

Benzen'in Karaciğer Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesine *In Vitro* Etkisi

Fatma ARI , Egemen DERE

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Bursa, TÜRKİYE

Received: 23.07.2002, Accepted: 17.10.2002

Özet: Bu çalışmada, karsinogen ve toksik bir ajan olarak bilinen benzenin karaciğer Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi üzerine etkisi *in vitro* çalışıldı. GST enzim aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen-glutasyon (CDNB-GSH) konjugatının oluşumu spektroskopik izlenerek tayin edildi.

Sonuçlarımız, GST konjugasyon aktivitesi ile benzen derişimi ve tepkime zamanı arasında ters bağlantı olduğunu gösterdi. Enzimin CDNB için Vmax ve Km değerlerinde farklılıklar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, GST enziminin CDNB-GSH konjugasyon tepkimesini benzenin karışık inhibisyon mekanizması ile inhibe ettiğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Benzen, Glutasyon S-transferaz

The *In Vitro* Effect of Benzene on Liver Glutathione S-transferase Enzyme Activity

Abstract: In this study, the effect of benzene which is known as a carcinogen and toxic agent on liver Glutathione S-transferase (GST) enzyme was studied *in vitro*. GST enzyme activity was determined by monitoring the formation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene –Glutathione (CDNB-GSH) conjugate by spectroscopic method.

Our results showed that there is an inverse correlation between GST conjugation activity and concentration of benzene, as well as reaction time. Variations in the Vmax and Km value for CDNB of

the enzyme was observed. The results obtained showed that GST activity for CDNB-GSH conjugation reaction was inhibited with mixed reaction mechanism by benzene.

Key Words: Benzene, Glutathione S-transferase

1. Giriş

Glutasyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18), detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Bu basamakta, Glutasyon (GSH) ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir [1]. GST, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid, mollusk ve birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. En sık rastlandığı dokular, başta karaciğer olmak üzere, incebağırsak, kalınbağırsak, böbrek, akciğer, meme, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok organın sitosolü ve membranıdır [2].

GST, çok substratlı bir enzimdir. GSH'un kosubstratına özgül olan bir G bölgesi ve hidrofobik elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesi vardır. GSH'un tiyol grubu, cebin açık olan kısmına dönüktür. Diğer substratlara bağlanan grup, bu tiyol grubudur [3]. GST, besinlerle birlikte alınan toksik maddelerin eliminasyonunu sağladığı gibi, prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak taşınmasını da sağlamaktadır [4]. Ayrıca reaktif elektrofilik bileşiklerin vücuda zarar vermesini, aynı tür bileşikleri birbirine kovalent bağlayarak ta önleyebilmektedir [5]. GST'in etkilediği bu ksenobiyotik akseptörler içinde nitrojenli, halojenli bileşikler, organofosfatlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar yer almaktadır. Bu moleküller için ilk biyolojik reseptör, endoplazmik retikulum ve elektron taşıma sisteminin bir kısmını oluşturan mikrozomal oksijenazlardır. Ksenobiyotikler, bu enzim sistemi ile oksijenlenir, oksijenatlı ürünlerin sonraki mekanizması, daha fazla oksijenasyon ve bu ürünlerin suda daha kolay çözünür hale gelmesidir [6].

Benzen, aromatik hidrokarbonların önemli bir üyesidir [7]. Çevreye insan ve doğanın aktiviteleri sonucu karışan benzen, toksik bir madde olması yanında, karsinojen olarak da bilinmektedir. Benzen, endüstride sıkça kullanılan stiren, fenol, sikloheksan, alkilatlar ve anilin gibi birçok kimyasal madde sentezinde, tüketim mallarında kimyasal kaynak, ara ürün ve çözücü olarak, lastik, ayakkabı, kozmetik, deterjan, zamk, boya sanayiinde, ziraatta ve otomobil yakıtlarında sıkça kullanılmaktadır [7]. Vücuda giren

benzen, başta karaciğer olmak üzere, kemik iliği, kas, bağırsak, akciğer, beyin, dalak ve testis gibi birçok dokuya ulaşmakta ve özellikle yağ ve yağlı dokularda depo edilmektedir. [8]. Benzenin kendisinden çok, onun metabolitleri (hidrokinon, fenol, benzokinon, mukonaldehid) ve bunların ara etkileşimleri, toksisite ve kanserojenitede daha etkilidir [9]. Bu moleküller, DNA, protein, karbohidrat ve lipidlere zarar verebilmektedir. Kronik benzen intoksikasyonu sonucu, trombositopeni, lökopeni, anemi ve pansitopeni meydana gelirken, nadiren neoplastik hastalıklar meydana gelmektedir [7]. Diğer biyolojik etki, kromozomal aberasyonlar, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve polikromatik eritrositlerin oluşumudur [10]. İnsanda en önemli etki, aplastik anemiye neden olan kemik iliği depresyonudur [7]. Benzen metabolizması, başlıca karaciğerde Sitokrom P450 IIE1 enzim sistemi aracılığı ile gerçekleşmekte olup, bir seri reaktif metabolit oluşumunu içermektedir [11]. Benzenin metabolik oksidasyonunun ilk ürünü, kararsız bir bileşik olan benzen oksittir. Sitokrom P 450 sistemi ile oksijenin molekül içine taşınması sonucu oluşan benzen oksit, fenol oluşturmak üzere yeniden düzenlenir [11]. Fenol, epoksinin spontan ve nonenzimatik düzenlenmesi ile, hidrokinon ve katekol ise, fenolün hidroksilasyonu ile oluşmaktadır. Glutatyon ile konjugasyon, ilave bir detoksifikasyon metabolik yoludur. Fenol, hidrokinon, katekol ve onun daha sonraki hidroksilasyon ürünü olan 1,2,4-trihidroksibenzen; etersülfat ve glukuronik asit ile birleştirilir. Bu ara ürünler, idrarda etersülfat ve glukuronidler şeklinde atılabilmektedir [12]. Bu çalışmada, 2.5, 5.0 ve 10 mM lık benzen derişimlerinin, karaciğer glutatyon S-transferaz (GST) enziminin, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratına karşı aktivitesi üzerine etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. Ayrıca benzen ile inkübasyon süresinin aktivite üzerine etkisi de araştırılmıştır.

2. Deneysel Yöntem

2.1. Kullanılan Kimyasal maddeler:

Sodyum Karbonat (%2) (merck), Bakır sülfat (%1) (merck), Sodyum potasyum tartarat (%2) (sigma), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (sigma), Bovine serum albumin (sigma), Potasyum hidrojen fosfat (merck), Sodyum hidrojen fosfat (merck), Etil alkol (%99) (merck), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (merck), Glutatyon (merck), At karaciğer Glutatyon S-transferaz enzimi (sigma), Benzen (%99.5) (merck).

Enzimsiz tam bir deney karışımı, kontrol olarak kullanıldı. Kuvars deney küvetine ilk 3 çözelti konuldu ve karıştırıldı. CDNB, GSH yokluğunda GST enzimini inhibe ettiği için ve enzim ilavesi ile katalitik tepkime hemen başlayacağı için, enzim en son ilave edildi ve karıştırıldı.

Inhibitörsüz Enzim Aktivite Tayini İçin Deney Karışımı

	Deney Tüpü	Kontrol
pH: 6.7,25 °C 10 mM. KP tamponu	1,67 ml.	1,67 ml.
5 mM. GSH (Tamponda taze hazırlandı)	0,20 ml.	0,20 ml.
CDNB (%99 etil alkolde) (mM)	0,08 ml.	0,08 ml.
GST 1µM (Tamponda taze hazırlandı)	0,05 ml.	—

Inhibitörlü Enzim Aktivite Tayini İçin Deney Karışımı

	Deney Tüpü
Benzen (Tamponda taze hazırlandı)	0,05 ml.
GST 1µM (Tamponda taze hazırlandı)	0,05 ml.
<i>Karıştırılıp, 5, 10, 15 dk. inkübe edilir.</i>	
pH: 6.7 ve 10 mM. KP tamponu	1,62 ml.
5 mM. GSH (Tamponda taze hazırlandı)	0,20 ml.
CDNB (%99 etil alkolde) (mM)	0,08 ml.

Her ölçüm, 3 tekrarlı olup, hesaplamalarda 3 tekrarın ortalaması kullanılmıştır. GST enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği GSH ile CDNB arasında tiyoeter bağının oluşmasının, CECIL 5000-spektrofotometrede 340nm. dalga boyunda izlenmesi ile tayin edildi [13,14]. Deneyler farklı CDNB derişimleri ile tekrar edildi.

Aktivite tayini için en uygun ölçüm süresi, enzim katalizli tepkimenin en yüksek düzeyde gerçekleştiği ve dengelendiği ana kadar olan süredir. Bu süre, birçok enzim katalizli tepkime için, genellikle 5 dakikadır. Özgül aktivite, aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı [13, 14].

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot C_{\text{protein}}} \cdot \Delta E / \Delta t \text{ (U / mg.)}$$

ϵ : Molar Soğurma Katsayısı ($10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V : Son hacim

C_{protein} : Enzim derişimi (mg/ml)

d : Işıık yolu (cm)

$\Delta E / \Delta t$: Birim zamanda (1 dk.) absorpsiyon farkı **v** : Kullanılan enzimin hacmi
İstatistiksel değerlendirme, Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney testleri uygulanarak, yapılırken [15], Protein tayini Lowry ve ark. (1951)'nin yöntemine göre Sığıır serum albumin standardı kullanılarak yapılmıştır [16].

3. Bulgular

Özgöl aktivite değerleri ve standart hatalar tablo1'de görölmektedir. Kontrol grubu ile farklı derişimlerde benzen uygulanan deney gruplarının GST enzimi spesifik aktivite değerleri incelendiğinde, benzen derişimi arttıkça, spesifik aktivitede bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Benzenin GST enzimi üzerindeki etkisi ve aktivitedeki azalma yüzdeleri incelendiğinde, GST enzimi aktivitesi; 2,5 mM benzen ile 5 dakikalık uygulama sonucunda %37, 10 dakikalık uygulama sonucunda %48, 15 dakikalık uygulama sonucunda ise %54'lük bir azalma göstermiştir. 5 mM benzen ile 5 dakikalık uygulama sonucunda %45, 10 dakikalık uygulama sonucunda %57, 15 dakikalık uygulama sonucunda ise %61'lik bir azalma göstermiştir. Son olarak, 10 mM benzen ile 5 dakikalık uygulama sonucunda %68, 10 dakikalık uygulama sonucunda %70, 15 dakikalık uygulama sonucunda ise %76'lık bir azalma göstermiştir. Aktivitedeki bu azalmalar, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

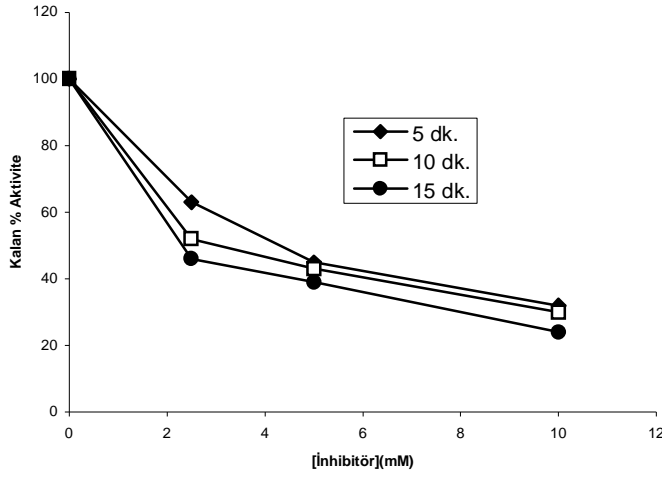
8 farklı substrat derişimindeki ortalama % aktivite düşüşleri ve inhibisyon dereceleri Tablo 2' de, grafik ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2. GST Enziminin Benzen ile Etkileşiminde Aktivasyon ve İnhibisyon Yüzdeleri

		Residüel (kalan) % Aktivite	% İnhibisyon
Zaman (dk.)	Enzim (Kontrol)	100	0
5	2,5 mM benzen	63	37
	5 mM benzen	45	55
	10 mM benzen	32	68
10	2,5 mM benzen	52	48
	5 mM benzen	43	57

	10 mM benzen	30	70
15	2,5 mM benzen	46	54
	5 mM benzen	39	61
	10 mM benzen	24	76

GST-benzen etkileşiminde elde edilen değerler, Lineweaver-Burk formülü esas alınarak, bilgisayar ortamında V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM benzen ile 5, 10 ve 15 dk'lık uygulamalar sonucunda hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri tablo 3 de, Lineweaver-Burk grafikleri şekil 2, 3 ve 4 de gösterilmiştir.



Şekil 1. İnhibitör Derişimine Göre Kalan % Aktivite Değişimi Grafiği

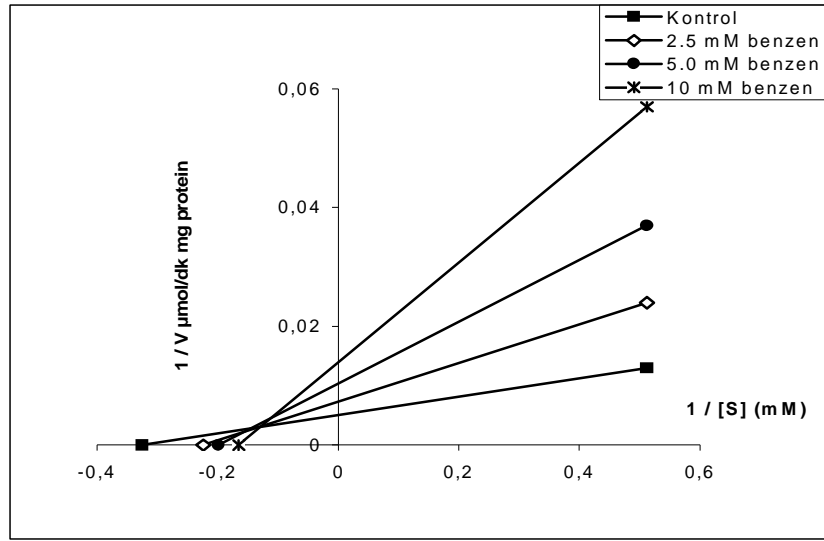
Tablo 3. GST Enziminin Benzen ile Etkileşiminde V_{max} ve K_m değerleri

		V_{max} $\mu\text{mol/dk mg protein}$	K_m (mM)
Zaman(dak)	Kontrol	195,07	3,08
5	2,5 mM benzen	134,67	4,46
	5 mM benzen	98,43	5,13
	10 mM benzen	73,91	6,06
10	2,5 mM benzen	111,22	4,54
	5 mM benzen	94,87	5,14
	10 mM benzen	69,05	6,31
15	2,5 mM benzen	97,24	4,60
	5 mM benzen	85,75	5,27
	10 mM benzen	56,14	6,46

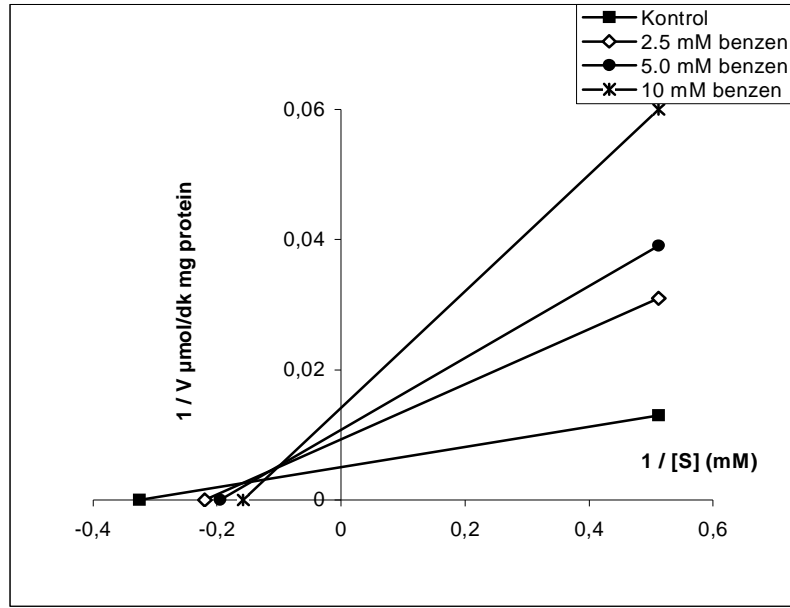
V_{max} : Enzimin maksimum aktivite gösterdiği andaki hızı K_m : Michaelis-Menten Sabiti

Bu çalışmada ayrıca, GST enziminin benzenin farklı sürelerde etkileşiminde, uygulama süresinin enzim aktivitesine etkisi de değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve değişik sürelerde benzen uygulanan deney gruplarının spesifik aktivite değerleri incelendiğinde, uygulama süresi artışı ile aktivitede azalma meydana geldiği görülmüştür.

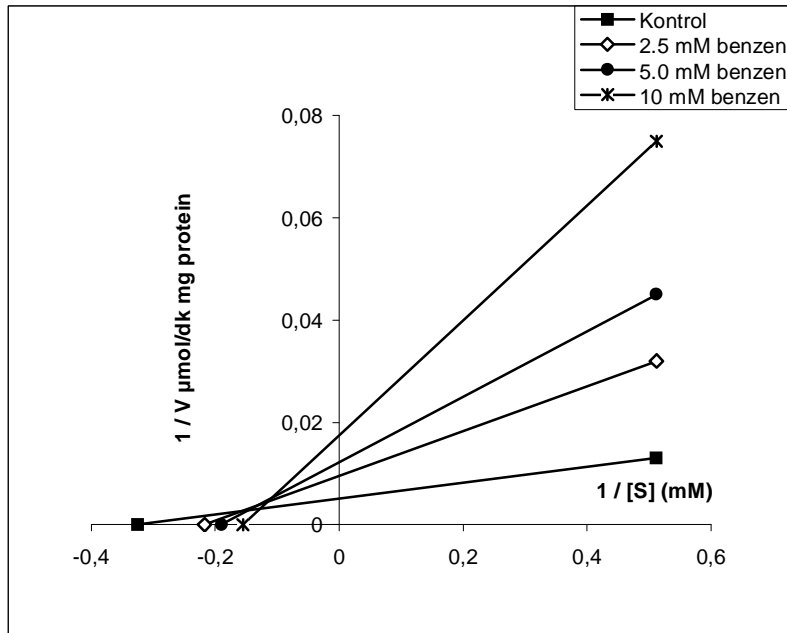
Uygulama süresine göre aktivitede meydana gelen değişimler incelendiğinde, 5 dakikalık benzen uygulamasında, bu değişme önemli seviyelerde gerçekleşmiştir. 10 ve 15 dakikalık uygulamalarda ise, 5 dakikaya kıyasla aktivite değişikliği daha az seviyelerde gerçekleşmiştir. Zamana bağlı bu aktivite değişimleri doğrusal olmamakla birlikte, istatistiksel açıdan sadece 5 ve 10 mM benzen uygulamalarında, ilk üç CDNB ve 62.5mM derişimde anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 2. GST Enziminin Benzen ile 5 dk. Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 3. GST Enziminin Benzen ile 10 dk. Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4. GST Enziminin Benzen ile 15 dk. Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği

Tablo 4 GST Enziminin Kontrol ve Benzen Uygulanmış Gruplarındaki Özgül Aktivite Değerlerinin Benzen Derişimine Göre Değişimi

CDNB		1,9531 *	3,9062	7,8125	15,625	31,250	62,500	125,000	250,000
Derişimi									
(mM)									
Kontrol		76,9±2,27 ^x	107,22±3,07 ^x	138,38±2,02 ^x	163,64±2,1 ^x	177,98±3,56 ^x	185,56±1,85 ^x	190,49±3,56 ^x	195,07±1,5 ^x
5 d a k i k a	2,5 mM benzen	40,86±1,48 ^y	62,85±1,23 ^y	84,18±0,9 ^y	103,64±2,57 ^y	117,9±1,75 ^y	126,23±3,23 ^y	130,33±1,43 ^y	134,67±0,61 ^y
	5 mM benzen	26,78±2,08 ^z	41,57±0,73 ^z	59,51±2,37 ^z	74,31±1,35 ^z	84,56±2,42 ^z	90,98±1,75 ^z	94,59±1,48 ^z	98,43±3,71 ^z
	10 mM benzen	17,65±0,9 ^t	28,78±1,44 ^t	42,31±1,07 ^t	53,89±1,67 ^t	61,83±1,76 ^t	67,34±0,74 ^t	70,36±1,75 ^t	73,91±1,68 ^t
Kontrol		76,9±2,27 ^x	107,22±3,07 ^x	138,38±2,02 ^x	163,64±2,1 ^x	177,98±3,56 ^x	185,56±1,85 ^x	190,49±3,56 ^x	195,07±1,5 ^x
10 d a k i k a	2,5 mM benzen	32,57±2,77 ^y	54,25±3,23 ^y	69,88±1,78 ^y	85,00±0,72 ^y	96,44±0,21 ^y	103,46±0,55 ^y	107,67±1,24 ^y	111,22±0,94 ^y
	5 mM benzen	25,94±1,35 ^z	40,28±3,07 ^z	57,54±1,28 ^z	71,42±1,28 ^z	81,86±0,94 ^z	87,83±3,85 ^z	91,02±2,17 ^z	94,87±1,98 ^z
	10 mM benzen	16,63±1,62 ^t	27,08±3,08 ^t	39,17±3,16 ^t	49,39±0,54 ^t	57,01±1,82 ^t	62,16±0,71 ^t	65,79±1,63 ^t	69,05±4,82 ^t
Kontrol		76,9±2,27 ^x	107,22±3,07 ^x	138,38±2,02 ^x	163,64±2,1 ^x	177,98±3,56 ^x	185,56±1,85 ^x	190,49±3,56 ^x	195,07±1,5 ^x
15 d	2,5 mM benzen	31,03±0,9 ^y	46,15±2,22 ^y	61,90±0,9 ^y	74,58±1,03 ^y	84,26±1,42 ^y	90,27±1,25 ^y	93,54±2,49 ^y	97,24±3,25 ^y

a k i k a	5 mM benzen	22,19±0,36 ^z	35,53±1,68 ^z	52,09±0,71 ^z	64,55±0,61 ^z	73,90±2,16 ^z	79,21±3,56 ^z	82,12±4,5 ^z	85,75±1,48 ^z
	10 mM benzen	13,38±1,03 ^t	21,91±0,74 ^t	31,09±0,36 ^t	39,43±1,03 ^t	45,97±1,27 ^t	51,05±2,41 ^t	53,19±4,16 ^t	56,14±1,23 ^t

* : Düşey ekseninde her grupta aynı harfle gösterilen veriler, 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir (x,y,z,t)

** : Tablodaki her veri, $\times 10^{-3}$ şeklinde ve 3 tekrarın ortalaması olup, GST enziminin spesifik aktivite değerlerini (U/mg) ifade etmektedir.

Tablo 5. GST Enziminin Kontrol ve Benzen Uygulanmış Gruplarındaki Özgül Aktivite Değerlerinin İnkübasyon Süresine Göre Değişimi

CDNB Derişimi (mM)		1,9531 *	3,9062	7,8125	15,625	31,250	62,500	125,000	250,000
Kontrol		76,9±2,27 ^x	107,22 ± 3,07 ^x	138,38 ± 2,02 ^x	163,64 ± 2,1 ^x	177,98 ± 3,56 ^x	185,56 ± 1,85 ^x	190,49 ± 3,56 ^x	195,07 ± 1,55 ^x
2,5 mM b e n z e n	5 dk.	40,86±1,48 ^y	62,85 ± 1,23 ^y	84,18 ± 0,90 ^y	103,64±2,57 ^y	117,9±1,75 ^y	126,23±3,23 ^y	130,33±1,43 ^y	134,67±0,61 ^y
	10 dk.	32,57 ± 2,77 ^z	54,25 ± 3,23 ^z	69,88 ± 1,78 ^z	85,00 ± 0,72 ^z	96,44 ± 0,21 ^z	103,46±0,55 ^z	107,67±1,24 ^z	111,22 ± 0,94 ^z
	15 dk.	31,03 ± 0,90 ^t	46,15 ± 2,22 ^t	61,90 ± 0,9 ^t	74,58 ± 1,03 ^t	84,26 ± 1,42 ^t	90,27 ± 1,25 ^t	93,54 ± 2,49 ^t	97,24 ± 3,25 ^t
Kontrol		76,9±2,27 ^x	107,22 ± 3,07 ^x	138,38 ± 2,02 ^x	163,64 ± 2,1 ^x	177,98 ± 3,56 ^x	185,56 ± 1,85 ^x	190,49 ± 3,56 ^x	195,07 ± 1,55 ^x
5 mM	5 dk.	26,78 ± 2,08 ^y	41,57 ± 0,73 ^y	59,51 ± 2,37 ^y	74,31 ± 1,35 ^y	84,56 ± 2,42 ^y	90,98 ± 1,75 ^y	94,59 ± 1,48 ^y	98,43 ± 3,71 ^y

b e n z e n	10 dk.	25,94 ± 1,35 ^y	40,28 ± 3,07 ^y	57,54 ± 1,28 ^y	71,42 ± 1,28 ^z	81,86 ± 0,94 ^z	87,83 ± 3,85 ^y	91,02 ± 2,17 ^z	94,87 ± 1,98 ^z
	15 dk.	22,19 ± 0,36 ^t	35,53 ± 1,68 ^t	52,09 ± 0,71 ^t	64,55 ± 0,61 ^t	73,90 ± 2,16 ^t	79,21 ± 3,56 ^t	82,12 ± 4,5 ^t	85,75 ± 1,48 ^t
Kontrol		76,9 ± 2,27 ^x	107,22 ± 3,07 ^x	138,38 ± 2,02 ^x	163,64 ± 2,1 ^x	177,98 ± 3,56 ^x	185,56 ± 1,85 ^x	190,49 ± 3,56 ^x	195,07 ± 1,55 ^x
10 mM b e n z e n	5 dk.	17,65 ± 0,90 ^y	28,78 ± 1,44 ^y	42,31 ± 1,07 ^y	53,89 ± 1,67 ^y	61,83 ± 1,76 ^y	67,34 ± 0,74 ^y	70,36 ± 1,75 ^y	73,91 ± 1,68 ^y
	10 dk.	16,63 ± 1,62 ^y	27,08 ± 3,08 ^y	39,17 ± 3,16 ^y	49,39 ± 0,54 ^z	57,01 ± 1,82 ^z	62,16 ± 0,71 ^z	65,79 ± 1,63 ^z	69,05 ± 4,828 ^z
	15 dk.	13,38 ± 1,03 ^t	21,91 ± 0,74 ^t	31,09 ± 0,36 ^t	39,43 ± 1,03 ^t	45,97 ± 1,27 ^t	51,05 ± 2,41 ^t	53,19 ± 4,16 ^t	56,14 ± 1,23 ^t

* : Düşey ekseninde her grupta aynı harfle gösterilen veriler, 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır (x,y,z,t)

**Tablodaki her veri, x 10⁻³ şeklindedir

4. Tartışma ve Sonuç

Benzen, insan ve doğanın aktiviteleri sonucu çevreye kontamine olur. Teknolojik, endüstriyel ve bilimsel alanda ihtiyaç duyulması sebebiyle de zararlı etkileri bilinmesine rağmen birçok ülkede kullanılmaktadır. Benzenin insan kaynaklı çevreye kontaminasyonu, petrol ve petrol ürünlerinin kullanımı, sigara dumanı, kömür ocakları, bazı tüketim malları ve endüstriyel alanda sıkça kullanılması ile olmaktadır.

Benzen metabolizmasında rol alan enzimlerden birisi de, GST enzimidir. Benzen oksitin GST aracılığı ile suda çözünen, dolayısıyla idrar ile atılabilecek son ürünlere dönüşümü, benzen metabolizmasında ayrı bir yoldur. Bu çalışmada, benzen uygulanmış enzimatik tepkimedeki GST'in özgül aktivitesi incelendiğinde, benzen uygulaması ile kontrole göre önemli azalmalar gerçekleşmiştir. GST enzimi, çok substratlı enzim olduğu için inhibitörlü ve inhibitörsüz enzimatik tepkimelerin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında farklı CDNB ve GSH derişimlerinde hesaplama yapılır. Bu çalışmadaki K_m ve V_{max} değerleri farklı derişimlerde kullanılan CDNB içindir. GSH derişimi sabit tutulmuştur (5 mM). Sonuçlarımız, benzen'in GST katalizli tepkime için inhibitör gibi davrandığını göstermiştir. Benzen derişimi, uygulama süresinden daha önemli bulunmuştur. 2,5 mM uygulama 5 ve 10 mM uygulamalar ile kıyaslandığında, daha önemli bulunmuştur. Yani ortamda 2,5 mM benzenin bulunması, GST enzimini önemli derecede inhibe edebilir, benzen derişiminin logaritmik artışları, bu inhibisyonu belirli ölçüde arttırmaktadır, ancak benzen derişimi 2 katına çıkmış olmasına rağmen, inhibisyon 2 katına çıkmamıştır (Tablo 4). 5 dk'lık benzen uygulamasındaki inhibisyon 10 ve 15 dk.'lık uygulamalar ile karşılaştırıldığında, önemli bulunmuştur (tablo 4). CDNB'nin 1,9531 mM, 3,9062 mM, 7,8125 mM derişimlerinin 5 mM ve 10 mM benzenli uygulamasında 5 dk ve 10 dk inkübasyonları, istatistiksel olarak önemsiz düşüşler gösterirken, 15,625 mM, 31,250 mM, 62,500 mM ve 250,00 mM'lık CDNB derişimleri önemli düşüşler göstermiştir. Bu sonuçlar, GST enzimi inhibisyonu için ortamda belirli bir miktar benzen varlığının yeterli olduğunu, ilk 5 dk'lık inkübasyonda gerçekleşen inhibisyonun maksimum %68 olarak 10 mM benzende, 15 dk.lık inkübasyonda ise maksimum %76 olarak 10 mM benzende gerçekleştiğini göstermiştir .

Bu çalışmada, GST enziminin kontrol tepkimesinde CDNB substratına karşı K_m değeri 3,08 mM, V_{max} değeri ise 195,07 U/mg protein bulunmuştur. Cıvciv karaciğeri ile yapılan bir çalışmada, GST'in CDNB'e karşı K_m değeri 588 μ M, V_{max} değeri ise 1,33

$\mu\text{mol}/\text{mgdk}$ olarak bulunmuştur [13]. Aynı araştırmacı, incebağırsaktan elde ettiği GST'in CDNB'e karşı K_m değerini $1111 \mu\text{M}$, V_{max} değerini $0,562 \mu\text{mol}/\text{mg dk}$ olarak bulmuştur [13]. Farklı çalışmalardaki K_m ve V_{max} değerleri arasındaki farklılık, kullanılan substratların derişimi, tür ve doku farklılıkları, deneylerin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda uygulanmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak sonuçlar birbiri ile paralellik göstermektedir. Farklı derişimlerde benzen uygulanmış tepkimelerde, GST enziminin CDNB' e karşı V_{max} ve K_m değerleri tablo 3'de gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre, V_{max} değerlerinde önemli bir azalma gerçekleşirken, K_m değerlerinde artış gerçekleşmiştir. Sonuçlarımız, benzenin GST üzerindeki etkisinin karışık tip inhibisyona uyum gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu inhibisyonda inhibitör, enzime aktif merkez dışında bir yerden bağlanır. Bir kısım enzim molekülü normal olarak substratları ile birleşir ve enzim-substrat kompleksi oluşurken, bir kısmı ise, inhibitör ile birleşir ve enzim-inhibitör kompleksi oluşur. Bir kısım enzim molekülü ise, hem substratla, hem inhibitörle birleşerek, enzim-inhibitör-substrat kompleksini meydana getirir. Oluşan bu yapı, enzimin büyük bir kısmını ortamdaki alıkoyar ve tepkimenin yavaşlamasına neden olur. Sadece inhibitör derişimine bağlı inhibisyonda, substrat derişimi tepkime hızı üzerinde etkisizdir [16].

Benzen ve onun metabolitleri, 2 şekilde etki etmiş olabilir; ya doğrudan enzime aktif merkez dışındaki bölgeden bağlanmak ve enzimin 3 boyutlu yapısını değiştirmek suretiyle ya da enzim-substrat kompleksine bağlanmak suretiyle enzimin katalitik etkinliğini azaltmak şeklinde olabilir. Çok substratlı enzimler için önerilen genel hız eşitliğine göre, enzimin substratlarından birinin (GSH) derişimi sabit tutulursa, tek substratlı tepkimeler gibi Michaelis-Menten Eşitliği'ne uyar. Böylece ona uyan Lineveawer-Burk grafiği de doğrusal olacaktır. Ancak doğruların hepsi inhibitör tarafından etkilenir. Böylece değişik inhibitör derişimlerindeki çizimlerin ekseni kesim noktası ve eğimi farklı olacaktır. Bu tip inhibisyona "Karışık Tip İnhibisyon" adı verilmektedir. Benzen doğrudan enzime bağlanıyor ise grafik, $1/V_0$ ekseninin soluna kayar. Fakat $1/[S]$ 'ın üstünde kalır. Bu tip inhibisyona aynı zamanda kompetitif-nonkompetitif inhibisyon da denmektedir. Çünkü gözlenen örnek, kompetitif ve nonkompetitif arasında yer almaktadır. Eğer benzen enzim-substrat kompleksine bağlanmış olsaydı, grafik yine $1/V_0$ ekseninin soluna kayacaktı. Ancak $1/[S]$ 'ın altında olacaktı. Bu tip inhibisyon ise, nonkompetitif- unkompetitif inhibisyon denir [17]. Bizim

çalışmamızda elde ettiğimiz Lineveawer-Burk grafiğinde farklı benzen derişimlerine ait çizimler, $1/V_0$ ekseninin solunda ve $1/S$ ekseninin üstünde kesişmektedir.

Widersten ve ark (1996), GSH'un yapısındaki Glisin aminoasidinin COOH grubunun enzim üzerindeki 2 Arg kalıntısına bağlandığını öne sürmüşlerdir [19]. Eğer benzen, GSH'a atak yapacak olursa, GSH'un enzime bağlanması engellenebilir ya da GSH yapısındaki değişme, 2. substratın enzime bağlanmasını engelleyebilir. Bir başka çalışmada, benzenin GSH seviyesini azalttığı gözlenmiştir. Ancak bu azalma, istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. Deneşlerimizde, önce enzim, benzen ile bir süre muamele edilmiş, sonra enzimatik tepkime başlatılmıştır. Benzen GSH veya CDNB' yi etkilemiş olsaydı; sonuçlarımızda, tepkimenin başındaki V_0 hızları, kontrole yakın, tepkime sonuna doğru kontrolden sapmalar göstermeliydi. Fakat benzen, muhtemelen enzim ile etkileşmiş olmalı ki, tepkime başındaki özgül aktivite değerleri kontrolden farklı çıkmıştır.

Bu çalışma, *in vivo* gerçekleştirilmiş olsaydı, benzen uygulaması ile GST aktivitesinde azalma değil, aksine bir artış beklenebilirdi. Çünkü benzenin organizmadaki ilk biyolojik reseptörü, karaciğerdeki Sitokrom P 450 IIE1 enzim sistemidir. Bu enzim için iyi bir substrat olan benzen, Sitokrom P450 IIE1 aracılığı ile (benzenin düşük derişimlerinde Sitokrom P450 IIE1, yüksek derişimlerinde Sitokrom P 450 IIB1 devreye girer) benzen oksite metabolize olduktan sonra, başta fenol olmak üzere, hidrokinon, katekol, benzokinon ve 1,2,4-trihidroksibenzen gibi ara metabolitlere dönüştürülmektedir [20]. Bu ara metabolitlerin birçoğu karaciğerdeki mikrozomal fraksiyonlara, proteinlere, enzimlere bağlanmakta ve birçok hepatik fonksiyonu etkilemektedir. Duzhak ve ark (1988), fare ve sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmaları, benzenin karaciğer metabolizması ve Sitokrom enzimi ile ilişkisini incelemişler ve benzen uygulaması ile her 2 canlıda da Sitokrom P450 IIE1 enzim sisteminin indüklendiğini gözlemlemişlerdir [21]. Benzenin Sitokrom P450 IIE1 aracılığı ile metabolize olduğu benzen oksit, GST için iyi bir substrattır. Benzen oksitin GST aracılığı ile fenil merkapturik asitlere dönüştürülmesi tepkimesi, benzen detoksifikasyonunda ilave bir metabolik yoldur. Pathiratne ve ark'nın (1986) sıçanlar üzerinde uyguladıkları çalışmalar sonucunda, benzenin GST aktivitesini indüklemiş olması bu düşüncemizi doğrular niteliktedir [22].

In vivo koşullarda uygulanan benzen molekülünün bir kısmı, GST' yi inhibe edebilir. Ancak bir kısım benzen molekülü GST ile temas ederken, büyük bir kısım Sitokrom P450 IIE1 aracılığı ile benzen okside metabolize olmaktadır. Bu yüzden *in vivo* çalışmalarda GST, benzen tarafından indükleniyor görülmektedir. Ancak inhibitör etkisi ortadan kalkmış değil, sadece ortamdaki benzen molekülleri Sitokrom P450 IIE1 katalizörlüğünde hızla metabolize olmuştur [7].

Sonuçlarımız, organizma için oldukça toksik, kanserojenik ve mutajenik etkilere sahip benzen kimyasalının GST için substrat olmadığını ve GST enzimini inhibe ettiğini göstermiştir. GST, benzen detoksifikasyonunda bu kimyasalı doğrudan kullanmayıp, onun ara bir metaboliti olan benzen oksiti substrat olarak kullanmaktadır.

Teşekkür: Bu araştırma Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- [1] C.Andersson, M., Soderstrom, B. Mannervik. J. Biochem. 1988, 249, 819-823.
- [2] H. W. Habig, J. M. Pabst, W. B. Jakoby. J. Biol. Chem., 1974, 249 (22), 7130-7139.
- [3] E. P. Anton, B. Johannes, G. Arne Vander, J. M. Gerard. J. Biochem, 1990. 265, 47-54.
- [4] BOYER, T.D.1989. The Glutathione S-transferases: An Update Hepatology, 9 (3), 486-96.
- [5] R.P. Puchalski, W.E.Fahl. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87,2443-2447.
- [6] A. Goodman, A.G. Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7rd Ed., 1980 1638.
- [7] World Health Organisation. Benzene. Genova. Environ Health Criteria. 1993, 150.
- [8] J.J. Mc Donalds, B.M. North, C.R. Breeden, C.C.Lai, W.Roth. Lancet, 1984, 352 (9137), 1344-1346.
- [9] F. H. Rogene Environ. Health Perspect, 1996, 106 (6), 1173-1175.
- [10] B. Turkel, U. Egelı. Environ. Health Pers. 1996, 106 (6), 1313.
- [11] I. Johansson, M. Ingelman-Sundberg. Cancer Res. 1988, 48, 5387-5390.
- [12] D.V. Parke, R.T. Williams. J. Biochem., 1953, 54, 231-238.
- [13] V. K. Çelik. Daminozid Uygulanmış Cıvcıvlerde İncebağırsak ve Karaciğer Glutasyon S-transferaz Enziminin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Cumhuriyet Üniv. Sağlık Bilm Ens. Doktora Tezi, Sivas. 1995.
- [14] H.N. Öztıp. Bazı Sigara Nitrozaminleri ve Nitritin Sıçan (*Rattus norvegicus*) Karaciğeri Mikrozomlarına ve Glutasyon Düzeylerine Etkisi. Cum.Üniv. Fen Bilim Ens. Doktora Tezi, Sivas. 1989.
- [15] H.Z. Jerrold, Biostatistical Analysis prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs New Jersey , 138-178, 1984
- [16] O.H.Lowry, N.J. Rosebrough, A.L.Forr, R.J. Randal. J. Biol. Chem 1951 193-265
- [17] T. Palmer. Enzim Bilgisi. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı. 1994, 187.
- [18] R. Morgenstern, G. Lundqvıst, V. Hancock, J. W. Depierre. J. Biol. Chem. 1987, 263 (14), 6671-75.
- [19] M. Widersten, R. Bjornestedt, B. Mannervik. J. Biochem. 1996, 35 (24), 7731-7742.

- [20] M.W. Powley, G.P. Carlson. *J. Biochem. and Mol Toxic.* 2000, 14 (6), 303-309.
- [21] T. G. Duzhak, N. I. Gutkina, I. B. Tsyrolov, V. V. Liakhovich.. *Biokhimiia (USSR)* 1998, 53 (2), 188-195.
- [21] A. Pathiratne, R. L. Puyear, J. D. Brammer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986, 82 (2), 72-280.