

Araştırma Makalesi / Research Article

Bakır(II) Komplekslerinin Glutasyon Redüktaz İnhibitor Çalışması

Studies of Glutathione Reductase Inhibitors Activity of Copper(II) Complexes

Turgay Tunç*

Geliş / Received: 13/06/2019

Revize / Revised: 18/07/2019

Kabul / Accepted: 08/09/2019

Öz- (S)-(+)-fenilglisinol, (1S, 2R)-2-amino-1,2-difeniletanol'in ve (R)-(+)-2-amino-1,1,3-trifenilpropanol bazlı kiral Schiff bazlarının bakır (II) kompleksi sentezlendi. Bu bileşiklerin glutasyon redüktaz enzimi üzerindeki etkileri incelendi. En iyi inhibitör etkisinin kompleks 3'e ait olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler- Schiff Baz, Bakır (II) Kompleksleri, Glutasyon Redüktaz.

Abstract- (S)-(+)-phenylglycinol, (1S, 2R)-2-amino-1, 2-diphenylethanol and (R)-(+)-2-amino-1, 1, 3-triphenylpropanol based chiral copper (II) complex of Schiff bases were synthesized. The effects of these compounds on glutathione reductase enzyme were investigated. The best inhibitory effect was found to belong to complex 3.

Keywords- Schiff Bases, Copper (II) Complexes, Glutathione Reductase.

*Sorumlu yazar iletişim: ttunc@ahievran.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-2431-8027>)
Kimya ve Proses Mühendisliği, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Bağbaşı Kampüsü, Merkez /Kırşehir

I. GİRİŞ

Canlılar reaktif oksijen türlerinin etkilerini nötralize eden antioksidan savunma sistemine sahiptir [1-4]. Reaktif oksijen türleri ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucu “oksidatif stress” meydana gelir, hücre içindeki proteinler, lipitler, yağlar ve nükleik asitlerde hasara neden olurlar [5, 6]. Oksidatif stresin günümüzde kanser, kalp yetmezliği gibi birçok hastalığın oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir [7, 8].

Glutasyon (GSH) DNA ve protein sentezinde, amino asitlerin taşınımında [9, 10] rol aldığı gibi disülfürlerine (GSSG) yükseltgenerek hücreleri oksidatif strese karşıda korur [11-14]. Glutasyon Redüktaz (GR), GSSG’ nin GSH’ a indirgenmesini katalizler ve indirgen olarak NADPH kullanır [15, 16]. GR inhibitörleri, oksidatif stres ve bununla ilgili hastalıkların araştırılmasında kullanılmaktadırlar, GR inhibitörleri oksidatif stresi artırarak tümörlerin çoğalmasını engeller. GSSG birikmesi DNA sentezini inhibe edip, hücre fonksiyonlarını bozduğu için GR inhibitörleri kanser ilacı olarak da kullanılırlar [17, 18].

Schiff bazları ve bunların metal kompleksleri sentez kimyası ve farmasetik kimyanın araştırdığı önemli konulardan biridir [19, 20]. Schiff-bazlarının bakır kompleksleri antitümör, antimikrobiyal, antivirüs v.s. gibi çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olmalarının yanı sıra Cu metali hücrede Cu(II) kationuna yükseltgenmekte ve GSH ile kompleks oluşturarak hücre içindeki GSH/GSSG oranını düşürmekte ve hücreye zarar vermektedir [21].

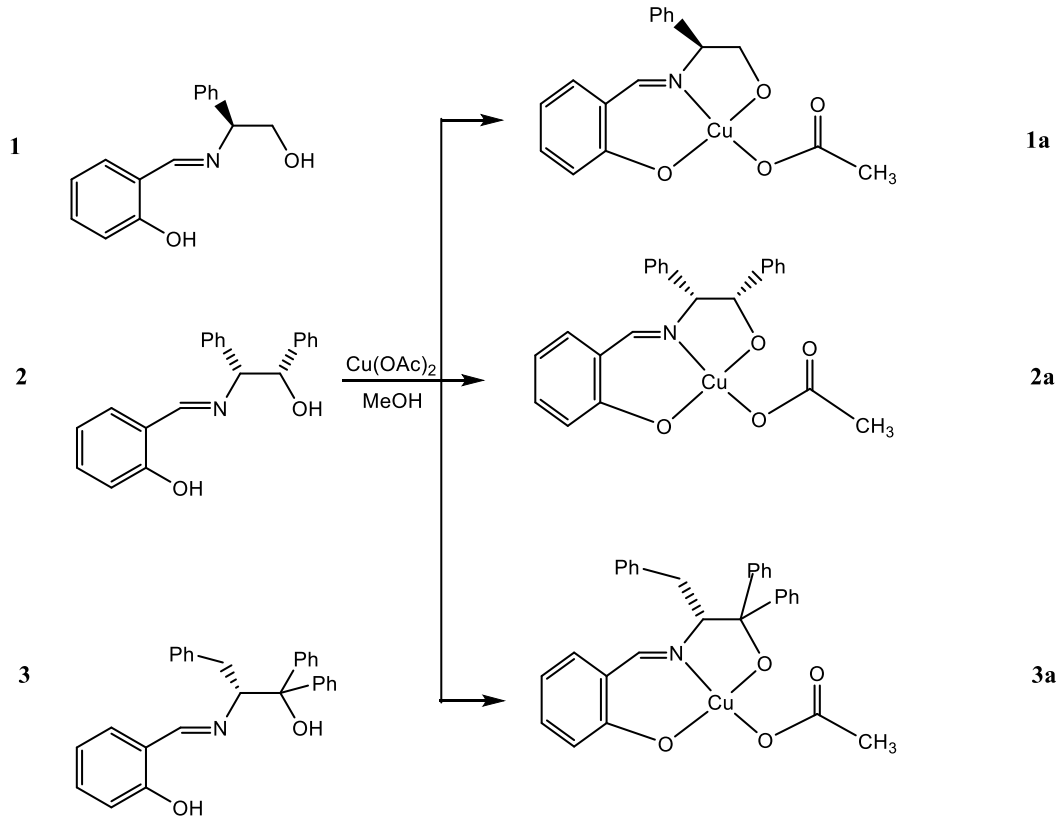
II. MATERYAL VE METOT

A. Reaktifler ve kimyasallar

Ekmek mayasından elde edilmiş GR (E.C 1.6.4.2; 160 U per mg-1 of protein) ve diğer kimyasallar (GSSG, GSH, NADPH, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, and DMSO) Sigma-Aldrich’ den satın alınmıştır.

B. Schiff base ligandlarının ve Komplekslerin sentezi

Çalışmada kullanılan ligantlar ve kompleksler literatüre göre aşağıdaki genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir [22, 23].



Şekil 1. Sentezlenen bileşiklerin yapısı.

C. Schiff Bazlarının Genel Sentezi

Etanol (25 ml) içerisindeki *o*-hidroksibenzaldehit (100 mL, 15 mmol) çözeltisine, etanol (25 ml) içerisindeki S-(+)-fenilglisinol, (1S, 2R) -2-amino-1,2-difeniletanol'in ve (R)-(+)-2-amino-1,1,3-trifenilpropanol (18 mmol) ilave edildi. Karışım 16 saat geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına soğutularak çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetatda kristallendirildi [22].

D. Bakır Komplekslerinin Genel Sentezi

Kiral Schiff bazının metanol çözeltisine (10 mL, 0.064 mmol) damla damla bakır (II) asetat (0.064 mmol, 11.7 mg) ilave edildi. Karışım daha sonra iki saat boyunca 60 °C' de geri soğutucu altında karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, karışım soğumaya bırakıldı ve 2 gün oda sıcaklığında bekletildi. Yeşil katı madde süzülde, iki kez soğuk metanol ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu [23].

E. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesini belirlemek için oda sıcaklığında UV-Vis. küvete fosfat tampon (pH:7.2), NADPH (1.10⁻⁴M) ve GSSG (2.10⁻⁴M) eklendikten sonra karışım dikkatlice karıştırıldı ve ön inkübasyon için 3 dakika bekletildi. Reaksiyon glutasyon redüktaz (1 U) eklenerek başlatıldı ve her 30 saniyede bir olmak üzere NADPH' in oksidasyonu 120 saniye boyunca takip edilerek absorbans ölçümleri alındı [24]. Aynı işlem farklı derişimlerdeki kompleks çözeltileri eklenerek en az 5 ölçüm alınarak tekrarlandı ve elde edilen verilerin ortalama değerleri kullanıldı. Bu verilerden IC₅₀ değeri grafiksel olarak belirlendi.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \Delta OD / 6.22 \times VT / VE$$

E \ddot{U} /mL: 1 mL' deki enzim ünitesi.

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değışımi.

6,22: 1 mM NADPH' in oluşturduğu absorbans değeri.

VT: Toplam küvet hacmi.

VE: Enzim hacmi.

F. IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Farklı inhibitör derişimin de aktivite ölçümü yapılarak komplekslerin %aktivite-kompleks derişimi grafikleri çizildi, eğri denklemlerinden komplekslerin IC₅₀ değerleri hesaplandı.

$$\%inhibisyon = \frac{\text{inhibitörsüz enzim ünitesinin değeri} - \text{inhibitörlü enzim ünitesi değeri}}{\text{inhibitörsüz enzim ünitesi değeri}} \times 100$$

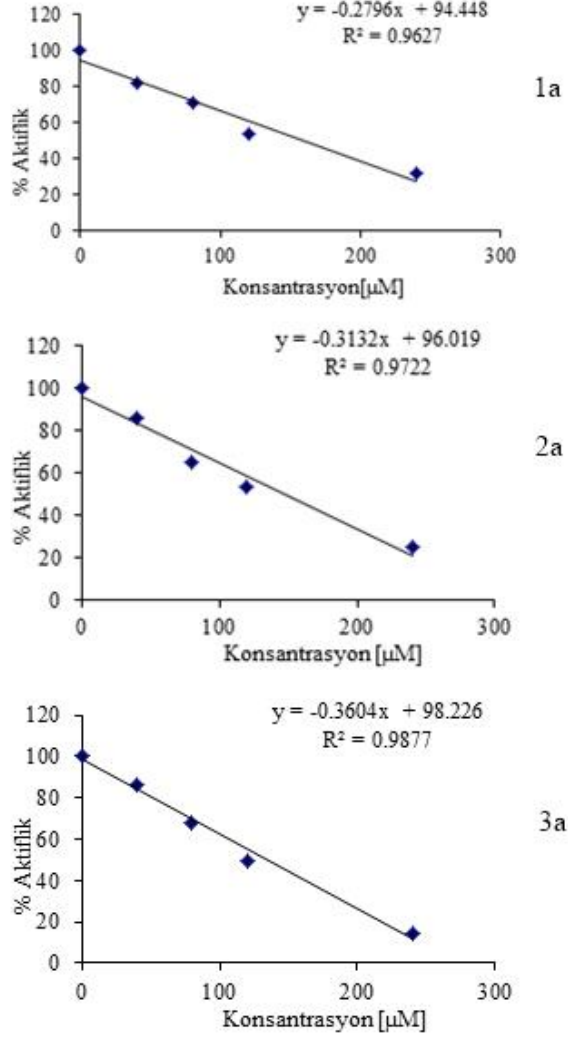
% aktivite = 100- % inhibisyon.

Tablo 1. Komplekslerin IC₅₀ verileri.

Kompleks	IC ₅₀ (μM)
1a	158.97
2a	146.93
3a	133.81

III. SONUÇ VE TARTIŞMALAR

Gale W. Rafter tarafından gerçekleştirilen bakır(II) bileşiklerinin literatürdeki IC_{50} değerlerine bakıldığında 60-2000 μM arasında değişen sonuçların bulunduğu görülmektedir [25]. Sentezlenmiş olan bileşiklerin IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında en iyi sonucun 3a bileşiğinin verdiği görülmüştür. Bu durumun 3a bileşiğindeki aromatik grupların sayısının çok olması sebebiyle GR enzimi ile daha fazla moleküller arası etkileşim yaptığından kaynaklandığı düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar literatüre katkı sağlayacağı gibi GR enzimine etki eden yeni etken maddelerin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.



Şekil 2. Komplekslerin % Aktivite-Kompleks derişimi grafiği.

KAYNAKLAR

- [1] Blanck, S., Maksimoska, J., Baumeister, J., Harms, K., Marmorstein, R., Meggers, E. (2012). "About the Art of Filling Protein Pockets Efficiently with Octahedral Metal Complexes", *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 5244-5246.
- [2] Barber, D., and Harris, S. (1994). "Oxygen free radicals and antioxidants: a review". *Journal of The American Pharmacists*, NS34, 26-35.
- [3] Yruela, I. (2005). "Copper in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156.

- [4] Chena, H., Chena, J., Guona, Y., Wena, Y., Liub, J., Liub, W. (2012). "Evaluation of the role of the glutathione redox cycle in Cu(II) toxicity to green algae by a chiral perturbation approach", *Aquatic Toxicology*, 120–121, 19-26.
- [5] Flikweet, J.P., Hoorn, R.K.J., Staal, G.E.J. (1974). "The effect of copper on human erythrocyte glutathione reductase", *Journal of Biochemistry*, 649-653, 5.
- [6] Rafter, G. W. (1982). "Copper inhibition of glutathione reductase and its reversal with gold thiolates, thiol, and disulfide compounds", *Biochemical Medicine*, 27, 381-391.
- [7] Vigouroux, S., Briand, M., and Briand, Y. (2004). "Linkage between the proteasome pathway and neurodegenerative diseases and aging", *Molecular Neurobiology*, 30, 201-221.
- [8] Willcox, J. K., Ash, S. L. and Catignani, G. L. (2004). "Antioxidants and prevention of chronic disease", *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 44, 275-295.
- [9] Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). "Glutathione, Annual Review of Biochemistry", 52, 711-760.
- [10] Dolphin, D., Avramovic, O., and Poulson, R. (1989). "Coenzymes and Cofactors, III", A, *John Wiley & Sons*, New York.
- [11] Pullela, P., Chiku, T., Carvan, M., and Sem, D. S. (2006). "Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes", *Analytical Biochemistry*, 352, 265-273.
- [12] Patsoukis, N. and Georgiou, C. (2004). "Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1783-1792.
- [13] Asmis, R., Wang, Y., Xu, L., Kisgati, M., Begley, J. G., and Mieyal, J. J. (2005). "A novel thiol oxidation-based mechanism for adriamycin-induced cell injury in human macrophages", *The Journal of The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 1866-1868.
- [14] Patsoukis, N. and Georgiou, C. (2005). "Fluorometric determination of thiol redox state", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 923-929.
- [15] Henderson, B., Fairlamb, A. H., and Cerami, A. (1987). "Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*", *Molecular Biochemistry Parasitology*, 24, 39-45.
- [16] Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., and Cerami, A. (1985). "Trypanothione a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids", *Science*, 222, 1485-1487.
- [17] Dolphin, D., Avramovic, O., and Poulson, R., (1989). "Glutathione reductase. In Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects. Part A", *Wiley-Interscience*: New York, 553-596.
- [18] Karplus, P. A., Krauth, S. R. L., Schirmer, R. H., and Schulz, G. E. (1988). "Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. A crystallographic analysis", *European Journal Biochemistry*, 171 (52), 193-198.
- [19] Kumar, S., Dhar, D. N., Saxena, P. N. (2009). "Applications of metal complexes of Schiff bases-A review", *Journal of Scientific and Industrial Research*, 68, 3, 181-187.
- [20] Sadimenko, A. P. Edited by: Katritzky, A. R. (2012). "Organometallic Complexes of Pyridyl Schiff Bases", *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Book Series: *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 107, 133-218.
- [21] Katwal, R., Kaur, H., Kapur, B. K. (2013). "Applications of copper - Schiff's base complexes: a review", *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 3, 1, 1-15.
- [22] Çolak, M., Aral, T., Hoşgören H., Demirel, N. (2007). Synthesis of Novel Chiral Schiff-Base Ligands and Their Application in Asymmetric Nitro Aldol (Henry) Reaction, *Tetrahedron Asymmetry*, 18, 1129.

- [23] Tunç, T., Demirel, N., Emir, M., Günel, A., Çolak, M., Karacan, N. (2018). DNA binding and cleavage activity of three new copper (II) complexes of chiral N-salicyl- β -amino alcohol Schiff bases, *J. Mex. Chem. Soc.*, 62(3), 51-66.
- [24] Guan, X., Hoffman, B. N., McFarland, D. C., Gilkerson, K. K., Dwivedi, C., Erickson, A. K., Bebensee, S., and Pellegrini, J. (2002). Glutathione and mercapturic acid conjugates of sulofenur and their activity against a human colon cancer cell line, *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 331-335.
- [25] Rafter, W. G. (1981). Copper inhibition of glutathione reductase and its reversal with gold thiolates, thiol, and disulfide compounds, *Biochemical Medicine*, 27, 381-391.