

DENEY NO: 1

I. FAZ REAKSİYONLARI

ETOKSİ RESORUFİN O-DEETİLİZ AKTİVİTESİ VE KOTİNİN TAYİNİ

A) Genel Bilgi:

Son yıllarda artan endüstrileşme ile canlılar pek çok ilaç ve kimyasal maddeye maruz kalmaktadırlar. Organizmaya giren bu bileşiklerden lipofilik özellikte olanlar kolaylıkla absorblanırlar, ancak atılmaları kısıtlıdır. Lipofilik özellikte olan bu kimyasalların hidrofilik hale geçerek organizmadan atılmaları yani biyotransformasyonları ksenobiyotik metabolize eden enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimler I. Faz I ve II. Faz enzimleri olarak iki gruba ayrılırlar. Bu enzimlerden I. faz enzimleri yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz, II. Faz enzimleri de konjugasyon tepkimelerini gerçekleştirir. Ksenobiyotiklerin daha polar hale geçerek vücuttan atılmasını sağlayan bu tepkimelerde çoklukla sitokrom P450'ye bağlı enzim sistemi rol oynar.

Gerek karaciğer gerekse karaciğer dışındaki birçok organ ve dokuda bulunan sitokrom P450'ye bağlı ksenobiyotik metabolize eden enzim sistemi steroidler, safra asitleri, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler, vitamin A ve D, biyogenik aminler, retinoidler, lipid hidroperoksidazlar ve fitoaleksinler gibi pek çok endojen maddenin oksidatif, peroksidatif ve redüktif metabolizmasında yer alırlar. Bu enzimlerin pek çoğu ayrıca ilaçları da kapsayan sentetik kimyasalları, çevre kirleticilerini, pestisitler, aromatik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi pek çok ksenobiyotiği de metabolize ederler. Bu enzim sistemi söz konusu kimyasal maddeleri etkili veya etkisiz hale dönüştürerek gerek ilaçların tedavi edici etkinliklerinin değişmesine gerekse karsinojenite, mutajenite gibi özel toksik etkilerin gelişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle bu sistemdeki değişiklikler etkinliklerinin ve/veya ksenobiyotiklerin toksisitesinin değişmesine yol açabilmektedirler. Bu enzim sisteminin en önemli bileşeni olan P450'nin çok sayıda formu olup her biri farklı gen tarafından kodlanıp sentezlenmektedir. Karaciğer, ksenobiyotiklerin metabolize edilmesinde en önemli görevi üstlenen organdır.

I. Faz tepkimeleri içinde en önemli tepkimeler yükseltgenme tepkimeleridir. Ksenobiyotiklerin % 90-95'i bu yolla metabolize olur. Metabolizma, genellikle ana maddenin inaktivasyonu sonuçlansa da bazı metabolitler ana maddeden daha toksik olabilirler, yani metabolik aktivasyon görülür. Yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzim sistemleri aşağıdaki gibidir:

a. Mikrozomal Enzim Sistemi

- i. Sitokrom P450 içeren monooksijenazlar (CYP'ler)
- ii. Flavin içeren monooksijenazlar (FMO)

b. Nonmikrozomal Enzim Sistemi

- i. Sitozolik enzimler (Alkol dehidrogenaz, Aldehit dehidrogenaz)
- ii. Mitokondriyel enzimler (MAO, DAO) olarak sınıflandırılırlar.

I.Faz tepkimelerinin önemli bir bölümü, mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Bu enzimler substratlarına OH- veya O- gibi küçük moleküller eklerler. Ksenobiyotik metabolize

eden enzim sisteminde yer alan I. faz enzimleri (CYP'ler), ilaçlar dahil birçok ksenobiyotiğin metabolizmasından sorumlu olan sistemdir.

I.Faz enzimlerinden biri olan 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi CYP1A1 göstergesi olarak ölçülmektedir. CYP1A1 pekçok kimyasalın aktivasyonundan sorumludur. Sigara dumanında bulunan PAH lar (örn. benzo(a)piren), aflatoksinler bu kimyasallardan bazılarıdır.

Sigara dumanı ile organizmaya giren nikotin de hızla metaboliti olan kotinine dönüşür. Bu nedenle EROD anzim aktivitesinin sigara içimiyle ilişkisini desteklemek amacı ile biyolojik sıvılarda kotinin ölçülür.

1) Etoksiresorufin O-Deetilaz (EROD) Enzim Aktivitesi

Deneyde kullanılan çözeltiler, malzemeler ve cihazlar:

1. Resorufin çözeltisi
2. 1 mM 7-etoksi resorufin çözeltisi
3. 12 mg/ml albumin çözeltisi
4. 0.1 M pH: 7.8 Tris HCl tampon çözeltisi
5. NADPH üreten sistem
6. Spektroflorimetre
7. Metil alkol
8. Otomatik pipetler
9. Sallamalı su banyosu
10. Santrifüj
11. Vortex
12. Deney hayvanı-sıçan/fare

Dokuların Eldesi ve Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması

Deney hayvanlarından çıkarılan karaciğer dokuları zedelenmeden ayrılıp, saf ve soğuk su ile yıkanarak kanlarından arıtılır. Daha sonra emici bir kağıt üzerinde suları süzülerek kurulan dokuların ağırlıkları 0,001 grama kadar hassasiyetle ölçülür. Tüm bu işlemler +4°C'de, buz banyosu içinde yapılır.

Sıçan karaciğer dokuları makasla kesilerek ufak parçalara ayrılır. Parçalara ayrılan dokular teflon cam homojenizasyon aygıtı buza yerleştirilerek üzerine 1 gram doku başına 5 mL (fare için 1 gram doku başına 3.5 mL) olacak şekilde % 1.15'lik KCl çözeltisinden ilave edilir ve homojenizatör yardımıyla dokular homojenize edilir. Homojenize edilen dokular, santrifüj

tüplerine konup 10000 g'de 20 dakika santrifüj edilir. 10000 g'de çöken doku fraksiyonları başlıca mitokondri ve hücre çekirdeğini içermektedir. Sıvı kısımda ise endoplazmik retikulum parçaları ve çözünür halde bulunan sitoplazma vardır. Bu kısım 10000 g fraksiyonu olarak ayrılmıştır. Elde edilen 10000 g fraksiyonu, yani üst faz, daha sonra tekrar santrifüj tüplerine konularak Beckman soğutmalı ultrasantrifüjde 30.000 rpm'de (108000 g) 1,5 saat süreyle santrifüj edilir. Pelletler, mikrozom içermektedir. Çöken kısım (pelletler) alınarak 1 g doku için 0,5 mL olacak şekilde %20 gliserol ile homojenize edildikten sonra elde edilen mikrozomal fraksiyonun bir kısmı, protein tayini için alınarak geriye kalan mikrozomal fraksiyonlar enzim aktivitelerinin hesaplanması için -80°C 'lik derin dondurucuda saklanır.

Protein Miktar Tayini

Hazırlanan mikrozomların protein miktarları Lowry ve ark.(1951) tarif ettikleri yöntemle göre hesaplanır. Karaciğer mikrozomu 1/100 (100 µl mikrozom çözeltisi 10ml'ye distile suyla tamamlanır) ve 1/200 (50 µl mikrozom çözeltisi 10ml'ye distile suyla tamamlanır) oranında seyreltilerek 2.5 ml Reaktif D ilave edilir. 10 dakika sonunda mümkün olduğunca hızlı bir şekilde bütün tüplere 0,25 mL Folin çözeltisi eklenir. Her bir ekleme sonrasında vorteks yardımıyla karıştırma işlemi yapılarak, 37°C 'de 30 dakika su banyosunda çalkalanır ve 660 nm'de köre karşı spektrofotometrede okuma yapılır. Çizilen standart eğriden (0.05 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.015 mg/mL ve 0.2 mg/mL derişimlerindeki sığır serum albumini, BSA) protein miktarları hesaplanır. Örnek standart eğri grafiği, aşağıda görülmektedir.

Reaktif D nin hazırlanması:

*****Reaktif A: 0.1 ml % 2'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

Reaktif B: 0.1 ml % 2'lik sodyum potasyum tartarat,

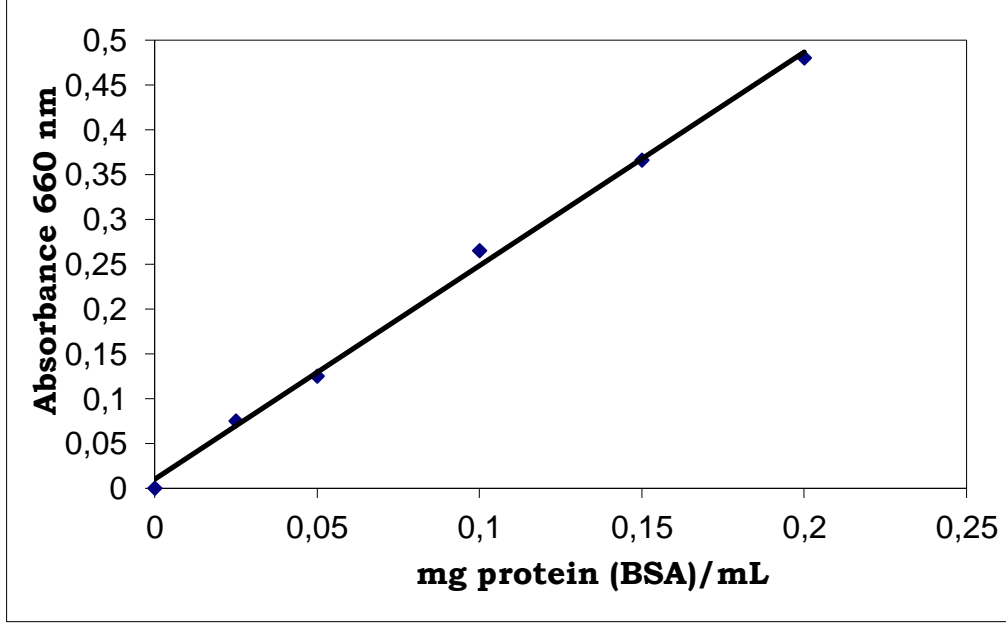
Reaktif C: 10 ml % 2'lik Na_2CO_3 'ün 0,1 N NaOH içindeki çözeltisi

Reaktif D çözeltisi, kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanır.

*****Folin çözeltisi: 2 N Folin reaktifi, 1:1 oranında saf su ile seyreltilir.

Tüp No	Tepkime ortamının elemanları	Hacim (ml)	İlave edilen çözelti (2.5 ml)	İlave edilen çözelti (0.250 ml)
1	Distile su	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
2	Distile su	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
3	0.1 mg/ml BSA*	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
4	0.1 mg/ml BSA	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
5	0.1 mg/ml BSA	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
6	0.1 mg/ml BSA	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
7	1/100 dil. Kc. Mik. Çöz.	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
8	1/1001 dil. Kc. Mik. Çöz.	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
9	1/2001 dil. Kc. Mik. Çöz.	0.5	Reaktif D	Folin çözel.
10	1/200 dil. Kc. Mik. Çöz.	0.5	Reaktif D	Folin çözel.

* BSA: Sığır serum albumini, bovine serum albumin (İng.)



Standart protein eğrisi

EROD Aktivitesinin Tayini

Mikrozomlara protein tayini yapıldıktan sonra 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi tayin edilir. 7-etoksiresorufin O-deetilaz, 7-etoksiresorufinin resorufine dönüşümünü sağlayan enzimdir. Bu enzimin aktivitesi, oluşan resorufin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan yöntemle saptanır. Kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılır.

EROD enzim aktivitesinin ölçümünde standart olarak resorufin çözeltisi kullanılmıştır. Dört farklı derişimde tepkime ortamına ilave edilen standartların spektrofotometrede okunan farklı resorufin miktarlarına karşılık gelen farklı FI değerleri de standart eğrinin çizilmesinde kullanılır.

Tepkime ortamında, 1.0ml' lik toplam hacimde, 0.2 mg mikrozomal protein, substrat olarak 1 μ M 7-etoksiresorufin , pH 7,8 Tris HCL tamponu; 12mg/ml albumin, kofaktör olarak (NADPH üreten sistem) 2.5 mM glukoz-6-fosfat, 2,5 mM NADP+, 1 U/0,5 mL glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM pH 7,8 potasyum fosfat tamponu bulunmaktadır. Kofaktör, kullanılmadan hemen önce hazırlanır.

Karaciğer mikrozomu EROD aktivitesi tepkime ortamının elemanları

Tepkime ortamının elemanları	Stok çözeltiler	İlave Edilen Hacim
7-etoksiresorufin	1 mM	0,100 mL
pH 7,8 Tris HCL tamponu	100 mM	0,550 mL
Albumin	1.2 mg/mL	0,100 mL
Mikrozomal protein	0.2 mg/mL	0,100 mL
NADP ⁺	10 mM	0,025 mL
MgCl ₂	100 mM	0,025 mL
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	1000 Birim (U)/0,2 mL	0,0002 mL
Potasyum fosfat tamponu pH: 7,8	400 mM	0,0748 mL
Glukoz-6-fosfat	100 mM	0,025 mL

Deneyin yapılışı:

Tepkime ortamı elemanlarından NADPH üreten sistem hariç diğer maddeleri içeren tüplere NADPH üreten sistem ilavesiyle reaksiyon başlatılır. Tüpler ağızları açık olacak şekilde sallamalı su banyosunda, 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 3 ml metanol ilavesiyle reaksiyon durdurulur ve tüpler tekrar buz banyosuna konur ve denatüre protein, 4000rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülür. Çözeltinin 3 ml si başka bir tüpe alınarak, çözeltinin FI değerleri spektrofotometrik (Eksitasyon: 538 nm, Emisyon: 587 nm) olarak ölçülür. FI değerleri okunduktan sonra EROD aktivitesi resorufin standartlarına karşı hesaplanır.

2) İdrarda KOTİNİN tayini

İdrar örneğinde kotininin tayini spektrofotometrik olarak barbitürik asit metodu ile saptanır. Bu yöntem kotininin barbitürik asitle renkli kompleks vermesi esasına dayanır. Oluşan renkli kompleksin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deneyde kullanılan çözeltiler, malzemeler ve cihazlar:

1. 4 M sodyum asetat tampon çözeltisi pH:4.7
2. % 10 luk potasyum siyanür
3. % 10 luk Kloramin-T
4. % 1 lik barbitürik asit çözeltisi (aseton:su- 1:1 içinde)
5. İdrar numunesi
6. Spektrofotometre

Deneyin yapılışı:

0.5 ml idrar üzerine sırası ile,

- 0.2 ml 4 M sodyum asetat tamponu pH:4.7
- 0.1 ml % 10 luk potasyum siyanür
- 0.1 ml % 10 luk Kloramin-T
- 0.5 ml % 1 lik barbitürik asit çözeltisi ilave edilir.
- 20 dakika beklenir.
- 506 nm de spektrofotometrede ölçülür.

Okunan absorbansın değeri daha farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin absorbans değerlerine göre hesaplanarak idrardaki kotinin miktarları hesaplanır.