

Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi

Çilem ÇİMEN Çiğdem ÖTER Halit DEMİR Ali SAVRAN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, VAN

ÖZET

Bu çalışmada, rat eritrositinden saflaştırılan katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetik özellikleri incelendi. Enzim aktivitesi 25°C, 240 nm' de Aebi metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu metod bütün kinetik incelemelerde kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklık tayin edildi. Lineweaver-Burk denklemi yardımıyla Vmax ve Km sabitleri saptandı.

Anahtar kelimeler: Katalaz, Enzim, Rat.

Investigation of Characterization and Kinetic of Catalase Enzyme To Obtain from Erythrocytes Rat

SUMMARY

In this study, characterization and kinetic properties of catalase purified from rat erythrocyte catalase and kinetic properties were investigated. Enzyme activity was determined with the Aebi method by using a spectrophotometer at 240 nm, 25 °C. This method was used for all kinetics studies. After that optimal pH and assay temperature were determined. By means of a Lineweaver-Burk plot, Vmax and Km values were calculated.

Keywords: Catalase, Enzyme, Rat.

GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda biyolojik reaksiyonları hızlandıran protein yapısında olan biyo – katalizörlerdir ve proteinlerin en büyük grubunu teşkil ederler (17,24). Enzimlerin canlı yapısındaki önemi gittikçe artmaktadır. Temel bilimler, kimya, biyoloji, tıp ve eczacılık gibi çok geniş araştırma alanındaki araştırmaların büyük bir kısmı enzimler üzerinde yapılmıştır.

Katalaz (CAT:EC 1.11.1.6), protein yapısında bol miktarda bulunan karakteristik bir enzimdir. Bu enzim yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmada mevcuttur. Ayrıca toksik hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada da önemli bir rol oynar (9,19). Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GSSG-Rx) ve süperoksit dismutaz (SOD) antioksidant etkiye sahip enzimlerdir. Antioksidant savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur. Bundan dolayı bu savunma sisteminde CAT, POD, GSSG-Rx ve SOD gibi antioksidant enzimler büyük öneme sahiptir. Serbest radikallerin zararlı etkileri hücrelerdeki antioksidant savunma sistemleri tarafından kontrol edilir (13). Katalaz enzimi hayvan hücrelerinin özellikle peroksizom organellerinde de yoğun bir şekilde bulunur (10). Katalazın canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında da bulunur (11). Farelerde bu enzimin birçok şekli saptanmıştır (21,23). Birçok ilaç ve kimyasal maddeler vücudun belli organlarında serbest radikal oluşum hızını artırabilir (20). Bu nedenle, antioksidant enzimler hem hücrenin kararlılığını muhafazada hem de serbest radikalleri yok etmede çok önemlidir (5,14).

Bu çalışma rat eritrositlerinden hem kontrol hem de piridazin muamelesinden sonra katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğini incelemek amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada kullanılan sodyum fosfat, standart serum albumin, hidrojen peroksit, sodyum klorür, sephadex G-200, DEAE-sephadex A50, DEAE-sephadex G-25, sephadex G-50 ve sephadex G-25 Sigma'dan alınmıştır. Sodyum metamizol ve potasyum penisilin (Penisiline, Alfasilin; Fako, Levent, İstanbul) eczanesinden temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler analitik olarak uygun saflıktadır.

Metot

Bu çalışmada her biri 180-200 g ağırlığında olan 22 ± 2 °C de oda şartlarında bakıma alınan sağlıklı Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Hayvanlar iki gruba ayrıldı. 1. gruptaki hayvanlara sadece serum fizyolojik verildi. 2. gruptaki hayvanlara ise 15 mg/kg piridazin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Her iki gruptaki ratlar eter anestezi altında bayıltılıp kuyruk kesme yöntemiyle kan örnekleri, 1, 3 ve 6. saatler sonunda alındı. 10 ml' lik santrifüj tüplerine kan örnekleri konulup 1500 rpm' de 15dk santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit atıldı. Geriye kalan eritrositler % 0.9'luk NaCl çözeltisiyle iki kere yıkandı. Eritrositlerin 1.5 katı kadar distile su ilave edilerek hemoliz gerçekleştirildi. Hemolizatın pH'sı fosfat tamponuyla 7.50'e ayarlandı. Derişimi %35-65 arasında değişen amonyum sülfat kullanılarak hemolizat çöktürüldü. Bu yöntemle en uygun çöktürmenin

olabilmesi için gerekli amonyum sülfat derişimi saptandı. Aktivite gösteren numuneler alınıp çeşitli dolgu maddeleri içeren DEAE-kolonuna doldurulup fosfat tamponuyla dengelendi. Kolondan belli sürelerde alınan numunelerin enzim aktiviteleri Aebi metoduna göre ölçüldü (1). Reaksiyon ortamında hidrojen peroksitin substrat olarak kullanıldığı bu yöntemde absorbands 240 nm'de spektrofotometrik olarak saptandı.

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada bütün periyotlarda sıcaklık 20-80 °C arasında olacak şekilde, sabit pH'da (7.50) 1M fosfat tamponu kullanılarak 15 dk inkübatörde bekletilen numunelerin aktivite tayinleri yapıldı. Enzim aktivitesi üzerinde pH'nın etkisini bulmak amacıyla bütün periyotlar için pH 2-12 aralığında değiştirilerek sabit sıcaklıkta (25 °C) aktivite tayinleri yapıldı. Bradford yöntemine göre 595 nm de standart şıır

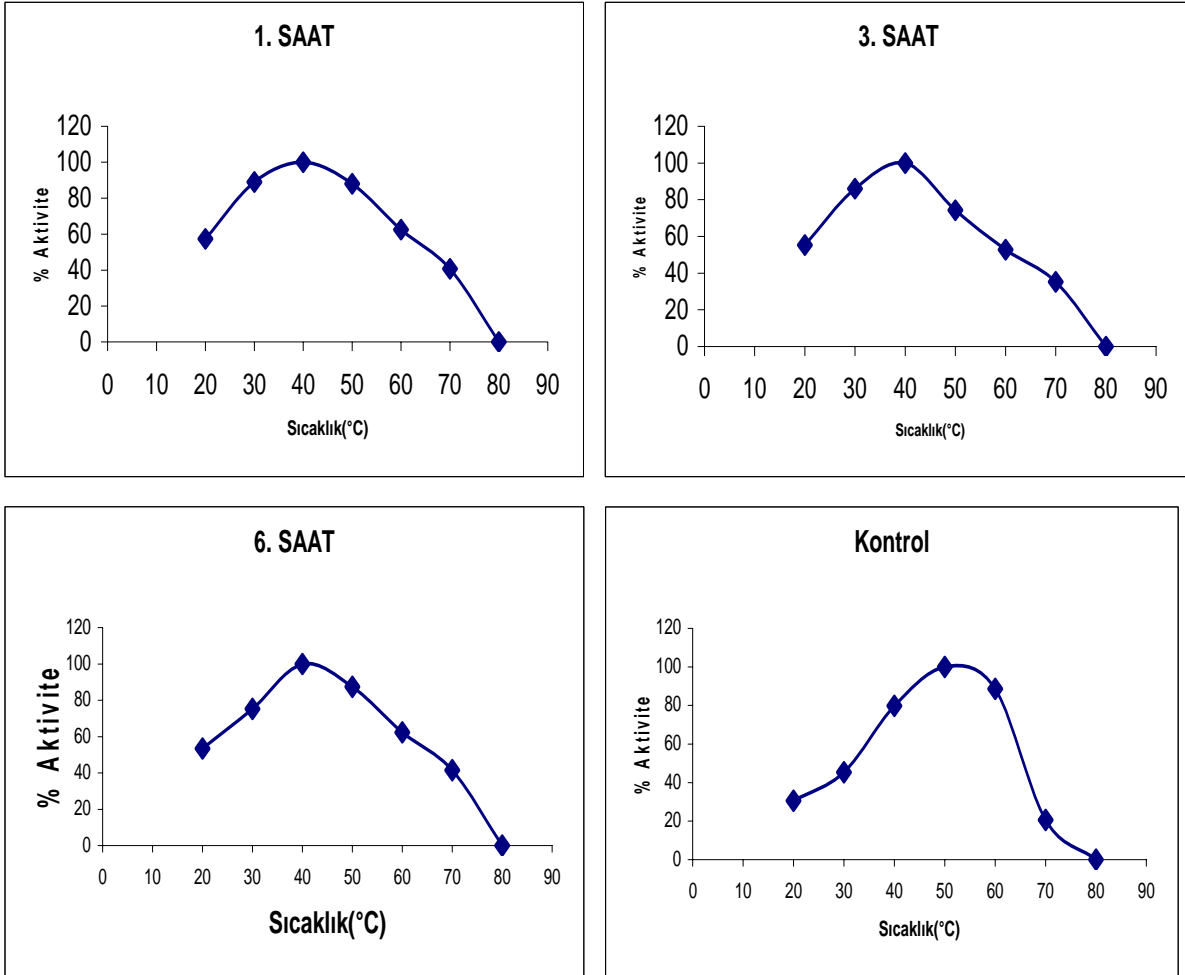
serum albumin yardımıyla kantitatif protein tayini yapıldı (8).

BULGULAR

1.Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimlerin katalizlediği herhangi bir tepkimenin hızı, genellikle ısı optimum değere gelinceye kadar artmaktadır. Isı artmaya başladığında kinetik enerji ve hız yükselirken aktivite genellikle belli bir sıcaklığa kadar artış gösterir. Sunulan bu çalışmada kontrol grubu için enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C, piridazin muamelesi sonrası 1. saat için enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C, 3. saat için enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C, 6. saat için enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C olarak saptanmıştır (Grafik 1).

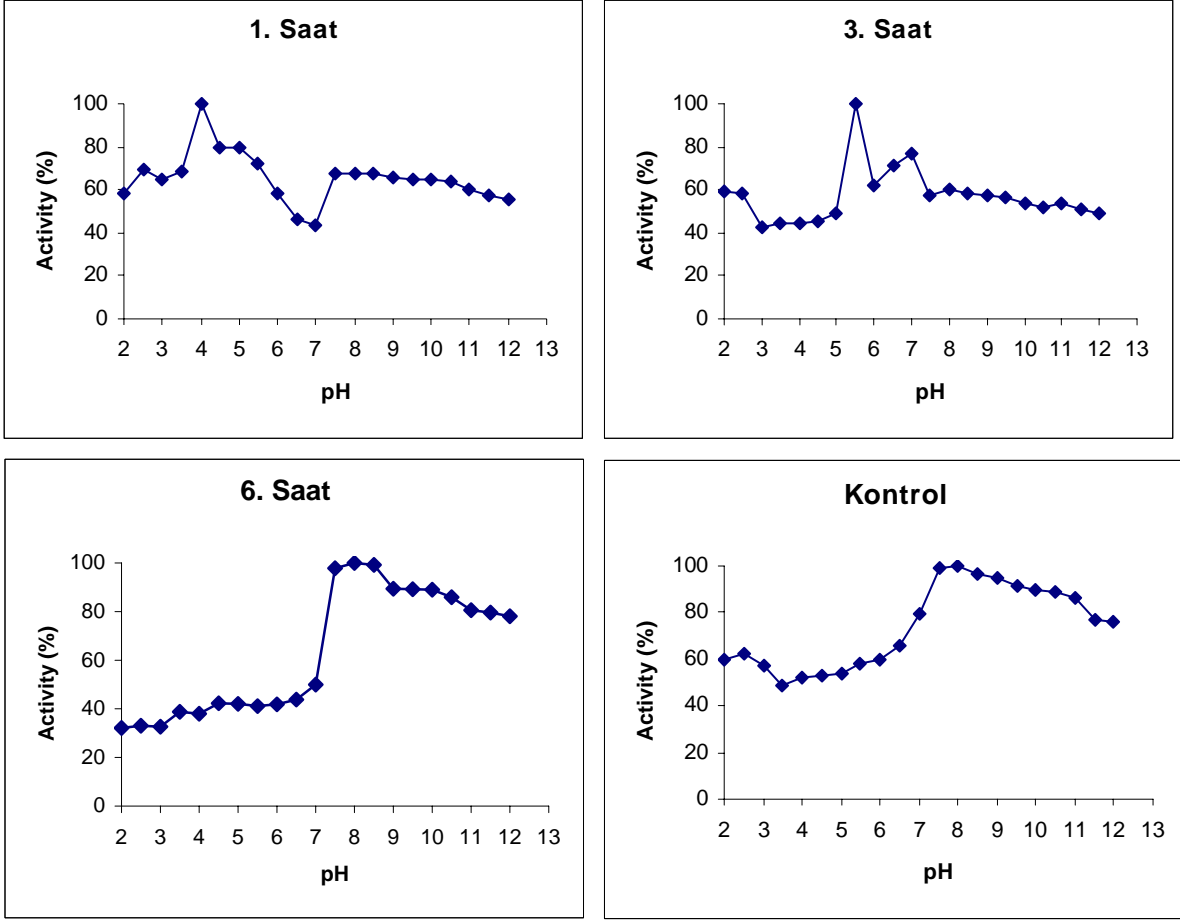
Grafik 1. Her Periyot İçin Katalaz Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi



2.Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Yapılan bu çalışmada kontrol grubu için optimum pH 8.00, piridazin muamelesinden sonra 1. saat için optimum pH 4, 3. saat için 5.5, 6. saat için ise 8 olarak saptanmıştır (Grafik 2).

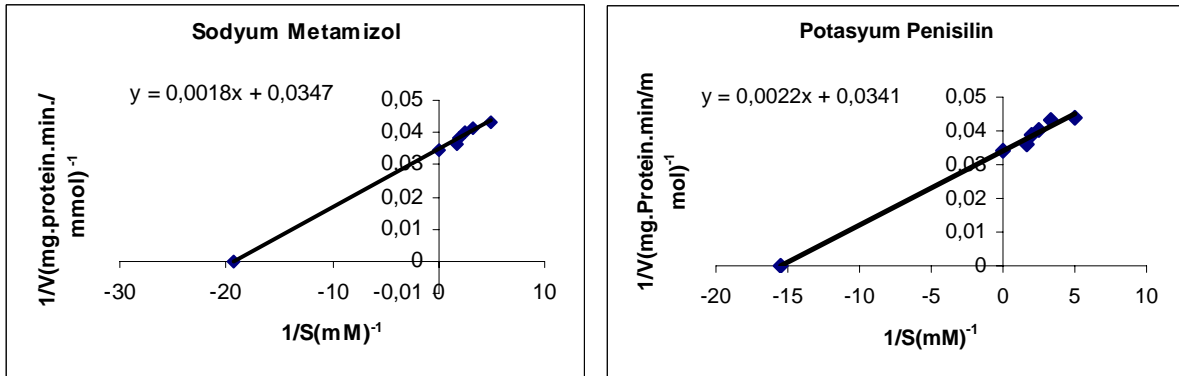
Grafik 2. Her Periyot İçin Katalaz Aktivitesinin pH ile Değişimi



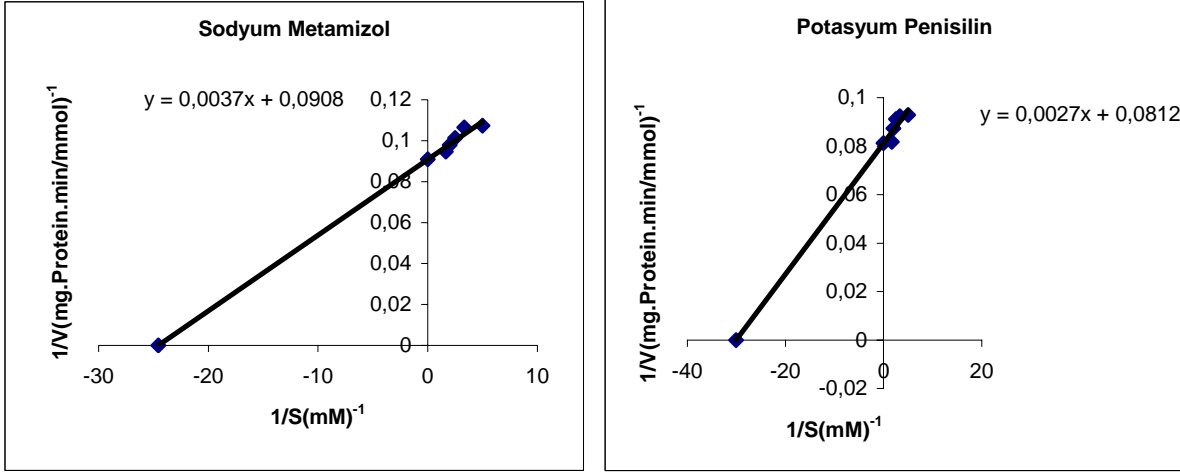
3.Kinetik Çalışmalar

Kinetik çalışmalar yapmak için değişik substrat konsantrasyonları ile enzimin parçalanma hızı bulundu. Bu değerlerden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Grafik 3, 4, 5). Bu grafikler yardımıyla V_{max} ve K_m değerleri saptandı (Tablo 1).

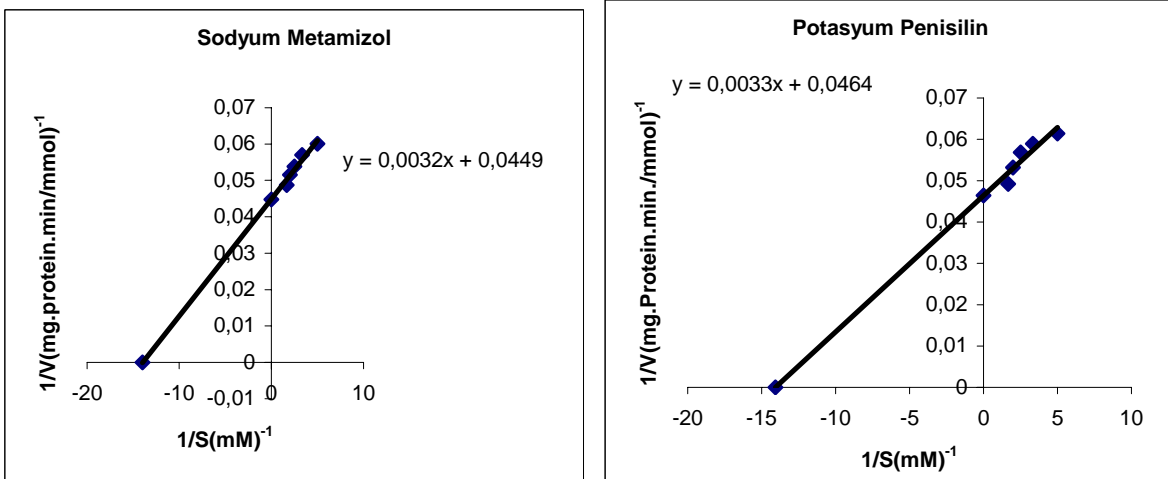
Grafik 3. Altıncı Saat Sonunda Rat Eritrositinden Elde Edilen Katalaz Enzimine Sodyum Metamizol ve Potasyum Penisilin İlaçlarının Etkisiyle İlgili Lineweaver-Burk Grafikleri.



Grafik 4. Üçüncü Saat Sonunda Rat Eritrositinden Elde Edilen Katalaz Enzimine Sodyum Metamizol ve Potasyum Penisilin İlaçlarının Etkisiyle İlgili Lineweaver-Burk Grafikleri



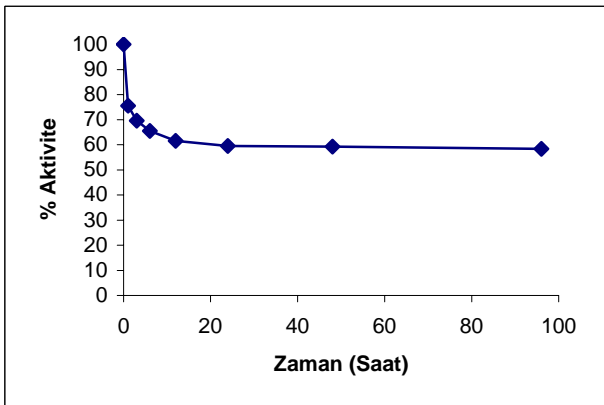
Grafik 5. Birinci Saat Sonunda Rat Eritrositinden Elde Edilen Katalaz Enzimine Sodyum Metamizol ve Potasyum Penisilin İlaçlarının Etkisiyle İlgili Lineweaver-Burk Grafikleri



4.Enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

Enzim aktivitesi 1, 3, 6, 12, 24, 48 ve 96. saatler sonunda ölçülerek aktivitenin zamanla ne kadar azaldığı veya değiştiği tespit edildi (Grafik 6).

Grafik 6. Katalaz Enziminin Aktivitesinin Zamanla Değişimi



TARTIŞMA ve SONUÇ

Katalaz, reaktif oksijen radikalini eliminasyon yoluyla bu işlemde koruyan antioksidant için önemli olan ve bir su molekülü ile bir oksijen molekülü içinden H₂O₂'yi uzaklaştıran bir enzimdir. Canlılarda antioksidant sistemler tüm hücreleri serbest radikal hasarına karşı korur (5,16). Katalaz enzimi eritrosit içinde çözünür bir şekilde bulunmuştur (22). Katalaz, oksitleyici, ağartıcı veya sterilizasyon amaçlı kullanılan hidrojen peroksidin uzaklaştırılması ve hidrojen peroksit veya glukoz biosensörlerinin bileşimi olarak analitiksel amaçlı geniş kullanılabilen bir enzimdir (4). Reaksiyon ortamında hidrojen peroksitin substrat olarak kullanıldığı bu yöntemde absorbans 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu çalışmada rat eritrositlerinde katalaz (CAT) aktivitesinin karakterizasyonu ve kinetiği araştırılmıştır. Kontrol grubu için optimum sıcaklık 50 °C olarak saptanmıştır. Deney grubu için optimum sıcaklık çeşitli periyotlara bağlı olarak farklılık göstermiştir Yapılan bir çalışmada da tavuk ve fare beyininde optimum sıcaklık sunulan bu çalışma ile tutarlılık göstermektedir (12). Bu durum inkübasyon süresinin önemli olduğu sonucunu verebilir.

Deneyde kullanılan piridazin halkasının biyolojik aktiviteleri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yine pirazol halkası bulunduran bisiklik yapıdaki hetero sistemlerden bazılarının özellikle bir kısım pirazol-piridazin türevlerinin antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antifungal etkilerinin olduğu literatürlerde belirtilmiştir (24). Bundan dolayı piridazin tercih edildi. Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlendiklerinden katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Ayrıca enzimler protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Proteinler gibi enzimler de büyük moleküllü olmaları nedeniyle bazı zarlardan geçemezler. Isı ile kolaylıkla denatüre olurlar ve ortamın asit ve baz durumuna göre duyarlılık gösterirler. 0 °C ile yaklaşık 40-50 °C arasında sıcaklık yükselmesi, enzimin etki hızını artırır. Ancak bu sıcaklıkların üstünde denatürasyon başlar (18). pH çalışmaları kontrol grubunun optimum pH değeri 8.5 olarak belirlenmiştir. Rat eritrositleri için tayin edilen pH değerleri daha önce yapılan çalışmalara uygunluk göstermektedir. Piridazin enjekte edilen ratlarda 1.,3. ve 6. saatlerde alınan numuneler için katalaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'lar sırasıyla 4.5, 5.5 ve 8.0 olarak tespit edilmiştir. 6.saat sonunda alınan enzimde elde edilen değer kontrol grubu ratlarda elde edilen değere benzerlik göstermesi ratların metabolizmasına piridazinin yaptığı etkiden kurtulmaya başladıklarını düşündürmektedir. Bütün enzimler için aktivitelerin en yüksek olduğu pH değerleri mevcuttur. Aktivite genellikle optimum pH değerlerinin altında ve üstünde düşer, bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite değişimi aynı şekilde değildir (18). Enzim aktivitesi çeşitli pH değerlerinde tayin edildiği zaman optimum pH genel olarak pH 7.5 ve 10.0 değerleri arasında gözlenir,

pH da herhangi ani bir değişiklik enzimin katalizlediği tepkimelerin hızlarını etkilemektedir (2,3). Bu değer yapıları çalışmalarla uyum içerisinde olduğu saptanmıştır (11). Bu durum pH-aktivite ilişkisinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Literatürde, katalaz enzimi için optimum pH 7.6 olarak verilmiştir (15). Bu pH enzimin hücre içi metabolizmada önemli rol aldığını göstermektedir.

Bu çalışmada 1., 3. ve 6. saatler sonunda ratlardan alınan numunelerin eritrositlerinden saflaştırılan katalazın inhibisyonunu incelemek amacıyla sodyum metamizol ve potasyum penisilin ilaçlarının enzime etkisi saptanmıştır. Bu etkilerden yararlanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilip, V_{max} ve K_m değerleri tespit edilmiştir. Tablolardaki (Tablo 1) sodyum metamizol ile ilgili veriler incelendiğinde V_{max} değerlerinin 1., 3. ve 6. saatlerde sırasıyla 22.27, 11.01 ve 28.82 mg protein.min/mmol arasında değiştiği görülmektedir. Enzimin substratı etkileyebileceği hızın 3. saatte düşmesi ratta bulunan piridazinin, katalaz enziminin inhibisyonuna etkisinin büyük olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde 3. saat sonucu elde edilen K_m değerlerinin de diğerlerinden büyük olması yukarıdaki düşüncüyü desteklemektedir. Potasyum penisilinle ilgili değerleri incelendiği zaman 1., 3. ve 6. saatler sonunda V_{max} değerleri sırasıyla 21.55, 12.31 ve 29.32 mg.protein.min/mmol olarak saptanmıştır. Tablolardaki K_m ve V_{max} değerlerinin birbirine uyumu, potasyum penisilin de enzim inhibisyonuna etkisinin benzer sonuçlar vermesi piridazinin rata etkisinin 3. saat sonunda maksimum olduğu fikrini ortaya koymaktadır.

Katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiği ilgili daha fazla çalışma yapılmalıdır. Bu çalışma *in vivo* ortamında yapılmıştır. Daha fazla araştırmalar hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- **Aebi H (1984):** Catalase.(in) Methods In Enzymology, L. Packer(Editör), 105: 121-126, Academic Pres, Orlando.
- 2- **Aldemir S (2002):** Koyun Karaciğerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Van.
- 3- **Alhrız S ve Türkoğlu V (2003):** Purification and Characterization of Acetylcholinesterase from the Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarichii Pallas*, 1881). Preparative Biochemistry and Biotechnology. 33: 137-145.
- 4- **Alptekin Ö, Yıldırım D, Özyılmaz G ve Tokel S (2004):** Florosile immobilize edilmiş katalaz enziminin immobilizasyon koşullarının optimizasyonu, XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, BK, S. 498, Kars.
- 5- **Alvyng A, Carson P, Flanagan CL, Ickes C, (1956):** Enzymatic deficiency in primaquin-sensitive erythrocytes. Science, 14, (124):484-5.
- 6- **Bildirici İ (1999):** 4-Benzoil-5-Fenil-1-(2,4,6-Trikloro Fenil)-Pirazol-3-Karboksilik Asitin Sentezi ve

Reaksiyonları. Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Van.

7- Bilgi C, Ünsal İ, Özer N, Erbil MK ve Karaca L (1995): Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from dog liver. Tr. J. Medical Sciences, 24: 291-295.

8- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-251.

9- DeDuve C (1983): Microbodies in the living cells. Sci. Am. 248, 42-52.

10- Demir H, Alkan S ve Savran A (2004): Sığır karaciğerinden saflaştırılan katalaz enzimi üzerinde bazı ilaçların inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, BK, S. 500, Kars.

11- Demir H, Akkoyun HT, Çimen Ç ve Çelik İ (2004): İnsan eritrositlerinden ve rat eritrositlerinden katalaz enzimi aktivitesi üzerinde bazı ilaç ve antibiyotiklerin (*in vivo*) inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniversitesi, 21-24 Haziran, Adana.

12- Farnararo M, Favilli F, Tonalli F ve Bruni P (1978): Some Properties of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat and Chick brain: A comparative study. Comp. Biochem. Physiol. 61: 351-356.

13- Gülçin I (2002): Isırgan Otuunun (*Urtica dioica*) Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi, Oksidatif Enzimlerin Karakterizasyonu ve Bazı *In vivo* Etkilerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, S. 37, Erzurum.

14- Halliwell B, and Gutteridge JMC, (1989): Free radicals in biology and medicine, 2nd Clarendon Pres., Oxford.

15- Halliwell B, and Gutteridge JMC, (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 186: 1-85.

16- Holmes RS and Masters CJ (1972): Species specific feature of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalases. Arch. Biochem. Biophys., 148, 217-233.

17- Keha E ve Küfrevioğlu Öİ (1993): Enzimler, Biyokimya Kitabı, Derya Yayınevi (2), S. 89, Trabzon.

18- Keha E ve Küfrevioğlu Öİ (1997): Enzimler, Biyokimya Kitabı, 2. Baskı, 97-98, Şafak Yayınevi, Erzurum.

19- Master C and Holmes R (1977): Peroxysime: New aspects of cell physiology and biochemistry. Physiol. Rew. 57, 866-882.

20- Mates JM, Perez-Gomez C, Nune De Castro I (1999): Antioksidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 32, (8): 595-603.

21- Nicholls P and Schonbaum GR (1963): In 'The Enzymes.' (Bayer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K., Eds.) 2nd ed. Vol. 8, pp. 147-225, Academic Press, New York.

22- Percy ME (1984): Catalase an old enzyme with a new role?, Can. J. Biochem. Cell Biol. 62: 1006-1014.

23- Schonbaum GR and Change B (1976): In 'The Enzymes.' (Bayer, P.D., ed.) 3rd Vol. 13, pp 368-408, Academic Press, New York.

24- Telefoncu A (1986): Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak. Yayını (Der.), S. 59, İzmir.