

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI 2-AMİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN ETKİSİNDE GLUTATYON
REDÜKTAZ AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ**

EMİNE EROĞLU ÇETİN

KİMYA ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2019

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI 2-AMİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN ETKİSİNDE GLUTATYON
REDÜKTAZ AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ**

Emine EROĞLU ÇETİN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Bu tez 09/10/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Dr. Öğr. Üyesi Hasan KARADAĞ
Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Esra BARIM
Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA
Üye**

**Prof. Dr. Murat KOCA
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI 2-AMİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN ETKİSİNDE GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Emine EROĞLU ÇETİN

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Dr.Öğr.Üyesi Hasan KARADAĞ
Yıl : 2019, Sayfa sayısı: 49

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Esra BARIM
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA
Dr.Öğr.Üyesi Hasan KARADAĞ

Bu çalışmada, ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) glutatyon redüktazı (GR) üzerine bazı 2-aminotiyazol türevleri olan 4,4'- (disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür (DMTA) ve 2-amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür (ACT)'in olan etkileri incelenmiştir. GR enzimi, 0 dan 500 ppm'e değişen 2-aminotiyazol türevleri derişimlerine maruz bırakılmıştır. DMTA derişimlerinin artışı ile GR aktivitesinde nisbi bir düşüş gözlemlenmiştir ACT derişimlerinin artışı ile GR aktivitesinde önemli bir istatıksel değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (p>0.05). Sonuç olarak, disülfıt köprüsü içeren DMTA, GR üzerine nisbi inhibisyon yapmış, disülfıt köprüsü içermeyen ACT ise GR üzerine inhibisyon yapmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon Redüktaz; 2-Aminotiyazol; 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklorür; 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol Hidroklorür

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY CHANGES IN EXPOSED TO SOME 2-AMINOTHIAZOLE DERIVATIVES

Emine EROĞLU ÇETİN

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ
Year : 2019, Number of pages: 49

Jury : Asst. Prof. Dr. Esra BARIM
Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ

In this study, effects of some 2-aminothiazole derivatives such as 4,4'-(disulfanediylbis(methylene)) bis(thiazol-2-amine) dihydrochloride (DMTA) and 2-amino-4-(chloromethyl)thiazole hydrochloride (ACT) on glutathione reductase (GR) from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were investigated. The GR enzyme was exposed to 2-aminothiazole derivatives concentrations ranging from 0 to 500 ppm. There was a relative decrease in GR activity with the increasing of DMTA concentrations. It was observed that there was no significant statistical change in GR activity with increasing ACT concentrations ($p>0.05$). As a result, DMTA containing disulfide bridge had relative inhibition on GR, ACT without disulfide bridge did not inhibit GR.

Key Words: Glutathione Reductase; 2-Aminothiazole; 4,4'-(Disulfanediylbis(methylene)) bis(thiazol-2-amine) Dihydrochloride; 2-Amino-4-(chloromethyl)thiazole Hydrochloride

BEYAN

“Bazı 2-Aminotiyazol Türevlerinin Etkisinde Glutasyon Redüktaz Aktivitesindeki Değişimlerin Belirlenmesi” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Emine EROĞLU ÇETİN
İmza

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Hasan KARADAĞ'a şükranlarımı sunuyorum, çok teşekkür ediyorum. Yine çalışmamda, 4,4'-(disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür sentez maddesini kendisinden aldığımız değerli hocam Prof.Dr. Cumhur KIRILMIŞ' a da teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer Kimya Bölümü hocalarıma, bana üniversite hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak çalışmam da bana olan güvenini benden esirgemeyen sevgili eşime, beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Emine EROĞLU ÇETİN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	2
2.1. Enzimler.....	2
2.1.1. Enzimlerin Tarihçesi.....	3
2.1.2. Enzimlerin Yapısı.....	5
2.1.3. Bir Gen Bir Enzim Hipotezi.....	7
2.1.4. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	8
2.1.4.1. Oksidoredüktazlar.....	9
2.1.4.2. Transferazlar.....	9
2.1.4.3. Hidrolazlar.....	9
2.1.4.4. Liyazlar.....	10
2.1.4.5. İzomerazlar.....	10
2.1.4.6. Ligazlar.....	10
2.1.5. Enzimlerin Kinetiği.....	11
2.1.5.1. Kimyasal Kinetik.....	11
2.1.5.2. Kataliz Olayı.....	12
2.1.5.3. Michaelis Menten Eşitliği.....	12
2.1.5.4. Lineweaver Burk eşitliği.....	14
2.1.6. Enzimlerin Spesifitesi.....	14
2.1.7. Enzimlerin Aktivitesinin İnhibisyonu.....	15
2.1.7.1. Geri Dönüşümsüz İnhibitörler.....	16
2.1.7.2. Dönüşümlü İnhibitörler.....	16
2.1.7.2.1. Yarışmalı İnhibitörler.....	16
2.1.7.2.2. Yarışmasız İnhibitörler.....	17
2.1.7.2.3. Yarı Yarışmalı İnhibitörler.....	18
2.1.8. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	18
2.1.8.1. Ortam pH'ı.....	19
2.1.8.2. Sıcaklık.....	19
2.1.8.3. Zaman.....	19
2.1.8.4. Substrat.....	20
2.1.8.5. Enzim Konsantrasyonu.....	21
2.1.8.6. Su.....	21
2.2. Glutasyon Redüktaz Enzimi.....	21
2.3. Tiyazol.....	22
2.4. 2-Aminotiyazol.....	22

2.5. 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklorür	23
2.6. 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol Hidroklorür	24
2.7. 2-Aminotiyazol'lerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Kullanılan Çözeltiler	26
3.2.2. 2-Aminotiyazol Türevlerinin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	27
3.2.3. Protein Tayini.....	27
3.2.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	29
3.2.5. İstatistik	30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	31
4.1. Bulgular.....	31
4.1.1. 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklorür'ün Glutasyon Redüktaz ile Etkileşimi.....	31
4.1.2. 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol Hidroklorür'ün Glutasyon Redüktaz ile Etkileşimi.....	32
4.2. Tartışma.....	34
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	35
5.1. Sonuçlar.....	35
5.2. Öneriler.....	35
KAYNAKLAR.....	36
KİŞİSEL BİLGİLER.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Glutasyon redüktaz yöntemi.....	30
Çizelge 4.1 Farklı DMTA derişimlerinin GR aktivitesi üzerine etkisi.....	31
Çizelge 4.2 Farklı ACT derişimlerinin GR aktivitesi üzerine etkisi.....	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Holoenzim.....	6
Şekil 2.2 Gen enzim ilişkisi	8
Şekil 2.3 Tiyazol'un yapısı.....	22
Şekil 2.4 2-Aminotiyazol'un yapısı.....	23
Şekil 2.5 Okside glutatyon'un (GSSG) yapısı.....	23
Şekil 2.6 4,4' - (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklorür'ün yapısı.....	24
Şekil 2.7 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür'ün yapısı	24
Şekil 3.1 Standart protein grafiği.....	29
Şekil 4.1 DMTA'nın GR aktivitesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.2 ACT'nin GR aktivitesi üzerine etkisi.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

E	: Enzim
ES	: Enzim substrat kompleksi
I	: İnhibitör
K _m	: Michaelis sabiti $= (k_1 + k_2) / k_1$ (hız sabiti)
pH	: "Power of hydrogen" (hidrojenin gücü): hidrojen derişiminin eksi logaritması

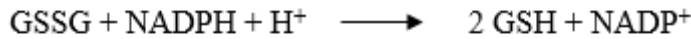
S	: Substrat
P	: Ürün
[S]	: Substrat konsantrasyonu
U	: Ünite
U/mg	: Spesifik aktivite
V ₀	: Başlangıç tepkime hızı
V _{max}	: Maksimum hız

Kısaltmalar

ACT	: 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür
DMTA	: 4,4' - (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat redükte

1.GİRİŞ

Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7) (GR), bir antioksidan enzim olup, okside glutasyonu (GSSG), β -Nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat redükte (NADPH) varlığında redükte glutatyona (GSH) dönüştürür [1].



Heterosiklik halka sistemine sahip, 2-aminotiyazol türevleri, antiviral [2], antimikrobia [3], antikanser [4] ve anti-inflamatuvar [5] aktivitelere sahiptir. Son zamanlardaki araştırmalar, 2-aminotiyazol türevlerinin, kynurenine-3-hidroksilaz ve siklin bağımlı kinaz enzimlerine karşı inhibitör olarak etki ettiği bildirilmiştir [6].

Bu çalışmada kullandığımız, 4,4'- (disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür (DMTA), Kırılmış ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş ve yapısı aydınlatılmış orijinal bir maddedir [7]. Bu madde yapısında disülfid köprüsü içeren, bu yönüyle GR'nin substratı olan GSSG'ye benzeyen, 2-aminotiyazol türevidir. 2-amino-4-(klorometil) tiyazol hidroklorür (ACT) ise disülfid köprüsü içermeyen 2-aminotiyazol türevidir.

Bu çalışmada 4,4'- (disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür ve 2-amino-4-(klorometil) tiyazol hidroklorür'ün GR enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelenmiştir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enzimler

Canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandırıp, herhangi bir yan ürün olmasına fırsat vermeyen ve böylece % 100 lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlere “enzim” denir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grup dışında bütün enzimler protein yapısında bulunmaktadır. Enzimler proteinlerin çok büyük bir kısmını ve en özel grubunu oluşturmaktadır [8].

Enzimlere aynı zamanda “maya” anlamı da verilmektedir. İnsanlar aslında çok eski zamanlardan beri enzimatik reaksiyonlardan faydalanmışlardır. Örneğin şarap, kıymız ve ekmek yapmında enzimlerden faydalanmışlardır. Ancak enzim ve enzimlerin katalitik etkisinin ne olduğunu bilmeden yararlanmışlardır [9].

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden çok karalıdır ve kendiliğinden reaksiyon verme gibi bir durumları yoktur. Bir hücrede herhangi bir kimyasal olayın gerçekleşmesi enzimlere bağlıdır. Biyomoleküllerin kararlılığı şunları sağlamaktadır; bir hücre içinde enzim yoksa bu reaksiyon vuku bulamaz ve kendiliğinden reaksiyonun gerçekleşmesi mümkün değildir. Bu şu anlama gelmektedir; enzimler protein yapısındadır ve olaylar DNA tarafından şifrelendiğinden, hücre içindeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenir ve kontrol edilir. Enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımdır. Bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgiler DNA tarafından aktarılmaktadır [8].

Enzimler, biyokimyasal olayları yaşamla bağdaştıran kimyasal bir köprü görevindedir. Enzimler olmayınca, vücuttaki biyokimyasal olaylar çok yavaşlar ve vücuda enerji sağlanamaz. Bununla beraber vücuttaki metabolik ihtiyaçların yerine getirilmesi zorlaşır. Enzimlerle beraber bütün biyokimyasal olaylar katalizlenir. Dolayısıyla enzimlerin reaksiyonları kat kat hızlandırdığı sonucuna ulaşılmaktadır [10].

Enzimler vücutta bir nevi ajan görevindedirler. Biyokimyasal olayların vücutta uyum içerisinde olmasını sağlarlar [11].

Enzimlerin gerektiğinden çok fazla çalışması, eksik çalışması veya enzimlerin hiç olmayışı birçok hastalığın sebebidir. Buna örnek olarak krabbe hastalığını verebilir. Krabbe hastalığı, myelin kaplamayı sağlayan enzimin yetersizliği sonucunda ortaya çıkan bir tür hastalıktır. Yine enzim yetersizliği sonucunda ise sinirsel bozukluklar meydana gelir [9].

Enzimler aynı zamanda canlı hücreler tarafından meydana gelir ancak etkisini gösterebilmek için bir hücrenin varlığına gereksinim duymazlar. Bu maddeler ısıya ise dayanıklı olmayan maddelerdir. Bundan dolayı laboratuvar ortamında birçok reaksiyonun gerçekleşebilmesi için yüksek bir ısıyla beraber belirli bir pH' a gereksinim duyarlar. Tüm koşullar laboratuvar ortamında gerçekleştirilse dahi yine de belli bir süreye ihtiyaç duyulur. Oysaki organizma koşullarında bu böyle değildir, ısının 37 derece civarında olması yeterlidir. Aynı zamanda pH ise nötr durumuna yakındır. Böyle koşullarda tepkime gayet hızlıdır [12].

Bütün bu nedenleri göz önünde bulundurunca enzim tepkimelerinin yaşam için son derece önemli tepkimeler olduğunu söylenebilir. Enzimler etkilerini her madde üzerinde göstermezken sadece belirli bir madde üzerinde göstermektedir. Enzimler katalize ettikleri tepkimeler sonucunda bazıları az bazıları ise daha fazla oranda tahrip olurlar. Bu nedenle enzimlerin organizmada sürekli olarak sentez halinde olmaları gerekmektedir [12].

2.1.1. Enzimlerin Tarihçesi

Enzimlerin niteliklerinin ne olduğu bilinmemesine rağmen yazının icadından çok önce kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin enzimlerden haberdar olunmadan peynir yapılmış, süt mayalanmış, şarap vb. yapılmıştır. Şarabın üretiminde Yunanlılar Baküs'ü kaynak olarak gösterirler. Bu tepkimeler enzimlerden meydana gelindiğini o dönemler bilinmezken daha sonraki dönemlerde keşfedilmiştir. Ancak o dönemlerde bu reaksiyonların gerçekleşmesinin canlı organizmalar ile mümkün olunacağı sanılıyordu. Pasteur özellikle canlı organizmaların şart olduğunu savunan bilim adamlarından biriydi. Bu nedenle eskiden fermentasyonların gerçekleşebilmesi için sadece canlı hücrelere ihtiyaç duyulduğu biliniyordu. Ancak Büchner yaptığı

çalışmalar ile Pasteur'un bu tezini çürütmüştür. Enzim ismi ise ilk defa Kühne tarafından bulunmuş ve kullanılmaya başlanmıştır [13].

Biyokimya tarihinde yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu enzimler üzerine olmuştur. 1760-1825 yılları arasında kataliz olayı ile ilgili önemli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. 1835 yılında İsveçli bir kimyager belirli bir enzim üzerine ilk çalışmayı gerçekleştirmiştir [8].

Enzimleri ilk defa 1833 yılında Payen ve Petsoz tarafından kullanmışlardır. Alkol kullanarak malt ekstresinden nişastayı ayırt etmeyi başarmışlar ve buna “diyastaz” adını vermişlerdir. Yaklaşık üç yıl sonra yani 1836 yılında Schwan mide suyundan “pepsin”i elde etmeyi başarmıştır [9].

1926 yılında ilk kristal halde bulunan üreaz enzimi Summer tarafından yalıtılmıştır. Northrop tarafından Pepsin, Tripsin ve Şimotripsin enzimleri kristal halde elde edilmiştir. Bu enzimlerin eldesi ise 1930 – 1936 yılları arasında gerçekleşmiştir [9].

1860 yılında L. Pasteure adındaki bilim insanı ise fermantasyon olayının yürütülmesinde enzimlerin yer aldığını deneyler ile ispatlamıştır. Ancak, Pasteur enzimlerin sadece canlı hücrelerin yapısında olduğunu düşünmüştür [8].

Enzimoloji alanında en önemli çalışmayı J.B. Sumner gerçekleştirmiştir. Üreaz enzimini “jack bean” bitkisinden elde etmiştir. Enzimi “jack bean” bitkisinden kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde ise yaklaşık olarak 2000’e yakın enzim elde edilmiştir. Bunların birçoğu saf halde elde edilmiş ve kinetikleri incelenmiştir. Geriye kalan çok az bir kısmına ise kristallendirme yöntemi uygulanmış ve elde edilmiştir. Fakat tüm bunlara rağmen yapılan genetik çalışmalara göre henüz varlığı tespit edilmemiş birçok enzim bulunmaktadır [8].

Günümüzde bulunan yaklaşık olarak 2000’e yakın enzimin 250 kadarı kristal halde bulunan enzimlerdir. Enzimoloji olarak adlandırılan kimya dalı enzim ve enzimler ile uğraşan bir kimya dalıdır. Biyokimyanın günümüzde de halen uğraştığı konuların başında gelmekle beraber en önemlisidir [9].

2.1.2. Enzimlerin Yapısı

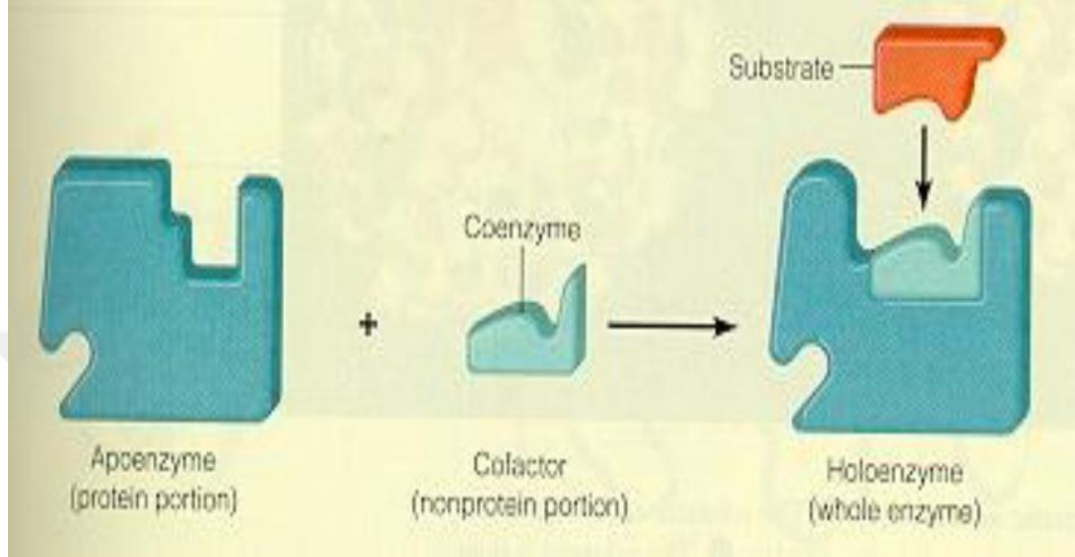
Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısında olan maddelere verilen genel isimdir. Enzimlerin protein yapıda oluşu proteinlerin karakteristik yapıya özgül olmalarından kaynaklanmaktadır. Genellikle enzimler belirli maddeler arasında bulunan tepkimelerin hiçbir kimyasal değişime uğratmadan meydana gelmesini veya hızının değişmesini sağlar. Enzimlerin etki ettiği maddeler genel olarak tek ve belirli olan maddelerdir. Enzimler bazı durumlar da birbirine çok benzeyen maddeler üzerinde etki yaratır. Aynı zamanda enzimlerin protein yapısı etki edeceği veya etki ettiği maddenin de şeklini ortaya çıkarır. Enzimlerin pek azı kendisinde mevcut halde bulunan protein ile etkili olabilirken büyük çoğunluğu daha etkili bir hale geçebilmesi için ekstra bir maddeye ihtiyaç duyarlar [9].

Enzimler basit ve konjuge olmak üzere iki şekilde bulunabilirler. Eğer ki enzim sadece protein yapıda bulunuyorsa “basit” protein dışında farklı bir madde içeriyorsa “konjuge” enzim adı verilir [14].

Yapılarında sadece protein bulunduran enzimlere üreaz, pepsin gibi enzimler örnek verilebilir. Bazı enzimler ise organik fakat protein yapıda olmayan prostetik gruplar içerirler. Bu gibi enzimlere ise flavin nükleotidli enzimler, proksidaz ve katalaz örnek olarak verilebilir. Bazı enzimler ise koenzim içerir. Bunlara da nikotinamid nükleotidli enzimler örnek olarak verilebilir [14].

Enzimler bir maddeye etki edeceği zaman veya bir tepkimenin şeklini değiştirmek istediği zaman ise bunu yapılarındaki proteinden faydalanarak yaparlar. Çok az enzim kendisinde mevcut olarak bulunan protein yapıları ile etkili olurlar. Enzimlerin çoğunluğu daha etkili hale geçebilmeleri için ek bir maddeye ihtiyaç duyarlar [12]. Konjuge protein yapıları enzimler etkili olabilmeleri için apoenzim denilen kısmına kuvvetle bağlanmış olan gruba prostetik gruplara ihtiyaç duyarlar. Bu prostetik grup ise proteinlerden kolayca ayrılmaz [13]. Apoenzimlere örnek olarak hidrolazlar, pepsin, tripsin vb. verilebilir. Bazı enzimler ise proteinlere ilaveten bir metal iyonu içerirler. Buna ise koenzim adı verilir. Koenzimlere ise örnek olarak katalaz, peroksidaz vb. verilebilir [12].

Enzimlerin bazı kısmı ise ısıya dayanaksızdır. Bu ısıya dayanaksız kısma “apoenzim” denir. Apoenzim ile beraber kofaktörlere ise “holoenzim” adı verilir [10].



Şekil 2.1 Holoenzim [10]

Konjuge enzim aslında haloenzim olarak bilinir. Bir enzim ve bir proteinin bileşiğidir. Apoenzim veya koenzim olarak da adlandırılabilir. Kofaktör ise bir enzimin kataliz özelliği için gerekli olan proteinsiz olan kısma verilen isimdir. Ortamdan eğer ki kofaktör kaldırılırsa apoenzim kısmı herhangi bir işlev görmez. Yani apoenzim bir nevi kofaktöre bağlıdır. Kofaktör, koenzim veya metal iyonundan oluşur. Kofaktör aslında bir taşıyıcıdır yani enzimlerin işini taşımak ile görevlidir. Mesela substratın aktif bir bölgeye bağlanmasını sağlayabilir. Her enzim metal iyonu gerektirmeyebilir ancak bazı aktif olan enzimler metal iyonu gerektirir [14].

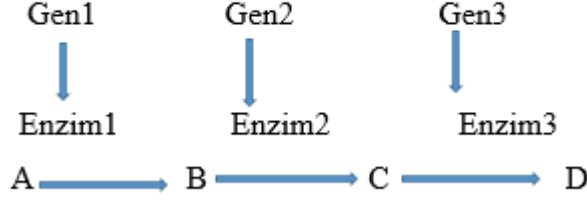
Tıpkı diğer proteinleri basit ve bileşik olarak isimlendirip gruplara ayırdığımız gibi enzimleri de basit ve bileşik olarak adlandırıp gruplara ayırırız. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını protein yapılarıyla yerine getirebilir ancak bazıları ise protein yapısında olmayan “kofaktör” olarak isimlendirilen bazı gruplara gereksinim duyarlar. Kofaktör aslında bir metal iyonudur ancak bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazı durumlarda aktivite için her ikisine de ihtiyaç duyulabilir. Enzimler sıcaklık ile denatüre olabilirken kofaktörler sıcaklık ile denatüre olmazlar çünkü sıcaklığa dayanıklılık

sağlarlar. Holoenzim adı verilen enzimler ise katalitik olarak aktif olan enzim – kofaktör komplekslerden oluşur. Kofaktörsüz olan enzime apoenzim, proteine ise apoprotein adı verilir. Apoenzimler, katalitik olarak eylemsizdirler. Bu bileşik veya metal iyonlarına karşı kofaktörlü enzimlerin farklı boyutlarda afiniteleri olabilir. Fakat bu kofaktörler genelde diyaliz ile uzaklaştırılabilirken bazı enzim-kofaktör bağlanmaları diyalizle dahi olsa uzaklaştırılamayabilir. Çünkü bu bağlanmaları kovalent yapıda ve sıkıdır. Buna “sitokrom c” deki “hem” grubu enzimin peptid zincirine kovalent bağla bağlı oluşu örnek olarak verilebilir. Enzime bazı koenzimler gevşek olarak bağlıdır. Gevşek bağlı olan koenzimler ile enzim arasındaki etkileşimler enzim-substrat etkilişimine benzetilebilir. Tepkime gerçekleşikten sonra enzimlerden ayrılarak başka bir metabolizma olaylarında yer almak isteyebilirler [8].

Koenzimler apoenzimleri aktif hale getirir. Aynı sebep ile kofaktör terimi de kullanılır. Kofaktörler enzimlere çok gevşek olarak bağlanmıştır. Çok kolay dializ edilme özelliğine de sahiptirler. Buna örnek olarak NAD, NADP verilebilir. Her kofaktör apoenzim ile kolay kolay parçalanmaz. Eğer, kofaktör apoenzim ile kolay kolay parçalanma özelliği göstermiyorsa buna “prostetik grup” adı verilir. Buna örnek olarak suksinik dehidrogenazdaki Flavin Adenin Dinükleotid verilebilir [9].

2.1.3. Bir Gen Bir Enzim Hipotezi

Yaşamsal olayların yer aldığı hücrenin içindeki enzimler protein yapısında olan moleküllerdir. Bu molekülün sentezinden sorumlu bir DNA bulunur bu DNA parçasına gen denir. Genler sadece protein sentezinden sorumlu olmayıp aynı zamanda enzimlerin sentezinden de sorumludurlar. Her bir enzimin bir gen tarafından şifrelenmesine, bir gen bir polipeptit hipotezi denir. Meydana gelen bu enzimler canlılardaki biyokimyasal olayları katalizlemek ile sorumludur. Eğer, herhangi bir enzimin sentezinden görevli genin yapısı bozulursa ve protein sentezi engellenecek olursa, canlılarda da çeşitli sorunlar ortaya çıkar. Meydana gelen bu sorun canlının yaşamına engel olabilir [15].



Şekil 2.2 Gen enzim ilişkisi [15]

Örnek olarak Gen2’de herhangi bir mutasyon meydana gelirse aşağıdaki gibi sorunlar ile karşılaşılabilir;

1. Enzim2 durur ve çalışmaz.
2. B maddesinin C maddesine dönüşmesi beklenemez.
3. B maddesi C maddesine dönüşmeyince ortamda C maddesi birikmeye başlar.
4. Tepkimenin devam etmesi için ortama Enzim2 veya C maddesinin hazır olarak verilmesi gerekmektedir [15].

2.1.4. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler önceleri “substrat” adı verilen bileşiklerin sonuna “az” eki getirilerek adlandırılmışlardır. Buna üreyi parçalayan enzime üreaz örneği verilebilir. Bu isimler substrat hakkında bizlere bilgi verirken, bazı enzimler hakkında bizlere herhangi bir bilgiyi vermemekteydi. Örneğin, pepsin, katalaz, tripsin vb. zamanla yapılan farklı çalışmalar ile farklı enzimler de ortaya çıkınca sistematik bir adlandırılma ihtiyacı hissedildi. Bunun üzerine enzimler katalizledikleri reaksiyon mekanizmaları ve reaksiyon tiplerine göre oluşturulan uluslararası komisyon tarafından sınıflandırılmaya başlandı. Sistematik adlandırılmanın en önemli birkaç özelliklerini sıralayacak olursak:

1. Reaksiyonlar ve reaksiyonları katalizleyen enzimler kendi aralarında 6 gruba ayrılmıştır.
2. Katalizlenen tepkimenin sonuna “az” eki getirilir.

3. Tepkimenin doğasını açıklayacak ifadeler gerek duyulduğu takdirde parantez içinde ve ismin sonuna yazılır.
4. Her bir enzime sistematik kod numarası verilir [8].

2.1.4.1. Oksidoredüktazlar

Oksidasyon ve redüksiyondan sorumlu olan enzimlerdir yani elektron transferi yapmaktan sorumludurlar [10].

Oksidasyon yükseltgenme, redüksiyon ise indirgenme anlamlarına gelmekle beraber bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Oksidazlar ile dehidrogenazlar substrat olarak, elektron verici ve hidrojen olarak kullanılabilirler [16].



Bir molekülden H koparılır ise o molekül yükseltgenme özelliği gösterir. Eğer ki bir başka moleküle H aktarımı olur ise o molekül indirgenme özelliği göstermiş olur [16].

2.1.4.2. Transferazlar

Fonksiyonel olan grupların transferini yapmak ile sorumlu olan enzimdir [10]. Transferazlar moleküllerinde sadece H içermez. H ile beraber başka gruplar da içerir [16].

Transferazların görevi bir fonksiyon halinde bulunan enzimleri bir molekülden diğerine aktarmaktır [11].



2.1.4.3. Hidrolazlar

Ester, eter, peptid gibi bağlarına bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizi katalizleyen enzim çeşididir [8].

Hidrolazlar değişik bağların hidrolizini sağlayıp bu bağlara su ekleyerek koparılmasını sağlar [16].



2.1.4.4. Liyazlar

Hidrolizlerden daha farklı bir mekanizma ile substratlardan grupları uzaklaştırır. Çift bağların olduğu tepkimeleri katalizler [8].



2.1.4.5. İzomerazlar

Geometrik ve optik izomerik bileşiklere dönüşmesini sağlayan enzimlere verilen isimdir [16].



2.1.4.6. Ligazlar

ATP gibi yüksek enerjili bağlardaki fosfatları hidrolize edip iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize etmesini sağlayan enzim çeşididir. Ligazlar aynı zamanda yüksek enerjiye sahip olan fosfatların enerjisini kullanır. Kullandığı bu yüksek enerji sayesinde karbon ile C,O,S,N arasında bağ oluşumunu katalizlemesini sağlayan enzimlerdir [16].



Birçok enzim atomları, elektronları veya farklı görevdeki grupları katalizlemek ile sorumludur [11].

2.1.5. Enzimlerin Kinetiği

Enzim kinetiği başlığı adı altında daha çok biyokimyasal tepkimelerin hızlarını kantitatif olarak incelemekte ve buna etki eden faktörleri ele alıp değerlendirmektir [8].

2.1.5.1. Kimyasal Kinetik

Ürünleri oluşturmak için birbiriyle etkileşen moleküllerin sayılarına göre sınıflandırılmasına “kimyasal kinetik” adı verilir. Tepkimeye giren bir, iki ya da üç molekülün ürünleri meydana getiren reaksiyonları farklı şekilde ve sırasına göre isimlendirilir. Bunlar sırasıyla; monomoleküller, bimoleküller ya da termoleküller olarak adlandırılabilir. Kimyasal reaksiyonlar bunun dışında derecelerine göre sınıflandırılır. Sıfırıncı, birinci, ikinci ve üçüncü olarak derecelendirilir. Bu şekilde derecelendirilmesi aslında tepkime hızlarına kaç farklı reaktant konsantrasyonunun etki ettiğini gözler önüne serer. Birinci derece reaksiyonların hızı sadece bir çeşit reaktantın derişimi ile doğru orantılıdır denilebilir. Buna örnek olarak A, P reaksiyonunu verebiliriz. Bu reaksiyon hızına göre birim zamanda A’ nın kaybolması ya da P’ nin oluşma hızları birbiri ile doğru orantılıdır denilir [9]. İkinci derece tepkimelerinin hızları iki reaktantın derişimine yada bir reaktant derişiminin ikinci bir kuvvetine bağlıdır diyebiliriz. Ancak burada örnek olarak verilen $A+B, P$ reaksiyonu her zaman ikinci derece olmayabilir. Çünkü bazı durumlarda birinci derecedenmiş gibi davranabilir. Bu şu şekilde açıklanabilir; A’ nın derişimi yüksek iken B’nin derişimi düşük olduğu durumlarda bimoleküler reaksiyonun hızı yalnızca B’nin derişimine bağlı olacağı için bu reaksiyon birinci mertebededir. Reaksiyon derecesi reaksiyonun reaktant sayısına bağlı olmayıp reaksiyonun vuku bulduğu şartlara doğrudan bağlı olduğu sonucuna varılır. Üçüncü dereceden reaksiyonlara birinci ve ikinci dereceden reaksiyonlara rastlandığı gibi sık rastlanmaz. Hatta birçok katalizörlü reaksiyonlar üçüncü dereceden sayılır [8].

2.1.5.2. Kataliz Olayı

Enzimlerin kataliz olayı süresi boyunca kovalent bağlar her zaman yeniden düzenlenme özelliğine sahiptirler. Ancak bazı gruplar geçici bir süreliğine substrata aktarılırlar. Bunun böyle olması aktivasyon enerjisini düşürür. Aktivasyon enerjisinin düşürülmesi olayını ise şöyle açıklanabilir; kurulan bazı bağlar yıkılan bazı bağlardan daha sağlam olur ve serbest enerji açığa çıkar. Açığa çıkan bu serbest enerji ise aktivasyon enerjisinin düşmesini sağlamaktadır. Temel sebebi kovalent olmayan bağlardan sağlanmasıdır. Enzimatik olan reaksiyonları enzimatik olmayan reaksiyonlardan ayıran temel etken ise bir ES kompleksinin oluşumudur. Bu kompleksinin substrat ile enzim arasında yapıyı sabitleyen bazı etkenler vardır. Bunlar ise hidrojen, hidrofobik-iyonik etkileşimler gibi bazı zayıf etkileşimlerdir. Bu etkileşimler geçiş durumunda iken maksimum özelliktedir [8].

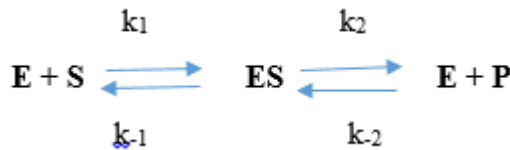
Katalizin temel sebebi ise çoklu zayıf bağların oluşumu sırasında meydana çıkan bağlanma enerjisiyle aktivasyon enerjisinin tahmin edilenlerden de ciddi olacak şekilde düşmesi olayıdır [16].

2.1.5.3. Michaelis Menten Eşitliği

Michaelis Menten denkleminde faydalanarak tek substratlı olan enzimlerin tepkime hızlarının yine substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi açıklamak için kantitatif olanaklarından faydalanıp açıklamak gerekir. Michaelis Menten denkleminde V_{max} ve K_m değerlerinin bilinmesi önemlidir. V_{max} , ilgili olan enzimin, belirli şartlar ve zaman dahilinde ilgili olduğu substrat ile tepkimeye girip ulaşabileceği en yüksek katalitik etkiye ulaşması durumudur. Aynı zamanda bu katalitik etki en yüksek etkidir. Bu şekildeki bir tepkimede enzimatik olan aktivitenin en yüksek düzeye ulaşmış olan katalitik aktivitenin yarı hızına ulaşması sırasında substrat konsantrasyonunun belirlenmesi durumuna ise K_m adı verilir. Bir nevi K_m Michaelis Menten denkleminin konsantrasyonu anlamına da geliyor denilebilir. K_m özellikle tek substratlı enzimler için enzimlerin derişimine bağlı değildir. Bu sebepten ötürü dakika $\setminus$ mol $\setminus$ litre olarak tanımlanıp ifade edilebilir [9].

Michaelis Menten derişimini çok basit olan bazı deneyler ile yaklaşık değerlerinin hesaplanma şansı bulunmaktadır. Bu sebeple enzim derişimini sabit tutmak gerekmektedir. Ancak farklı olan başlangıçtaki substrat derişimlerini uygulamak şartıyla ilk başlardaki tepkimelerin hızlarını hesaplamak yeterli olmamaktadır. Bu sebep ile başlangıçtaki tepkime hızları ile kullanılmış olan substrat derişiminin grafiğe dökülmesi sonucu enzimlerin Km değerinin bulunması kolaylaşır. Fakat her enzimin Km değeri benzerlik göstermeyip farklılaşır. Bu substrattan substrata değişir. Aynı zaman Km değerini ısı ve pH değerleri de etkiler. Bununla beraber Vmax da substrat türüne göre ısı ve pH etkisine göre farklılık gösterir [9].

Enzimlerin genel olarak birçok özelliği Michaelis – Menten yöntemi kullanılarak açıklanır. Bu yöntem ile enzim (E) substratına (S) bağlanarak enzim – substrat kompleksi (ES) meydana gelir. Bu reaksiyon ise üründe meydana getirebilir veya tekrardan E ve S meydana getirebilir [17].



Bu denklemden yola çıkarak denklemdaki birinci kısmı alınır ve kitle etkisi kanunu uygulanır. Tepkimeye giren E ve S maddelerinin derişimleri, tepkimenin sonucunda meydana gelen ES kompleksi derişime bölünüp sabit olan bir değer meydana çıkar [9].

Michaelis _ Menten eşitliği bulunurken şu önemli noktalara dikkat edilmelidir:

1. Substrat konsantrasyonu, enzimlerden çok daha büyüktür [10]
2. [ES] zaman içerisinde herhangi bir değişikliğe uğramaz. Her zaman ES oluşum hızı yıkım hızına eşittir [10]
3. P (ürün) birikimi çok olmaz. Bu nedenle E + P ‘den ES oluşum ihtimali tahminlerden dahi azdır [10]

Michaelis Menten eşitliği:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

2.1.5.4. Lineweaver Burk eşitliği

Hiperbolik eğrilerden yüksek düzeydeki substratlarda $V_{\max}$ ' ı kesin olarak bulmak zordur. Bu nedenle Michaelis Menten eşitliği ters çevrilerek gerekli düzeltmeler yapılarak Lineweaver-Burk eşitliği bulunur [10].

$$1/V = K_m/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max}$$

2.1.6. Enzimlerin Spesifitesi

Enzimler özgül olan maddelerdir. Fakat bu enzimlerin bu şekilde özgül oluşu çok farklı değişiklikler gösterebilir. Ancak birçok enzim farklı substrata etki eder. Örneğin protein konusunda ismi geçen D-Amino Asit Oksidaz sadece "D" konfigürasyonuna etki eder ve amino asitleri okside eder. "L" konfigürasyonu gösterenlere etki yapmayabilir. L-Laktat Dehidrogenaz sadece L-laktata etki yapabilirler. Bazen de bazı durumlarda enzimler “grup spesifitesi “ etkisi gösterebilirler. Örnek olarak "Heksokinaz"lar heksozların fosforilasyonunu örnek olarak verebiliriz. Bazı enzimler ise bazı gruplar için kesinlikle spesifiktirler diyebiliriz. Mesela bir heksokinaz yalnızca glikozun fosforulasyonunu sağlar. Eğer ki bunu sağlıyorsa “glukokinaz” ismi verilir, bu ise kesin olan bir grup özgüllüğü gösterir [9].

"Karboksiptidaz"ları incelendiğinde, bunların peptit zincirlerinin C-terminal uçlarında bulunan peptit bağlarını etkiledikleri görülür. Ancak bu her enzim için geçerli olmayabilir. Bazı enzimler ise yalnızca spesifik yani özgül olan enzimlere etki ederler. Enzimlerin tamamı değil ancak bir kısmı belli bir grup üzerinden bütün maddelere etki etme özelliği gösterirler. Buna örnek verecek olursak pepsinleri örnek

olarak verebiliriz. Pepsinler midedeki bütün proteinlere etki etme özelliğinde bulunurlar [9].

2.1.7. Enzimlerin Aktivitesinin İnhibisyonu

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro etkinliklerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması veya tamamen yok edilmesine inhibisyon denir. Buna neden olan bileşikler vardır. Neden olan bu bileşiklere de inhibitör ismi verilir. İnhibitörler aslında küçük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Aynı zamanda iyonlardır denilebilir [18].

Bazı maddeler enzimler ile ilişki kurma özelliğine sahiptirler ancak buna rağmen substrat gibi hareket etme özelliğinden yoksundurlar. Bir diğer deyiş ile enzimler bu maddelerin başka bir ürüne dönüşmesine engel olur. Fakat bu birleşme sebebi ile enzimin kendisi de katalitik görevini yerine getirmekte zorlanır [9].

İnhibisyon aynı zamanda enzimlerin yapısal özelliklerinin incelenmesinde çok büyük rol oynar, aynı zamanda enzimlerin katalitik etkisinin incelenmesini de sağlar. Hücre içerisinde bulunan metabolik olan olaylara rehberlik eder. Biyolojik olan sistemlerin de aynı zamanda kontrol mekanizmasını sağlar. Enzim katalizinin inhibisyonu birçok zehirli bileşik tarafından ortaya çıkabilir [16].

Kimyasalların bir çoğu enzim aktivitesini engellemektedir. Bu kimyasallar doğal olabileceği gibi sentetikte olabilirler. Etki mekanizmalarına göre inhibitörler iki farklı gruba ayrılmaktadır. Bunlar ;

1. Geri dönüşümsüz (irreversible) inhibitörler,
2. Dönüşümlü (reversibl) inhibitörler
 - Yarışmalı (competitive) inhibitörler,
 - Yarışmasız (non-competitive) inhibitörler
 - Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibitörler,

Enzim inhibitörleri hem yavaşlatır hem de reaksiyonu durduran moleküllerdir. Bu ve buna benzer sebeplerden ötürü inhibitörlerin yapımı farmakolojik olarak çok büyük bir öneme sahiptir. Örnek verecek olursak aspirin, ağrı sürecinde sorumlu moleküllerin üretimindeki enzimi inhibe etmekten sorumludur [16].

2.1.7.1. Geri Dönüşümsüz İnhibitörler

Dönüşümsüz inhibitörler enzimlere kovalent bağ ile bağlanan reaksiyonlardır. Dönüşümsüz inhibitörler enzimlerin sadece aktif bölgesine bağlanmakla kalmaz enzimlerin farklı bölgelerine de bağlanırlar ve bağlandığı bölgeyi ise engellerler [8]. Bu tür inhibisyonlar diğer gruplara göre enzimlere sıkı sıkı bağlılık göstermektedir. Ayrıca ayrışma gösterirken çok yavaştırlar. Bunlara örnek olarak ise sinir gazlarının asetil kolin esteraza etkileri verilebilir [10].

2.1.7.2. Dönüşümlü İnhibitörler

Bu inhibitörler dönüşümsüz inhibitörlerin aksine enzimlerle geçicide olsa bir denge kurmak isterler. Bu kurmak istedikleri dengeye ise “inhibisyon dengesi” ismi verilir [8]. Bu tür dönüşümlü inhibisyonlarda substrat derişiminin ya da inhibitöre oranla enzim derişiminin arttırılması ile enzim inhibitör ilişkisi tersine çevrilir [16].

2.1.7.2.1. Yarışmalı İnhibitörler

Yarışmalı inhibitörler enzim üzerine bağlanırken enzimin üzerine substrat ile aynı yere çok aktif olarak bağlılık gösterirler. Bu bağlanma esnasında S ile yarışma gösterirler. Bu sebepten ötürü dönüşümlü inhibitörlerde hız, S ve I derişimi ile bağlıdırlar. S artışı ile dönüşümlü inhibisyonunu geri çevirme şansı yakalanır. Bununla birlikte bu V_{max} 'a kadar çıkarılabilir [10].

Yarışmalı İnhibisyonda, enzimin etki yaptığı substratlar vardır ve bu substrata çok benzeyen bir madde bulunur. Bu diğer madde, enzimin "Aktif Yerini" işgal eder. Bu işgal ile enzimin asıl substratı ile ilişki kurmasına karşı tedbir alır. Yarışmalı

inhibisyonda inhibitör madde molekülleri bazı enzim moleküllerini işgal eder. Bu molekülleri işgal ederek enzimin katalitik etkisinin yavaşlamasını sağlarlar. Buna örnek olarak "Suksinik Dehidrogenaz" ın "Malonik asit"le inhibisyonunu verebiliriz. Suksinik asit sitrik asit siklusu dizisinde suksinik dehidrogenaz enziminin katalitik etkisi ile çok kolay bir şekilde fumarik aside dönüşü sağlanabilir. Ancak ortamda malonik asidin bulunması ve formül yapı benzerliği göstermesi sebebi ile bu dönüşümün yavaşlamasına neden olur. Yarışmalı inhibitörlerde enzimin inhibitör ile bağlanması dönüşümlüdür. Ve bu dönüşüm ile substrat derişiminin çoğaltılması sağlanır. Bu çoğalma ile tüm ilişkiler ayrılır. Fakat bu arada bir de "Unkompetitif inhibitörler" den bahsetmek mümkün olabilir. Unkompetitif İnhibitörde Enzim, Substrat ve İnhibitör arasında aslında üçlü bir ilişki vardır ve dönüşümlü değildir. Bu inhibisyon doğrudan enzim –substrat kompleksine bağıllık göstermiş olur. Bu durum genelde iki substratlı enzim derişiminde gözlenir [9].

Yarışmalı inhibitörler kovalent bağ yapmazlar, enzime ise dönüşümlü olacak şekilde bağlanma özelliği gösterirler. Yarışmalı inhibitörler substrat ile benzerlik gösterirler. Substrata benzedikleri için enzime bağlanmak için adeta substrat ile yarışırılar. Eğer ki ortamda substrat derişimi daha çok ise yarışmalı inhibitörün ortama bağlanma şansı azalacaktır. Bunun tersi olarak ortamda substrat derişimi daha az ise yarışmalı inhibitörün ortama bağlanma şansı artacaktır [16].

2.1.7.2.2. Yarışmasız İnhibitörler

Yarışmasız inhibitörler ve substratlar enzime aynı anda bağlanır. Ve bu bağlanma enzimin aynı bölgesinde olmaz. Bundan da anlaşılacağı üzere substratlar ve inhibitörler arasında herhangi bir yarışma söz konusu olmaz [8]. Bu tür inhibitörlerin substratın derişimi ile ilişki göstermez. Hem substrat hem de inhibisyon olan madde aynı anda enzime bağlanır. İnhibisyonun enzimin aktif yeri dışında herhangi bir yere bağlanmış ise, o enzimin moleküllerinin substrat ile tepkimeye girme hızında bir azalma görülür. Oysaki yarışmalı inhibitörlerde, sadece tepkimeye giren enzim moleküllerinin sayısında bir azalma söz konusu olur.

Yarışmasız inhibitörün en sık görülen şekli, inhibisyonun, enzimin aktif yeri dışında kalan katalitik etkisi vardır. Bu etki ile ilgili ayrıca, üç boyutluluk şeklinin korunması yönünden önemli olan fonksiyonel gruplarından birisi ile dönüşümlü bir şekilde birleşmesi haline verilen isimdir. Fakat bazı enzimler yapılarında fonksiyonları için esas olan —SH grupları bulundurlar. Enzimin normal şekilde görev yapabilmesi için —SH gruplarının bozulmaması gerekir. —SH gruplarının metal iyonları tarafından yarışmasız bir şekilde inhibe edilmesi gerekir. Bununla birlikte enzimin normal katalitik etkisini sürdürmesine engel olmuş olur. Bu çeşit ağır metallere örnek olarak Ag^+ , Hg^+ verilebilir [9].

Yarışmasız inhibitörler enzimlere bağlanırken kovalent bağ yapmadan dönüşümlü olarak bağlanma özelliği gösterirler. Yarışmasız inhibitörlerin yarışmalı inhibitörlerden ayrılan bazı yönleri vardır. Bu farklar şunlardır; inhibitöre fazla substrat eklenmesi yarışmasız inhibitörlerin enzimlerden ayrılması söz konusu değildir. Bunlar substrata benzeme gibi bir yönleri bulunmaz ve aktif bölge dışında başka bir yere bağlanırlar. Aktif bölge dışında başka bir yere bağlanarak enzimin aktivitesinde bir azalma görülür [16].

2.1.7.2.3. Yarı Yarışmalı İnhibitörler

Yarı yarışmalı inhibisyonunda inhibitör serbest olan enzime bağlanmayıp sadece ES kompleksine bağlanır. İnhibitör varlığında ortamdan sürekli olarak ES kompleksi uzaklaştırılır. Fakat ES kompleksi sürekli olarak varlığını korur [8].

2.1.8. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler tarafından katalize uğrayan tepkimelerin hızını etkileyen bir takım faktörler bulunur. Bu faktörler arasında pH, ısı, ışık ve diğer fiziksel faktörler ile beraber enzim derişimini, substrat derişimini, zaman, tepkime ürünleri, ortamdaki çeşitli iyonların varlığı, hormonların ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisini saymak mümkündür [18].

2.1.8.1. Ortam pH'ı

Ortamın pH 'ına enzimlerin reaksiyon hızı bağlıdır. Enzimlerin etkisinin fazla olması belli bir pH aralığına bağlıdır. Enzim aktivitelerinin en fazla olduğu pH' a ise "enzimlerin optimum pH"ı adı verilir [18].

Katalitik bir olay esnasında E, S ve kofaktörlerin tepkimeye girebilmesi için bazı kimyasal grularına sahip olması gerekmektedir. Bu kimyasal gruplar ise iyonize ve aniyonize gruplardır. Bunların dışında uç pH'lar enzimlerin denatüre olmasına sebep olurlar [10].

2.1.8.2. Sıcaklık

Enzim tepkimelerinin hızı aynı zamanda sıcaklıkla da artış gösterir. Başlarda sıcaklığın her 10 °C artış göstermesi enzim aktivitesinin % 100 artmasına sebebiyet verir. Her 10 °C'lık ısı artışta tepkimenin hızında meydana gelebilecek olan artışa "o reaksiyonun ısı katsayısı" adı verilir. Ancak her enzimin belli bir sıcaklığı vardır ve bu belirli olan sıcaklık aşılması gerekmektedir. Bu sıcaklık aşıldıktan sonra ise enzimler de tıpkı diğer proteinler gibi denatüre olur. Denatüre olduktan sonra ise etkilerini yitirirler [18].

Tüm kimyasal tepkimelerin hızı sıcaklık olunca artış gösterir. Enzim bulunan tepkimeler bu genel olan kuraldan farklı bir davranış göstermesi söz konusu olamaz. Sıcaklığın artışı ile enzimatik olan tepkimenin hızında da artış gözlenir. Ancak bu sıcaklık 50-60 derecenin üzerine çıktığı takdirde aktivite de azalma meydana gelir. Böyle bir durumun meydana gelmesi ise enzimlerin yapısında meydana gelen denatürasyondan dolayı olur [8].

2.1.8.3. Zaman

Enzimlerde başlangıç süreci olarak hız yüksek özelliklerde görülür. Ancak bunun sonucu olarak oluşan ürünler tepkimenin hızında bir azalma gösterir (Enzimler). Herhangi bir enzim tarafından katalizlenme özelliği gösteren tepkime

yürürken tepkimenin hızını giderek düşürür. Bunun asıl sebebi tepkime devam ediyorken meydana gelen ürünlerin kendi aralarında reaksiyona girerek tersi olan yönde tepkime oluşturmalarıdır. Oluşan bu tepkimeler ile enzimin zamanla inaktive olur, tepkimenin inhibe eden maddelerin oluşur ve substrat tükenir. Bu gibi faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırmak gerekir ve bunun için enzim çalışmaları genellikle tepkimenin başlangıç aşamasında meydana gelir (ilk 1-3 dakika) [18].

Enzimlerin hızının zamanla düşmesinin genel sebebi ürünlerin tersi yönde hareket etmesidir ancak bunu engellemek için bir takım çalışmalarda bulunulmuştur. Yapılan çalışmalara göre enzimlere etki eden faktörleri ortadan kaldırmak için enzimler üzerindeki çalışmalar da substratlara rastlanmıştır. Bu substratların yaklaşık olarak % 10 kadarı harcanır. Harcanan substratta ise tepkimenin başlangıç değerine rastlanır [12].

2.1.8.4. Substrat

Substrat konsantrasyonu ile enzim tepkime hızının arasında doğru orantı vardır. Ortamda yer alan enzim konsantrasyonunun sabit bir şekilde kalması ile beraber diğer koşullarında değişmemesi durumunda substrat derişiminde artış gözlenir. Substratın artması ile enzimatik olan tepkimelerin de hızında değişiklikler meydana gelir. Başlangıçta substrat miktarının artması durumunda tepkimenin hızında ilk durumda çok büyük bir artış meydana gelir. Ancak substrat ilavesi olursa ve bu devam ederse eğer, bu çok büyük olan artış zamanla yavaşlar. Yavaşlaması durumunda daha sonra sabit bir düzeyde kalır. Böyle bir durumun meydana gelme sebebi ise enzim molekülleri düşük substrat derişimin de substrat ile tam olarak birleşmemesinden kaynaklanır. Aynı zamanda enzim moleküllerinin yüzeyinde birçok aktif olan yer boş kalır ancak belirli bir düzeye gelen derişimde substratın ilavesi ile o boşta kalan yerler substrat ile dolmaya başlar. Substrat ile dolan yerler sayesinde enzim tam kapasite ile çalışmaya başlar. Bunun sonucu olarak enzim katalitik olan görev sınırının en üst düzeyine ulaşmış olur. Tüm bunlardan yola çıkarak enzimlerin tepkimesinde substratların artması ile çok farklı reaksiyon tepkimeleri meydana gelir [12].

2.1.8.5. Enzim Konsantrasyonu

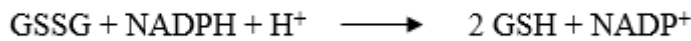
Ortamda çok fazla miktarda substrat bulunması halinde enzimi miktarında artış gösterildikçe substrat enzim ile doğru orantılı olacak şekilde artış göstermiş olur [10]. Enzim miktarı kaç katına çıkarılırsa çıkarılsın tepkimenin hızı da aynı oranda artış gösterir. Ancak bu durum tepkimenin başlangıcı için geçerli olur. Tepkimenin devamı esnasında ise inhibe edici özelliklere sahip nedenler ve aynı zamanda substratın azalması ile birlikte hız azalma gösterir. Bu ve buna benzer nedenler söz konusu olmadığı takdirde hız daima yüksektir [12].

2.1.8.6. Su

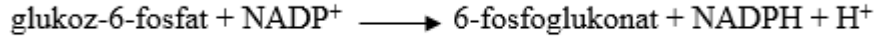
Enzim tepkimelerinin gerçekleşmesi için diğer faktörler ile beraber ortamda aynı zamanda bir miktar suyun da bulunması gerekmektedir. Çünkü ortamda buluna moleküllerin birbirine çarparak hareket olması gerekmektedir. Bunun için ise ortamda bir miktarda olsa sıvının bulunması lazım ve bu sıvıyı karşılayacak olan ise sudur. Bunlara örnek olarak tohumları verebiliriz. Tohumlarda su miktarı az olduğu durumlarda tepkimeler gerçekleşirken minimal seviyede olurlar [19].

2.2. Glutasyon Redüktaz Enzimi

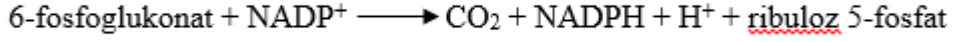
Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7) (GR), bir antioksidan enzim olup, okside glutasyonu (GSSG), NADPH (β-Nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat redükte) varlığında redükte glutatyon (GSH) dönüştürür [1].



Gerekli olan NADPH, hayvan ve bitki dokularında çeşitli enzim sistemleri tarafından sağlanır. Fakat en iyi bilineni oksidatif pentoz fosfat yoludur [20]. Bu yolun ilk enzimi, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz'dır.



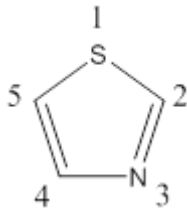
İkinci enzimi, 6-fosfoglukonat dehidogenaz enzimidir.



Glutatyon redüktaz, iki protein altünitesi içerir [21]. Her biri aktif bölgesinde flavin (FAD) içerir. NADPH, FAD'ı indirger ve elektronlarını aktif bölgedeki iki sistein artığı arasındaki disülfid köprüsüne (-S-S-) aktarır. İki -SH grubu oluşur ve GSSG ile reaksiyona girer ve GSSG'yi 2GSH'a indirger ve tekrar sisteinler arasındaki disülfid köprüsü oluşur.

2.3.Tiyazol

Tiyazol veya 1,3-tiyazol azot ve kükürt atomu içeren beşli halka yapısına sahip heterosiklik bileşiktir (Şekil 2.3). Tiyazolün kendisi piridin benzeri bir kokuya sahip soluk sarı bir sıvı olup moleküler formülü $\text{C}_3\text{H}_3\text{NS}$ 'dir [22]. Tiyazol halkası, vitamin tiaminin (B_1) bir bileşeni olarak dikkate değerdir.

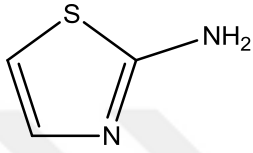


Şekil 2.3 Tiyazol'un yapısı

2.4. 2-Aminotiyazol

2-Aminotiyazol, bir tiyazol çekirdeğine sahip olan heterosiklik bir amindir (Şekil 2.4). Aynı zamanda bir sıklık izotiyooüre olarak da kabul edilebilir. Piridine benzer bir kokuya sahiptir ve suda, alkollerde ve dietil eterde çözünür. Genel olarak kükürt ilaçları, biyositler, mantar öldürücüler, boyalar ve kimyasal reaksiyon

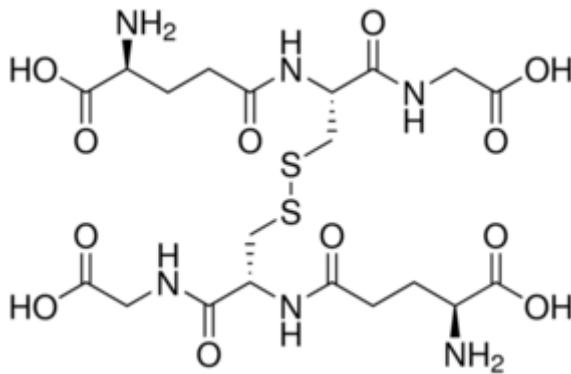
hızlandırıcıları dahil birçok bileşiğin sentezi için bir başlangıç noktası olarak kullanılır. 2-Aminotiyazol, hipertiroidizm tedavisinde tiroid inhibitörü olarak kullanılabilir ve antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Alternatif olarak, bileşiğin asit tartrat tuzu kullanılabilir. Prion enfekte nöroblastom hücre hatları kullanan son çalışmalar, aminotiyazolün prion hastalıkları için terapötik bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermiştir [23].



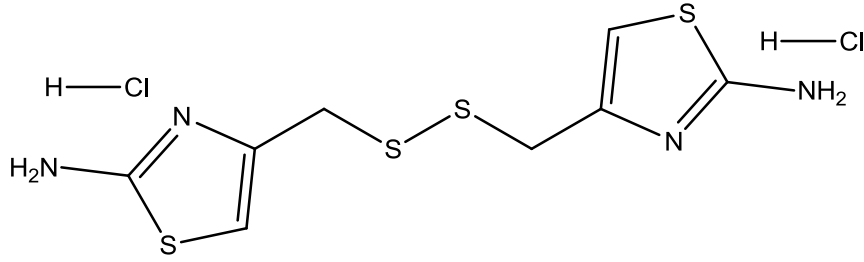
Şekil 2.4 2-Aminotiyazol'un yapısı

2.5. 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklörür

4,4'- (disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklörür (DMTA), Kırılmış tarafından sentezlenmiş ve Kırılmış ve arkadaşları tarafından yapısı aydınlatılmış orijinal bir maddedir [7]. Yapısında disülfid köprüsü içeren, bu yönüyle GR'nin substratı olan GSSG (Şekil 2.5)'ye benzeyen, 2-aminotiyazol türevidir (Şekil 2.6). ($C_8H_{10}N_4S_4 \cdot 2HCl$, $MW = 290,46 + 72,92 = 363,38$ g/mol).



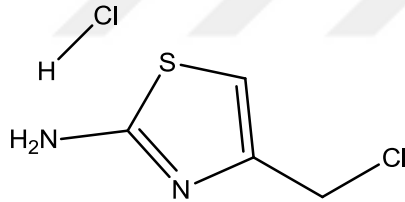
Şekil 2.5 Okside glutatyon'un (GSSG) yapısı



Şekil 2.6 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür'ün yapısı

2.6. 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol Hidroklorür

2-Amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür (ACT)) ise disülfid köprüsü içermeyen 2-aminotiyazol türevidir (Şekil 2.7). ($C_4H_5ClN_2S.HCl$, $MW=148,61+36,46=185,07$ g/mol).



Şekil 2.7 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür'ün yapısı

2.7. 2-Aminotiyazol'lerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Literatüre baktığımızda, DMTA ve ACT'nin GR aktivitesi üzerine etkileri konusunda doğrudan bir çalışma bulunmamıştır. Bununla birlikte, 2-aminotiyazol türevlerinin veya tiyazol türevlerinin diğer enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri üzerine çalışmalar bulunmuştur. Mesela, 2-aminotiyazol türevleri, kinurenin-3-hidroksilaz ve sikline bağımlı kinaz enzimlerine karşı inhibitör görevi görür [6]. Ayrıca, 2-aminotiyazol-4-karboksamid bileşiği, serin / treonin protein kinaz (CHK1) inhibitörlerinin yeni bir sınıfını oluşturmuştur [24]. Başka bir çalışmada, $10 \mu M$ 'lik bir

konsantrasyonda (4 - ((4- (4-klorofenil) -2-tiyazolil) amino) fenol bileşiği) sfingosin kinaz için deney koşullarında ılımlı bir inhibitördür (% 15-25 inhibisyon) [25]. Başka bir çalışma, 3- (5- (4- (benziloksi) -3-metoksifenil) -1- (4- (4-bromofenil) tiyazol-2-il) -4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il) -2H -kromen-2-on'un potansiyel bir tirozinaz inhibitörü olduğu gösterilmiştir [26].



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) dihidroklorür (DMTA), Kırılmış tarafından sentezlenmiş ve kullanılmıştır [7]. 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol hidroklorür (ACT) (SYX00295), Okside glutatyon (G4501), β -Nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat redükte (N1630), Glutatyon redüktaz (G3664), sığır serum albumin, sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum klorür (NaCl), bakır II sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Folin-Ciocalteu, potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), saf su ve trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich'ten alınmıştır. Analitik saflıkta kimyasallar kullanılmıştır.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

UV-1800 UV-VİS Shimadzu Scientific Instruments İnkübatörlü Spektrofotometre, Thermo Scientific Orion 2-Star Benchtop pH Metre, Regal Cool 4542A NF No Frost Buzdolabı, Velp Scientifica Vortex (Girdap Karıştırıcı), Protech Etüv, Ohaus Adventurer Pro Elektrikli Analitik Terazî.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (100 mM, pH=7,6) : 3,865 g KH_2PO_4 ve 12,471 g K_2HPO_4 saf suda çözünüp saf su ile 1L' ye yakın tamamlanır. 1M HCl ve 1M NaOH ile çözeltinin pH' sının 7,6 olması sağlanır ve daha sonra üzeri saf su ile 1L' ye tamamlanır.

1M HCl çözeltisi: % 37'lik stok HCl'den saf su üzerine 8,3 mL HCL (stok, derişik) eklenip saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

1M NaOH çözeltisi: 4 g NaOH alınıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Glutasyon Redüktaz (GR) Çözeltisi (~10 U/mL) (0,026 mg/mL): 500 U'likten 100-300 U /mg'lıktan 150 µL GR alınıp tüpte bulunan 7350 µL fosfat tamponun (100 mM, pH=7,6) üzerine eklenir. Veya 50 µL stok GR alınıp üzerine 2450 µL fosfat tamponun (100 mM, pH=7,6) üzerine eklenir.

Serum Fizyolojik (% (w/v) 0,9 NaCl): 0,9 g NaCl tartılarak üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Standart Protein Çözeltisi (0,5 mg/mL): 0,025 g sığır albümini tartılır ve üzeri serum fizyolojik ile yavaşça karıştırılarak (köpürmemesi için) 50 mL'ye tamamlanır. Veya % 30 albuminden 83,3 µL alınıp 50 mL'lik balon jodede yarısından fazlası serum fizyolojik ile dolu olan çözeltiliye eklenir. Yavaşça karıştırılarak (köpürmemesi için) yine serum fizyolojik ile 50 mL'ye tamamlanır.

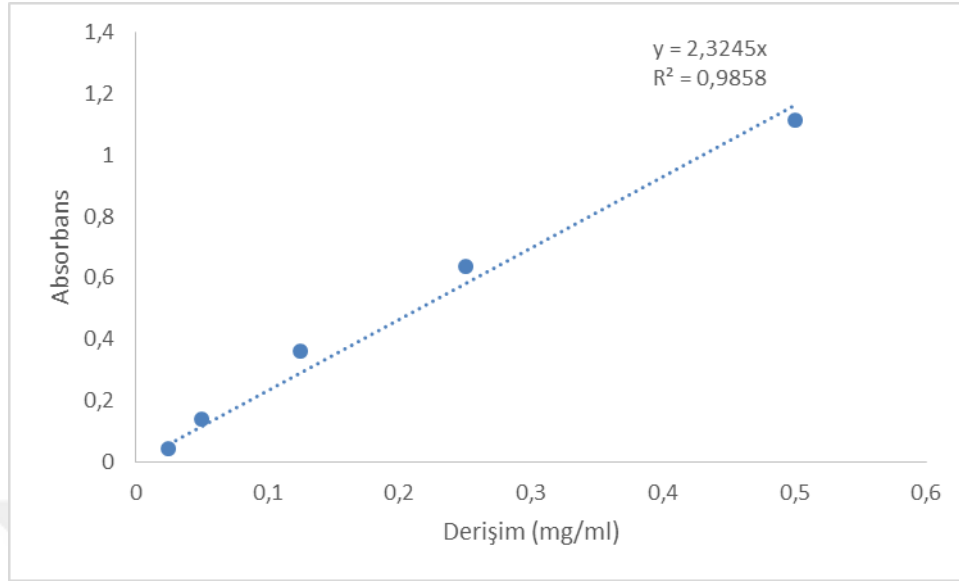
3.2.2. 2-Aminotiyazol Türevlerinin Enzim Aktivitesine Etkisi

DMTA ve ACT maddeleri saf su içinde hazırlanmıştır. 0,0100 g madde alınarak üzerine 2 mL saf su eklenmiştir. Böylece 5000 ppm (mg/L) etken madde çözeltisi hazırlanmıştır. Bu etken maddeden 0, 25, 50, 100, 250, 500 ppm derişimlerinde ve yaklaşık 0,026 mg protein/mL derişiminde 700 µL GR enzim çözeltisi oda sıcaklığında (25 °C) 10 dk etkileştirilmiştir. Kontrolde 300 µL saf su ve 700 µL GR enzim çözeltisi etkileştirilmiştir [27]. Bu etkileşimden sonra GR aktivitesi 37 °C'de 340 nm'de ölçülmüştür.

3.2.3. Protein Tayini

Glutasyon redüktaz'ın protein içeriği Lowry ve ark (1951) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir [28]. Protein tayini için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- 1) Çözelti A: Bu çözelti için 2 g Na_2CO_3 ve 0,1 M NaOH (0,4 g) çözülerek saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 2) Çözelti B: 0,5 g. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve % 1'lik tri sodyum sitrat. 2 H_2O (1 g) çözülerek saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı an hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)
- 4) Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 5) Standart Protein Çözeltisi: 1 mL'sinde 0,5 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisinde hazırlanmıştır.
- 6) Standart Protein Grafiğinin Çizimi: 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla standart protein çözeltisinden (0,5 mg/mL) 0; 25; 50; 125; 250; 500 μL eklenip serum fizyolojik ile 0,5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tüplerin protein derişimleri sırasıyla 0; 0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL'ye karşılık gelir. Her tüpe 2,5 ml C çözeltisi ilave edilip, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,25 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur. Okunan bu absorbanslar standart protein derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Standart protein grafiği

3.2.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Prensip: GR aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'a yükseltgenmesi esnasındaki absorbans değişiminin 340 nm'de okunmasına göre belirlenir [29].

Ayırçalar:

1-100mM Potasyum Fosfat Tamponu: (pH=7,6)

K₂HPO₄ 12,471 g

KH₂PO₄ 3,865 g

Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2-Günlük Tampon

1mM GSSG ve 0.12 mM NADPH'ın tampon içinde çözülmesiyle hazırlanır.

0.0165 g GSSG + 0.0027 g NADPH 27 mL 100 mM potasyum fosfat tamponu içinde çözülür.

Yöntem: GR aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.1'de gösterilen ayırçalar konmuştur.

Çizelge 3.1 Glutasyon redüktaz yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Saf su	100	-
Günlük tampon	900	900
Örnek	-	100

Çalkalanır ve 37 °C’de 340 nm’de 0. ve 5. dk. köre karşı absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

$$\text{GR Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_o}$$

ΔOD =Zamana bağlı absorbans farkı

t= Zaman

V_t = Toplam hacim

V_o =Örnek hacmi

6,22= 1 cm’lik ışık yolunda 1nmol NADPH’ın verdiği absorbans değeri

GR Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = GR Aktivitesi / Protein Miktarı

3.2.5. İstatistik

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. Her bir 2-aminotiyazol türevi etkisinde derişimler arasındaki aktivite düzeylerini karşılaştırmak için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ardından Student Newman-Keuls'un testi uygulanmıştır. SPSS in 22 sürüm istatistik yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır. Farklılıklar, $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

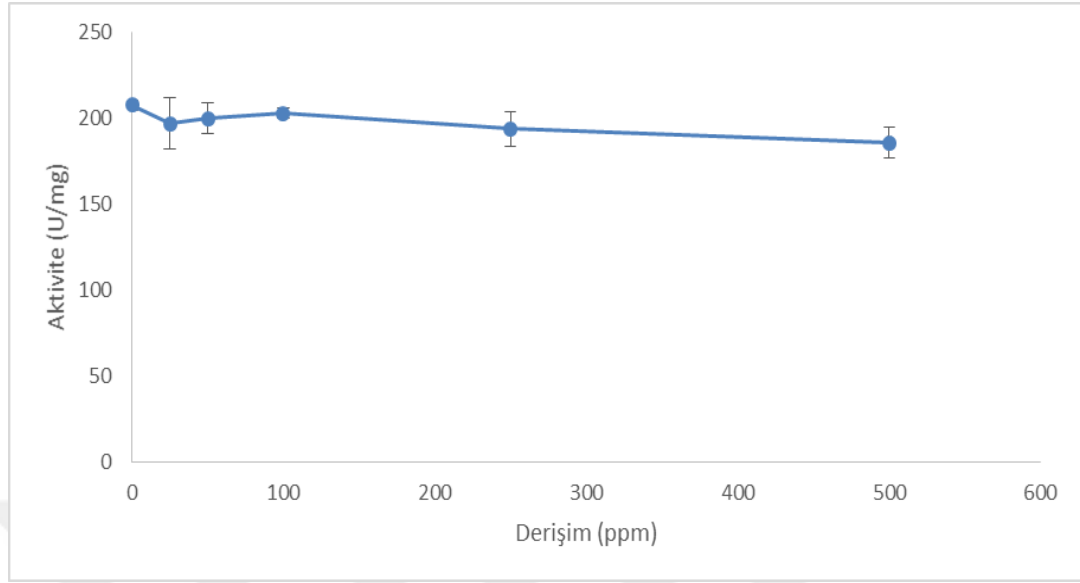
4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. 4,4'- (Disülfandilbis(metilen)) bis (tiyazol-2-amin) Dihidroklorür'ün Glutasyon Redüktaz ile Etkileşimi**

DMTA'nın 0'dan 500 ppm'e kadar hazırlanan çözeltilerinin GR üzerine etkisi ölçülmüştür. Enzim aktivite ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Aktivite-derişim grafiği ise Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı DMTA derişimlerinin GR aktivitesi üzerine etkisi

Derişim (ppm)	Aktivite±standart sapma(U/mg)
0	208±3 ^a
25	197±15 ^a
50	200±9 ^a
100	203±3 ^a
250	194±10 ^a
500	186±9 ^a

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Çizelgedeki “a” harfi kontrole göre aktivite düzeyleri arasında istatistiksel ayırım olmadığını göstermektedir ($p > 0.05$, $n=3$).



Şekil 4.1 DMTA'nın GR aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 incelendiğinde DMTA derişimi artarken GR enzim aktivitesinde, hafif bir düşüşün olduğu fakat kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olmadığı görülmektedir ($p>0.05$, $n=3$). DMTA'nın 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde GR enzim aktivitesindeki yüzde değişimler sırasıyla -5,29 ; -3,85 ; -2,40 ; -6,73 ve -10,58 olduğu hesaplanmıştır.

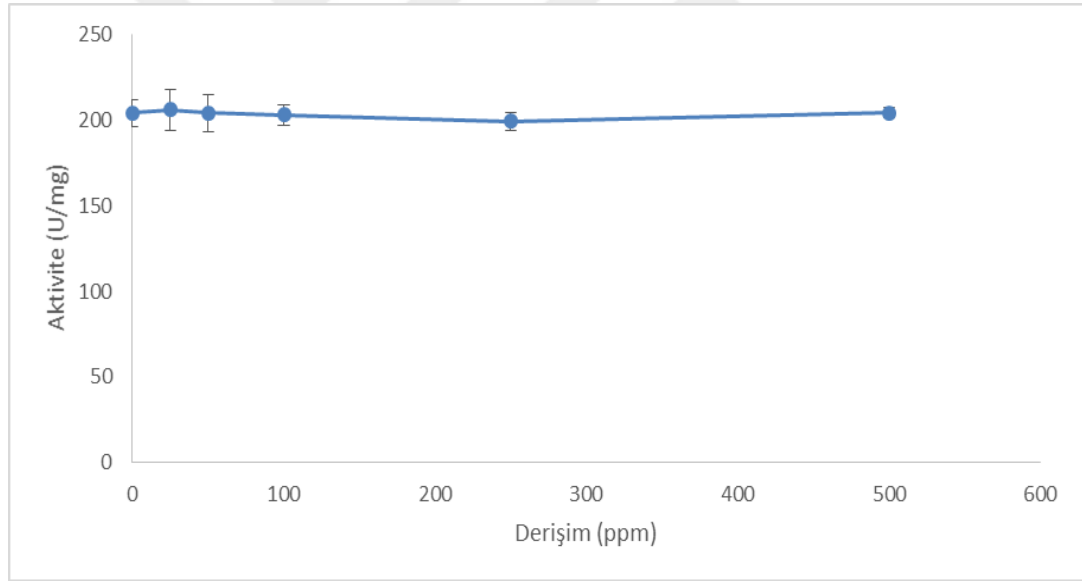
4.1.2. 2-Amino-4- (klorometil) tiyazol Hidroklorür'ün Glutasyon Redüktaz ile Etkileşimi

ACT'nin 0'dan 500 ppm'e kadar hazırlanan çözeltilerinin GR üzerine etkisi ölçülmüştür. Enzim aktivite ve standart sapma değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Aktivite-derişim grafiği ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı ACT derişimlerinin GR aktivitesi üzerine etkisi

Derişim (ppm)	Aktivite±standart sapma(U/mg)
0	204±8 ^a
25	206±12 ^a
50	204±11 ^a
100	203±6 ^a
250	199±5 ^a
500	204±3 ^a

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Çizelgedeki “a” harfi kontrole göre aktivite düzeyleri arasında istatistiksel ayırım olmadığını göstermektedir ($p > 0.05$, $n=3$).



Şekil 4.2 ACT'nin GR aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2 incelendiğinde ACT derişimi artarken GR enzim aktivitesinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel açıısından önemli bir değişimin olmadığı görölmektedir ($p > 0.05$, $n=3$). ACT'nin 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde GR enzim aktivitesindeki yüzde değişimler sırasıyla +0,98 ; 0,00 ; -0,49 ; -2,45 ve 0,00 olduğu hesaplanmıştır.

4.2. Tartışma

DMTA ve ACT'nin GR aktivitesi üzerine etkileri konusunda literatüre baktığımızda, şimdiye kadar doğrudan bir çalışma bulunmamıştır. Bununla birlikte, 2-aminotiyazol türevlerinin veya tiyazol türevlerinin diğer enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri üzerine çalışmalar bulunmuştur. 2-aminotiyazol türevleri, kinurenin-3-hidroksilaz ve sikline bağımlı kinaz enzimlerine karşı inhibitör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir [6]. Ayrıca, 2-aminotiyazol-4-karboksamid bileşiği, serin / treonin protein kinaz (CHK1) inhibitörlerinin yeni bir sınıfını oluşturmuştur [24]. Başka bir çalışmada, 10 µM'lik bir konsantrasyonda (4 - ((4- (4-klorofenil) -2-tiyazolil) amino) fenol bileşiği) sfingosin kinaz için deney koşullarında ılımlı bir inhibitör olduğu bildirilmiştir (% 15-25 inhibisyon) [25]. Başka bir çalışma, 3- (5- (4- (benziloksi) -3-metoksifenil) -1- (4- (4-bromofenil) tiyazol-2-il) -4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il) -2H -kromen-2-on'un potansiyel bir tirozinaz inhibitörü olduğu rapor edilmiştir [26].

Yapılan çalışmada, GR aktivitesi üzerine bazı 2-aminotiyazol türevleri olan DMTA, ve ACT'in olan etkileri incelenmiştir.

DMTA yapısında disülfid köprüsü içermektedir, GR'nin substratı olan GSSG ise disülfid köprüsü içermektedir. DMTA inhibisyon yapabilecek potansiyeldedir. Yapılan deneyler sonucunda, DMTA'nın 500 ppm etkisinde GR enzim aktivitesindeki yüzde -10,58 gibi nisbi derecede bir inhibisyon yaptığı hesaplanmıştır. Canlı hücrelerde böyle bir inhibisyonun oluşması durumunda GSH oluşamayacaktır. Dolayısıyla insan hücrelerinde, uygun fonksiyonların korunmasında ve oksidatif stresin önlenmesinde bir eksiklik oluşacağını düşünmekteyiz. Fakat, ACT'nin GR enzim aktivitesinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel açıısından önemli bir değişiklik yapmadığı tespit edildi. ACT maddesinin DMTA'ya göre GR üzerinde etkinliğinin daha zayıf olduğunu düşünmekteyiz.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER**5.1. Sonuçlar**

- 1) DMTA derişimi artarken GR enzim aktivitesinde, hafif bir düşüşün olduğu gözlemlenmiştir.
- 2) DMTA'nın 500 ppm etkisinde GR enzim aktivitesindeki yüzde -10,58 gibi ılımlı derecede bir inhibisyon olduğu belirlenmiştir.
- 3) ACT derişimi artarken GR enzim aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir.
- 4) ACT'nin önemli bir inhibisyon yapmadığı belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

- 1) Farklı sentez maddelerin GR enzimi üzerine etkileri araştırılabilir.
- 2) Çalışılan 2-aminotiyazol türevlerinin GR enzimi dışında diğer enzimler üzerine etkileri araştırılabilir.
- 3) Sentez maddelerin etkilerinin değerlendirilmesinde *in vitro* çalışmanın yanında *in vivo* çalışmalarda yapılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] B. Halliwell ve J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals In Biology And Medicine*. Third Edition, New York: Oxford University Press, 1999.
- [2] S. Ghaemmaghami, B.C.H. May, A.R. Renslo ve S.B. Prusiner, “Discovery of 2-aminothiazoles as potent antiprion compounds”, *Journal of Virology*, vol. 84, no. 7, pp. 3408–3412, 2010.
- [3] H.L. Siddiqui, M. Zia-Ur-Rehman, N. Ahmad, G.W. Weaver ve P.D. Lucas, “Synthesis and antibacterial activity of bis[2-amino-4-phenyl-5-thiazolyl] disulfides”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 55, no. 7, pp. 1014–1017, 2007.
- [4] E.A. Kesicki, M.A. Bailey, Y. Ovechkina, J.V. Early, T. Alling, J. Bowman, E.S. Zuniga, S. Dalai, N. Kumar, T. Masquelin, P.A. Hipskind, J.O. Odingo ve T. Parish, “Synthesis and evaluation of the 2-aminothiazoles as anti- tubercular agents”, *Plos One*, 11(5): e0155209, 2016.
- [5] P. Lin, R. Hou, H. Wang, I. Kang, ve L. Chen, “Efficient Synthesis of 2-Aminothiazoles and Fanetizole in Liquid PEG-400 at Ambient Conditions”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 56, no. 3, pp. 455–458, 2009.
- [6] K.S. Kim, S.D. Kimball, R.N. Misra, D.B. Rawlins, J.T. Hunt, H.Y. Xiao, S. Lu, L. Qian, W-C. Han, W. Shan, T. Mitt, Z.W. Cai, M.A. Poss, H. Zhu, J.S. Sack, J.S. Tokarski, C.Y. Chang, N. Pavletich, A. Kamath, W.G. Humphreys, P. Marathe, I. Bursuker, K.A. Kellar, U. Roongta, R. Batorsky, J.G. Mulheron, D. Bol, C.R. Fairchild, F.Y. Lee, ve K.R. Webster, “Discovery of aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities”, *J. Med. Chem*, vol. 45, no. 18, pp. 3905–3927, 2002.
- [7] H. Karabıyık, C. Kırılmış ve H. Karabıyık, “Geometry dependence of electron donating or accepting abilities of amine groups in 4,4’disulfanediylbis(methylene)dithiazol-2-amine: Pyramidal versus planar”, *Journal of Molecular Structure*, vol. 1141, pp. 650-659, 2017.
- [8] E. Keha, ve İ. Küfrevioğlu, *Biyokimya*. Ankara: Akif Yayınevi, 2011.
- [9] G. Bingöl, *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1977.
- [10] Ç. Kolancı, *Temel ve Klinik Biyokimya*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2009.
- [11] H. Yazar, *Enzimler*. Sakarya: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya, 2015.
- [12] T. Ası, *Tablolarla Biyokimya*. Ankara, 1999. <http://veterinary.ankara.edu.tr/-fidancı> [Erişim tarihi: 15-Mart- 2019]
- [13] M. Atasagüngil, *Enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1965.
- [14] A. Altıntaş, *Enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, 2001.
- [15] E. Kefeli, *ÖABT Fen Bilimleri Öğrt. Kitabı*. Ankara: Lider Yayınları, 2017.
- [16] E. Ulakoğlu Zengin, *Enzimler*. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2005.
- [17] J. Berg, j. Tymoczko ve L. Stryer, *Biyokimya* . Ankara: Palme yayıncılık, 2014.
- [18] Ş. Pekyardımcı, *Enzimler ve Enzim Kinetiği*. Ankara, 1995.

- [19] Ö. İmamoğlu, *Enzimler*. Muğla: Muğla Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2008.
- [20] B. Chance, H. Sies ve A. Boveris, “Hydroperoxide metabolism in mammalian organs”, *Physiol Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 527-605, 1979.
- [21] R. Thienne, E.F. Pai, R.H. Schirmer ve G.E. Schultz, “Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution”, *J. Mol. Biol.*, vol. 152, pp. 763–782, 1981.
- [22] T. Eicher ve S. Hauptmann, *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications*. ISBN 978-3-527-30720-3, 2003.
- [23] A. Gallardo-Godoy, J. Gever, K.L. Fife, B.M. Silber, S.B. Prusiner ve A.R. Renslo "2-Aminothiazoles as therapeutic leads for prion diseases", *J Med Chem.*, vol. 54, no. 4, pp. 1010–21, doi:10.1021/jm101250y. PMC 3041857. PMID 21247166, Feb 24, 2011.
- [24] X. Huang, C.C. Cheng, T.O. Fischmann, J.S. Duca, M. Richards, P.K. Tadikonda, P.A. Reddy, L. Zhao, M.A. Siddiqui, D. Parry, N. Davis, W. Seghezzi, D. Wiswell ve G.W. Shipps Jr, “Structure-Based Design and Optimization of 2-Aminothiazole-4-Carboxamide as a New Class of CHK1 Inhibitors”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, pp. 2590–2594, 2013.
- [25] D. Vogt, J. Weber, K. Ihlefeld, A. Brüggerhoff, E. Proschak ve H. Stark, “Design, Synthesis and Evaluation of 2-Aminothiazole Derivatives as Sphingosine Kinase Inhibitors”, *Bioorgan. Med. Chem.*, vol. 22, pp. 5354–5367, 2014.
- [26] A. Saeed, P.A. Mahesar, P.A. Channar, Q. Abbas, F.A. Larik, M. Hassan, H. Raza ve S.Y. Seo, “Synthesis, Molecular Docking Studies of Coumarinyl-Pyrazolinyl Substituted Thiazoles as Non-Competitive Inhibitors of Mushroom Tyrosinase”, *Bioorg. Chem.*, vol. 74, pp. 187–196, 2017.
- [27] H. Karadag ve R. Bilgin, “Effect of cyprodinil and fludioxonil pesticides on human superoxide dismutase”, *Asian J. Chem.*, vol. 22, no. 10, pp. 8147-8154, 2010.
- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr ve R.J. Randall, “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265–275, 1951.
- [29] I. Carlberg ve B. Mannervik, “Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, no. 14, pp. 5475–5480, 1975.

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emine EROĞLU ÇETİN
Doğum Yeri : Adıyaman - Besni
Doğum Tarihi :1993
Medeni Hali :Evli
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta : erogluemine379@gmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Kimya Anabilim Dalı	Adıyaman Üniversitesi	2019
Lisans	Fen Bilgisi Öğretmenliği	Adıyaman Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Adıyaman Lisesi	2010

Yayınlar

H. Karadağ, E. Eroglu, C. Kırılmış, “Influences of some 2-aminothiazole derivatives on glutathione reductase activity”, in *5th International Conference on New Trends in Chemistry (5th ICNTC 2019)*, Athens, Greece, 22 – 24 April 2019, pp. 20 (Oral Presentation).

H. Karadağ, E. Eroğlu, C. Kırılmış, “Determination of glutathione reductase activity changes exposed to some 2-aminothiazole derivatives”, *Cumhuriyet Science Journal*, vol.40, no.1, pp.136-140, 2019. DOI: 10.17776/csj.504690.