

**BAZI PESTİSİTLERİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILAN MİTOKONDRIAL TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN
AKTİVİTESİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION IN VITRO EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON
THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL THIOREDOXIN REDUCTASE
ENZYME THAT PURIFIED FROM RAINBOW TROUT LIVER**

İlknur ÖZGENÇLİ¹, Yusuf TEMEL¹, Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU¹, Mehmet ÇİFTÇİ^{2*}

¹Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 25100-ERZURUM

²Bingöl Üniversitesi, Rektörlük, 12000-BİNGÖL

ÖZET

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine bazı herbisit ve insektisitlerin *in vitro* etkileri incelendi. Enzimin saflaştırılmasında 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi kullanıldı. Enzim 11,8 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, % 2,38 verimle ve 648,4 kat saflaştırıldı. Enzimin saflık kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile yapıldı ve tüm kinetik çalışmalarda saf enzim kullanıldı. Yapılan kinetik çalışmalarda 4'ü herbisit 4'ü insektisit olmak üzere kullanılan tüm pestisitlerin enzim üzerinde inhibisyon etkisi tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Gökkuşağı Alabalığı, Tiyoredoksin Redüktaz, Herbisit, İsektisit, İnhibisyon*

ABSTRACT

In this study, we determined the *in vitro* effects of some herbicides and insecticides on the activity of mitochondrial Thioredoxin Reductase that purified from liver of rainbow trout. For purification of enzyme, 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography technique was used. The enzyme was purified 648,4-fold from rainbow trout liver mitochondria in a yield of 2.38 % with 11,8 U/mg. SDS-PAGE was done to control the purify of enzyme and also showed a single band for the enzyme. According to the kinetic studies, inhibition effects of all pesticides including four of herbicides and four of insecticides were identified.

Key Words: *Rainbow Trout, Thioredoxin Reductase, Herbicide, Insecticide, Inhibition*

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet ÇİFTÇİ, Bingöl Üniversitesi, Bingöl Üniversitesi Rektör Yardımcısı, 12000, Bingöl, ciftcim@atauni.edu.tr

1. GİRİŞ

Tiyoredoksin redüktazlar (EC 1.6.4.5) lipoamid dehidrogenaz, glutasyon redüktaz gibi piridin nükleotit disülfid oksidoredüktazlar arasında flavoprotein ailesine bağlı enzimlerdir. Bu ailenin üyelerinin her biri disülfid içeren aktif bir bölge, bir NADPH bağlanma yeri ve bir FAD prostetik grubun oluşturduğu homodimerik proteinlerdir [1]. Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR), Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys amino asitlerinden oluşan katalitik bölümü ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağlanma bölümü ile aktivite gösterirler. Ayrıca, katalitik bölüm ile etkileşime giren ve redoks aktivitesi için gerekli olan C-terminal bölgesinde selenosistein içerirler [2,3]. Selenyum TrxR aktivitesi için gereklidir. Yapılan çalışmalarda kültür ortamına 1 µM Se eklenmesi halinde hücrel TrxR aktivitesinin 40 kat arttığı görülmüştür [4]. TrxR aktivitesi, oksidatif heksos monofosfat (HMPS) siklusunun kontrol noktası enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ile üretilen NADPH tarafından düzenlenir [5]. Enzimin sitozolik ve mitokondrial olmak üzere iki formu vardır [2]. Ancak memelilerde TrxR ler sitozolik, mitokondrial ve testis-spesifik tiyol regülatörü olmak üzere 3 değişik izoformda bulunur [6].

Enzimin en önemli fonksiyonu tiyoredoksin proteininin NADPH'ya bağımlı olarak indirgenmesini katalizlemektir. Bu reaksiyonda elektronlar NADPH'dan enzimin prostetik grubu olan FAD aracılığıyla enzimin substratı olan tiyoredoksine akar ve substratı indirger [1]. TrxR'ler okside tiyoredoksinleri indirgeme kabiliyetleri sebebiyle bu isimle adlandırılmışlardır [3]. Tiyoredoksinler (Trx) ise Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys amino asitlerinden oluşan bir katalitik bölüm içeren 10-12 kDa'luk bir protein ailesidir. Bu proteinlerin iki sistein grubu geri dönüşümlü oksidasyon / redüksiyona uğrar. Trx'in redükte olmuş ditiyol formu [Trx-(SH)₂] disülfid grubu içeren okside protein substratlarını redükte eder. Okside disülfid formu [Trx-(S-S)] ise TrxR tarafından düzenlenen NADPH-bağımlı bir yolla

siklusa geri katılır [7].

Tiyoredoksin dışında lipoik asit [8], lipid hidroperoksit [9], selenit, vitamin C [10], Vitamin K₃ [11], 5,5'dithiobis-(2 nitrobenzoik asit), allokstan [12], dehidroaskorbat [13] ve tümör supresor protein P53 [14] enzimin bilinen diğer substratlarıdır. Ancak bu substratların çoğunun indirgenmesinde TrxR'nin fizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir.

TrxR/Trx sistemi, DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli olan deoksiribonükleotidlerin yapımında kritik bir rol oynar. Trx, nükleotid difosfatların deoksiribonükleotidlere dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan ribonükleotid redüktazın, ribozu indirgemesi için gerekli olan elektronları sağlar [15]. Ribonükleotitlerin D-Riboz kısmının 2' Deoksiriboza indirgenmesi bir ara hidrojen taşıyıcı proteini olan tiyoredoksin aracılığıyla NADPH tarafından verilen bir çift hidrojen atomuna gereksinim duyar. Tiyoredoksin NADPH'dan ribonükleotid difosfata H atomları taşıyan -SH grubu çiftlerine sahiptir. Oksitlenmiş ya da disülfid formu tiyoredoksin redüktazla katalizlenen bir tepkimeyle NADPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş tiyoredoksin, ribonükleotid redüktaz tarafından nükleozit difosfatları (NDP) deksinükleozitdifosfatlara (dNDP) indirgemede kullanılır [16].

Bu çalışmada öncelikle tiyoredoksin redüktaz enziminin gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrisinden ilk kez saflaştırılması ve bazı pestisitlerin bu enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden EDTA, DTNB, Potasyum Fosfat, NADPH, Etanol, Poliakrilamid, Coomassie brilliant blue, Sodyum dodesil sülfat, DTT, Tris, HCl, 2' ,5' ADP Sepharose 4B ve diğer tüm kimyasal maddeler Sigma Chem Com.'dan temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1 Homojenatın Hazırlanması

Homojenat hazırlamak için gökkuşuğu alabalığı karaciğeri (40 g) bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Karaciğer parçaları 120 ml 0,05 M Tris HCl (pH 7,5) tamponu içersine alınarak ultratüraks vasıtasıyla homojenize edildi. Hazırlanan homojenattan mitokondri organeli elde edebilmek için gradientli santrifüj yapıldı. Öncelikle 6000xg'de 30 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant 22000xg'de 30 dk tekrar santrifüj edildi. Çökelek homojenat tamponuna alınarak 22000xg'de 30 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra çökelek 3 defa 20'şer saniyelik periyotlarla sonikatöre konuldu. Sonikatörle parçalanmış çökelek 24000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklenmek üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2 2', 5'-Adp Sepharose 4B Afinite Kromatografisiyle Enziminin Saflaştırılması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz enzimini saflaştırmak amacıyla hazırladığımız süpernatant kolona yavaş yavaş tatbik edildi. Kolon örnek numune geçişi tamamlandıktan sonra dengeleme tamponu ile 280 nm'de absorbans görmeyinceye kadar yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 2-10 mM NADP⁺ çözeltisiyle gradientli elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüatlar 0,5 ml olarak

toplandı. Toplanan elüatlarda enzim aktivitesi bakıldı.

2.2.3 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim için kantitatif protein miktarı Bradford metoduna göre belirlendi [17].

2.2.4 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [18].

2.2.5 In Vitro İnhibisyon Çalışmaları

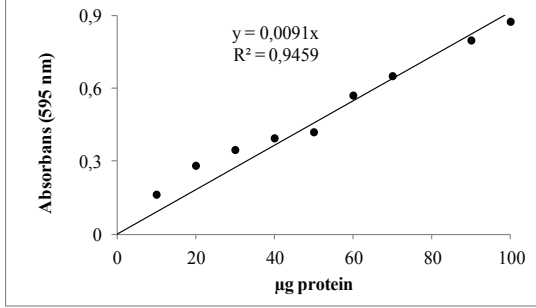
Etken maddesi glifosat izopropilamin, fenoksaprop-p-etil, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu ve haloksifop-p-metil ester olan 4 çeşit herbisit ve etken maddesi diklorvos, lambda siyalotrin, sipermetrin, klorpirifos olan 4 çeşit insektisit enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi incelendi. Çalışılan her madde ilk olarak saf suyla 1000 kat veya daha fazla seyreltildi. Her pestisit 5 farklı konsantrasyonunda enzimin aktivitesi ölçüldü. İnhibitörsüz enzimin aktivitesi olan kontrol aktivitesi %100 olarak kabul edilip diğer inhibitör konsantrasyonlarında % Aktiviteler hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonlarına karşı % Aktivite grafiği çizildi. Çizilen bu grafiklerden inhibitörler için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Homojenat, gradientli santrifüj ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çö-

zeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 1’de gösterildi.



Şekil 1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

3.2 Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B Afinitite Kromatografisiyle Saflaştırması İle İlgili Sonuçlar

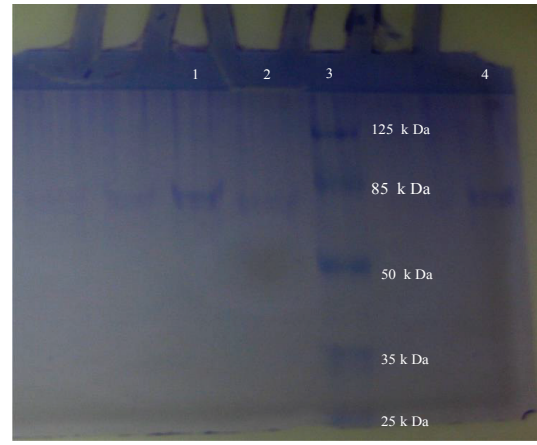
Hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinitite kolonuna yüklendi. Daha sonra gradientli elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar **çizelge 1**'de gösterildi.

Çizelge 1. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinitite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	60	744,8	13,2	0,0182	100	1
2',5'-ADP Sepharose 4B afinitite kromatografisi	8	0,0264	0,314	11,8	2,38	648,4

3.3 Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğeri Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

2', 5'-ADP Sepharose 4B afinitite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 2’de gösterildi.



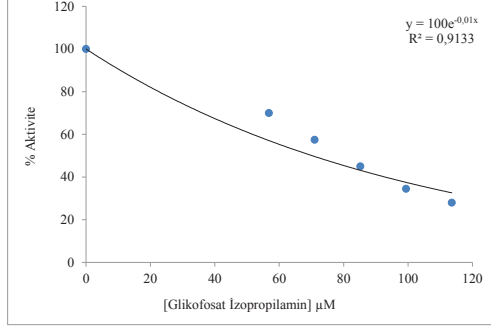
Şekil 2. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinitite kolonundan elüe edilen Gökkuşluğu alabalığı karaciğeri mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.

*1., 2. ve 4. kuyu: Afinitite kolonundan alınan Tiyoredoksin redüktaz enzimi, 3. kuyu: standart proteinler (β-galaktosidoz: 120 kDa, BSA: 85 kDa, ovalbumin: 50 kDa, CA: 35 kDa, β-laktoglobulin: 25 kDa, lizozim: 20 kDa)

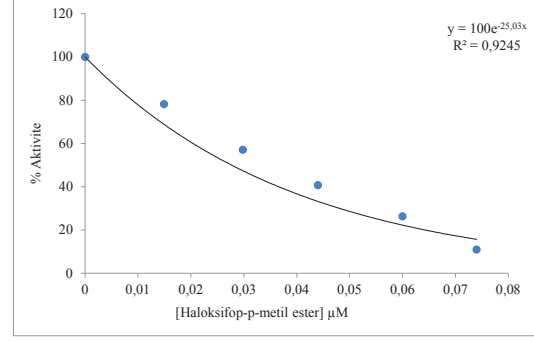
3.4 Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğeri Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Gökkuşluğu alabalığı karaciğeri mitokondrial Tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkilerini belirleyebilmek için bu pestisitlerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda alınarak gökkuşluğu alabalığı karaciğeri tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu kullanılan pestisit kon-

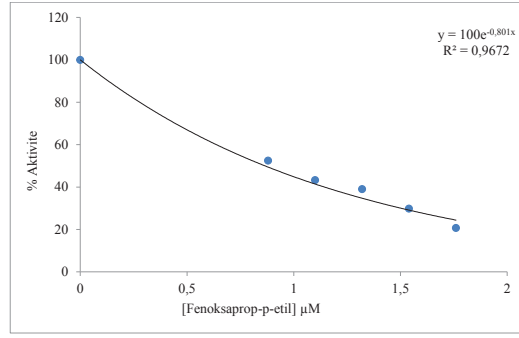
santrasyonuna karşı % Aktivite grafikleri Şekil 3- 11’de verildi.



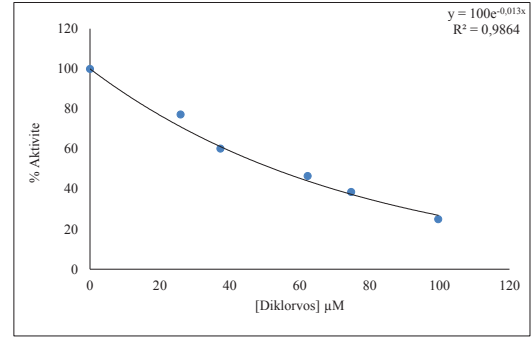
Şekil 3. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi glifosat izopropilamin olan herbisitinin etkisi



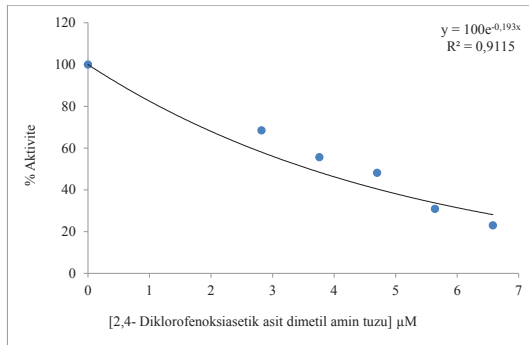
Şekil 6. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi haloksifop-p-metil ester olan herbisitinin etkisi



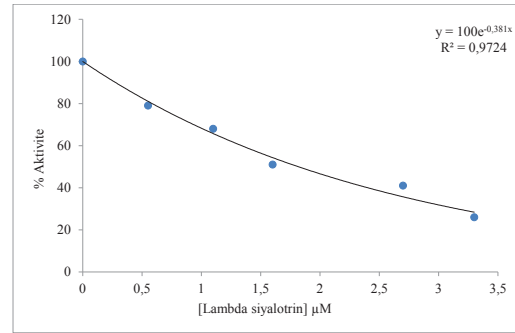
Şekil 4. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi fenoksaprop-p-etil olan herbisitinin etkisi



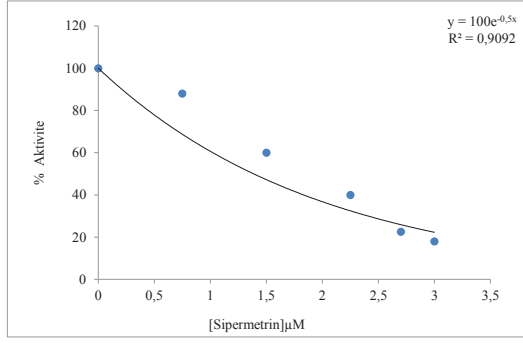
Şekil 7. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi diklorvos olan insektisitinin etkisi



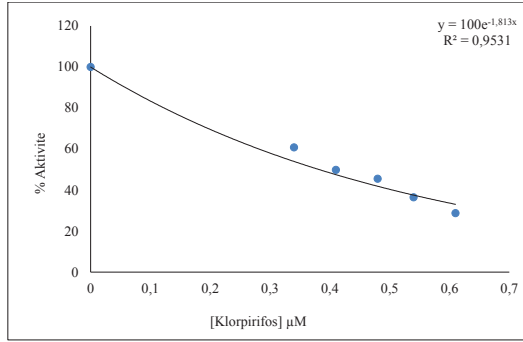
Şekil 5. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu olan herbisitinin etkisi



Şekil 8. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi lambda siyalotrin olan insektisitinin etkisi



Şekil 9. Gökkuşluğu alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi sipermetrin olan insektisitinin etkisi



Şekil 10. Gökkuşluğu alabalığı karaciğeri mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi klorpirifos olan insektisitinin etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tiyoredoksin Redüktazın en önemli biyolojik fonksiyonu tiyoredoksini indirgemesine bağlı olarak hücre büyümesine katkı sağlamak ve oksidatif strese karşı korumaktır [3]. TrxR'lerin fizyolojik substratları olan tiyoredoksinler, hücre büyümesi ve inhibe apoptoz düzenlemesinde önemli rol oynarlar [19,20].

Vücutta fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve

mutasyonu önler [21]. Tiyoredoksin redüktaz enziminin fizyolojik substratı olan Tiyoredoksin proteini de hidrofilik fazda okside substratı redükte etmesi açısından antioksidan etki gösterir ve bu yönüyle oksidatif stresi engeller. İnsan, hücrelerin oksidatif stresten korunması için önemli bir antioksidan olan askorbik asit sentezleme kabiliyetine gereksinim duyar. Bu nedenle diyetle alımı ve oksidize formlarından (dehidroaskorbik asit, askorbil serbest radikali) askorbata dönüşümü hücre içi askorbat seviyesinin muhafazası için önemlidir. TrxR'ler oksidatif stres altındaki hücrelerde askorbil serbest radikalleri askorbata indirgeme bakımından önemlidir [3].

İnsan tümörlerinin çoğunda p53 mutasyonunun görülmesi bu proteinin kanser önlemede önemli bir rol oynadığını gösterir [22]. Tümör baskılayıcı protein olan p53, insan genomunun bütünlüğünü sağlamak, apoptoz kontrolünü sağlamak, hücre döngüsünü durdurmak ve DNA tamirini aktive etmek gibi hayati rolleri olan multifonksiyonel bir proteindir [23]. P53 aktivitesini kontrol eden birçok mekanizmanın yanı sıra redoks kontrol mekanizması da oldukça önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde TrxR I geninin bozulması halinde p53 proteinin gen ekspresyonunu uyarma kabiliyetinin engellendiği görülmüştür [24,25].

Bazı hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda, TrxR enziminin dolaylı olarak rol aldığı saptanmıştır. Özellikle kanser, AIDS ve immun sistem hastalıklarında TrxR nin fonksiyonunun anlaşılması bu enzimin insan hastalıklarında da rol alan bir enzim olduğunun en iyi kanıtı olmuştur. Kanser hücreleri ve birçok kanser çeşidi üzerinde yapılan çalışmaların çoğu TrxR sistemle ilişkilendirilmiştir [3]. Trx/TrxR sisteminin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser tedavisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürür [26].

Bu çalışmada yukarıda bahsettiğimiz sebeplerden ötürü ilk olarak; fazlaca önem taşıyan tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması hedeflendi. Daha sonra bu enzimle ilişkilendirilen hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların

hazırlanmasında fikir verebilecek maddelerin tayini için bazı pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Yapılan literatür taramasında TrxR enziminin sıçan karaciğeri [27], sığır karaciğeri ve timusu [28], E.coli [29], maya [30] gibi kaynaklardan çalışıldığı görülmüştür. Saflaştırma basamakları genel olarak incelendiğinde amonyum sülfat çöktürmesi, sephadex G-50, DEAE selüloz, CM selüloz ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinin birbirini izlediği çok aşamalı bir prosedür izlendiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra saflaştırılan enzimlerin sitozolik mi mitokondrial mi olduğu konusunda tereddütlerimiz oluşmuştu. Yaptığımız bu çalışmada ilk olarak bu çok basamaklı ve zaman kaybına sebep olan saflaştırma prosedürlerinin yerine tek basamakta 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisiyle ve yüksek saflıkta enzim elde edilmiştir. Böylece diğer çalışmalara nazaran hem yüksek aktivitede ve stabil enzim elde edilmiş hem de zamandan tasarruf sağlanmıştır. Ayrıca enzim mitokondrial peletten elde edildiğinden tereddüt etmeden mitokondrial olduğunu söyleyebileceğimiz TrxR saflaştırılmıştır.

Çalışmamızın sonraki aşamasını Trx/TrxR sistemiyle ilişkilendirilen hastalıkların tedavisinde fikir belirtebilecek bileşiklerin tayin edilmesi oluşturmaktaydı. Çalışmaya başlamadan önce literatür taraması yapılarak hangi madde ve bileşiklerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi oluşturduğu konusunda fikir edinilmiştir. Buna göre; şuanda mevcut kanser tedavisinde kullanılan ajanlardan siplatin, PX-12 ve plörotin geri dönüşümsüz birer TrxR inhibitörleridir. Yine Gd⁺³ içeren bir porfirin olan moteksafin gadolinyum kanser hücresindeki metabolizmayı bozarak DNA tamirini engeller ve hücre ölümünü kolaylaştırır [24]. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 13-cis-retinoic acid [12], nitrojen mustardlar (Chlorambucil, melphalan), alkil sülfanatlar (busulfan), daunorubicin, doxorubicin, karmustin ve platin içeren antikanser bileşiklerin enzim üzerinde inhibisyon etkisi saptanmıştır [31]. Aurothioglucose, arsenik trioksit, flavonoid-

ler, platin ve altın bileşiklerinin yanı sıra Cu⁺², Ni⁺², Zn⁺², Cd⁺², Mn⁺², Co⁺²[32], Hg⁺²[33] gibi ağır metallerde enzim üzerinde inhibisyon etkisi saptanan metallerdir.

Yaptığımız çalışmada etken maddesi glifosat izopropilamin, fenoksaprop-p-etil, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu ve haloksifop-p-metil ester olan 4 çeşit herbisit ve etken maddesi diklorvos, lambda siyalotrin, sipermetrin, klorpirifos olan 4 çeşit insektisit enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi incelenmiştir. Tüm pestisitlerin enzim aktivitesi üzerinde μM düzeyinde inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondrial TrxR enzimi üzerinde her bir pestisit için IC₅₀ değerleri aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 2. Gökkuşığı alabalığı karaciğeri Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri

İLAÇLAR	IC ₅₀ DEĞERLERİ(μM)
Glifosat izopropilamin	69
Fenoksaprop-p-etil	0,86
2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu	3,57
Haloksifop-p-metil ester	0,027
Diklorvos	53,07
Lambda siyalotrin	1,82
Sipermetrin	1,38
Klorpirifos	0,38

IC₅₀ değerleri glifosat izopropilamin için 69, fenoksaprop-p-etil için 0,86, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu için 3,57 ve haloksifop-p-metil ester bileşiği için 0,027, diklorvos için 53,07, lambda siyalotrin için 1,82, sipermetrin için 1,38 ve klorpirifos için 0,38 μM olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan pestisitlerin tamamının çok eser miktarda dahi enzimi tamamen inhibe etmesinden dolayı bu bileşikler, Trx/TrxR sistemiyle ilişkilendirilen tümör, kanser, AIDS ve değişik immün sistem rahatsızlıklarında Trx/TrxR salınımını azaltma

maksatlı ilaçların hazırlanmasında fikir verici olabilir. Aynı zamanda bu pestisitlerin, sulama kanallarıyla nehirlerle ulaşması ve buradan balıklara nüfus etmesi durumunda, yine sulama kanalları ya da elle temas yoluyla insan sindirim sistemine erişmesi durumunda Trx/TrxR sistemini geri dönüşümsüz inhibe edeceğinden onarılmaz zararlara yol açabilir.

KAYNAKÇA

- [1] Williams, C.H. Jr, Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase, a family of flavoenzyme transhydrogenases, In Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller, F., ed.), 3; 121-211. CRC Press, Boca Raton, FL., 1992.
- [2] Powis, G., Montfort, W.R., Properties and biological activities of thioredoxin, Pharmacol Toxicol, 41, 261-295, 2001.
- [3] Mustacich, D., Powis, G. Thioredoxin reductase, Biochem J, 346, 1-8, 2000.
- [4] Gallegos, A., Berggren, M.I., Gasdaska, J.R. and Powis, G., Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium, Cancer Res., 57, 4965-4970, 1997.
- [5] Ayene, IS., Stamato, T.D., Mauldin SK, Biglow JE, Tuttle SW, Jenkins SF et al., Mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene leads to inactivation of ku dna binding during oxidative stress, J Biol Chem 277, 9929-35, 2002.
- [6] Turanov, A., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., Characterization of Protein Targets of Mammalian Thioredoxin Reductase, Methods enzymol, 474, 245-254, 2010.
- [7] Nishinaka, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Redox control of cellular function by thioredoxin: a new therapeutic direction in host defence, Arch Immunol Ther Exp 49, 285-92, 2001.
- [8] Arner, E.S.J., Nordberg, J. and Holmgren, A., A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 225, 268-274, 1996.
- [9] Björnstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J. and Holmgren, A., Human thioredoxin reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols, J. Biol. Chem., 270, 11761-11764, 1995.
- [10] Arner, E.S.J. and Holmgren, A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, Eur. J. Biochem., 267, 6102-6109, 2000.
- [11] Holmgren, A., Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action, Eur. J. Biochem., 254, 9113-9119, 1979.
- [12] Rigobello, M.P., Callegaro, M.T., Barzon, E., Benetti, M. and Bindoli, A., Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the regulation of membran permeability, Free Radical Biology-Medicine, 24, 370-376, 1998.
- [13] May, J.M., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F., Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase, J Biol Chem, 272, 22607-22610, 1997.
- [14] May, J.M., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F., Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase, J. Biol. Chem., 273, 23039-23045, 1998.
- [15] Jordan, A., Reichard, P., Ribonucleotide reductases, Annu Rev Biochem, 67, 71- 98, 1998.
- [16] Lehninger, A.L., Principles of biochemistry. Newyork: Worth , Publishers Inc, 2000.

- [17] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation(quantification**) of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-251, 1976.
- [18] Laemmli, UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.
- [19] Baker, A., Payne, C.M., Briehi, M.M. and Powis, G., Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, **inhibits** apoptosis *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, 57, 5162-5167, 1997.
- [20] Gasdaska, J.R., Berggren, M.I., and Powis, G., Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism, *Cell Growth Differ*, 6, 1643-1650, 1995.
- [21] Dündar, Y., Aslan, R., Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 306, 1-17, 1999.
- [22] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., P53 mutations in human cancers, *Science (Washington DC)*, 253, 49-53, 1991.
- [23] Jeorger, A.C., Fersht, A.R., Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants, *Oncogene*, 26, 2226-2242, 2007.
- [24] Hainaut, P., Miller, J., Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding, *Cancer Res.*, 53, 4469-4473, 1993.
- [25] Polyak, K., Xia, Y., Zweler, J.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., A model for p53-induced apoptosis, *Nature (London)*, 389, 300-303, 1997
- [26] Kemerdere, R., Glial tümörlerde tiyoredoksin redüktaz dengeleri (Uzmanlık Tezi), İstanbul Üniversitesi Cerrah Paşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji ABD, İstanbul, 2008
- [27] Luthman, M., Holmgren, A., Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization, *Biochemistry*, 21, 6628-6633, 1982.
- [28] Holmgren, A., Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction, *J Biol., Chem.* 252, 4600-4606, 1977.
- [29] Gonzales, P.P., Baldesten, A., Reichard, P., Purification of a thioredoxin system from yeast, *Journal of Biochem.*, 245, 2363-2370, 1970.
- [30] Bar-Noy, S., Gorlatov, N., Stadtman, T. C., Overexpression of wild type and secys/cys mutant of human trxr in E.coli: the role of selenocysteine in the catalytic activity, *Free Radical Biology&Medicine*, 30, 51-61, 2001.
- [31] Wittle, A.B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H., Arner, E.S.J., Inhibition of trxr but not of gr by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radical Biology&Medicine*, 39, 696-703, 2005.
- [32] Tandogan, B. and Uluşu, N.N., Thioredoxin reductase, *Hacettepe J. Biol, Chem.*, 39, 87-92, 2011.
- [33] Carvalho, C. Et. Al, Biomarkers of adverse response to mercury : histopathology versus thioredoxin reductase activity, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 359879-359888, 2012.