

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**KATALAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE PEROKSİNİTRİT
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aybike SİVRİKAYA

AĞUSTOS 2007

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**KATALAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE PEROKSİNİTRİT
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kimyager Aybike SİVRİKAYA

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.08.2007
Tezin Savunma Tarihi : 27.08.2007**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2007

ÖNSÖZ

Bu çalışma, katalaz enzimi aktivitesi üzerine peroksinitrit anyonunun etkisinin tayinini içermektedir. Çalışmadaki deneysel kısımlar, Kimya Bölümü Biyoanalitik Laboratuvarı ve Spektroskopi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamda çalışmanın büyük bir aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamda bana her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen, Sayın Doç.Dr. Murat KÜÇÜK'e de teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca bütün hayatım boyunca her zaman yanımda oldukları ve desteklerini benden esirgemedikleri için sevgili anneme ve babama, kardeşlerime en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Aybike SİVRİKAYA

Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. Katalaz Çift Fonksiyonlu Bir Enzimdir	2
1.1.2. Katalazın Katalitik Mükemmelliği.....	3
1.1.3. Katalaz Neye Benzer.....	3
1.2. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz	5
1.3. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri	5
1.3.1. UV – Spektrofotometrik Yöntem.....	5
1.3.2. Titrimerik Yöntem.....	6
1.3.3. Diğer Tayin Yöntemleri	6
1.4. Katalaz nerelerde Bulunur.....	7
1.5. Literatür Özeti	8
1.6. Katalazın Kullanım Alanları	9
1.7. Peroksinitrit Anyonu Hakkında Genel Bilgi	10
1.7.1. Laboratuarda Elde Yöntemleri.....	11
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	12
2.2. Peroksinitrit Sentezi ve Konsantrasyonunun Tayini	13
2.2.1. Peroksinitrit Sentezi	13
2.2.2. Peroksinitritin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	15
2.3. Karaciğer Numunelerinin Alınması ve Hazırlanması	15
2.4. Katalaz Aktivitesi Tayini	15

2.5. Peroksinitrit – Katalaz Etkileşmesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	16
2.6. Bozundurulmuş Peroksinitritin (BPN) Aktiviteye Etkisi.....	17
3. BULGULAR.....	19
3.1. Sentezlenen Peroksinitritin Konsantrasyonu	19
3.2. Karaciğer Homojenatındaki Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	19
4. TARTIŞMA	26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
6. KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Canlı organizmalarda oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Katalaz enzimi tüm canlı dokularında mevcut bir antioksidan enzim olup turnover sayısı en yüksek enzimdir. Oksijenin eksik indirgenme ürünlerinden olan H₂O₂'nin dönüştürülmesinde görev alan bu enzim özellikle karaciğer mikrozomlarında yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan peroksinitrit, asidik çözeltideki hidrojen peroksidin sodyum nitrit ile muamele edilmesiyle oluşan kararsız peroksinitröz asidin sodyum hidroksit kullanılarak kararlı peroksinitrit anyonuna dönüştürülmesi sonucu elde edildi. Sentezlenen peroksinitritin kararlılığı sıcaklık ve pH'ya bağlıdır. Anyon bazik ortamda ve -70⁰ C'de uzun zaman muhafaza edilebilmektedir. Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonu molar absorptivite katsayısından (ϵ : 1670 M⁻¹.cm⁻¹; 302 nm'de) ölçülebilmekte ve NaOH ile istenen konsantrasyonda çözeltisi elde edilebilmektedir

Palamut karaciğer dokusundan (40.000 g, 10 dakika) elde edilen mikrozomal katalaz ekstraktının aktivitesi klasik yöntem olan 240 nm'de H₂O₂'nin absorbansındaki azalmanın ölçülmesi ile yani kinetik yolla tespit edildi. Ortama ilave edilen 5 farklı konsantrasyondaki (10, 20, 40, 50 ve 100 µM) PN'in çözeltisi ile katalaz aktivitesi tayin edildi. Ayrıca nötral ya da asidik ortamda oluşan bozundurulmuş peroksinitrit (BPN) in 5 farklı konsantrasyonu ile de muamele edilen katalaz enziminin aktivitesi ölçüldü.

Sonuç olarak PN ve BPN ürünlerinin katalaz enziminin inaktivasyonuna neden olduğu ve bu inaktivasyonun konsantrasyona bağımlı olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, Peroksinitrit, Bozundurulmuş Peroksinitrit, Karaciğer, Palamut

SUMMARY

Determination of Peroxynitrite Effect on Catalase Enzyme Activity

In living organisms there is a balance between oxidants and antioxidants. Catalase, an antioxidant enzyme, which occurs in all living tissues, has the highest turnover number. This enzyme especially occurs in large concentrations in liver microsomes and plays a role in the conversion of H_2O_2 , one of the short reduction products of O_2 .

Peroxynitrite used in the study, obtained by conversion of instable peroxynitrose, formed by treating acidic hydrogen peroxide solution with sodium nitrite, using sodium hydroxide to stable peroxynitrite anion. The stability of the synthesized peroxynitrite is depend on temperature and pH. Anion can be kepted in basic media and at $-70^{\circ}C$ for a long time. The concentration of synthesized peroxynitrite can be measured by molar absorbtivity coefficient (ϵ : $1670 M^{-1}.cm^{-1}$; at 302 nm) and with NaOH wanted concentrations can be obtained.

The activity of microsomal catalase extract obtained from bonito's liver tissue (40.000 g, 10 minutes), is confirmed with the clasical method, measuring the decrease in the absorbance of H_2O_2 at 240 nm. Catalase activity is determined by adding 5 different concentrations of peroxynitrite solution (10, 20, 40, 50 and 100 μM) into the media. Also enzyme activity is measured with 5 different concentrations of vicious peroxynitrite solution formed in neutral or acidic media.

In conclusion, it's confirmed that, the products of PN and BPN caused inactivation of catalase enzyme and this inactivation is due to concentration.

Key Words: Catalase, Peroxynitrite, Vicious Peroxynitrite, Liver, Bonito

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Katalazda hem'in 3 boyutlu gösterilişi	4
Şekil 2. E.coli katalazının X-ışını kristalografisi ile aydınlatılmış 3 boyutlu yapısı.....	4
Şekil 3. Peroksinitrit sentez düzeneği	14
Şekil 4. 10 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi	21
Şekil 5. 20 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi	21
Şekil 6. 40 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi	22
Şekil 7. 50µL Peroksinitrit ile enzim aktivitesi.....	22
Şekil 8. 100 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi	23
Şekil 9. 5 farklı konsantrasyonda PN ve BPN'nin palamut karaciğer katalaz enzimi üzerine etkisine ait % absorbands değerleri.....	25

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Katalaz aktivite ölçüm yöntemleri.....	7
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihaz ve malzemeler	12
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	12
Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları.....	13
Tablo 5. Aktivite tayini için yapılan pipetlemeler	16
Tablo 6. Katalaz aktivitesi tayininde peroksinitrit (PN) etkisi için yapılan pipetlemeler	17
Tablo 7. Katalaz aktivitesi tayininde bozundurulmuş peroksinitrit (BPN) için yapılan pipetlemeler	18
Tablo 8. Palamut karaciğer mikrozomal dokusunda katalaz aktivitesi üzerine değişik konsantrasyonlarda peroksinitrit (PN), bozundurulmuş peroksinitrit (BPN), kör (PN+H ₂ O ₂) etkisinin incelenmesi için yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri	20
Tablo 9. Palamut karaciğer mikrozomal dokusunda katalaz aktivitesi üzerine değişik konsantrasyonlarda peroksinitrit (PN), bozundurulmuş peroksinitrit (BPN), kör (PN+H ₂ O ₂) etkisinin incelenmesi için yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri	20
Tablo 10. 10,20,40,50,100 µM'lık peroksinitrit (PN) ve bozundurulmuş peroksinitritin (BPN) katalaz üzerine etkisinin incelenmesine ait % absorbans değişim değerleri	24

SEMBOLLER DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
BPN	: Bozundurulmuş Peroksinitrit
BSA	: Sığır serum albumini
CAT	: Katalaz
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KCl	: Potasyum klorür
K _m	: V _{max} 'ın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	: Potasyum monohidrojen fosfat
mL	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
MnO ₂	: Mangan (IV) oksit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaKCO ₃	: Sodyum - potasyum tartarat
NO	: Nitrik oksit
nm	: Nanometre
PN	: Peroksinitrit
3PG	: 3-fosfogliserat
SOD	: Süperoksit dismutaz
V _{max}	: Maksimum hız
Fe	: Demir
Fe ⁺²	: Ferro demir
Fe ⁺³	: Ferrik demir

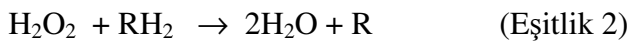
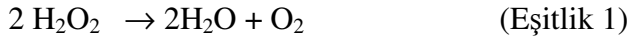
H^+ : Hidrojen iyonu
 O_2 : Oksijen molekülü
 O_2^- : Süperoksit radikali
OONO : Peroksinitrit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Katalaz (CAT:E.C 1.11.1.6), çok yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda mevcuttur. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz antioksidan etkiye sahip bir enzim olup toksik ve yükseltgen etkiye sahip hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada önemli rol oynar. Katalaz dokuları H₂O₂ ve kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin toksik etkilerinden korumada görevlidir (Aydemir, Kuru; 2003). Antioksidan savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur. Katalaz hem grubu içeren bir oksidoredüktazdır. Katalaz enzimi canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında da bulunan bir enzim olup hücrelerin özellikle peroksizomlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Farelerde bu enzimin bir çok şekli saptanmıştır (Çimen vd., 2005).

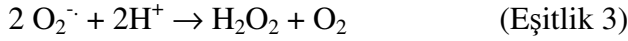
Katalaz güçlü ve kararlı bir yükseltgen olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Eşitlik 1). Katalaz enzimi sadece hidrojen peroksiti detoksifiye etmekle kalmaz aynı zamanda da fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller içeren toksik etkili bileşikler okside etmede rol oynar ve yine substrat olarak hidrojen peroksidi kullanır (Eşitlik 2). Katalaz enzimi, oksitleyici, ağartıcı veya sterilizasyon amaçlı kullanılan hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında, hidrojen peroksit veya glukoz biyosensörlerinin analitiksel amaçlarla ölçülmesinde oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir (Çimen vd.,2005).



RH₂ bileşiği; fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller temsil etmektedir. Katalaz tarafından katalizlenen her iki reaksiyon türü de H₂O₂ harcamaktadır (URL-1, 2007).

Dallanmış ve uzun zincirli yağ asitlerinin beta-oksidasyonundan farklı olarak peroksizomlarda yıkımları sonucu yan ürün olarak H₂O₂ oluşmaktadır. Oluşan peroksidin buzundurulmasında yine katalaz enzimi görev yapmaktadır (URL-1, 2007).

Katalazı indirek olarak içeren bir diğer redoks reaksiyonu DNA'nın üretimi ile ilgilidir. Ribonükleotit redüktaz ribonükleotit difosfatların uyuştukları deoksiribonükleotit difosfatlara dönüşümünden sorumludur. Ribonükleotitredüktaz aktivitesi için önemli olan trosil serbest radikaline sahiptir. Bu radikal süperoksit iyonu (O₂⁻) salan NAD(P)H : flavin oksidoredüktaz enzimi tarafından üretilir ve bu reaktifliği yüksek radikal süperoksit dismutaz ile H₂O₂'ye dönüştürülür (URL-1, 2007) :



Oluşan bu H₂O₂ katalaz için bir substrattır.

Bitkilerde oksijenli solunumla H₂O₂ üretilir. Oksijenli solunum kloroplastta 3-PG'dan glikolat senteziyle ve glikonatin 3-PG'a peroksizom yoluyla geri dönüşümü ile yürür. Bu proseste NADH ve ATP'deki enerji kullanılarak O₂ tüketilip CO₂ açığa çıkarılır. Oksijenli solunum yüksek ışııkta ve yetersiz CO₂ varlığında bitkileri fotooksidatif hasardan korur (URL-1, 2007).

Katalaz birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Enzim organellerde bulunarak hidrojen peroksit seviyelerinin bir regülatörü olarak davranır ve karaciğer peroksizomlarında D-aminoasit oksidaz ve urikaz gibi birkaç hidrojen peroksit üreten enzimle birleşerek spesifik bir peroksidaz gibi rol oynar (URL-1, 2007).

1.1.1. Katalaz Çift Fonksiyonlu Bir Enzimdir

Katalaz her biri H₂O₂ içeren iki farklı katalitik role sahiptir. Aktif kısımda bulunan prostetik hem grubunda tek bir Fe merkezi içermesi, tek bir aktif bölgenin iki farklı fonksiyona sahip olduğunu iddia eder (URL-1, 2007).

Bazı katalazlar peroksidatif reaksiyonlarda bazılarında daha iyidir. Katalazlar HPI ve HPII katalazlar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. HPII katalazlar yalnızca H₂O₂'nin dönüştürülmesini katalizlerken, HPI katalazlar her iki aktiviteye de sahiptir.

HPI katalazların çift fonksiyonlu olmayı nasıl başardıkları hala bir sorudur. HPI katalazlar HPI-A ve HPI-B olmak üzere iki izoenzim şeklinde bulunurlar (URL-1, 2007).

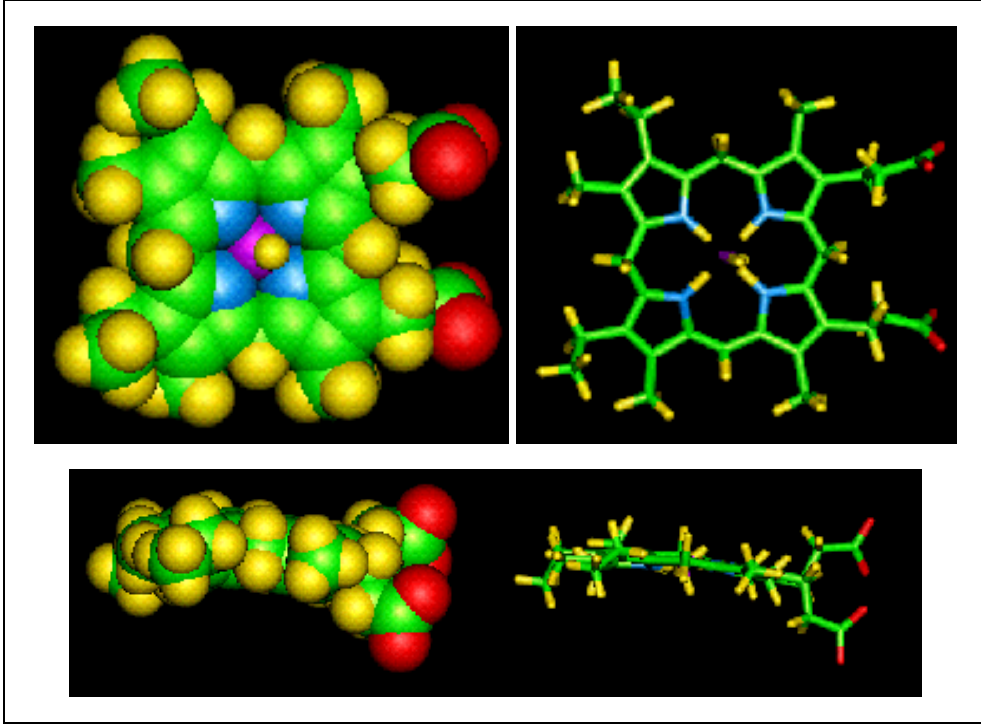
1.1.2. Katalazın Katalitik Mükemmelliği

Katalaz sıra dışı bir enzimdir. Katalazın bir enzimin olabileceği en yüksek verimlilik seviyesinde olduğu iddia edilir. Çözeltideki herhangi bir enzim katalizli reaksiyon için hız, enzim ve substrat moleküllerinin birbirleriyle çarpışma sıklığıdır. Bu yayılma kontrollü hız $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aralığındadır. Katalazın katalitik verimliliği ise (k_{cat} / K_M) $4.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'dir ve oldukça yüksektir. Bilinen enzimler içinde en yüksek dönüştürme sayılarından birine sahiptir (40.000.000 molekül/dakika). Bu yüksek hız H_2O_2 'nin detoksifikasyonundaki yeteneğini göstermektedir (URL-1, 2007).

1.1.3. Katalaz Neye Benzer

Katalazda hem bir prostetik grup olarak bulunur. Her bir katalaz molekülü (Mol ağırlığı 240.000 Da) 4 polipeptit zincirinden oluşan bir tetramer olup her bir tetramer bir adet prostetik hem grubu içerir. Her bir zincir 500'den fazla amino asitten oluşmaktadır. Hemoglobinler, sitokromlar, kloroformlar ve legumlardaki azot bağlayan enzimlere benzer olarak bu tetramerlerde 4 porfirin hem grubu yerleşmiştir (Şekil-1-Şekil-2) , (URL-1, 2007).

Prostetik grup sıkıca bağlı bazı proteinlerin biyolojik fonksiyonu için gerekli spesifik, polipeptit olmayan bir kısımdır. Hem bir protoporfirin halkası ve bir merkezi Fe atomu içerir. Bir protoporfirin halkası birbirine meten köprüleriyle bağlı 4 pirol halkasından oluşur. Demir ferro (Fe^{+2}) ya da ferrik (Fe^{+3}) hallerinde bulunabilir (Carter, 2007).



Şekil 1. Katalazda hem'in 3 boyutlu gösterilişi



Şekil 2. E.coli katalazının X-ışını kristalografisi ile aydınlatılmış 3 boyutlu yapısı

1.2. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz

Biyolojik sistemlerde antioksidanlar, genellikle non-enzimatik, enzimatik ve yardımcı enzimler olarak sınıflandırılabilir. Non-enzimatik antioksidanlardan α -tokoferol (vitamin E) yağda çözünen bir antioksidandır. Askorbik asit (vitamin C) glutatyonla birlikte sulu fazda önemli bir antioksidandır (Çetin, 2000; Yurdakul, 2005).

Enzimatik antioksidanları inceleyecek olursak; katalaz, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve hemoprotein peroksidazlar gibi hidroperoksidazlar bu gruba girer. Genelde yüksek spesifik hücresel içerik, spesifik organ ve subseleler lokalizasyonlar ile metal içeriğinin spesifik formu özellikle bakır, demir, mangan ve selenyum ile karakterize edilirler. Bu antioksidan sistemler doğada yaygın olarak dağılmışlardır ve biyolojik sistemlerde reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı önlemede görev alırlar (Çetin, 2000; Yurdakul, 2005).

Katalaz ilk olarak sığır karaciğerinden daha sonra da kandan ve diğer kaynaklardan izole edilmiş önemli antioksidanlardan biridir.

Hücre organellerinde bulunan katalaz spesifik peroksidaz rolünü oynamaktadır. H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 verecek şekilde parçalanmasını katalize ederken, H donörlerini örneğin metanol, etanol, formik asit ve fenoller 1 mol peroksidi harcayarak katalizler (Çetin, 2000).

1.3. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Katalaz aktivitesi hem H_2O_2 'nin bozunması hem O_2 'nin serbest kalması ile ölçülebilir. Biyolojik materyal için seçilen metot, UV spektrofotometrik metottur. Titrimetrik metotlar karşılaştırmalı sonuçlar için uygundur.

1.3.1. UV – Spektrofotometrik Yöntem

Metodun uygulama alanı biyokimya, klinik biyokimya ve hematolojidir. Ultraviyole alanda, dalga boyu azaldıkça H_2O_2 devamlı olarak absorpsiyonda bir artış gösterir. H_2O_2 'nin azalışı, 240 nm'de ($\epsilon_{240} = 400 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$) izlenir. Deney süresince enzimin inhibe olmasını veya O_2 'nin açığa çıkmasıyla küvette oluşan baloncukları önlemek için

bağıl olarak düşük konsantrasyonlarda (10-20 mM) H_2O_2 kullanılması gerekir. Substrat konsantrasyonu ile bozunma hızı arasında doğrusal bir oran olduğundan dolayı H_2O_2 konsantrasyonu önem taşımaktadır.

Sıcaklık üzerine deney koşullarının bağımlılığı düşük olduğu için ($Q_{10} < 1.1$), ölçümler oda sıcaklığında yürütülebilir. pH aktivite grafiği V_0 'a bağlı olarak geniş bir pH aralığında (pH 6.8-7.5) olduğundan, ölçümler pH 7.0'da yapılmaktadır (Afsar ve Demirata, 1993; Dinçer, 2000).

1.3.2. Titrimerik Yöntem

Katalaz aktivitesinin titrasyon ile tayini, yüksek UV absorpsiyon, pigmentasyon veya çökme nedeni ile spektrofotometrik metodun kullanılmasının uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Düşük katalaz aktiviteli doku homojenatlarında (örneğin beyin, fibroblastlar ve tümörler) süt, bitki ve bakteri orjinli konsantre ekstraktlar için bu metod uygundur. H_2O_2 'nin bozunması, karışımda örneğin permanganat ile geri titrasyon yapıldıktan sonra mevcut peroksidin ölçümü prensibine dayanır.

30 sn'den fazla inkübasyon zamanlı titrimetrik metotlar sadece karşılaştırmalı sonuçlar verir. İyi düzeyde eğrilerin çizilmesi, çok sayıda ölçüm alınması ve zamana gereksinim duyar. Perborat kararlı bir substrat olduğundan rutin analizler için uygun olup, enzimin inhibisyonu yavaşlamaktadır. H_2O_2 ve perborat ile elde edilen sonuçlar aynı öneme sahiptir. Pratikte Feinstein (1949) metodu uygun olup, deney koşulları Bonnichsen (1955) prosedürüne uygun olarak düzenlenmiştir (Dinçer, 2000).

1.3.3. Diğer Tayin Yöntemleri

Yaygın olarak kullanılan katalaz aktivite tayin yöntemleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Katalaz aktivite ölçüm yöntemleri (Dinçer, 2000).

Metot	Materyal	Kaynaklar
A. H ₂ O ₂ uzaklaştırılmasının ölçümü		
1. Titrimetrik Yöntemler		
a) İyodometrik	Doku, kan	Bonninhsen vd. (1947)
b) Permanganometrik	Doku, kan Doku, kan	Feinstein (1949) Takahara vd. (1960)
2. Spektrofotometrik Yöntem (E ₂₄₀)	Doku	Bergmeyer (1955) Werner ve Heider (1963)
3. Fotometrik Yöntem (E ₄₀₅ -E ₄₁₅)		
a) Titanyum sülfat	Doku, kan	Hübl ve Bretschneider (1964)
b) Titanyum tetraklorür	Kan	Pilz ve Johann (1965)
c) Vanadik asit	Doku	Warburg ve Krippahl (1963)
4. Flerometrik Yöntem		Perschke ve Broda (1061)
a) Scopoletin (Florosansın azalması)	Sulu çözeltiler	Aebi (1963)
b) Diasetildiklorofloreksin		Keston ve Brandt (1965)
B.O ₂ üretiminin belirlenmesi		
1. Polarografi Mikroorganizma		Jacop (1964)
2. Oksijen Elektrodu	Kan Kan	Ogata (1964) RØrth ve Jensen (1967)
3. Manometrik yöntem	Kan ve doku	
a) van Slyke aletleriyle	Kan ve doku	Kirk (1963)
b) Filtre kağıdı ile		Gagnon vd. (1959)
C. İmmuno çöktürme (anti-katalaz ile)	Kan ve doku	Higashi vd. (1961) Ben-Yoseph ve Shapira (1973)
D. Isı üretiminin ölçümü	Kan	Landahl (1953)

1.4. Katalaz Nerelerde Bulunur

Doğada yaygın bir şekilde bulunan katalaz tüm aerobik organizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Katalaz aktivitesi memeli dokularında çok çeşitlilik gösterir, karaciğer ve böbrekte yüksek ve bağ dokularında düşüktür. Bu hücrelerde (mitokondri ve

peroksizomlarda) tanecik bağımlı iken eritrositlerde sulu fazda bulunur. İnsan eritrositleri katalaz bakımından oldukça zengindir. Katalaz nadir görülen bir enzim yetersizliğinde homozigotların kırmızı hücrelerinde bulunmaz. Diğer yandan eritrositlerde katalaz ve glutatyon peroksidaz hemoglobin ve diğer SH-proteinleri (enzim, membran, stroma) için koruyucu bir fonksiyona sahiptir. Kırmızı hücrelerde katalaz aktivitesi azaldıkça yükseltgenlerin (H_2O_2 , askorbat, X-ışınları) etkinliği artar (Aebi, 1984).

Katalazın en bol bulunduğu organel peroksizomlardır. Peroksizomlar hayvan hücrelerinde yağ asitlerinin oksidasyonunu ve kolesterol ve safra asitlerinin sentezini sağlar. Hidrojen peroksit yağ asidi oksidasyonunun bir yan ürünüdür. Beyaz kan hücreleri H_2O_2 'yi bakteri öldürmek için üretir. Her iki durumda da katalaz hücreyi H_2O_2 'nin zararından korur. Bitki hücrelerinde peroksizomlar oksijenli solunumda ve simbiyotik azot bağlamada rol alır.

Bakteri gibi prokaryot organizmalar membransız bir çekirdeğe sahiptir ve peroksizomlar gibi membrana bağlı organelleri yoktur. Katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimler hücre duvarının iç ve dış membranları arasında bulunan periplazmik boşlukta bulunurlar. Burada hücre içinde bulunurlarsa toksik etki yapacak olan birçok enzim bulunmaktadır. Burada bulunan katalaz periplazmada taşınan toksik moleküller üzerinde etkili olur ya da bakteri duvarından dışarıya atılarak çevredeki toksik moleküller üzerinde etkili olur. Bakteri tarafından atılan katalaz, bir infeksiyon sırasında zarar görmüş olan beyaz kan hücrelerinden bakterinin korunmasında bir rol oynar.

1.5. Literatür Özeti

Bell vd. (1986) insan karaciğer katalazının cDNA dizilişini çalışmışlar. Kodlama bölgesi 1581 baz çifti içerir. Quan vd. (1986) CAT geninin 34 kb uzunluğunda olduğunu ve 13 ekzona ayrıldığını bulmuştur. Wieacker vd. (1980) insan-fare hücreleri hibrit kolonlarında çalışarak katalaz için bir gen belirlemiştir.

Hibrit hücrelerde insan katalazının belirlenmesi katalaz modifiye edici enzim aktivitesinden kaynaklanan elektroforetik patternlerin karmaşıklığı ile yapılmıştır. Bu nedenle, elektroforezde spesifik bir insan antikoru kullanılmıştır. Farede, katalaz β -globulinlere ya da LDH-A ya sentetik hassa değildir. Niikawa vd. (1982) WAGR sendromlu iki farklı hastanın eritrositlerindeki katalaz aktivitesindeki azalıştan yararlanarak WAGR kompleksi geni katalazının kapalı dizilişini belirlemiştir. Kırmızı

hücre katalazlarının çeşitli elektroforetik değişkenleri Baur (1963) tarafından belirlenmiştir. Nance vd. (1968) de elektroforetik değişkenleri tanımlamıştır. Kenney vd. (2005) keratokonus kornealarının katalaz mRNA sında 2,20'lik ve enzim aktivitesinde 1,8'lik bir artış gösterdiğini bulmuştur. Keratokonus kornealarında V/B2, B ve L katefinlerin azaltılmış seviyelerinin antioksidan bir enzim olan katalazı regüle edebilecek olan hidrojen peroksit üretimini ayarlayabileceğini kabul etmişlerdir. Bu ve diğer buluşlar keratokonus kornealarının oksidatif stres ve doku indirgenmesine yol açtığı hipotezini desteklemektedir.

Hamilton ve Neel (1963) Japonya'da akatalazyanın en az iki şeklinin olduğunu kanıtlamıştır. Akatalazya İsviçre (Aebi vd., 1962) ve İsrail (Szeinberg vd.,1963)'de bulundu. İsraili ve İsviçrelilerde homozigotlar artan katalaz aktivitesini, aktivitenin sıfır olduğu ve yan-reaktif madde belirlenmediği Japon hastalığına uygun olan farklı bir mutasyon olabileceğini savunarak gösterir. Ogata, (1991) mutant farede ve Japon ve İsviçli hastalık formlarındaki rezidüal katalaz özelliklerini karşılaştırdı.

Shibata vd. (1967) aktif katalazın yaklaşık altıda biri büyüklüğünde immünolojik olarak reaktif, enzimatik olarak inaktif olan proteinin akatalazemiklerin kırmızı hücrelerinde var olduğunu bulmuştur.

Goth ve Eaton (2000) Bulgar katalaz yetersizliği olan hastaların etkilenmemiş birinci dereceden akrabalarla ve Bulgar halkının geneliyle karşılaştırıldığında artan bir diyabet frekansı gözlemlemiştir. Araştırmacılar, katalazın kantitatif yetersizliğinin pankreatik beta hücrelerde birikimli oksidan hasara yol açtığını ve diyabete neden olduğunu düşünmüştür. Boyd vd.(1986) iki farklı enzimli bir katalaz RFLP tanımlamış ve bu polimorfizmleri aralıklı aniridyali hastalardaki katalaz geninin ortadan kaldırılmasında kullanmıştır. Mannens vd. (1987) aniridyali dokuz hastadan altısında yerleşmiş olan katalazın yok edildiğini buldu (AN2; 106210). Jiang vd.(2001) sistolik kan basıncı yükselmesi olarak tanımlanan esansiyel hipertansiyon ve CAT geninin başlangıç kodonundan 844 bp yukarıda yerleşmiş olan bir tek nükleotitli polimorfizm (SNP) arasındaki ilişkiyi bulmuştur (URL-2, 2007).

1.6. Katalazın Kullanım Alanları

Günümüzde birçok endüstri kolunda enzim içeren biyolojik sistemler kullanılmaktadır. Katalaz; gıda, süt, tekstil, kağıt gibi ağartma işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır

(Dhaese, 1996). Süt endüstrisinin bazı alanlarında mikroorganizma kontaminasyonunu önlemek amacıyla süte katılmasına izin verilen $\square\%0.05 - \%\square0.25$ oranındaki hidrojen peroksidin, kullanım öncesi giderilmesi büyük önem taşımaktadır. Hidrojen peroksidin bozundurulmuş ortamdan uzaklaştırılması yöntemlerinden biri, katalazın kullanıldığı enzimatik metotlardır.

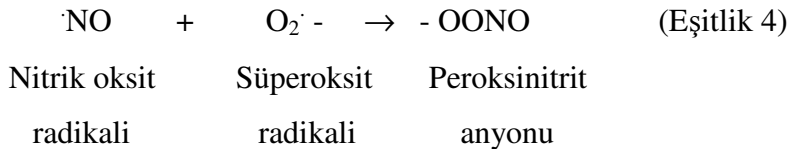
Katalaz esaslı yöntemlerde, hidrojen peroksidin suya ve oksijene dönüştürülerek insan sağlığına verebileceği olumsuz etkiler ortadan kaldırılır (Akertek ve Tarhan, 1995; Akgöl ve Dinçkaya, 1999; Görenek, 1999; Yıldız, 1999).

Hidrojen peroksidin analizi, tıp dışındaki bilimsel araştırmaların yürütülmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Özellikle akseptör olarak oksijeni kullanan oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin katalizlediği pek çok tepkimede, ürün olarak hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır.

Söz konusu enzimlerin katalizlediği tepkimelerde oluşan hidrojen peroksit miktarının çeşitli yöntemlerle belirlenmesiyle, gerçekte tayini istenen maddenin miktarına geçilmektedir. Böylece katalaz biyosensörleriyle, hem bilimsel çalışmalara yardımcı olunmakta, hem de gıda sanayiinden farmakolojiye, biyoteknolojik çalışmalardan çevre analizlerine kadar pek çok alanda hidrojen peroksidin ve ürünlerinin tayinleri yapılabilmektedir (Popescu vd., 1995; Akgöl ve Dinçkaya, 1999).

1.7. Peroksinitrit Anyonu Hakkında Genel Bilgi

Peroksinitrit fizyolojik olarak nitrik oksit ve süperoksit radikalinden sentezlenmektedir. Sentezi bu iki maddenin aynı merkezde oluşumuna ve diffüzyonuna ileri derecede bağımlıdır. Sentez reaksiyonu ikinci mertebeden bir reaksiyon olup Eşitlik 4'de gösterilmektedir. Radikal olmamasına rağmen sebep olduğu hasar onu oluşturan ön maddeler olan nitrik oksit ve süper oksidin oluşturduğu hasara oranla çok daha fazladır. Peroksinitrit biyomoleküllerin birçoğunu modifiye edip fonksiyonlarını etkiler. Peroksinitrit 6.8 pKa değerine sahiptir ve bazik pH'da kararlı yapıdadır. Asidik ya da nötral ortamlarda çabucak bozunmaktadır.



Fizyolojik peroksinitrit sentezindeki ön maddeler radikal yapıda iken peroksinitrit anyonik yapıdadır, ancak biyosisteme verdiği hasar onlara kıyasla çok daha ileri seviyededir. Nitrik oksidin yarılanma ömrü saniyeler civarındadır ve nitrikoksit membranlardan kolayca geçebilmektedir. Ancak süperoksit radikalının yarılanma ömrü milisaniye mertebesindedir ve membrandan ancak anyon kanalları aracılığıyla geçebilmektedir. Dolayısıyla peroksinitrit daha çok süperoksitin fazla sentezlendiği durumlarda ve bölgelerde fizyolojik olarak sentezlenebilmektedir (Küçük, 2002).

1.7.1. Laboratuarda Elde Yöntemleri

Araştırmalarda kullanmak amacıyla çalışmanın tipine de bağlı olarak peroksinitrit birkaç farklı yolla sentezlenebilmektedir (Uppu vd., 1996). Bunlar arasında en önemlileri şunlardır:

- Asidik hidrojen peroksit ile nitrit anyonunun reaksiyonundan peroksinitrit sentezi
- Peroksinitritin tetrametilamonyum tuzunun sentezi
- Azidür -ozon reaksiyonundan peroksinitrit sentezi
- Alkil nitrit ve hidrojen peroksit ile bifazik peroksinitrit sentezi

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Tablo 2’de çalışmalarımızda kullanılan cihazların markaları ve Tablo 3’de kullanılan kimyasalların adları ve özellikleri, Tablo 4’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları verilmektedir.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihaz ve malzemeler

Kullanılan Malzeme / Cihaz	Marka / Model
Dondurucu	Arçelik
Otomatik Pipetler	Scorex, Acura 825
Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Vortex Karıştırıcı	Labnet VX 100
Hassas Terazi	Ohaus Explorer Pro
Su Banyosu	Nüve ST 402
Etüv	Binder
pH metre	Hanna instruments
Spektrofotometre	LaboMed, inc
Manyetik Karıştırıcı	Chiltern MS21S
Blendir	Moulinex

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Merck %30 d:1.4
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Merck , %99
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck , >%99
Mangan IV oksit (MnO ₂)	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Potasyum monohidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Sığır serum albumini (BSA)	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva , >%91
Bakır sülfat (CuSO ₄)	Merck
Sodyum potasyum tartarat (NaKCO ₃)	Merck
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Metil kırmızısı	Roche
Folin reaktifi	Merck

Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çözelti	Hazırlanışı
0.7M HCl / 0.6M H ₂ O ₂	6.13 mL %30 H ₂ O ₂ (d:1,11 g/mL) ile 5.8 mL %37 HCl (d: 1.19 g/mL) saf suda çözündürülüp 100 mL çözelti hazırlandı.
0.6M NaNO ₂	4.14 g NaNO ₂ saf suda çözündürülerek 100mL çözelti hazırlandı.
50 mM fosfat tamponu (pH 7.2)	1.904 g KH ₂ PO ₄ ve 6.264 g K ₂ HPO ₄ saf suda çözündürüldü, pH 7.2 ye ayarlandı ve hacmi 250 mL ye tamamlandı.
1.3 M NaOH	5.2 g NaOH saf suda çözülerek 100mL çözelti hazırlandı.
30 mM H ₂ O ₂	240µL %30 H ₂ O ₂ (d: 1.4g/mL) saf suda çözündürülerek 100mL çözelti hazırlandı.
1 mg/mL BSA	0.5g BSA %0.9 NaCl nin 10mL sinde çözündürülüp, bu çözeltilerden 1mL alınıp %0.9 NaCl ile 50mL ye tamamlandı.
Karışık indikatör	%0.1 metilen mavisi ile %0.1 metil kırmızısı 3:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

2.2. Peroksinitrit Sentezi ve Konsantrasyonunun Tayini

Denemelerde kullanılacak olan peroksinitritin sentezi için asidik ortamda sodyum nitritin hidrojen peroksitle reaksiyonu yöntemi uygulandı. Oluşan ürünün kararlılığını sağlamak için sodyum hidroksit çözeltisi kullanıldı. Peroksinitritin konsantrasyonunun belirlenmesinde 302 nm'de verdiği maksimum absorbanza dayalı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

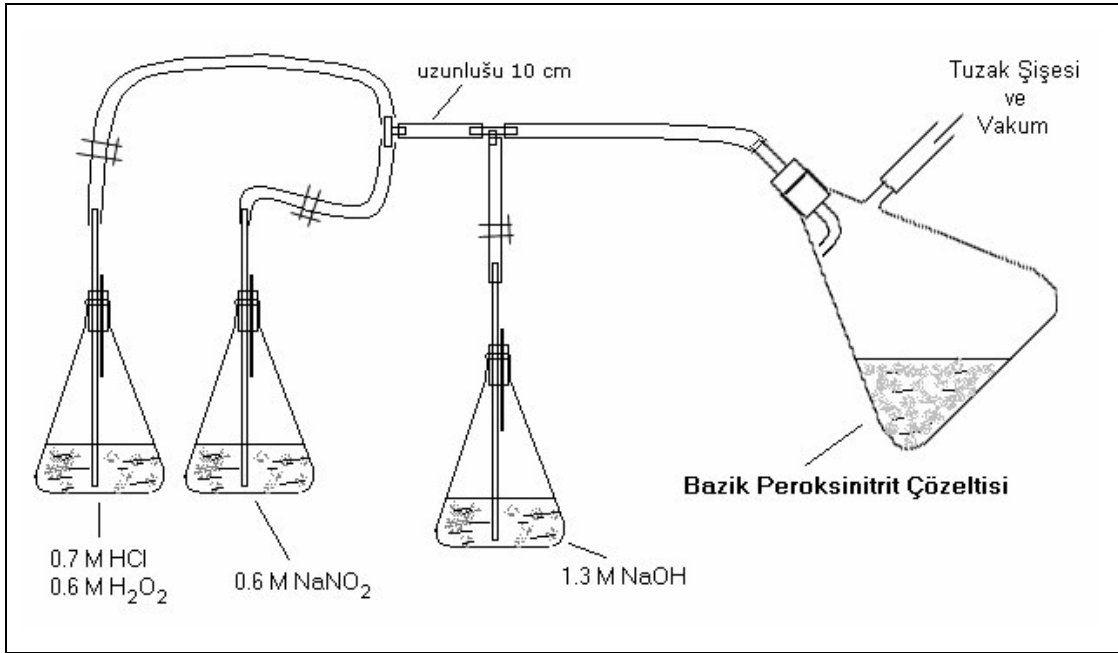
2.2.1. Peroksinitrit Sentezi

Peroksinitritin laboratuarda sentezi için Beckman vd., (1996) geliştirdiği metot uygulandı (Koppenol vd., 1996). Bu amaçla şekildeki düzenek kullanıldı 0.7 M HCl içeren 0.6 M H₂O₂ çözeltisinin 0.6 M NaNO₂ ile karıştırılmasıyla oluşan peroksinitroz asit (HONOO), kararlılığı çok düşük olduğundan dolayı 1.3 M NaOH çözeltisi ile karıştırılarak nispeten çok daha kararlı olan bazik pH'ya sahip peroksinitrit (ONOO⁻) çözeltisi elde edildi. Her bir erlendeki çözeltinin sistemdeki akışı 10 mL/s olacak şekilde ayarlandı. Akış hızının sabit tutulmasını sağlayabilmek için de vakum oluşturmada su trompu yerine

vakum pompası tercih edildi. Bu şekilde mümkün olan en yüksek konsantrasyonda peroksinitrit ve en düşük miktarda yan ürün elde edilmeye çalışıldı. Bir tuzak şişesi kullanılarak sentez sırasında ilk gelen kısım toplama erleni döndürülmek suretiyle alınmadı ve çözelti rengi tamamen sarıya döndükten sonraki kısım toplama kabında biriktirildi.

Şekil 3'te peroksinitrit sentez düzeneği gösterilmektedir. Düzenekte 150 mL'lik erlenler ve 1 mm çapında plastik borular kullanıldı. Çözelti hacimleri ise 100 mL olarak hazırlandı. Sentezlenen peroksinitritin bozunmasını yavaşlatmak amacıyla soğuk ortamlarda daha kararlı olduğu bildirildiğinden toplama kabı buz banyosunda muhafaza edildi. Reaktif çözeltiler de benzer şekilde buz banyosunda soğutuldu.

Elde edilen bazik peroksinitrit çözeltisi, ortamdaki fazla hidrojen peroksitten kurtulmak için MnO_2 ile muamele edildi. Bu amaçla sentezlenen peroksinitrit çözeltisi bir erlen içinde MnO_2 ile 10 dakika buz banyosunda karıştırıldı ve sonra ince gözenekli süzgeç kağıdı kullanılmak suretiyle süzülerek tayinlerde kullanılan peroksinitrit çözeltisi elde edildi.



Şekil 3. Peroksinitritin sentez düzeneği: Vakumla çekim hızı 10 mL/s olacak şekilde ayarlanan düzenekte asidik H₂O₂ ve NaNO₂ çözeltileri birinci birleşme bölgesinde reaksiyon vererek peroksinitröz asidi (ONOOH) oluşturur ve bu ürün de ortama ikinci birleşme bölgesinde 1.3 M NaOH ilave edilmesiyle kararlı peroksinitrite (ONOO⁻) dönüştürülür.

2.2.2. Peroksinitritin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için peroksinitrit çözeltisinin 302 nm dalga boyunda gösterdiği absorbans ölçüldü. Lambert- Beer eşitliğine göre (Eşitlik 5) ışın yolu (b) 1 cm alınarak, ölçülen absorbans (A) peroksinitritin bu dalga boyundaki molar absorptivite katsayısı (ϵ_{302}) olan $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'e bölünerek konsantrasyon belirlendi.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \rightarrow \quad c = A / \epsilon \cdot b \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Peroksinitrit çözeltisinin her kullanımdan önce mutlaka spektrofotometrik yöntemle konsantrasyonu belirlendi. Çalışma sırasında çözelti buz banyosunda bekletildi. Bu sayede istenilen konsantrasyonda peroksinitrit ile çalışılması mümkün oldu.

2.3. Karaciğer Numunelerinin Alınması ve Hazırlanması

Taze alınan palamutlar kesilerek karaciğer kısımları dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan karaciğerler %1.5'lik KCl ile yıkanarak kan ve diğer kısımlardan temizlendi, kurutma kağıdı ile kurulandıktan sonra hassas terazide 24.55 g olarak tartıldı.

Kurulanmış karaciğerlere 36 mL tampon ilave edilerek parçalayıcıda iyice parçalanması sağlandı. Homojenatlar fosfat tamponu ile 5 kat seyreltildi ve +4 °C'de 4000xg'de 15 dakika süreyle soğukta santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant (sulu kısım) alınarak pellet (katı) atıldı. Homojenatlar tekrar tamponla 2:1 oranında seyreltildi ve +4 °C'de 40.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi ve ependorf tüplere (1.0 mL) bölünerek derin dondurucuda bekletildi.

2.4. Katalaz Aktivitesi Tayini

Katalaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde önerilen oldukça fazla yöntem bulunmasına rağmen hemen hepsinin esası 240 nm'de H_2O_2 'nin bozundurulması ile absorbandsdaki azalmaya dayanan ölçüm tekniğidir (Aebi, 1984).

Enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. 3mL'lik kuvars küvet içinde 25 °C'de 2mL H₂O₂ çözeltisi 0.9mL fosfat tamponu (pH 7.2) ve 0.1mL enzim çözeltisi karışımının 240 nm'de absorbandsındaki azalma kaydedildi. Katalaz aktivitesi ile ilgili yapılan prosedür ve pipetlemeler Tablo 5'de verilmektedir.

Tablo 5. Aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

İlave edilen çözelti hacmi (mL)	Kör	Nümune
H ₂ O ₂ çözeltisi (30 mM)	2	2
Fosfat tamponu	1.0	0.9
Doku Homojenatı	-	0.1
240 nm'de absorbands okundu.		

2.5. Peroksinitrit – Katalaz Etkileşmesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Oksidan özelliğe sahip peroksinitritin anyonunun palamut karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek üzere yapılan aktivite çalışmalarında, değişik konsantrasyonlarda peroksinitrit çözeltisiyle muamele edilen aynı miktardaki enzim içeren homojenatlarda katalaz aktivitesi incelendi. Çalışmada ayrıca kontrol olarak bozundurulmuş peroksinitritin aynı konsantrasyonlarında denemeler yapıldı ve 5 farklı konsantrasyonda elde edilen katalaz aktiviteleri tespit edildi.

Burada katalaz aktivitesinden farklı olarak eklenen her peroksinitrit çözeltisi hacmi için, içerisindeki baza eşdeğer konsantrasyonda asit içeren eşit hacimde HCl çözeltisi ilave edildi. Ayrıca bir sonraki safhada peroksinitritin bozundurulması işleminde yine aynı HCl çözeltisinin eşdeğer miktarları kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca kör olarak ortamda enzim yok iken reaktiflerden ileri gelen absorbandsı çıkarmak amacıyla 5 farklı konsantrasyonda PN + H₂O₂ kullanıldı.

Peroksinitrit çözeltisindeki baza eşdeğer HCl çözeltisi hazırlanmasında öncelikle yaklaşık 0.5 M HCl çözeltisi hazırlandı. Belli miktarlarda peroksinitrit çözeltisi ile titrasyon yapılmak suretiyle peroksinitritin birim hacminin ne kadar HCl çözeltisine eşdeğer olduğu hesaplandı. Daha sonra uygun seyreltme yapılarak peroksinitritin eşit hacmine eşit hacimde eşdeğer miktarda HCl içeren çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin

konsantrasyonu etüvde kurutulmuş sodyum karbonatla titre edilerek 0.293 M olarak hesaplandı.

Denemelerde kullanılan peroksinitrit çözeltisinin konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümle 5.65 mM olarak bulundu. Aktivite ölçümü için pipetlemeler Tablo 6 ve 7’de verildiği şekilde 10mL’lik deney tüplerinde yapıldı.

Peroksinitrit çözeltisi ve hidrojen peroksit çözeltileri ilavesi en son yapıldı ve bunlar hızlıca ilave edilip vorteksle karıştırıldı. Bu işlemin hızlıca yapılmasının nedeni peroksinitritin nötral pH’da kararsız olması ve bozunmasıdır. Ayrıca substrat olan H₂O₂ ilavesiyle de reaksiyon başlamaktadır. Vorteksleme işleminden 10 dakika sonra 240 nm’de absorban kuvars küvetlerde ve 30 saniye içinde okuma yapıldı. Sonuçlar grafiksel olarak ifade edildi.

2.6. Bozundurulmuş Peroksinitritin (BPN) Aktiviteye Etkisi

Bu aşamadaki denemelerde Bölüm 3.6.1.’de yapılan işlemlerin benzeri yapıldı. Benzer şekilde beş farklı konsantrasyondaki peroksinitrit çözeltisi bozunduruldu ve çalışmada kullanıldı. Bozundurma için her bir peroksinitrit çözeltisi üzerine eşdeğer HCl içeren çözeltilerin eşit hacimleri ilave ederek karıştırıldı ve böylece peroksinitrit bozunduruldu. Daha sonra denemelerde bozundurulmuş bu peroksinitrit çözeltileri kullanıldı. Tablo 6’da bozundurulmadan ve Tablo 7’de bozundurulduktan sonraki katalaz aktivitesinin tayini için yapılan pipetlemeleri göstermektedir.

Tablo 6. Katalaz aktivitesi tayininde peroksinitrit (PN) etkisi için yapılan pipetlemeler

(µL)	Test (1)	(Test 2)	Test(3)	Test (4)	Test (4)	Test (5)
Homojenat (Numune)	100	100	100	100	100	100
H ₂ O ₂ çözeltisi (30mM)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Tampon	900	900	900	900	900	900
PN	-	10	20	40	50	100
HCl	-	10.17	20.34	40.68	50.85	101.7
Saf su	1000	979.83	959.66	919.32	899.15	798.3

Tablo 7. Katalaz aktivitesi tayininde bozundurulmuş peroksinitrit (BPN) için yapılan pipetlemeler

μL	Test (1)	(Test 2)	Test (3)	Test(4)	Test (5)	Test (6)
Homojenat (Numune)	100	100	100	100	100	100
H ₂ O ₂ çözeltisi (30mM)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Tampon	900	900	900	900	900	900
Bozundurulmuş PN	-	10	20	40	50	100
HCl (0.293M)	-	10.17	20.34	40.68	50.85	101.7
Saf su	1000	979.83	959.66	919.32	899.15	798.3

3. BULGULAR

3.1. Sentezlenen Peroksinitritin Konsantrasyonu

Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonu, 302 nm'de gösterdiği absorbansın ölçülmesine dayalı olarak belirlendi. Konsantrasyon hesaplanırken absorbans, molar absorptivite katsayısına (ϵ : $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bölündü. Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonunun 17.5 mM olduğu belirlendi. Bu çözelti 1 M NaOH ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonda PN çözeltisi elde edildi. Derin dondurucuda bekletilen PN konsantrasyonu zamanla azaldığından her tayinde PN konsantrasyonu ölçümü yapılmaktadır.

3.2. Karaciğer Homojenatındaki Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine peroksinitrit anyon radikalinin etkisi olup olmadığını incelemek için dört ayrı ölçüm yapıldı. Birinci ölçümde normal katalaz aktivitesi ortamda peroksinitrit (PN) ve bozundurulmuş (BPN) yok iken yapıldı. Sonra ortama 5 farklı konsantrasyonlarda (10 mM, 20 mM, 40mm, 50 mM ve 100 mM) peroksinitrit ilave edilerek katalaz aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ortama aynı miktarda nötral veya asidik ortamda bozundurulmuş peroksinitrit (BPN) ilave edilerek ölçümler yapıldı. Son ölçüm ise ortamda katalaz enzimi yokluğunda reaktif körü kullanılarak (PN+H₂O₂) ilave edilerek kör çalışıldı. Elde edilen absorbans değerleri Tablo 8 ve 9'da verilmektedir.

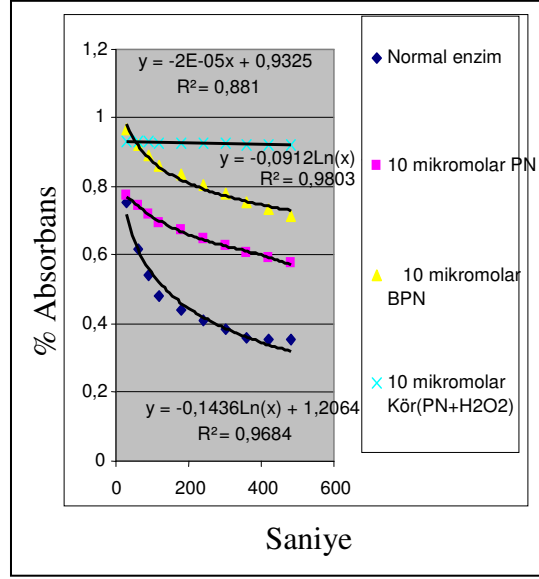
Tablo 8. Palamut karaciğer mikrozomal dokusunda katalaz aktivitesi üzerine değişik konsantrasyonlarda peroksinitrit (PN), bozundurulmuş peroksinitrit (BPN), kör (PN+H₂O₂) etkisinin incelenmesi için yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri

Zaman(s) Abs.(240nm)	Normal enzim	10 µM PN	10 µM BPN	10 µM Kör (PN+H ₂ O ₂)	20 µM PN	20 µM BPN	20 µM Kör (PN+H ₂ O ₂)
0	1,2	0,83	1,03	0,94	0,96	0,95	0,985
30	0,756	0,775	0,965	0,934	0,948	0,923	0,979
60	0,62	0,743	0,924	0,932	0,933	0,889	0,979
90	0,541	0,718	0,892	0,93	0,914	0,859	0,979
120	0,482	0,694	0,862	0,929	0,9	0,83	0,979
180	0,441	0,672	0,834	0,928	0,884	0,803	0,978
240	0,412	0,65	0,806	0,926	0,87	0,778	0,978
300	0,385	0,629	0,778	0,925	0,856	0,753	0,978
360	0,358	0,609	0,756	0,924	0,841	0,731	0,978
420	0,355	0,592	0,733	0,924	0,828	0,71	0,977
480	0,354	0,575	0,712	0,924	0,816	0,69	0,977

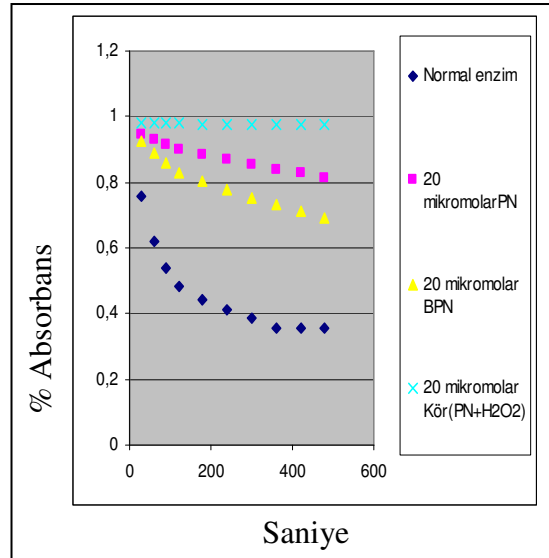
Tablo 9. Palamut karaciğer mikrozomal dokusunda katalaz aktivitesi üzerine değişik konsantrasyonlarda peroksinitrit (PN), bozundurulmuş peroksinitrit (BPN), kör (PN+H₂O₂) etkisinin incelenmesi için yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri

Zaman(s) Abs.(240nm)	40 µM PN	40 µM BPN	40 µM Kör(PN+H ₂ O ₂)	50 µM PN	50 µM BPN	50 µM Kör (PN+H ₂ O ₂)	100 µM PN
0	1,10	1,270	1,290	1,280	1,350	1,210	1,675
30	1,08	1,247	1,178	1,176	1,341	1,199	1,666
60	1,064	1,229	1,179	1,167	1,331	1,3	1,662
90	1,052	1,213	1,179	1,156	1,323	1,299	1,655
120	1,04	1,197	1,179	1,146	1,315	1,299	1,65
180	1,029	1,182	1,178	1,138	1,303	1,298	1,646
240	1,019	1,167	1,178	1,129	1,3	1,299	1,642
300	1,009	1,152	1,178	1,121	1,291	1,298	1,638
360	0,99	1,137	1,177	1,112	1,281	1,298	1,633
420	0,99	1,124	1,177	1,104	1,27	1,297	1,629
480	0,981	1,111	1,178	1,096	1,261	1,298	1,624

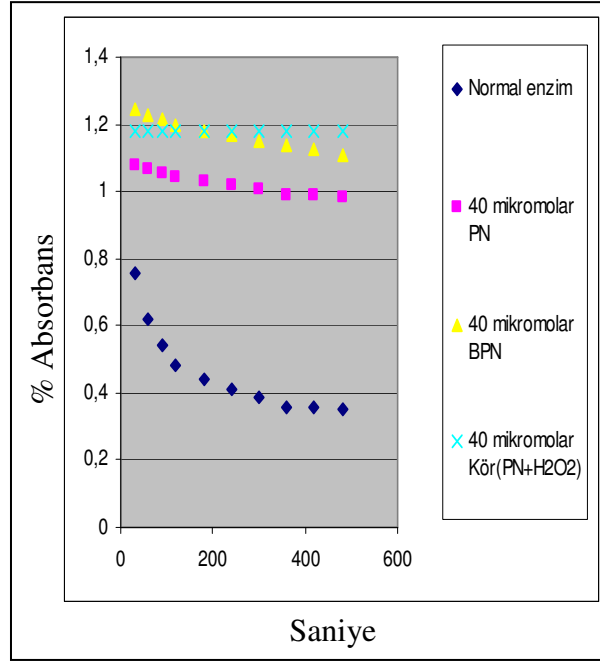
Tablo 8 ve Tablo 9’da verilen değerlere ait grafikler Şekil 4 ile Şekil 8 arasında verilmektedir. Bu şekillerden de görüldüğü gibi katalaz enzimine ait absorbans değerleri PN ve BPN miktarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Buna göre artan PN ve BPN miktarına karşılık absorbans da artış göstermektedir. Bu daha Şekil 4 ile Şekil 8’deki (aşağıdaki) grafiklerden 5 farklı konsantrasyonda PN ve BPN nin karaciğer katalaz enzimi üzerine etkisini göstermektedir. Yani ortama PN ve BPN ilave edilince 240 nm’de absorbans artmasının sebebi bu ürünlerin 240nm’de ışığı absorplamasından kaynaklanmaktadır.



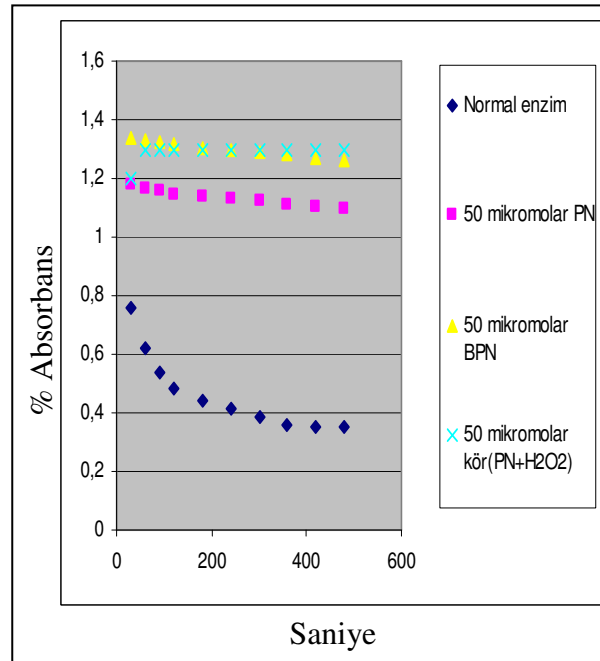
Şekil 4. 10 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi



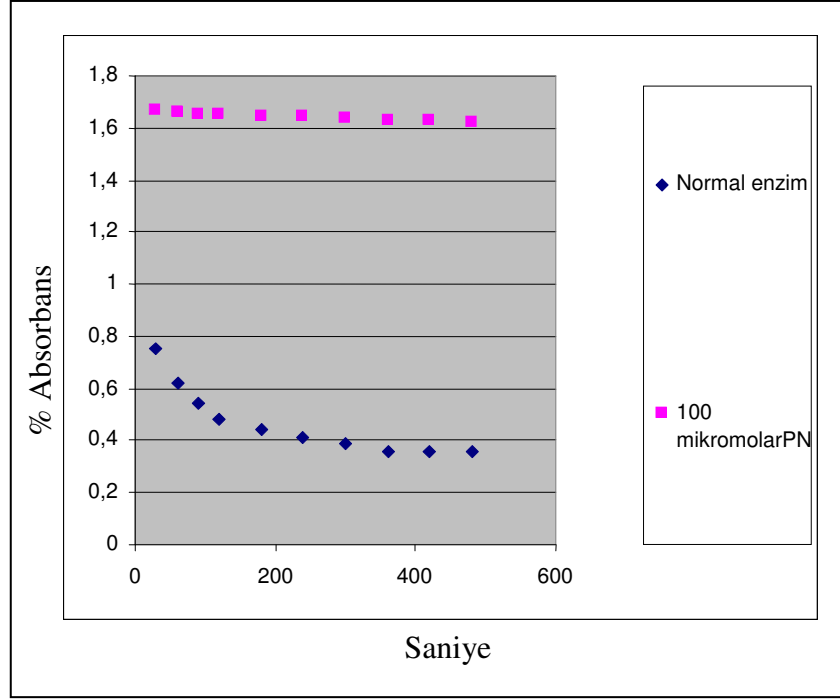
Şekil 5. 20 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi



Şekil 6. 40 μ M PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi



Şekil 7. 50 μ M PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi

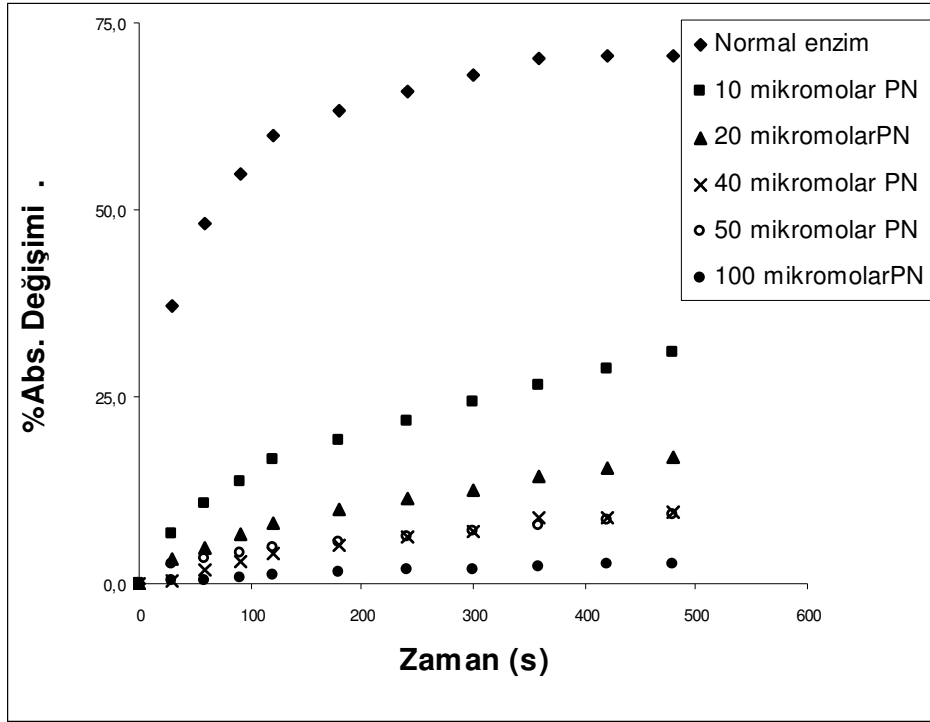


Şekil 8. 100 µM PN ve BPN'nin katalaz enzimi üzerine etkisi

Tablo 8 ve 9'daki absorbans değerlerinden de görüldüğü gibi ortama PN ilave edildiğinde absorbans artmakta ve BPN ilave edilince absorbans daha da artmaktadır. Ölçümün amacı absorbansdaki ($\Delta A / \Delta t$) değişimi tespit etmek olduğu için bulunan absorbans değerlerinden % absorbansdaki değişim miktarları hesaplandı. Elde edilen % absorbans değişimine ait değerler Tablo 10'da verilmektedir. Tablo 10'da 5 farklı konsantrasyondaki PN ve BPN'in katalaz enzimi üzerinde meydana getirdiği % absorbans değişimlerinin grafiği Şekil 9'da verilmektedir. PN ve BPN'in her ikisinin etkisi ile de % absorbans değişimi arasında ters orantı bulunmaktadır. Buna göre absorbansdaki artış ne kadar fazla ise PN'in etkisi o kadar az demektir. Bu şekilde görüldüğü gibi PN anyon radikali katalaz enziminin aktivitesini azaltmıştır. PN'den başka ortama ilave edilen BPN'de de katalaz aktivitesi azalmıştır. Katalaz aktivitesi ile artan PN arasında ters orantı vardır.

Tablo 10. 10, 20, 40, 50, 100 μM 'lık peroksinitrit (PN) ve bozundurulmuş peroksinitritin (BPN) in katalaz üzerine etkisinin incelenmesine ait % absorbans değişim değerleri

Zaman (s)	Normal enzim	10 μM PN	10 μM BPN	10 μM K�r	20 μM PN	20 μM BPN	20 μM K�r	40 μM PN	40 μM BPN	40 μM K�r	50 μM PN	50 μM BPN	50 μM K�r	100 μM PN
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	37,0	6,6	6,3	0,6	1,3	2,8	0,6	1,8	1,8	8,7	8,1	0,7	0,4	0,5
60	48,3	10,5	10,3	0,9	2,8	6,4	0,6	3,3	3,2	8,6	8,8	1,4	3,0	0,8
90	54,9	13,5	13,4	1,1	4,8	9,6	0,6	4,4	4,5	8,6	9,7	2,0	3,1	1,2
120	59,8	16,4	16,3	1,2	6,2	12,6	0,6	5,5	5,7	8,6	10,5	2,6	4,5	1,5
180	63,3	19,0	19,0	1,3	7,9	15,5	0,7	6,5	6,9	8,7	11,1	3,5	4,8	1,7
240	65,7	21,7	21,7	1,5	9,4	18,1	0,7	7,4	8,1	8,7	11,8	3,7	5,2	2,0
300	67,9	24,2	24,5	1,6	10,8	20,7	0,7	8,3	9,3	8,7	12,4	4,4	5,6	2,2
360	70,2	26,6	26,6	1,7	12,4	23,1	0,7	10,0	10,5	8,8	13,1	5,1	6,1	2,5
420	70,4	28,7	28,8	1,7	13,8	25,3	0,8	10,0	11,5	8,8	13,8	5,9	6,6	2,7
480	70,5	30,7	30,9	1,7	15,0	27,4	0,8	10,8	12,5	8,7	14,4	6,6	6,9	3,0



Şekil 9. 5 farklı konsantrasyonda PN ve BPN'nin palamut karaciğer katalaz enzimi üzerine etkisine ait absorbandaki % değişim oranları. Bulunan bu değerlerde reaktif körüne ait değerler çıkartılmıştır.

Şekil 9'dan da görüldüğü gibi normal katalaz aktivitesi PN miktarlarına bağlı olarak azalmaktadır. Enzim aktivitesindeki azalış PN ve BPN'nin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

4. TARTIŞMA

Katalaz enzimi prokaryotik ve ökaryotik bütün canlılarda yaygın bir şekilde bulunan antioksidan bir enzimdir. Katalaz homotetramerik yapıda bir enzim olup her bir alt grupta bir tane hem grubu ve ona bağlı bir Fe atomu içeren ve molekül ağırlığı yaklaşık 200-340 kDa olan bir enzimdir. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPOX), ve glutatyon reduktaz (GR) gibi önemli antioksidan enzimler de olduğu gibi katalaz enzimi de oksidatif stresten etkilenmektedir (Trenzado vd. 2006, Atli vd. 2006).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller en dış elektron kabuğundan bir elektron kaybetmiş olduklarından bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Serbest radikal oluşturan kaynaklar oldukça fazla olup radyasyon, virüsler, UV-ışınları, X-ışınları, ozon kozmik ışınlar, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, otomobil egzoz gazları, sanayi atıkları, enfeksiyonlar, stres, hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları bunlardan bazılarıdır. Oksijenin eksik indirgenme ürünleri olarak da adlandırılan bazı serbest oksijen radikallerinden süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^\cdot) radikalleri bazen tek başlarına etkili olabildikleri gibi bazen de bir başka serbest radikal ile birleşerek daha toksik ajanların oluşmasına yol açmaktadırlar (Sies, 1991).

Nitrik oksit (NO) in vivo olarak oluşan serbest radikallerden biridir. Fizyolojik olarak sinyal iletiminde rol alan bir haberci olmasına rağmen, süperoksit radikali ile birleşerek kendinden daha toksik peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna yol açmaktadır. Peroksinitrit güçlü bir oksidan ajan olup fizyolojik şartlar altında proteinlerin başta tirozin birimlerine olmak üzere triptofan, metoyonin, fenilalanin ve sistein amino asitlerine saldırarak onları nitrolayabilir veya oksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olabilirler (Tsuda vd., 2000; Goldstein vd., 1996, Küçük, 2002).

Fizyolojik olarak oldukça önemli bu iki molekülün birbiriyle olan etkileşimini incelemek çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Proteinlerin primer yapılarının değişimine sebep olan ajanlar inhibitörlerdir. Yapılan çalışmada palamut karaciğer dokusunda bulunan katalaz enzimi aktivitesi üzerine peroksinitrit anyon radikalinin herhangi bir inhibitör etkisinin olup olmadığı incelendi.

Çalışmada önce palamut karaciğerinden elde edilen mikrozomal katalaz aktivitesi ölçüldü. Bu ölçüm 240 nm'de ortamdaki katalaz miktarına bağlı olarak absorbansda azalma oluşturmaktadır yani $\Delta A / \Delta t$ oranı değişmektedir. Çalışmada PN ve BPN'in katalaz enzimi üzerine etkisi 240 nm'de absorbans okunarak takip edildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde ortama PN ilave edilince absorbans PN konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Bu bize PN'in 240 nm'de absorpsiyon yaptığını göstermektedir. Gerçek katalaz üzerindeki etkiyi göstermek için absorbansdaki değişimi belirlemek gerekmektedir. PN'li ortamda absorbansdaki azalma ne kadar fazla ise PN'in etkisi o kadar az demektir, ya da bunun tersi durumunda absorbansdaki % değişim ne kadar az ise PN'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi o kadar az demektir. Tablo 10 % absorbans değişimleri ile ve Şekil 9'da 5 farklı konsantrasyondaki PN'in ve BPN'nin katalaz üzerine olan etkisini açıklamaktadır. Her iki anyon radikalinin katalaz enzimi üzerine aynı inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. PN ve BPN'in her ikisinin de oksidan ajanlar olup katalaz enziminin oksidasyonuna sebep olduğu ancak, enzim aktivitesini konsantrasyona bağlı olarak azalttığı bulundu. Daha önceki araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda PN veya onun bozunma ürünlerini proteinlerin ve aynı şekilde enzimlerin özellikle fenolik veya aromatik yapıya sahip amino asitleri nitroladığı ve bundan dolayı proteinlerin primer yapılarının bozulmasına neden olabileceği ileri sürülmüştür.

Yapılan literatür çalışmaları sonucu şimdiye kadar PN anyon radikali ile katalaz enzimi veya başka bir antioksidan enzim üzerindeki in vitro inhibisyon etkisi çalışmaları yok ya da çok az bulunmaktadır. Bu nedenle bulunan sonuçları karşılaştırma imkanımız olmamıştır. Ancak katalazın bir protein olması bakımından diğer proteinlerin oksidasyonuna sebep olduğundan aynı şekilde de katalazın oksidasyonuna ve dolayısıyla inhibisyonuna da neden olduğu görülmektedir (Küçük, 2002). Nitekim yapılan bir çalışmada antioksidan bir enzim olan glutamin sentaz enzimini dönüşümlü olarak peroksinitriti inhibisyona uğrattığı tespit edilmiş ve bunun yine tirozin üzerinden nitrolama ile mümkün olabileceği bildirilmiştir (Görg vd., 2007).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak laboratuarda sentezlenen oksidan kaynaklı peroksinitritin in vitro olarak balık karaciğer katalaz enziminin inaktivasyonuna neden olduğu bulundu. Bu enzim inaktivasyonunun muhtemel katalaz enzimi üzerindeki aminosit birimlerinin nitrolanması ile mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada palamut karaciğer katalaz enziminin saflaştırılması işlemleri yapılabilirdi. Bunun için amonyum sülfat tuz çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değiştirme kromatografileri (anyon ve katyon değiştirici) uygulanabilirdi. Saf katalaz üzerindeki PN'in etkisini gözlemleyebilmek için doğal elektroforez ile PN ile muamele edilmiş ve PN ile muamele edilmemiş katalazın elektroforetik mobilitelerinde fark da gözlemlenmek suretiyle PN'in etkisi gösterilmiş olurdu. Güçlü oksidan etkiye sahip PN'in sadece katalaz üzerine değil başka protein ve antioksidan enzimler üzerine etkisini de incelemek mümkündür. Bu konuda direkt olarak yapılan çalışmalar yetersiz olduğundan bu çalışmanın konudaki boşluğu dolduracağına inanıyoruz.

6. KAYNAKLAR

- Aebi, H., Jeunet, F., Rich20terich, R., Suter, H., Butler, R., Frei, J. ve Marti, H. R., 1962. Observations in two Swiss families with acatalasia. Enzym. Biol. Clin. 2, 1-22.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, Method. Enzymol., 105, 121-126.
- Ahmad, I., 2001. Catalase, Free Radicals in Biology and Medicine, Iowa University, Iowa, Spring Term. 1-10.
- Afsar, H. ve Demirata, B., 1993. Indirect Spectrophotometric Determination of Hydrogen- Peroxide, Fresenius J. Anal. Chem., 347, 460.
- Akertek, E. ve Tarhan, L., 1995. Characterization Of Immobilized Catalases And Their Application İn Pasteurization Of Milk With H2O2, Appl.Biochem. Biotechnol., 50, 291-303.
- Akgöl, S. ve Dinçkaya, E., 1999.A Novel Biosensor For Specific Determination Of Hydrogen Peroxide: Catalase Enzyme Electrode Based On Dissolved Oxygen Probe, Talanta, 48, 363-367.
- Aydemir, T. ve Kuru, K., 2003. Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors on enzyme activity ,Turkish Journal of Chemistry 27,1,85-97.
- Baur, E. W., 1963. Catalase abnormality in a Caucasian family in the United States. Science 140, 816-817.
- Bell, G. I., Najarian, R. C., Mullenbach, G. T. ve Hallewell, R. A., 1986 . cDNA sequence coding for human kidney catalase. Nucleic Acids Res. 14,5561-5562.
- Bonnichsen, R., In Colowick, S. P. ve Kaplan, N. O., 1995. Blood Catalase, Methods in Enzymology, Academic Pres, New York, 2, 781-784.
- Boyd, P., van Heyningen, V., Seawright, A., Fekete, G. ve Hastie, N., 1986. Use of catalase polymorphisms in the study of sporadic aniridia. Hum. Genet. 73, 171-174.
- Carter, Brannon ve Robin L. 2007. <http://crystal.uah.edu/~carter/enzyme/catalase.htm>, 13.12.2007
- Chaudiere, J. ve Ferrari- Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Cemical to Biochemical Mechanism, Food and Chemical Toxicology, 37, 949-962.
- Çetin, K., 2000. Tavuk Karaciğerinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.

- Çimen, Ç., Öter Ç., Demir H. ve Savran A., 2005; Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, VAN YYÜ Vet. Fak.Derg. 16,1,15-20.
- Dhaese, P., 1996. Catalase: An enzyme at with growing industrial potential, *Chim. Oggi.*, 14,1-2,19-21.
- Diñer, A., 2000. Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Feinstein, R. N., 1949. *J. Biol. Chem.*, 180, 1197.
- Goldstein, S., Squadrito, G. L., Pryor, W.A. ve Czapski, G., 1996. Direct and indirect oxidations by peroxynitrite, neither involving the hydroxyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21,7, 965-974 .
- Goth, L. ve Eaton, J. W., 2000. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 356, 1820-1821.
- Görenek, G. 1999. Aljinat Kürecikler İçinde Katalaz İmmobilizasyonu , Yüksek Lisans Tezi , Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Görg, B., Qvartskhaca, N., Voss,P., Grune,T., Haussinger, D. ve Fremut, S. 2007. Reversible inhibition of mamalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS letters*, 581, 84-90.
- Hamilton, H. B. ve Neel, J. V., 1963. Genetic heterogeneity in human acatalasia. *Am. J. Hum. Genet.* 15, 408-419.
- Hatchikian, E. C., 1972. Regulation of the reduction of Sulfite and Thiosulfate by Ferredoxin, Flavodoxin and Cytochrome C3 in Extracts of the Sulfate Reducer *Desulfovibrio gigas*, *Biochim. Biophys. Acta*, 258, 701-708.
- Hatchikian, E. C., LeGall, J., Bruschi. M. ve Dubourdiou, M., 1972. Regulation of the reduction of Sulfite and Thiosulfate by Ferredoxin, Flavodoxin and Cytochrome C3in Extracts of the Sulfate Reducer *Desulfovibrio gigas*, *Biochim. Biophys. Acta*, 258, 701-708.
- Hazell, S. L., Evans Jr, D. J. ve Graham, D. Y.,1991. *Helicobacter pylori* Catalase, *J. Gen. Biotechnol. Prog.*, 20, 1578-1582.
- Jiang, Z., Akey, J. M., Shi, J., Xiong, M., Wang, Y., Shen, Y., Xu, X., Chen, H., Wu, H., Xiao, J., Lu, D., Huang, W. ve Jin, L., 2001. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum. Genet.* 109, 95-98.

- Kenney, M. C., Chwa, M., Atilano, S. R., Tran, A., Carballo, M., Saghizadeh, M., Vasiliou, V., Adachi, W. ve Brown, D. J., 2005. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays an role in this disorder. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 46, 823-832.
- Koppenol, W.H., Kissner, R. ve Beckman, J.S.,1996 Synthesis of peroxynitrite: To go with the flow or on solid grounds. Methods in enzymology, 269, 269-302.
- Küçük, M., 2002. Saflaştırılmış Farklı Orijinli Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerine İn Vitro Peroksinitritin Muamelesininin Etkilerinin İncelenmesi. Doktora tezi. KTÜ Fen-Bilimleri Enstitüsü Trabzon.
- Mannens, M., Slater, R. M., Heyting, C., Blik, J., Hoovers, J., Bleeker-Wagemakers, E. M., Voute, P. A., Coad, N., Frants, R. R. ve Pearson, P. L., 1987. Chromosome 11, Wilms' tumour and associated congenital diseases. Cytogenet. Cell Genet. 46, 655.
- Nance, W. E., Empson, J. E., Bennett, T. W. ve Larson, L., 1968. Haptoglobin and catalase loci in man: possible genetic linkage. Science 160, 1230-1231.
- Niikawa, N., Fukushima, Y., Taniguchi, N., Iizuka, S. ve Kajii, T., 1982. Chromosome abnormalities involving 11p13 and low erythrocyte catalase activity. Hum. Genet. 60, 373-375.
- Ogata, M., 1991. Acatalasemia. Hum. Genet. 86, 331-340.
- Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B. ve Gravel, R. A., 1986. Isolation and characterization of the human catalase gene. Nucleic Acids Res. 14, 5321-5335.
- Shibata, Y., Higashi, T., Hirai, H. ve Hamilton, H. B., 1967. Immunochemical studies on catalase. II. An anticatalase reacting component in normal hypocatalasemic, and acatalasemic human erythrocytes. Arch. Biochem. 118, 200-209.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stres, From Basic Research to Clinical Application, American Journal Medic, 9, 31-37.
- Szeinberg, A., De Vries, A., Pinkhas, J., Djaldetti, M. ve Ezra, R., 1963. A dual hereditary red blood cell defect in one family: hypocatalasemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Acta Genet. Med. Gemellol. 12, 247-255.
- Takahara, S., Hamilton, H. B., Neel, J.V., Kobara T.Y., Ogura, Y. ve Nishimura, E.T., 1960. J. Clin. Invest., 39, 610.
- Thompson, V. S., Schaller, K. D. ve Apel, W.A., 20003. Purification and Characterization of a Novel Thermo-Alkali-Stable Catalase from *Thermus brockianus*, Biothechnol. Prog., 19, 1292-1299.
- Tsuda, T., Kato, Y. ve Osawa, T., 2000. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. FEBS letters, 484, 207-210.

Uppu, R.M., Squadrito, G.L., Cueto, R. ve Pryor, W.A.,1996: Selecting The Most Appropriate Synthesis Of Synthesis Of Peroxynitrite.Methods in Enzymology, 269, 285-295.

Yıldız , H., 1999. Selüloz Asetat Küreciklerüzeyinde Katalaz İmmobilizasyonu , Yüksek Lisans Tezi , Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Yurdakul, Z., 2005. Oksijen ve Canlılar, <http://www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen/oksijen.htm>, 15 Mart 2005.

Wieacker, P., Mueller, C. R., Mayerova, A., Grzeschik, K. H. ve Ropers, H. H., 1980. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. *Ann. Genet.* 23, 73-77.

URL-1, www.catalase.com/cataext.htm, 10 Aralık 2007.

URL-2, www.expasy.ch, 15 Aralık 2007.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Trabzon'da doğdu. 2001 yılında Akçaabat Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Trabzon'da doğdu. 2001 yılında Akçaabat Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.