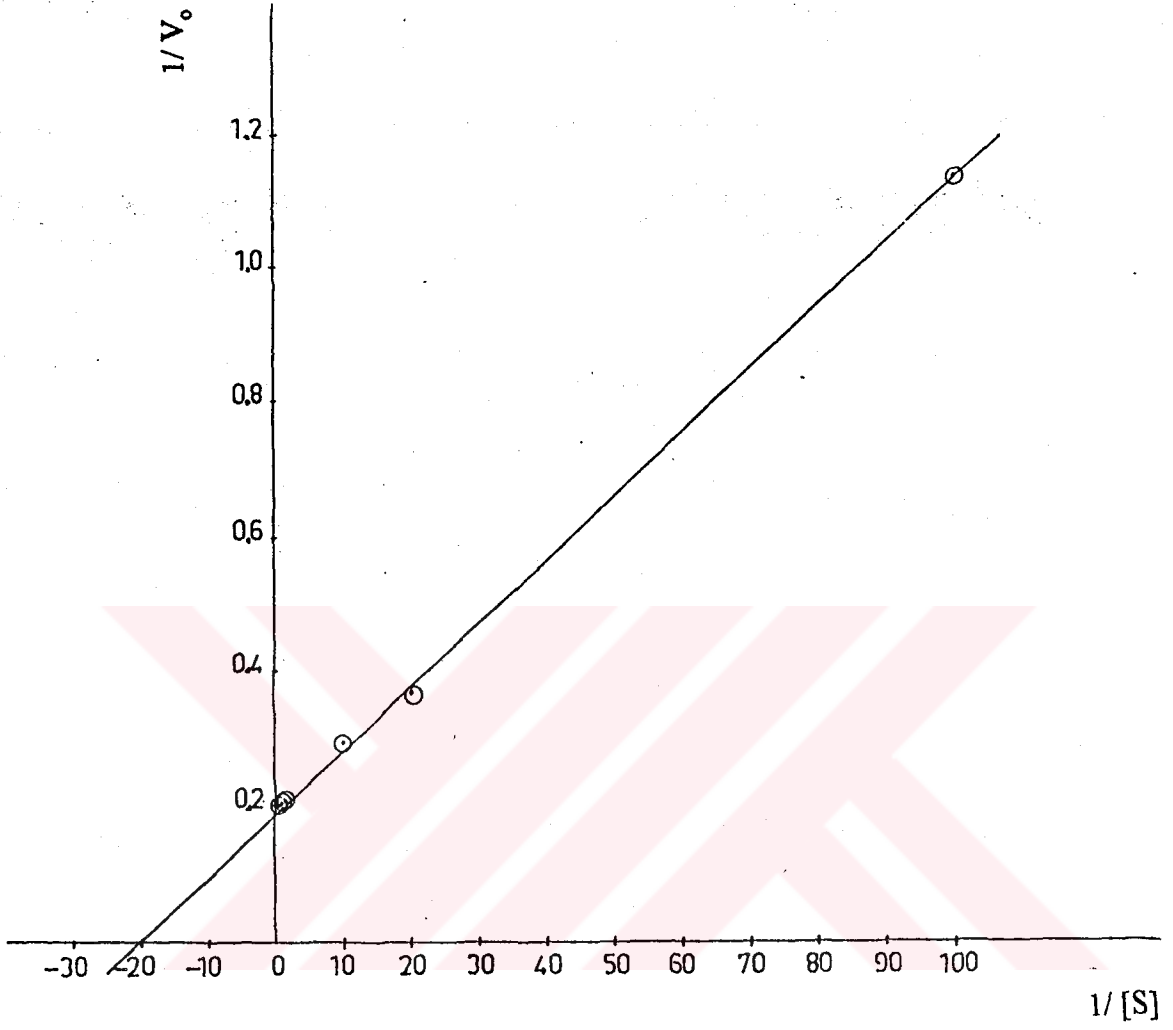
Gökkuşuğı alabalığı karaciğer mikrozoalarında anilinin *p*-aminofenole dönüşümünü katalizleyen bir hidroksilaz aktivitesi tespit edildikten sonra bu aktivitenin anilin substratı konsantrasyonu ile nasıl değıştiğı çeşitli anilin konsantrasyonlarının kullanıldığı kinetik deneylerle gözlendi. Gökkuşuğı alabalığı karaciğer mikrozoalarının substrat doygunluğunu gösteren eğri Şekil 7. de verildi. Anilinin *p*-aminofenole hidroksilasyonu için, optimum substrat konsantrasyonu, bu eğrinin, substrat konsantrasyonu artmasıyla değışmeyen veya sabit kalan aktivitedeki, minimum substrat miktarı 0.5 mM olarak belirlendi. 0.01-5 mM arasında değışen anilin konsantrasyonları kullanıldığında gözlenen aktivite değerleri ile çizilen Lineweaver-Burk (Şekil 8.) ve Eadie-Hofstee (Şekil 9.) oldukça lineer olup her iki eğri de çok uyumlu maksimum hız (V_{max}) ve Michaelis sabiti (K_M) değerlerini vermiştir. Lineweaver-Burk eğrisinden 5.30 U/mg protein V_{max} ve 0.050 mM K_M değerleri ve Eadie-Hofstee eğrisinden de V_{max} 5.40 U/mg protein ve K_M 0.051 mM değerleri elde edildi.

Tablo 6. Gökkuşuğı Alabalığı Karaciğer Mikrozoal Anilin Hidroksilaz Enzim Kinetiğı ve Anilin Konsantrasyonunun Etkisi

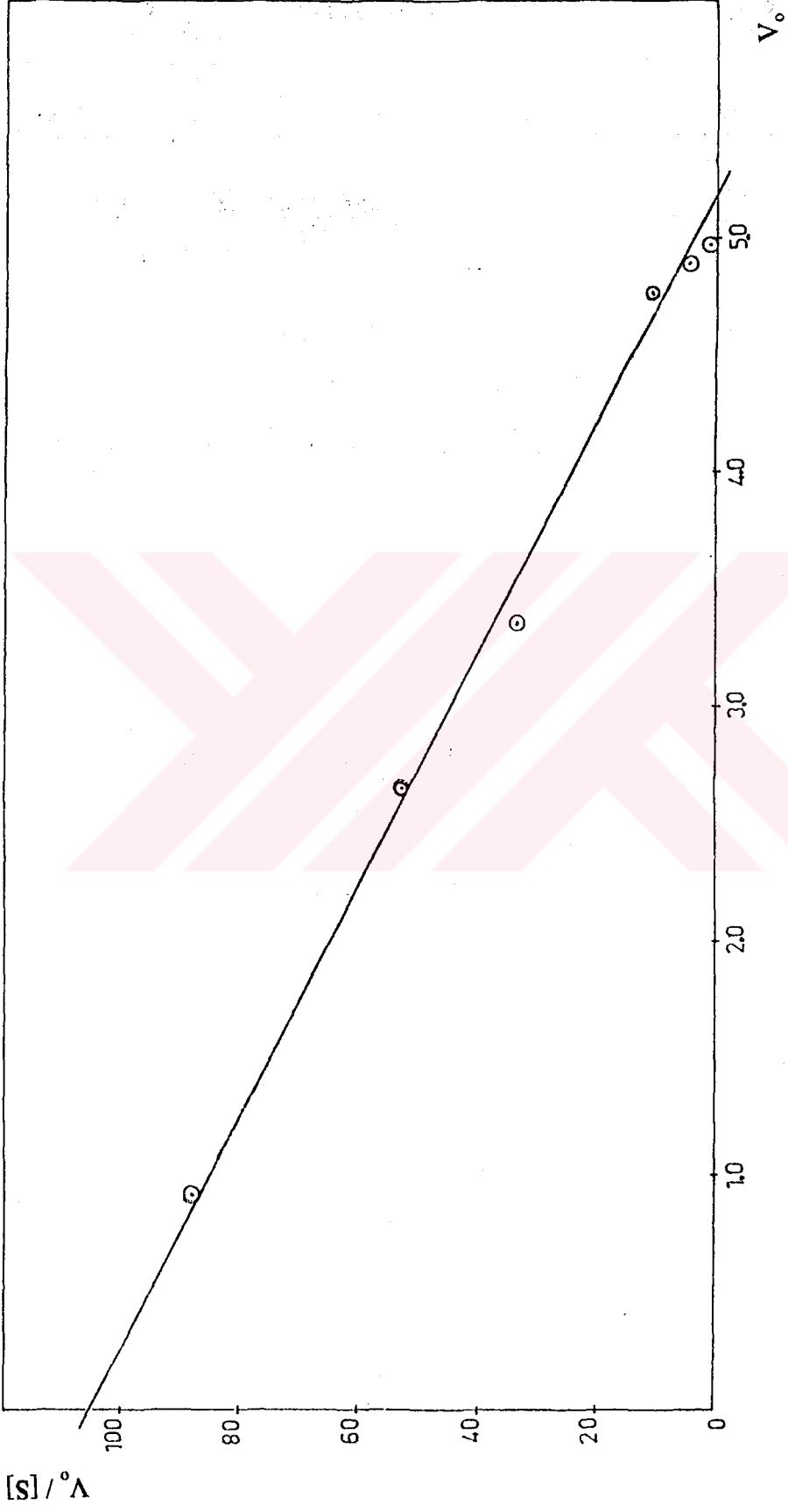
V_o (pmol/dak/mg)	[S] (mM)	$1/V_o$	$1/[S]$	$V_o/[S]$
0.88	0.01	1.1363	100.0	88.000
2.64	0.05	0.3787	20.0	52.800
3.36	0.10	0.2976	10.0	33.600
4.80	0.50	0.2083	2.0	9.600
4.88	1.00	0.2049	1.0	4.880
4.96	5.00	0.2016	0.2	0.992



Şekil 7. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Anilin Substratı Konsantrasyonu Etkisi



Şekil 8. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi (Lineweaver-Burk Eğrisi)



Şekil 9. Gökkuşuğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi
(Eadie-Hofstee Eğrisi)

3.4.4. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine *In Vitro* Metal İyonlarının Etkisi

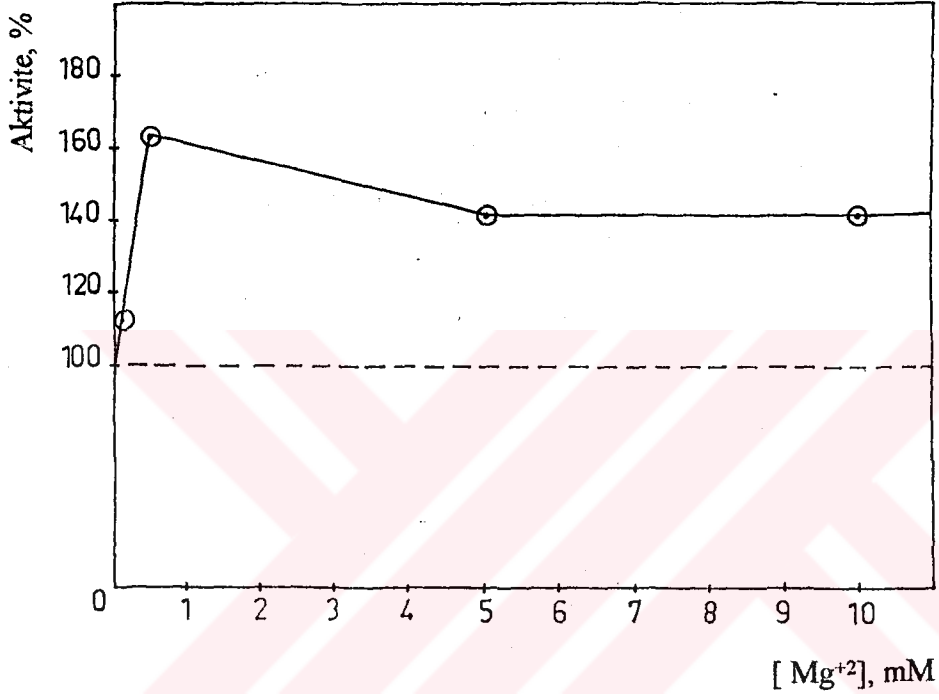
Gökkuşığı alabalığı karaciğer mikrozomlarında gözlenen anilin hidrosilasyonu reaksiyonuna metal iyonlarının herhangi bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla yaklaşık 0.1-10 mM konsantrasyon aralığında Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının ilavesi ile aktivitedeki değişimler gözlemlendi. Bu aktivite deneyleri yapılmadan önce mikrozomal karışımlar hazırlanırken mevcut olabilecek metal iyonlarının etkisini azaltmak ve sonuçları etkilemesini önlemek için 0.1 mM EDTA ihtiva eden potasyum fosfat tamponu, pH 7.4, ile karışımlar muamele edildi. Santrifüjleme işleminde mikrozomlar çöktürülüp bu metal iyonlarının etkisi ortadan kaldırıldı. Daha sonra, mikrozomlar uygun tampon ile homjenize edildi ve metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla uygun konsantrasyonlarda metal tuzları ilave edildi.

Tablo 7. ve Şekil 10. da 0.1-10 mM $MgCl_2$ konsantrasyonlarının anilin hidroksilaz aktivitesi üzerine etkisi görülmektedir. 0.5 mM Mg^{+2} konsantrasyonunda maksimum hidroksilaz aktivitesi gözlenmesine rağmen Mg^{+2} nin daha çok aktiviteyi stimüle edici etkisi olduğu gözlemlendi.

Tablo 7. Mg^{+2} İyonunun Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

[Mg^{+2}], mM	Aktivite (U/mg protein)	% Aktivite
0.0	10.8	100
0.1	12.0	111
0.5	17.6	163
5.0	15.2	141
10.0	15.2	141

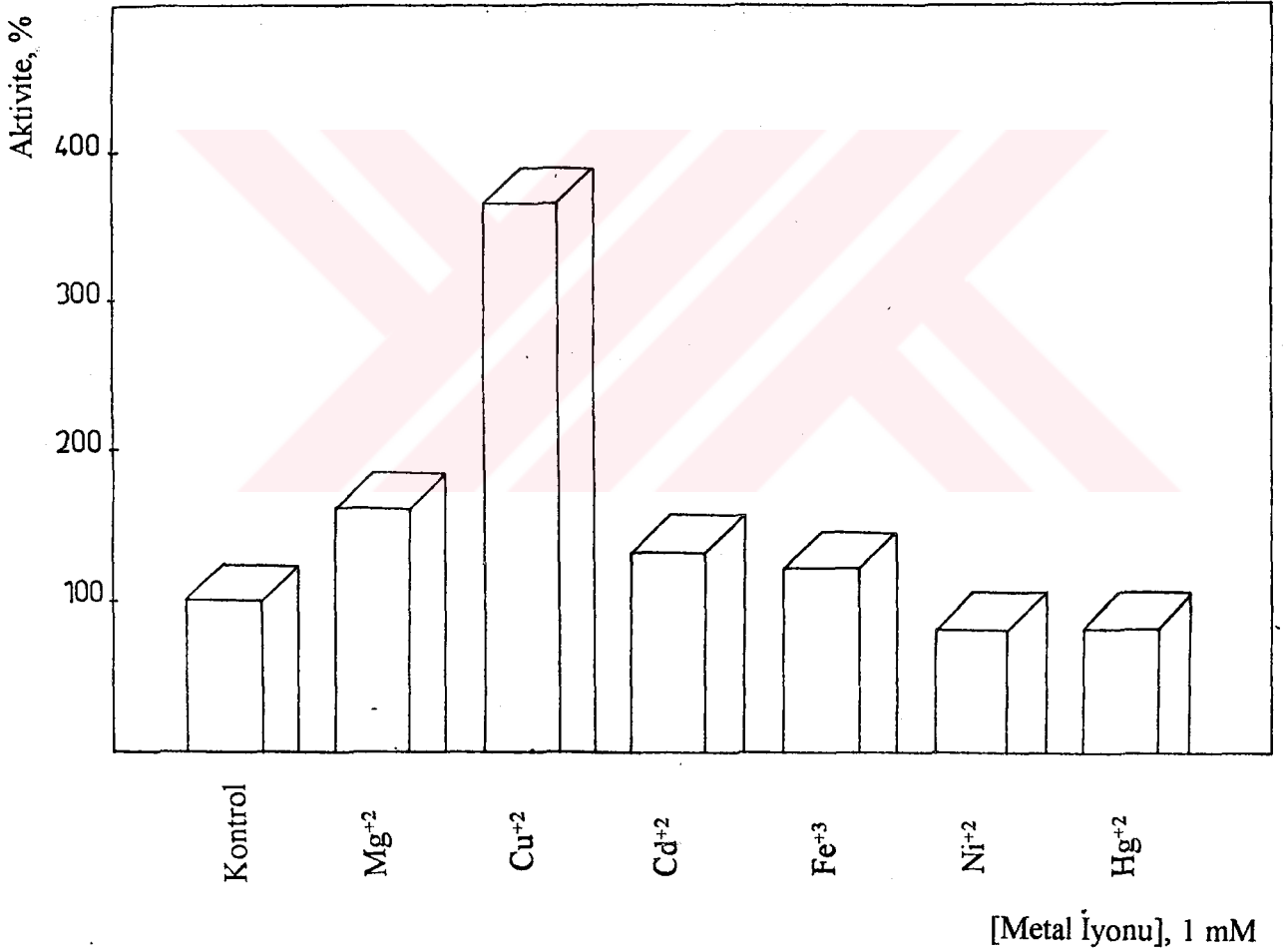
Tablo 8. de çeşitli metal iyonlarının alabalık karaciğeri mikrozomal anilin hidroksilaz üzerine etkileri belirtilmektedir. Görüldüğü gibi Ni^{+2} iyonunun ilavesi ile anilin hidroksilaz aktivitesi 1 mM Ni^{+2} durumunda hemen hemen %23 oranında azalmıştır. Benzer bir etki Hg^{+2} nin 1 mM olduğu durumda da gözlenmiştir. 1 mM Cd^{+2} veya Fe^{+3} ise daha çok anilin hidroksilaz aktivitesini az oranda stimüle ederken Cu^{+2} iyonu diğer iyonlara göre aktiviteyi oldukça arttırmıştır.



Şekil 10. Mg²⁺ İyonunun Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tablo 8. Çeşitli Metal İyonlarının Gökkuşuğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

[Metal İyonu], 1 mM	% Aktivite
Kontrol	100
Mg ⁺²	163
Cu ⁺²	365
Cd ⁺²	131
Fe ⁺³	122
Ni ⁺²	78
Hg ⁺²	78



Şekil 11. Çeşitli Metal İyonlarının Gökkuşuğu Alabalığı Karaciğer Mikrozomal Anilin Hidroksilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz bölgesinde kültür olarak yetiştirilmekte olan ve endüstriyel öneme sahip Gökkuşuğu alabalığı Salmo gairdneri karaciğer mikrozomlarında anilin *p*-aminofenole dönüşümünü katalizleyen bir enzimin varlığı ortaya konmuş ve mikrozomlarda bu enzim sistemi çeşitli yönleriyle karakterize edilmiştir. Böylece, anilin hidroksilazın alabalık karaciğer mikrozomlarında varlığı, alabalıkta anilin için bir detoksifikasyon sisteminin görev yaptığını göstermektedir.

Çalışmalarımızda alabalık karaciğer mikrozomu anilin hidroksilaz aktivitesi 0.0686 nmol *p*-aminofenol/dak/mg protein olarak tespit edilmiştir. Anilin hidroksilaz aktiviteleri yaklaşık olarak sığanda; 0.32, koyunda; 0.66, domuzda; 0.71 ve tavşanda da ortalama 0.75 nmol *p*-aminofenol/dak/mg protein (17, 27) olarak bildirilmektedir. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi alabalık karaciğer mikrozomları, yukarıdaki organizmalardaki anilin hidroksilaz aktivitelerine uygunluk göstermektedir.

Alabalık karaciğer mikrozomları üzerinde yaptığımız *in vitro* çalışmalarda, anilin hidroksilaz aktivitesi üzerinde çeşitli ortam şartlarının etkisi de araştırılmıştır. Santrifügasyonla elde edilen mikrozomlarda, anilin *p*-aminofenole hidroksilasyonu, 0.5 mg mikrozomal protein içeriğine kadar düzgün bir şekilde artmış ve yaklaşık 2.0 mg mikrozomal protein konsantrasyonu üzerindeki değerlerde, anilin hidroksilasyon hızının değişmeden kaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.). Benzer sonuçlar tavşan ve koyun karaciğer mikrozomal anilin hidroksilaz aktiviteleri için bildirilmektedir (17, 21).

Çok çeşitli araştırmacılar, çeşitli organizmaların karaciğer ve akciğer mikrozomlarında tespit ettikleri anilin hidroksilazın maksimum aktivitesi için NADPH in gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda NADH in da NADPH ile yarıştığı bazı çalışmalarla belirlenmiştir. Alabalık karaciğer mikrozomlarında tespit ettiğimiz anilin hidroksilaz aktivitesinin bu kofaktörlere bağımlılığı, bu bileşikler ayrı ayrı veya birlikte ya da NADPH üretim sistemi kullanılarak tayin edilmiştir (Tablo 5.). Deneme şartlarında ve doymuş kofaktör konsantrasyonlarında karaciğer mikrozomları NADPH ile NADH tan çok daha fazla anilin hidroksilaz aktivitesi göstermiştir. Bu iki kofaktör birlikte kullanıldıklarında ise, NADPH ile elde edilen aktiviteden ortalama %7.7 kadar daha fazla bir aktivite gözlenmiş, NADPH veya NADH 'ın her ikisinde yokluğunda ise ihmal edilebilir aktiviteler elde edilmiştir. NADH tek başına, NADPH ile gözlenen aktivitenin %17.7 si kadar aktiviteye sebep olmuştur. Ayrıca NADPH üretebilen bir sistem kullanıldığında da NADPH tek başına kullanıldığında elde edilen aktiviteye oldukça yakın (%98) bir aktivite değerine varılmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar diğer hayvanların mikrozoamlarında tespit edilen değerlerle oldukça uyumluluk göstermekte olması, yine alabalıkta benzer bir enzim sisteminin mevcudiyetini ortaya koymaktadır.

Şekil 7. de görüldüğü gibi alabalık karaciğer mikrozomal anilin hidroksilaz enzimi hemen hemen 0.5 mM konsantrasyonda anilin substratına doymakta ve maksimum hızlara varılabilmektedir. Ayrıca değişen substrat konsantrasyonları ile elde edilen hız verilerinin Lineweaver-Burk (Şekil 8.) ve Eadie-Hofstee (Şekil 9.) eğrileri ile belirlenmesiyle oldukça uyumlu kinetik veriler elde edilmiştir. Lineweaver-Burk eğrisinden V_{max} 5.30 U/mg protein, K_M 0.050 mM ve Eadie-Hofstee eğrisinden de V_{max} 5.40 U/mg protein, K_M 0.051 mM olarak tespit edilmiştir. Elde edilen her iki eğrinde lineer ve çok uyumlu olması, ayrıca tek bir V_{max} ve K_M değeri vermeleri alabalık karaciğer mikrozoamlarında, anilinin *p*-aminofenole dönüşümünü katalizleyen tek bir enzimin varlığı sonucunu ortaya koymakta ve alabalık karaciğer mikrozomal anilin hidroksilaz enziminin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu göstermektedir. İlave olarak, bu eğrilerden elde edilen K_M değeri ortalama 0.05 mM olarak alındığında, 10 katı kadar substrat konsantrasyonunda (0.5 mM anilin) bile anilin hidroksilazın doyumluğa ulaşacağı ve yaklaşık %91 lik bir aktiviteye varılacağı ortaya çıkmaktadır (Şekil 7.).

Anilin hidroksilaz aktivitesinin metal iyonlarından etkilendiği, çeşitli çalışmalarla bildirilmektedir. Tablo 7. den de Ni^{+2} ve Hg^{+2} iyonlarının önleyici etkiye sahip oldukları görülmektedir. 1 mM Ni^{+2} iyonu durumunda aktivitede %22 oranında bir azalma, 1 mM Hg^{+2} iyonunda da gözlenmiştir. Bu metal iyonlarının deniz suyunda bulunduğu ve her iki iyonunda organizmalara karşı karsinojenik ya da toksik olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla organizmaların bu metal iyonlarına maruz kalması, karaciğerde detoksifikasyon reaksiyonlarında bozukluklara sebebiyet vereceği açıktır. Böylece anilin organizmada birikecek, hem doğrudan organizmaya ve hem de dolaylı olarak besin zinciri yoluyla diğer canlılara zarar verecektir. Bu iki metal iyonu dışında, Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının alabalık karaciğer mikrozomal anilin hidroksilaz aktivitesini stimüle ettiği gözlenmiştir.

Stimüle edici bir örnek teşkil etmesi bakımından Mg^{+2} iyonunun anilin hidroksilaz üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir. 0.1-10 mM $MgCl_2$ konsantrasyonlarının mikrozomal anilin hidroksilaz aktivitesinde önce bir artış, Mg^{+2} iyonu konsantrasyonunun artışıyla da aktivitede daha fazla bir değişme olmadığı gözlenmiştir.

İzole edilip, saflaştırılmış anilin hidroksilaz enzimi ile yapılacak karakterizasyon işlemleri, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu enzim sisteminin çalışma mekanizması ve fonksiyonu hakkında kuşkusuz daha detaylı bilgi sağlayacaktır.

5. KAYNAKLAR

1. Gonzalez, F.J., The Molecular Biology of Cytochrome P450s, Pharmacological Reviews, 40, 4 (1989) 243-248.
2. Klingenberg, M., Pigments of Rat Liver Microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 75 (1958) 376-386.
3. Garfinkle, D., Studies on Pig Liver Microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 77 (1958) 493 -509.
4. Omura, T. ve Sato, R., A New Cytochrome in Liver Microsomes, J. Biol. Chem., 237 (1961) 1375-1376.
5. Omura, T. ve Sato, R., The Carbonmonoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for It's Hemoprotein Nature, J. Biol. Chem., 239 (1964) 2370-2378.
6. Omura, T. ve Sato, R., The Carbonmonoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification and Properties, J. Biol. Chem., 239 (1964) 2379-2385.
7. Gunsalus, I.C. ve Sligar, S.G., Oxygen Reduction by the P450 Monooxygenase Systems, Adv. Enzymol., 47 (1977) 1-44.
8. Lu, A.Y.H. ve Coon, M.J., Role of Hemoprotein P450 in Fatty Acid Hydroxylation in a Soluble Enzyme System from Liver Microsomes, J. Biol. Chem., 243 (1968) 1331-1332.
9. Narhi, L.O. ve Fulco, A.J., Characterization of a Catalytically Self-Sufficient 119,000-Dalton Cytochrome P450 Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*, J. Biol. Chem., 261, 16 (1986) 7160-7169.
10. Nebert, D.W. ve Gonzalez, F.J., P450 Genes: Structure, Evolution and Regulation, Ann. Rev. Biochem., 56 (1987) 945-993.
11. Guengerich, F.P., Cytochrome P450 Enzymes, American Scientist, 81 (1993) 440-447.
12. Poulos, T.L. ve Raag, R., Cytochrome P450_{cam} : Crystallography, Oxygen Activation and Electron Transfer, FASEB J., 6 (1992) 674-679.

13. Remmer, H. ve Marker, H.J., Drug-Induced Changes in the Liver Endoplasmic Reticulum, Science, 142 (1963) 1657-1658.
14. Poland, A. ve Glover, E., Comparison of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin, a Potent Inducer of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase with 3- methylcholantrene, Mol. Pharmacol., 10 (1974) 349-359.
15. Poland, A., Glover, E., Robinson, J.R. ve Nebert, D.W., Genetic Expression of Aryl Hydrocarbon Activity, J. Biol. Chem., 249 (1974) 5599-5606.
16. Parke, D.V., Biochemistry of Foreign Compounds, Pengamon Press, London, 1968, 224-230.
17. Arınç, E. ve İşcan, M.Y., Comparative Studies of Sheep Liver and Lung Microsomal Aniline-4-Hydroxylase, Comp. Biochem. Physiol., 74c (1983) 151-158.
18. Lu, A.Y.H. ve Levin, W., The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System, Biochem. Biophys. Acta, 344 (1974) 205-240.
19. Conney, A.H., Pharmacological Implications of Microsomal Enzyme Induction, Pharmacol. Rev., 19 (1967) 317-366.
20. Gillette, J.R., Davis, D.C. ve Sasame, H.A., Cytochrome P450 and It's Role in Drug Metabolism, Ann. Rev. Pharmacol., 12 (1972) 57-84.
21. Bend, J.R., Hook, G.E.R., Easterling, R.E., Gram, T.E. ve Fouts, J.R., A Comparative Study of the Hepatic and Pulmonary Microsomal Mixed-Function Oxidase Systems in the Rabbit, J. Pharmacol. Exp. Ther., 183 (1972) 206-217.
22. Arınç, E. ve Şen, A., Effect of *in vivo* Benzene Treatment on Cytochrome P450 and Mixed-Function Oxidase Activities of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Liver Microsomes, Comp. Biochem. Physiol., 104c, 1 (1993) 61-65.
23. Waxman, D.J., Rat Hepatic P450IIA and P450IIC Subfamily Expression Using Catalytic, Immunochemical and Molecular Probes, Methods in Enzymology, 206 (1991) 249-267.
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randal, R.J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265-275.
25. Johannesen, K.A.M. ve DePierre, J.W., Measurement of Cytochrome P450 in the Presence of Large Amounts of Contaminating Hemoglobin and Methemoglobin, Analytical Biochemistry, 86 (1978) 725-732.

26. Fujita, T. ve Mannering, G., Electron Transport Components of Hepatic Microsomes, J. Biol. Chem., 248 (1973) 8150-8156.
27. Cinti, D.L., Moldeus, P. ve Schenkman, J.B., Kinetic Parameters of Drug-Metabolizing Enzymes in Ca^{+2} -Sedimented Microsomes from Rat Liver, Biochem. Pharmacol., 21 (1972) 3249-3256.



6. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon 'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon 'da tamamladı. 1992 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden yüksek onur öğrencisi olarak "Kimyager" ünvanı ile mezun oldu. Aynı yılın güz yarısında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce 'dir.

