

612.351.11:667.43

A 711 k

1996-3249

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURULU
TIP ARAŞTIRMA GRUBU
PROJE NO: TAG-382

KOYUN KARACİĞER ve ANCIĞER MİKROZOMAL
ANILIN 4-HİDROKSİLİZ ENZİMİNİN KARAKTERİZE EDİLMESİ

EMEL ARINÇ
MESUDE İŞCAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

ANKARA
1980

612.351.11 : 667.43

A 711k

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

TIP ARAŞTIRMA GRUBU

PROJE NO: TAG-382

KOYUN KARACİĞER ve AKCİĞER MİKROZOMAL
ANİLİN 4-HİDROKSİLAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZE EDİLMESİ

EMEL ARINÇ

MESUDE İŞCAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

ANKARA

1980

15136

ÖZET

ARINÇ, Emel ve İŞCAN, Mesude. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin karakterize edilmesi.

Anilinin p-aminofenole dönüşümünü katalize eden, anilin 4-hidroksilaz enziminin özgül aktivitesi, koyun karaciğer ve akciğer mikrozomlarında, sırasıyla, 0,65 (N=10) ve 0,15 (N=13) nmol p-aminofenol/mg protein/dakika olarak bulundu. Anilin konsantrasyonunun, pH'nın, çeşitli kofaktörlerin, enzim miktarının ve inkübasyon süresinin enzim aktivitelerine etkisi incelenerek, karaciğer ve akciğer mikrozomal enzimlerinin maksimum aktivitesi için gerekli olan optimum şartlar saptandı.

Karaciğer ve akciğer anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin aktivitesinin tamamen, kofaktör NADPH'ye bağımlı olduğu gözlemlendi. Karaciğer anilin 4-hidroksilaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee grafiklerinin eğri hatlı olduğu ve bu enzimin Michaelis-Menten kinetiğini takip etmediği saptandı. Karaciğer enzimi için, bu grafiklerden, 3,21 mM ve 0,072 mM anilin değerinde iki Km değeri bulundu. Akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin Lineweaver-Burk grafiğinden Km 1,43 mM anilin olarak hesaplandı.

İki değerlikli metal iyonlarından olan magnezyum, nikel ve kadmiyum iyonlarının anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. Magnezyum iyonlarının koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkileri reaksiyon ortamına 0,1 mM'dan 100 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda $MgCl_2$ ilâvesiyle incelendi. Magnezyum iyonunun akciğer ve karaciğer hidroksilaz enzimlerinin aktivitesini hızlandırdığı ve en fazla etkinin 2,5-10,0 mM magnezyum iyonu konsantrasyonunda olduğu saptandı. Nikel

ve kadmiyum iyonlarının karaciğer ve akciğer hidroksilaz enzimlerinin aktivitesini engellediği gözlemlendi. İnkübasyon ortamına 0,1 mM, 1 mM ve 5 mM nikel iyonu ilâvesinin karaciğer enzim aktivitesini sırasıyla, % 11, % 27 ve % 100 oranında engellediği saptandı. 0,1 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarındaki nikel iyonunun akciğer enziminin aktivitesini sırasıyla, % 20, % 35, % 45 ve % 100 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Kadmiyum iyonlarının karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesini engelleyici etkisinin çok daha kuvvetli olduğu saptandı.

Neticede, koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimleri, gözlenen bazı kinetik farklılıklara rağmen, genel olarak birbirine benzer bulundu.

ABSTRACT

ARINÇ, Emel ve İŞCAN, Mesude. Characterization of hepatic and pulmonary microsomal aniline 4-hydroxylase from sheep.

The specific activity of the aniline 4-hydroxylase which catalyzes hydroxylation of aniline to p-aminophenol was found to be 0.65 (N=10) and 0.15 (N=13) nmole p-aminophenol formed/mg protein/minute, in sheep liver and lung microsomes, respectively. The effects of aniline concentration, pH, cofactors, amount of the enzyme, and the incubation period on enzyme activity were studied, and the optimum conditions for maximum activity of liver and lung microsomes were determined.

Liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase activity was found to be completely dependent on the presence of cofactor NADPH. The Lineweaver-Burk and Eadie-Hofstee plots of the liver enzyme were found to be curvilinear, suggesting that the enzyme did not follow the Michaelis-Menten kinetics. From these graphs, two different K_m values were calculated for the liver enzyme as 3.21 mM and 0.072 mM aniline. K_m of the lung enzyme was calculated to be 1.43 mM aniline from its Lineweaver-Burk graph.

The effect of magnesium ions on the sheep liver and lung aniline 4-hydroxylase activity was examined by the addition of $MgCl_2$ at different concentrations, varying between 0.1 mM and 100 mM, into the incubation medium. Magnesium ion was found to have a stimulatory effect on the aniline 4-hydroxylation activity of both enzymes, and the maximum enzyme activities were obtained at 2.5-10.0 mM magnesium ion concentrations. The effects of nickel and cadmium ions on the enzyme activities were also examined. Nickel ions at 0.1 mM, 1 mM, and 5 mM concentrations inhibited the liver aniline 4-hydroxylase activity 11 %, 27 %, and 100 % respectively, whereas the same metal ion concent-

rations caused 20 %, 35 %, and 45 % inhibition respectively, for the lung enzyme.

Although some kinetic differences were observed, sheep liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase enzymes were found to be similar, in general.

TEŐEKKÜR

Bu projenin gerekleŐmesinde katkısı olan Tırkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu yetkililerine, bu alıŐmada kullanılan koyun karaciğer ve akciğerlerini b uy uk bir titizlikle seçerek bize sağlayan Veteriner Dr. Sıtkı NebioĐlu'na, akciğer ve karaciğer mikrozoamlarının hazırlanmasında emeği geçen Eczacı M umtaŐ IŐcan'a teŐekk ur ederiz.

KISALTMALAR

- NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, indirgenmiş.
NADP⁺ : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.
NADH : Nikotinamid adenin dinükleotid, indirgenmiş.
NAD⁺ : Nikotinamid adenin dinükleotid.
HEPES : N-2 Hidroksietilpiperazin-N-etansülfonik asit.
o- : orto.
p- : para.
m- : meta.
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit.
pAP : para-Aminofenol^a

^aYalnız bazı şekillerde kullanıldı.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
TABLOLARIN LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	vi
I. GİRİŞ	1
II. YÖNTEMLER	5
Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması	5
Akciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması	7
Protein Tayini	7
Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini	7
Mikrozomal Sitokrom P-450 Konsantrasyonunun Tayini	11
Mikrozomal NADPH Bağımlı Sitokrom c Redüktaz aktivitesinin Tayini	11
Kimyasal Maddeler	12
III. BULGULAR	13
Anilin 4-Hidroksilaz Enzimi	13
Enzimin Maksimum Aktivitesi İçin Optimum Şartlar	14
Anilin 4-Hidroksilaz Enziminin Kofaktör Gereksinimi	14
pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi	16
Enzim Aktivitesinin İnkübasyon Süresi İle Değişimi	16
Mikrozomal Enzim Miktarının Anilin 4- Hidroksilaz Reaksiyonunun Hızı Üzerine Etkisi	16
Süstrat Konsantrasyonunun Karaciğer Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkisi	21
Süstrat Konsantrasyonunun Akciğer Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkisi	21
İki Değerlikli Metal İyonlarının Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkileri	27
Magnezyum İyonlarının Etkisi	27
Nikel İyonlarının Etkisi	33
Kadmiyum İyonlarının Etkisi	33
IV. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
V. KAYNAKLAR	39

TABLOLARIN LİSTESİ

	<u>sayfa</u>
1. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılan inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH kullanıldı).....	9
2. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılan inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanıldı).....	10
3. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin kofaktör gereksinimi	15
4. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılması tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH kullanılan).....	29
5. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerine magnezyum iyonlarının çeşitli kofaktörler ile birlikte etkisi.....	31
6. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılması tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılan).....	32
7. NiCl ₂ ve CdCl ₂ 'ün, <u>in vitro</u> , karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri üzerindeki etkileri.....	34

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<u>sayfa</u>
1. Imai ve Sato (22) yöntemine göre çizilen tipik bir p-aminofenol standart eğrisi.....	13
2. pH'nın akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisi.....	17
3. pH'nın karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisi.....	18
4. Karaciğer (○—○) ve akciğer (●—●) mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin inkübasyon zamanına bağlı olarak değişmesi.....	19
5. Mikrozomal enzim miktarının anilin 4-hidroksilasyon reaksiyonunun hızı üzerine etkisi.....	20
6. Sübstrat konsantrasyonunun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesine etkisi.....	22
7. Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	23
8. Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin Eadie-Hofstee grafiği.....	24
9. Sübstrat konsantrasyonunun koyun akciğer anilin 4-hidroksilaz aktivitesine etkisi.....	25
10. Koyun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	26
11. Magnezyum iyonunun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	28
12. Magnezyum iyonunun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	28

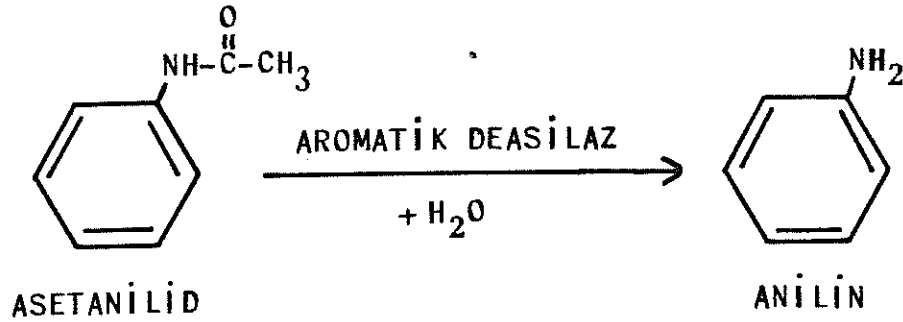
I. GİRİŞ

Anilin çok eski ve oldukça yaygın kullanımı olan endüstriyel maddelerden biridir. Selülozik bileşiklerin, antioksidanların, boya maddelerinin, boyacılıkta kullanılan kimyasal maddelerin ve farmasötik preparatların yapımında ara maddesi olarak kullanılan anilin, laboratuvarlarda çözücü olarak da kullanılır.

Almanya'da 1865-1870 yıllarında, boya endüstrisinin kurulmasından yirmi sene sonra, bu fabrikalarda çalışan işçilerde mesane kanserinin bulunduğu saptanmış ve o zamandan sonra, anilinin, mesane kanserine sebep olduğuna inanılmıştır. Ancak uzun yıllar süren hayvan deneyleri, aromatik aminler grubuna dahil bazı bileşiklerin (β -naftilamin, benzin ve asetamid flüoren gibi) mesane kanserine neden olduğunu belirlemiş ve anilin ile asetil türevi olan asetanilidin kanserojen olmadığını saptamıştır (1,2). Epidemiyolojik çalışmalar ve laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan bazı çalışmalar anilinin akut ve kronik toksisitesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir (3,4). Akut zehirlenmelerde en önemli belirti, kanda methemoglobin oluşmasıdır. İnsanlar üzerindeki deneyler, ağızdan 25 mg anilin alındığında, kanda farkedilebilir düzeyde methemoglobin oluştuğunu göstermiştir (5). Hemoglobinin methemoglobine oksitlenmesi reaksiyonuna, fenil hidroksilamin, o-aminofenol ve p-aminofenol gibi anilin metabolitlerinin etken olduğu bilinmektedir (3, 5). Methemoglobininin yanısıra, anilinin eritrositlerde şekilsel değişikliklere ve kanda "Heinz" cisimciklerinin oluşmasına neden olduğu saptanmıştır. Heinz cisimciklerinin alyuvar zarına bağlı olarak buldukları, aktif ve pasif transport ile hücre zarı reaksiyonlarını zedeledikleri ve neticede hemolize sebep oldukları saptanmıştır (3).

Anilin genel olarak vücuda deri, solunum ve sindirim yolu ile girer. Bundan başka anilin, asetanilid gibi bazı

ilaçların metaboliti olarak da vücutta teşekkül edebilir (6).



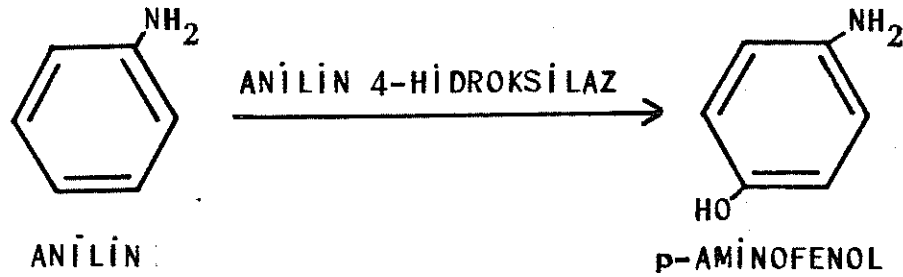
Anilin insan vücuduna dolaylı olarak da girebilir. Şöyle ki, anilin ile ilgili endüstrilerin imalât artıklarını nehir ve göllere vermesiyle bu kimyasal maddeler sularda birikir. Çevremizde bulunan hayvanlardan bir kısmı ise (koyun, inek v.b.) insanlara doğrudan doğruya besin maddesi olmaktadır. Bu hayvanların bu kimyasal maddeleri metabolize edip edemediklerini bilmek, hayvan sağlığı kadar, o hayvanı yiyen insan sağlığı bakımından da önemlidir. Bilhassa protein, karbonhidrat ve vitamin değeri yüksek olduğu için çocuklarımızın yemesini tercih ettiğimiz karaciğerin, 20. yüzyılın başından beri sentez yolu ile elde edilen, çeşitli yollardan insan vücuduna alınan binlerce yabancı bileşiğin metabolize edildiği, bu esnada da bazen ana maddeden daha toksik maddelerin teşekkül edip, depo edildiği bir organ olduğu son on sene içinde yapılan araştırmalar sonunda aydınlatılmıştır. Bu yabancı maddelerden biri olan anilinin koyun karaciğeri tarafından nasıl metabolize edildiğini bilmek yukarıda belirtildiği gibi insan sağlığı bakımından da önemlidir.

Deney hayvanlarında ve insanda anilinin açile olduğu veya orto, para ve N-pozisyonlarında hidroksile edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından gözlenmiştir (6). Parke (7), anilin metabolizmasını in vivo olarak tavuk, kedi, köpek, sıçan, fare, hamster, kobay ve tavşanda çalışmış ve genellikle anilinin orto ve para pozisyonlarda hidroksile edildiğini saptamıştır. Parke (7), ^{14}C -anilin verilen tavşanın idrarından o-, m- ve p-aminofenollerini izole etmiş ve ana metabolit olarak oluşan p-aminofenolün verilen dozun % 55'ini

teşkil ederken, o-aminofenol ile m-aminofenolün verilen dozun % 10'u ile % 0,1'ini oluşturduğunu saptamıştır. Ayrıca ^{14}C -anilin verilen diğer hayvanların idrarlarında oluşan p- ve o-aminofenol yüzdesinin her hayvan için farklı olduğu gözlenmiştir (6,7). Bu buluşlar anilinin hidrosilasyonunda en az iki ayrı enzimin rol oynadığı varsayımını ortaya atmıştır.

Anilinin metaboliti olan p-aminofenolün, karaciğerde bulunan glikuronik asit veya sülfat iyonuyla enzimler vasıtasıyla konjuge olarak, böbrekler yoluyla vücuttan atıldığı gösterilmiştir (6,7). Bu şekilde anilinin p-aminofenole dönüşümünü bir detoksifikasyon reaksiyonu olarak kabul edebiliriz.

Anilinin p-aminofenole hidrosilasyonunu katalizleyen enzim anilin 4-hidroksilaz olarak isimlendirilir.



Karaciğer anilin 4-hidroksilaz aktivitesi sıçanlarda (8,9), farede (9), kobayda (8,9), tavşanlarda (8,10) ve balıkta (11) saptanmıştır.

Bend ve arkadaşları (10,12) Yeni Zelanda tavşanlarının, Matsubara ve grubu (13), Albino tavşanlarının akciğer anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin maksimum aktivite için, NADPH ve O_2 'e gereksinimi olduğunu bildirmişler ve bu aktivitenin menadion (14), sitokrom c ve karbon monoksit (12,14) tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir.

1972 yılında Lu ve arkadaşları (15), 1973 yılında Fijuta ve Mannering (16), sıçan karaciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin mikrozomal hidrosilazlar, monooksijenazlar veya karışık fonksiyonlu oksidazlar olarak bilinen enzim sisteminin bir üyesi olduğunu gösterdiler.

Tavşan karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin, fenobarbital verilen tavşanların karaciğerlerinden elde edilen saflaştırılmış sitokrom P-450, sitokrom c redüktaz ve lipit fraksiyonlarının bir araya getirilmesiyle yeniden oluştuğu saptandı (17,18).

Koyun karaciğerinin çok yüksek besin değeri olmasına ve insanlar tarafından büyük ölçüde sarfedilmesine karşın literatürde, koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimi ve anilin metabolizması üzerinde mevcut bir bilgi yoktur. Diğer bir husus da, anilin ile ilgili endüstride çalışanların genel olarak anilini solunum yoluyla almalarıdır. Bu bakımdan anilin akciğerler tarafından nasıl metabolize edildiğini bilmek çok önemlidir. İdeal olarak bu tür deneylerin insan akciğerinden elde edilen enzimlerle yürütülmesi lâzımdır. Bu da bilindiği gibi çok güçtür. Bu bakımdan, koyun akciğeri üzerindeki çalışma bir bakıma bir model olacaktır. Son senelerde laboratuvarımızda yürütülen çalışmalarda (19), koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin, sitokrom P-450'ye bağımlı monooksijenazların bir üyesi olduğu gösterildi. Bu çalışmanın amacı ise koyun karaciğer ve akciğer anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin maksimum aktivitesi için optimum şartların saptanması, enzimlerin bazı özelliklerinin incelenmesi ve magnezyum, nikel ve kadmiyum iyonlarının, anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

II. YÖNTEMLER

Karaciğer Mikrozoomlarının Hazırlanması: Bazı teknik değişikliklerle, Arınç ve Philpot'ın (20) tavşan akciğer mikrozoomlarının hazırlanmasında kullandıkları yöntem kullanıldı. Bu yöntem aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

1. Mezbahadan (Et ve Balık Kurumu, Ankara) dört aylığın üstündeki kuzu ve koyunlardan (Akkaraman) alınan hastaliksız karaciğerler, safra keseleri çıkarıldıktan sonra derhal plastik torbalara konulup, içinde buz bulunan kaplara yerleştirildi ve hemen laboratuvara getirildi. Mikrozoomların hazırlanması süresince bütün işlemler soğuk odada, 0-4°C arasında yapıldı.
2. Karaciğerler bir beher içinde soğuk distile su ile yıkanarak kanından olduğunca arıtıldı. Sonra suyu süzülerek, emici bir kâğıt üzerinde kurulandı. Ağırlığı 0,1 grama kadar hassasiyetle ölçülerek kaydedildi. Karaciğer bundan sonra bağ ve yağ dokularından temizlendi.
3. Homojen bir numune elde etmek amacıyla, ağırlığı 500-750 gram arasında değişen bütün bir karaciğer, önce makasla ufak parçalara ayrıldı, sonra bu parçalar önceden soğutulmuş olan et kıyma makinasından geçirildi. Kıyılmış karaciğerin 75 gramı, 0,1 grama kadar hassasiyetle tartılarak bir kenara ayrıldı. Karaciğerin 1,0 gramı için 4 ml olacak şekilde hacmi hesaplanan 300 ml 0,15 M KCl çözeltisi bir beher içine konuldu.
4. Kıyılmış ciğerlerden birkaç gram teflon-cam homojenize aygıtının (Elvehjem-Glass homogenizer with teflon pestle) buza yerleştirilmiş cam kısmına kondu. Ciğerlerin üzerine beherde bulunan 0,15 M KCl çözeltisinden bir miktar

ilâve edildi. Homojenize aletinin teflon ucu ise bir matkabın (Black and Decker, V850, multispeed drill) ucuna takıldı ve matkap 2400 rpm'de döndürülerek 5 kez cam kabın dibine kadar sokup çıkarıldı. Bu sırada teflon ucun fazla yukarıya çekilmemesine dikkat edildi. Bu iş bitince ciğerler delikli Buchner hunisine yerleştirilmiş iki kat sargı bezinden bir behere süzüldü.

5. Homojenize edilen ciğerler santrifüj tüplerine dolduruldu. Tüpler Sorvall RC-2B (Automatic refrigerated centrifuge, Ivan Sorvall Inc., Newton, Connecticut 06470, A.B.D.) soğutmalı santrifüjünde 12 000 x g'de 20 dakika çevrildi. (SS-34 rotoru için 10 000 rpm, GSA rotoru için 8 750 rpm).
6. 12 000 x g'de çöken karaciğer fraksiyonu başlıca mitokondri ve hücre çekirdeğini içerir. Sıvı kısımda ise, endoplazmik retikulum parçacıkları ile çözünür halde bulunan sitoplazma kimyasal maddeleri bulunur. Bu sıvıdan mikrozomlar, sıvının Beckman L-2 65B Ultrasantrifüjün'de (Spinco Division of Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Calif. 94304, A.B.D.), tüm kapasitesi 162 ml olan 50 Ti rotorunda, rotorun 45 000 rpm'de (133 373 x g) 40 dakika çevrilmesi ile çöktürüldü. (L-2 65B ultrasantrifüjünde 50 Ti rotorunun maksimum hıza erişmesi 15 dakika aldığı düşünülerek, zaman süresi baştan 55 dakikaya ayarlandı). Çöken mikrozomların üstündeki sıvı kısım şırınga ile atıldı.
7. Mikrozomlar yıkanmak üzere 0,15 M KCl çözeltisinde süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan, mikrozomlar, süspansiyonun, ultrasantrifüjde 50 Ti rotorunda 45 000 rpm'de 30 dakika döndürülmesiyle çöktürüldü.
8. Elde edilen mikrozom çökeleğinin üzerindeki sıvı atıldı. Mikrozomlar 1 gram karaciğere 0,5 ml çözelti eşdeğer olacak şekilde % 25'lik gliserin çözeltisi içinde süspansiyon edilerek, teflon-cam homojenize aygıtında homojenize edildi. Bu şekilde elde edilen homojen karaciğer mik-

rozom süspansiyonunun genellikle 1 ml'de 30-40 mg prote-
in içerdiği saptanmıştır.

9. Yıkanmış mikrozoamların bir kısmı protein miktarı ve ani-
lin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi tayininde kullanıldı.
Kalan mikrozom süspansiyonu küçük plastik şişelere ko-
nuldu. Şişeler azot gazı ile doldurularak -20°C'de mu-
hafaza edildi.

Akciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması: Karaciğer mik-
rozomlarının hazırlanması için uygulanan yöntem, aşağıda an-
latılan bazı teknik değişikliklerle, akciğer mikrozoamlarının
hazırlanmasında da kullanıldı. Yöntemdeki farklılıklar a-
şağıda belirtilmiştir.

Kademe 3 ve 4'de: Et kıyma makinasından geçmiş akci-
ğerler, 1 gramı başına 3 ml 0,15 M KCl çözeltisi ilâve edi-
lerek homojene edildiler.

Kademe 4'de: Akciğer homojene edilirken, 2 400 rpm'de
döndürülen teflon uç, cam homojenize aygıtına 10-12 kez so-
kup çıkarıldı.

Kademe 9'da: Mikrozoamlar 1 gram akciğere 0,3 ml çö-
zelti eşdeğer olacak şekilde % 25'lik gliserin çözeltisi i-
çinde süspansiyon haline getirildiler.

Protein Tayini: Hazırlanan mikrozom süspansiyonla-
rının protein miktarları Lowry ve arkadaşlarının (21) yön-
temlerine göre tayin edildi. Kristalize sığır serum albumi-
ni standart olarak kullanıldı.

Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini: Anilin 4-
hidroksilaz enzim aktivitesi, meydana gelen p-aminofenol
miktarının Imai ve arkadaşlarının (22) tarif ettiği yöntemle
göre tayin edilmesiyle saptandı. Kofaktör olarak, NADPH, ve-
ya NADPH üreten bir sistem kullanıldı. Enzim için optimum
şartlar "BULGULAR" kısmında gösterildiği gibi saptandı. En-

zim aktivitesinin tayini aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

İnkübasyon ortamı: Tablo 1'de görüldüğü gibi yalnız NADPH kullanılan tipik bir reaksiyon ortamı, 1,0 ml'lik toplam hacimde, 10 mM anilin, 100 mM HEPES tamponu, pH 7,6, 0,5 mM NADPH, ve 0,5 mg mikrozoom proteini içerdi. NADPH yerine kullanılan, NADPH üreten sistemde ise (Tablo 2), 0,25 mM NADP⁺, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM glikoz-6-fosfat, 1,0 ünite glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (EC.1.1.1.49, 1 ünite glikoz-6-fosfat dehidrojenaz, 25°C'de ve 1 dakikada 1 µmol NADP⁺ indirger) ve 14,2 mM HEPES tamponu, pH 7,8, içeren çözelti kullanıldı. NADPH üreten sistem aktivite tayininin yapılacağı gün hazırlandı. Önce 37°C'de 5 dakika tutuldu, sonra kullanılıncaya kadar buz içinde muhafaza edildi.

Standart: Standart olarak p-aminofenol çözeltisi kullanıldı. p-Aminofenol çözeltisi ışığa karşı çok hassas olduğundan, her deneyde, 0,5 mM p-aminofenol taze olarak, koyu renkli bir balon jofede hazırlandı ve yukarıda "İnkübasyon ortamı" olarak tarif edilen, anilin de dahil bütün reaksiyon bileşiklerini içeren inkübasyon ortamına, p-aminofenol çözeltisi dört farklı konsantrasyonda (2,5, 5,0, 12,5, 25,0 nmol) ilâve edildi. Aynı şekilde p-aminofenol yerine distile su ilâve edilmiş eşdeğer bir inkübasyon karışımı hazırlandı ve aşağıda "İşlem" kısmında tarif edildiği gibi reaksiyonlara aynı şartlar altında devam edildi. p-Aminofenol bulunmayan tüple, p-aminofenol içeren tüpler arasındaki absorpsiyon farkları p-aminofenol için standart eğri çiziminde kullanıldı (Şekil 1).

İşlem:

Yukarıda "İnkübasyon ortamı" kısmında tarif edilen kofaktör hariç, diğer inkübasyon maddelerini içeren tüpler, 37°C'de bulunan su banyosuna konuldu. Reaksiyon NADPH veya NADPH üreten çözeltinin ilâvesiyle başlatıldı ve reaksiyona tüplerin ağızları açık olarak, sallamalı su banyosunda

Tablo 1. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılan inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH kullanıldı).

Elemanlar	Stok Çözeltisi	İlâve Edilecek Hacim (ml)	1 ml'lik İnkübasyon Karışımındaki Son Konsantrasyon
HEPES Tamponu pH 7,6	200 mM	0,50	100 mM
Anilin	100 mM	0,10	10 mM
Mikrozomlar	2,5 mg prot/ml karaciğer için (veya) 17,5 mg prot/ml akciğer için	0,20 (0,20)	0,5 mg prot 3,5 mg prot
H ₂ O		0,15	
NADPH	10 mM	0,05	0,5 mM

Tablo 2. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılan inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanıldı).

Elemanlar	Stok Çözeltileri	İlâve Edilecek Hacim (ml)	1 ml'lik İnkübasyon Karışımındaki Son Konsantrasyon
HEPES Tamponu pH 7,6	200 mM	0,50	100 mM
Anilin	100 mM	0,10	10 mM
Mikrozomlar	2,5 mg prot/ml karaciğer için (veya) 17,5 mg prot/ml akciğer için	0,20 (0,20)	0,5 mg prot 3,5 mg prot
H ₂ O		0,05	
NADPH üreten sistem:			
Glikoz-6-fosfat	100 mM	0,025	2,5 mM
MgCl ₂	100 mM	0,025	2,5 mM
HEPES Tamponu pH 7,8	200 mM	0,071	14,2 mM
NADP ⁺	10 mM	0,025	0,25 mM
Glikoz-6-fosfat Dehidrojenaz	260 Ü/ml	0,004	1 ünite

(Grant Instruments, Cambridge Ltd., Barrington, Cambridge CB2 5QZ, İngiltere) 37°C'de 25 dakika devam edildi. Reaksiyon 0,5 ml % 20'lik trikloroasetik asit ilâvesiyle durduruldu ve tüpler hemen bir buz banyosuna alındı.

Denature olmuş protein 7 500 rpm'de (Sorvall RC-2B centrifuge, SS-34 rotor) 15 dakika döndürülerek çöktürüldü. Üstte kalan çözeltilinin 1 ml'si çökeleği bozmadan otomatik bir pipetle çekilerek başka bir tüpe alındı. Üzerine 0,5 ml % 20'lik sodyum karbonat ve bunu takiben 0,5 ml taze hazırlanmış % 4'lük fenol içeren 0,4 N NaOH çözeltisi ilâve edildi.

Tüpler 37°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra oluşan mavi rengin şiddeti 630 nm'de Zeiss Spektrofotometre'sinde (Carl Zeiss Oberkochen/Wuertt., Batı Almanya) ölçüldü. Çizilen standart eğriden (Şekil 1) enzimatik yolla oluşan p-aminofenol miktarları hesaplandı.

Mikrozomal Sitokrom P-450 Konsantrasyonunun Tayini:

Sitokrom P-450 konsantrasyonu Omura ve Sato (23,24) yöntemi ile Cary 17 Spektrofotometre'sinde (Cary 17 Recording Double Monochromator Spectrophotometer, Cary Instruments, a Varian Subsidiary, Monrovia, Calif. 91016, A.B.D.) ışık yolu 1 cm olan küvetlerde tayin edildi. % 30 gliserin, 10^{-4} M EDTA içeren, 0,1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,6, 25°C'de) içinde seyreltilen karaciğer veya akciğer mikrozomları sodyum ditiyonit ile indirgenerek karbon monoksit fark spektrumları alındı. Sitokrom P-450 konsantrasyonu, $A_{450}-A_{490}$ için ekstinsiyon katsayısı $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınarak, çizilen spektrumdan bu iki dalga boyundaki optik dansite farkından hesaplandı (23,24).

Mikrozomal NADPH Bağımlı Sitokrom c Redüktaz Aktivitesinin Tayini:

Akciğer ve karaciğer mikrozomlarının NADPH-sitokrom c redüktaz aktivitesi Masters ve arkadaşlarının (25) tarif ettiği yöntemle, sitokrom c'nin 550 nm dalga boyundaki indirgenme hızının spektrofotometrik olarak ölçülme-

si ile tayin edildi. 1 unite redüktaz, 25°C'de 1 dakikada 1 nmol sitokrom c'yi indirgeyen enzim miktarı olarak tarif edildi.

Kimyasal Maddeler

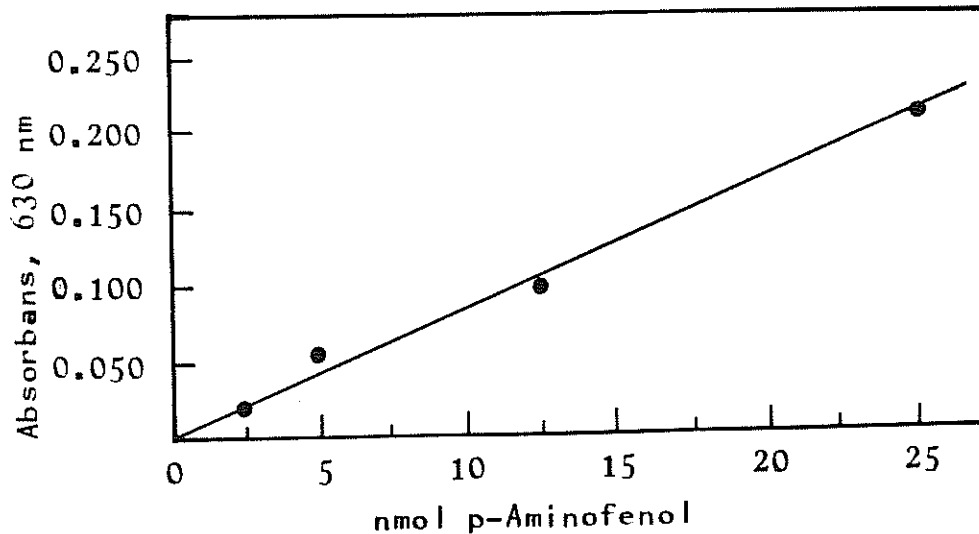
Glikoz-6-fosfat, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (maya), sığır serum albumini, NADPH, NADH ve HEPES, Sigma (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, A.B.D.) firmasından alındı. p-Aminofenol Fluka, A.G., Buchs S.G., İsviçre'den temin edildi. Diğer kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, piyasadan satın alındı.

III. BULGULAR

Anilin 4-Hidroksilaz Enzimi

Koyun karaciğer ve akciğerlerinden hazırlanan mikrozomlardaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, reaksiyon sonunda meydana gelen p-aminofenol miktarının kolorimetrik olarak tayin edilmesiyle saptandı. Şekil 1'de görüldüğü gibi, 630 nm'de ölçülen absorbansa karşı çizilen p-aminofenol standart eğrisi, çalışılan koşullar altında doğrusal bulundu.

Anilin 4-hidroksilaz enziminin özgül aktivitesi, değişik Akkaraman koyunlarından elde edilen karaciğer mikrozomal preparatlarında, 0,85, 0,90, 0,54, 0,76, 0,40, 0,50, 0,90, 0,40, 0,80, 0,40 olarak, değişik Akkaraman koyunlarından elde edilen akciğer mikrozomal preparatlarında ise, 0,15, 0,15, 0,07, 0,12, 0,09, 0,27, 0,25, 0,12, 0,12, 0,08, 0,12, 0,20, 0,27 olarak bulundu. Bu değerlerden ortalama enzim



Şekil 1. Imai ve Sato (22) yöntemine göre çizilen tipik bir p-aminofenol standart eğrisi.

özgül aktivitesi karaciğer ve akciğer mikrozoamları için, sırasıyla 0,65 (N=10) ve 0,15 (N=13) olarak hesaplandı. Gerek karaciğer, gerekse akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin mikrozoamlar % 20'lik (veya % 25'lik) gliserin içinde süspansiyeye edilip, hemen azot gazı ile doyurulduğu zaman, en az bir ay kadar sabit kaldığı saptandı. Diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda, karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin özgül aktivitesi sıçanlarda 0,705 (N=4) (8) ve 0,33 (N=15) (9), kobaylarda 1,40 (N=4) ve 0,166 (N=15) (9), farede 0,5, tavşanlarda 0,542 (N=22), Yeni Zelanda tavşanlarında 1,2, 1,1, 0,75, 0,46 (10) ve 0,53 (26) nmol p-aminofenol/mg protein/dakika olarak saptanmıştır. Bu değerler bizim bulduğumuz değerlerle karşılaştırıldığında, koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimi özgül aktivitesinin daha çok sıçan, tavşan ve fare karaciğer enzimlerinin aktivitelerine benzer olduğu gözlenir. Akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin özgül aktivitesi sıçanlarda 0,072 (8), kobaylarda 0,179 (8), tavşanlarda 0,348 (8), 0,34 (10), 0,075 (14) ve 0,23 (26) nmol p-aminofenol/mg protein/dakika olarak saptanmıştır. Bu değerler, bizim bulduğumuz değerlerle karşılaştırıldığında, koyun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimi özgül aktivitesinin daha çok kobay ve tavşan akciğer enzimlerinin aktivitelerine benzer olduğu görülür.

Enzimin Maksimum Aktivitesi İçin Optimum Şartlar

Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin maksimum aktivitesi için optimum şartlar saptandı. Enzim aktivitesine kofaktörlerin, pH'nın, inkübasyon zamanının, enzim konsantrasyonunun etkisi ve substrat konsantrasyonunun aktiviteye etkisi incelendi.

Anilin 4-Hidroksilaz Enziminin Kofaktör Gereksinimi.

Tablo 3'de gösterildiği gibi, kofaktör NADPH'nin hem akciğer hem de karaciğer mikrozomal hidroksilaz enziminin aktivitesi için gerekli olduğu saptandı. Bundan başka, glikoz-6-fosfat, Mg^{++} ve glikoz-6-fosfat dehidrojenazdan oluşan

Tablo 3. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin kofaktör gereksinimi.^a

Kofaktör	Karaciğer	Akciğer
	Enzimi	Enzimi
	% Aktivite	% Aktivite
NADPH	100,00	100,00
NADH	18,80 (18-19,6)	19,50 (16-23,5)
NAD ⁺	3,10 (3-3,2)	3,50 (3,1-3,9)
NADP ⁺	4,60 (4-5,2)	4,90 (4,7-5,1)
NADH+NADPH ^b	103,20 (102-104,4)	102,80 (100-105,6)
NADPH üreten sistem ^c	105,00 (100-110)	100,50 (100-101)
Kofaktör yok	0,00	0,00

^aİnkübasyon koşulları "Yöntemler" Tablo 1'de anlatıldığı gibidir. İnkübasyon ortamında 0,5 mM olan NADPH yerine, eşdeğer konsantrasyonlarda, NADPH üreten sistem veya diğer nükleotidler kullanıldı. Parantez içindeki neticeler iki ayrı deney serisinden elde edilen değerleri göstermektedir. Her değer de çift olarak yapılan numunelerden elde edilen neticelerin ortalamasıdır.

^b0,25 mM NADPH, 0,25 mM NADH kullanıldı.

^cİnkübasyon ortamı Tablo 2'de verildi.

NADPH üreten sistemin anilin 4-hidroksilaz reaksiyonunda tamamen NADPH'nin yerine kullanılabileceği gösterildi (Tablo 3).

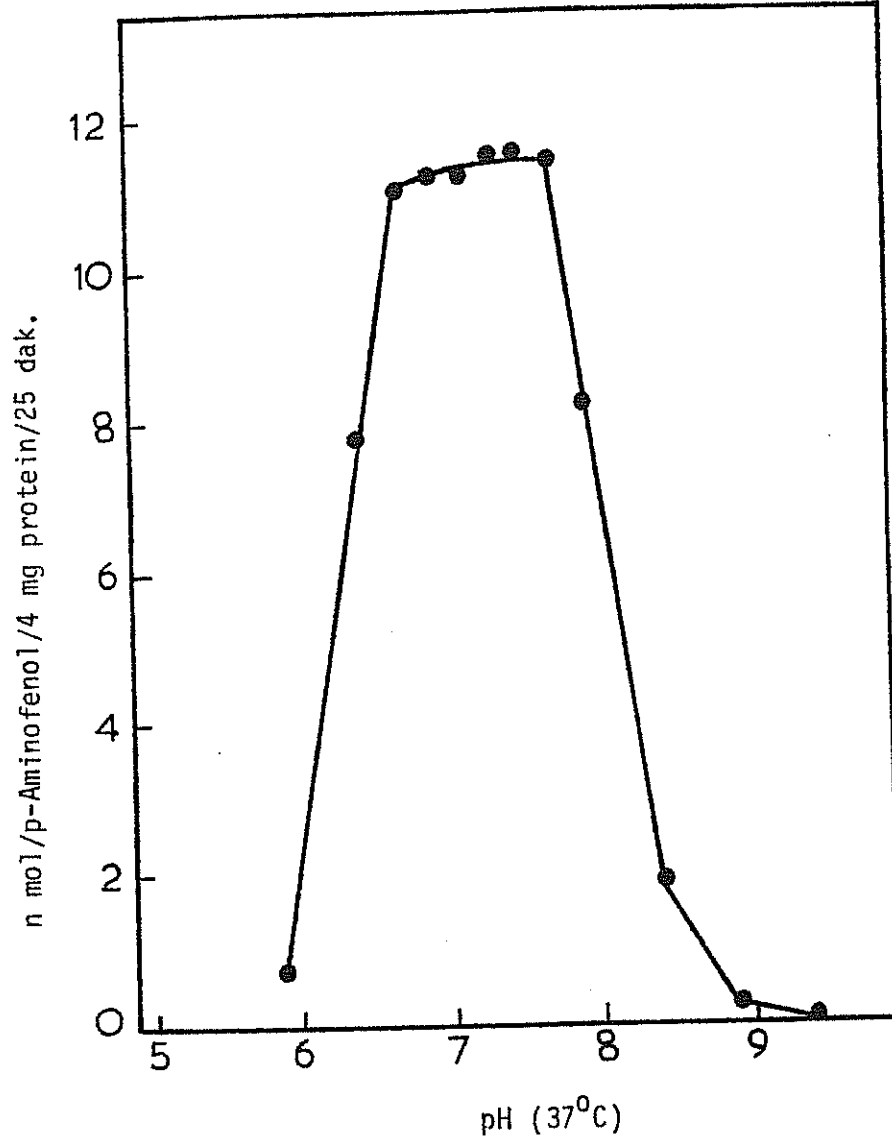
NADH kofaktör olarak kullanıldığı zaman her iki sistemde de NADPH'nin verdiği aktivitenin % 20'sinin altında bir değer elde edildi. NADH ve NADPH beraber kullanıldıkları zaman her iki sistemde de % 100'ün biraz üstünde olan bir aktivite değeri saptandı. Karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin NAD^+ veya $NADP^+$ bulunan ortamda maksimum aktivitelerinin takriben ancak % 3 veya % 5'ine erişebildikleri gözlemlendi. Kaynatılmış mikrozomların, NADPH bulunan ortamda anilin 4-hidroksilaz aktivitesi içermediği saptandı.

pH'nin Enzim Aktivitesine Etkisi. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi $25^{\circ}C$ 'de pH değerleri 6 ile 9,5 arasında değişen 0,2 N HEPES tamponu kullanılarak incelendi. Tampon çözeltinin pH'sı 0,2 N NaOH çözeltisinin ilavesiyle ayarlandı. İnkübasyon ortamının pH'sı tekrar $37^{\circ}C$ 'de ölçüldü. $25^{\circ}C$ 'de pH'sı 7,6 olan 0,2 M HEPES tamponu ile hazırlanan ve elemanları Tablo 1'de verilen inkübasyon ortamının pH'sı $37^{\circ}C$ 'de 7,5 olarak saptandı.

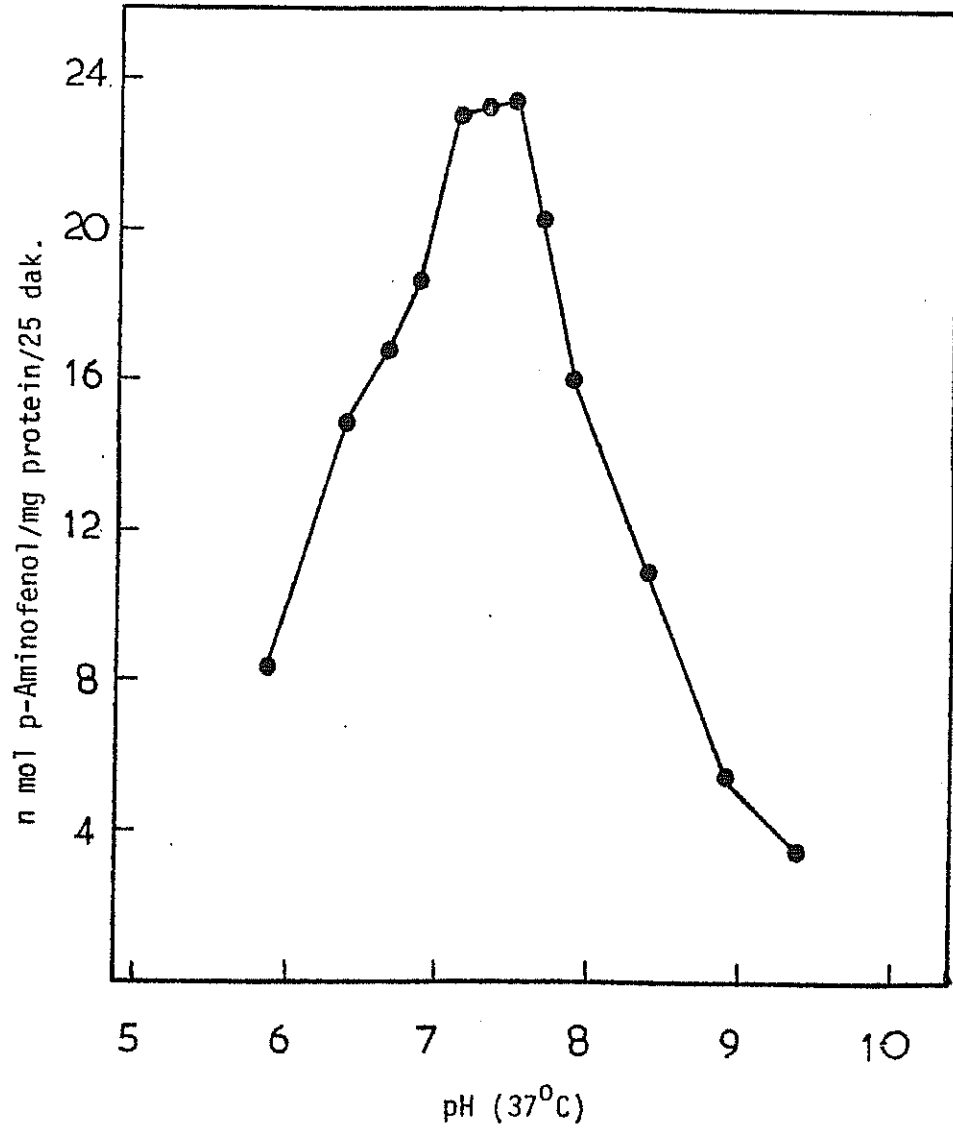
Şekil 2'de gösterildiği gibi akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin pH optimumu $37^{\circ}C$ 'de 6,7 ile 7,7 arasında bulundu. Karaciğer anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin ise $37^{\circ}C$ 'de pH 7,1 ile 7,5 arasında en yüksek değerde olduğu saptandı (Şekil 3).

Enzim Aktivitesinin İnkübasyon Süresi İle Değişimi. İnkübasyon süresinin akciğer ve karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 4'de gösterilmiştir. Karaciğer ve akciğer enzimlerinin katalize ettiği hidroksilasyon reaksiyonlarının en az 60 dakikaya kadar lineer olarak arttığı saptandı ve deneylerde standart olarak 25'er dakikalık inkübasyon süreleri kullanıldı.

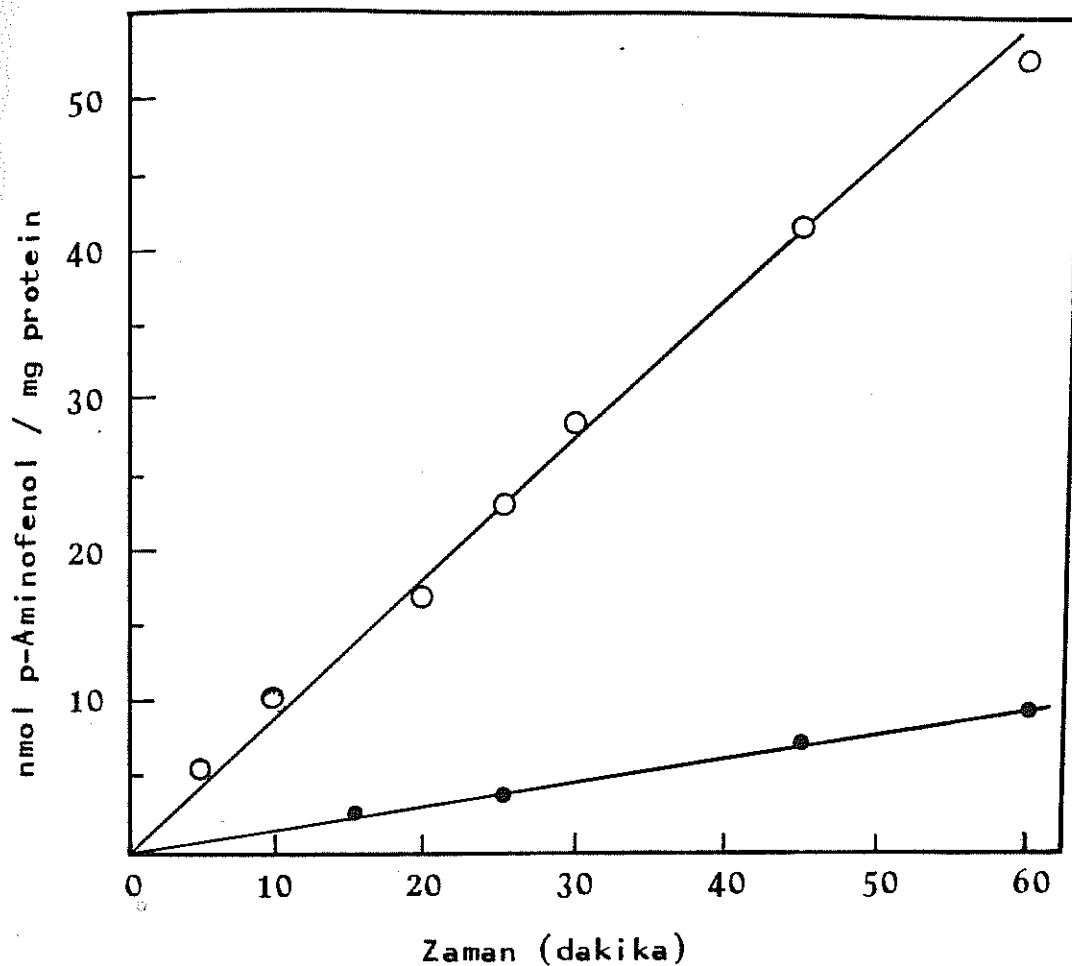
Mikrozomal Enzim Miktarının Anilin 4-Hidroksilaz Reaksiyonunun Hızı Üzerine Etkisi. Şekil 5'de gösterildiği gibi, 1 ml inkübasyon ortamında 0,5 ile 2 mg arasında değişen



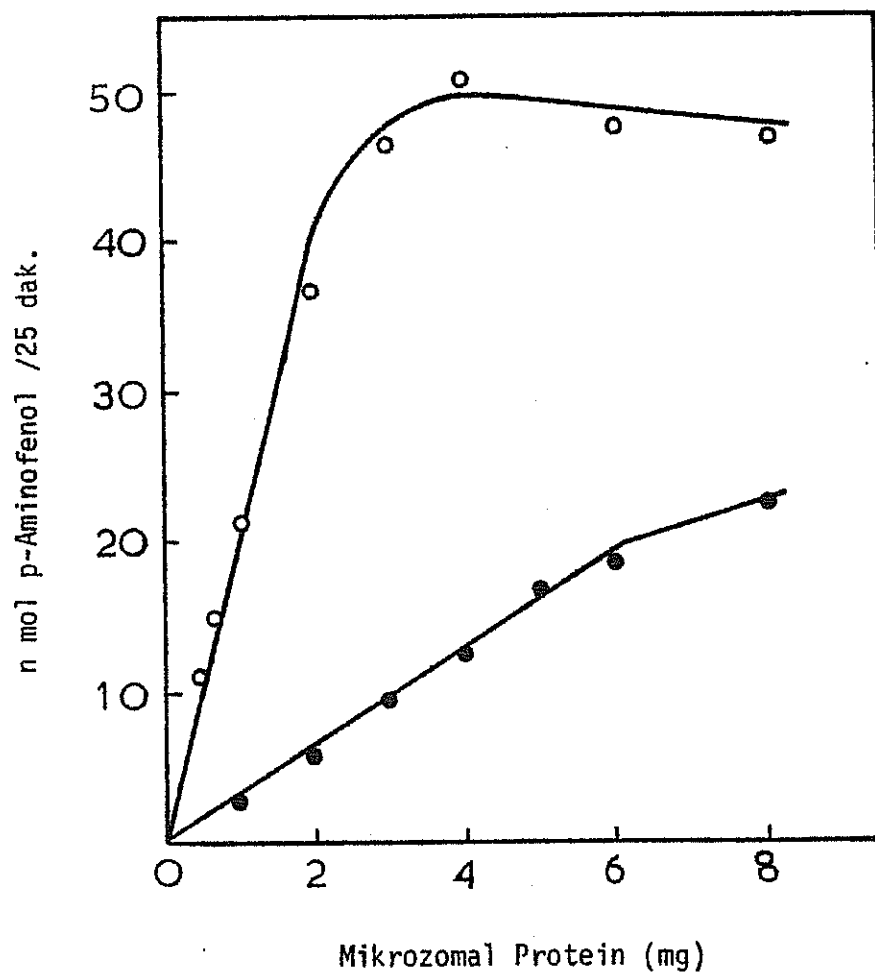
Şekil 2. pH'nın akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisi. Kofaktör olarak NADPH kullanıldı.



Şekil 3. pH'nın karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesine etkisi. Kofaktör olarak NADPH kullanıldı.



Şekil 4. Karaciğer (O—O) ve akciğer (●—●) mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin inkübasyon zamanına bağlı olarak değişmesi.



Sekil 5. Mikrozomal enzim miktarının anilin 4-hidroksilasyon reaksiyonunun hızı üzerine etkisi. Inkübasyon ortamı, 1 ml de, 0.5 μ mol NADPH, 100 μ mol HEPES, pH 7.6, 10 μ mol anilin ve grafikte gösterilen miktarlarda karaciğer (○—○) ve akciğer (●—●) mikrozomal protein içerdi. Mikrozomlar 5 aylık kuzu karaciğer veya akciğere hazırlandı.

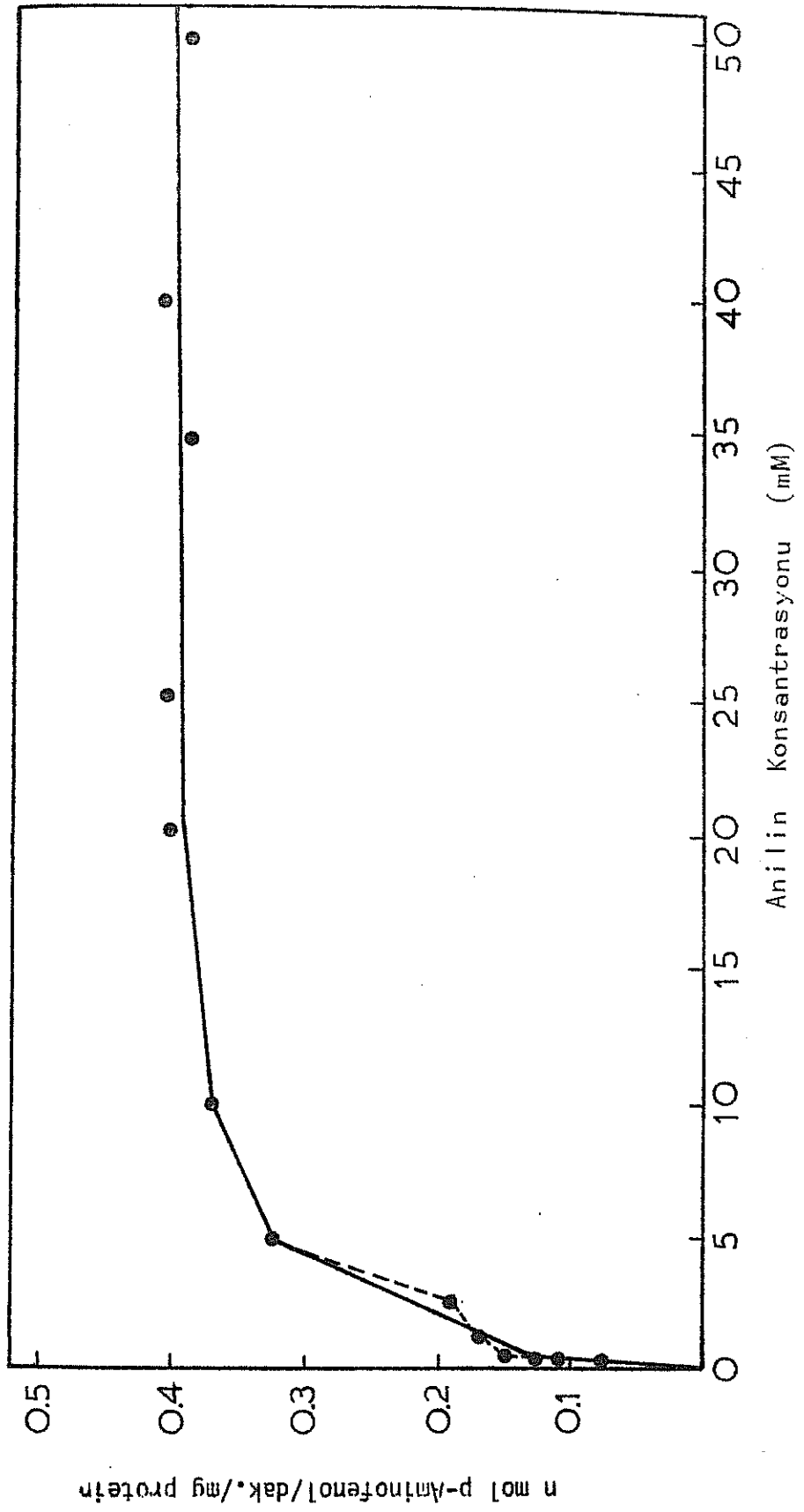
miktarlarda karaciğer mikrozoamları, veya 1 ile 6 mg arasında değişen miktarlarda akciğer mikrozoamları bulunan ortamda, anilin 4-hidroksilasyon hızının mikrozomal protein miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı saptandı.

Sübatrat Konsantrasyonunun Karaciğer Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkisi. Şekil 6'da koyun karaciğer mikrozoomal anilin 4-hidroksilaz enziminin sübatrat doygunluk eğrisi görülmektedir. Enzimin maksimum aktivitesi için, optimum anilin konsantrasyonu yaklaşık olarak 10 mM bulunmuştur. 50 mM'a kadar denenen sübatrat konsantrasyonlarında, enzimin sübatrat tarafından inhibisyonu görülmemiştir. Kinetik çalışmalar esnasında K_m ve $V_{maks.}$ değerlerini saptamak üzere anilin 4-hidroksilaz enzimi için Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri çizilmiştir. Elde edilen Lineweaver-Burk (Şekil 7) ve Eadie-Hofstee (Şekil 8) grafiklerinin eğri hatlı "Curvilinear" oluşu enzime bağlanan sübatratın Michaelis-Menten kinetiğini takip etmediğini göstermektedir.

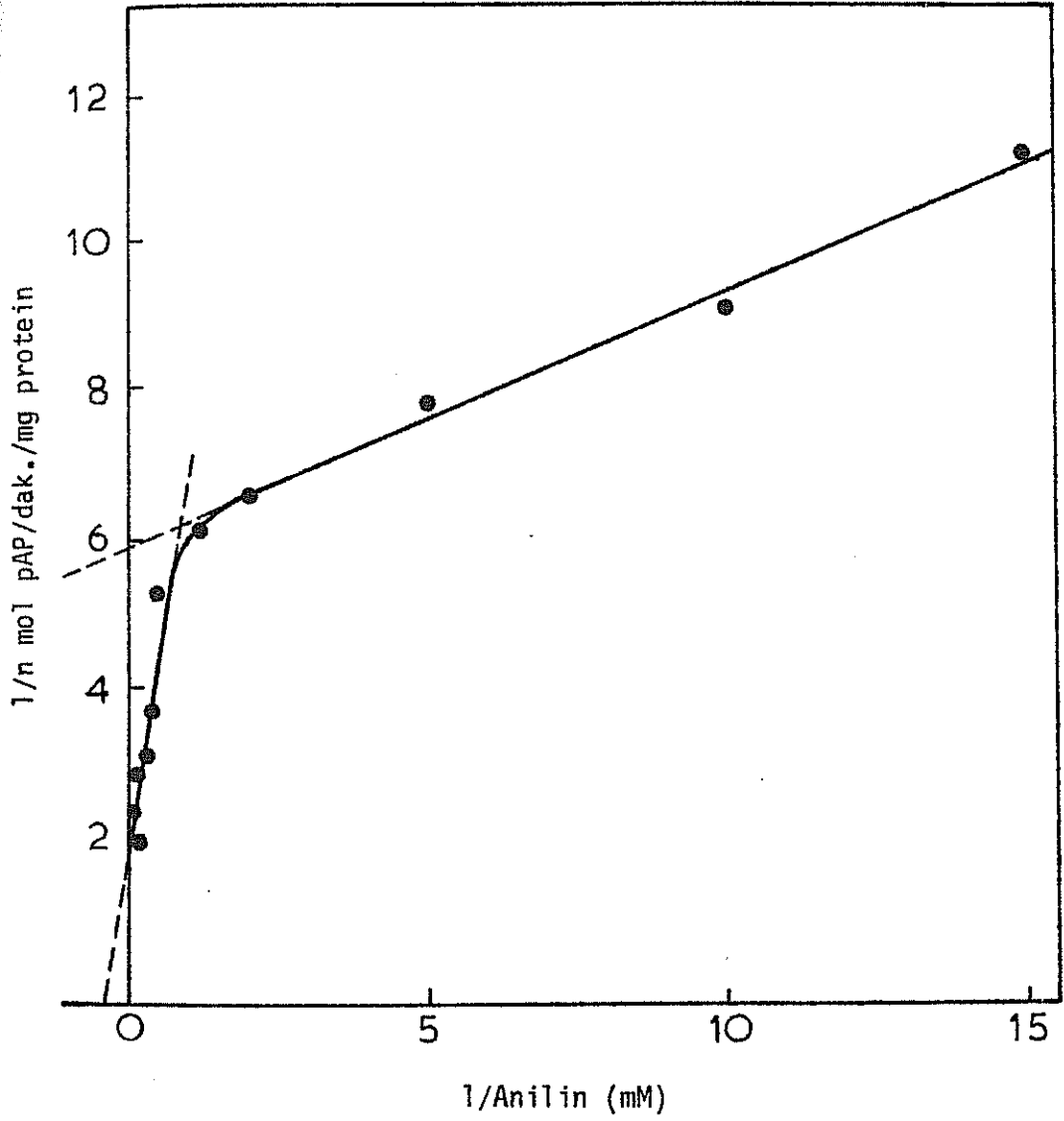
Lineweaver-Burk grafiğinden K_m değerleri 3,13 mM ve 0,082 mM anilin, $V_{maks.}$ değerleri 0,55 ve 0,17, Eadie-Hofstee grafiğinden ise K_m değerleri 3,29 mM ve 0,063 mM anilin, $V_{maks.}$ değerleri ise 0,460 ve 0,178 olarak hesaplanmıştır. Bu iki grafikten elde edilen K_m değerleri birbirleriyle uyum içindedir. Ortalama olarak 3,21 mM ve 0,072 mM olmak üzere karaciğer anilin 4-hidroksilaz enzimi için iki K_m değeri hesaplanmıştır.

Sübatrat Konsantrasyonunun Akciğer Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkisi. Şekil 9'da görülebileceği gibi, akciğer mikrozoomal anilin 4-hidroksilaz enziminin maksimum aktivitesi için optimum anilin konsantrasyonu yaklaşık olarak 7,5 mM bulunmuş ve bu değer 15 mM anilin konsantrasyonuna kadar sabit kaldığı gözlenmiştir. 15 mM'ın üstünde anilin reaksiyonu inhibe ettiği, 40 mM ve 50 mM'lık konsantrasyonlarda ise, enzimin maksimum aktivitesinin % 35'inin inhibe edildiği saptanmıştır.

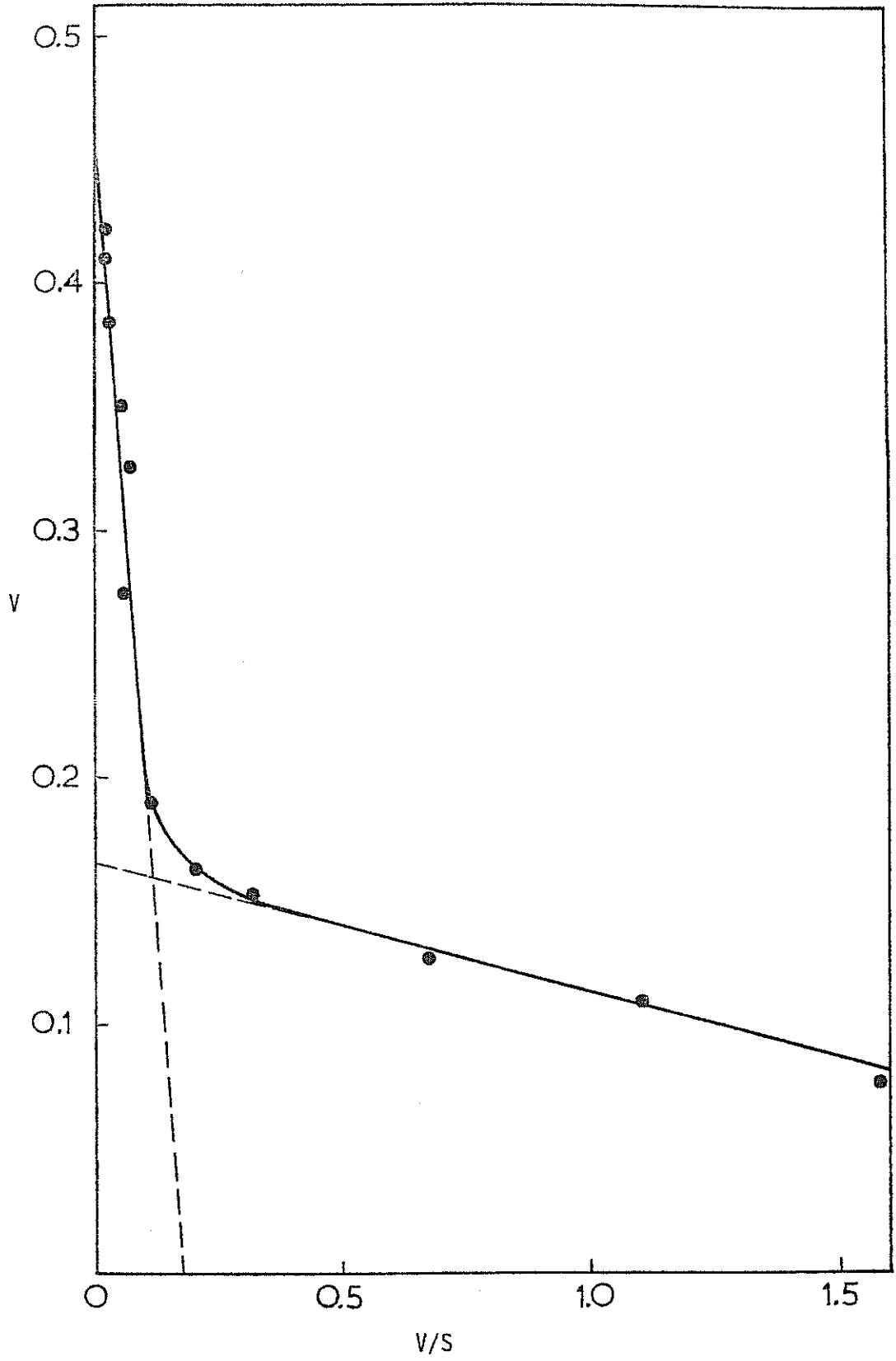
Enzimin Şekil 10'da gösterilen Lineweaver-Burk grafiğinden K_m değeri 1,43 mM anilin ve $V_{maks.}$ değeri 0,3 nmol



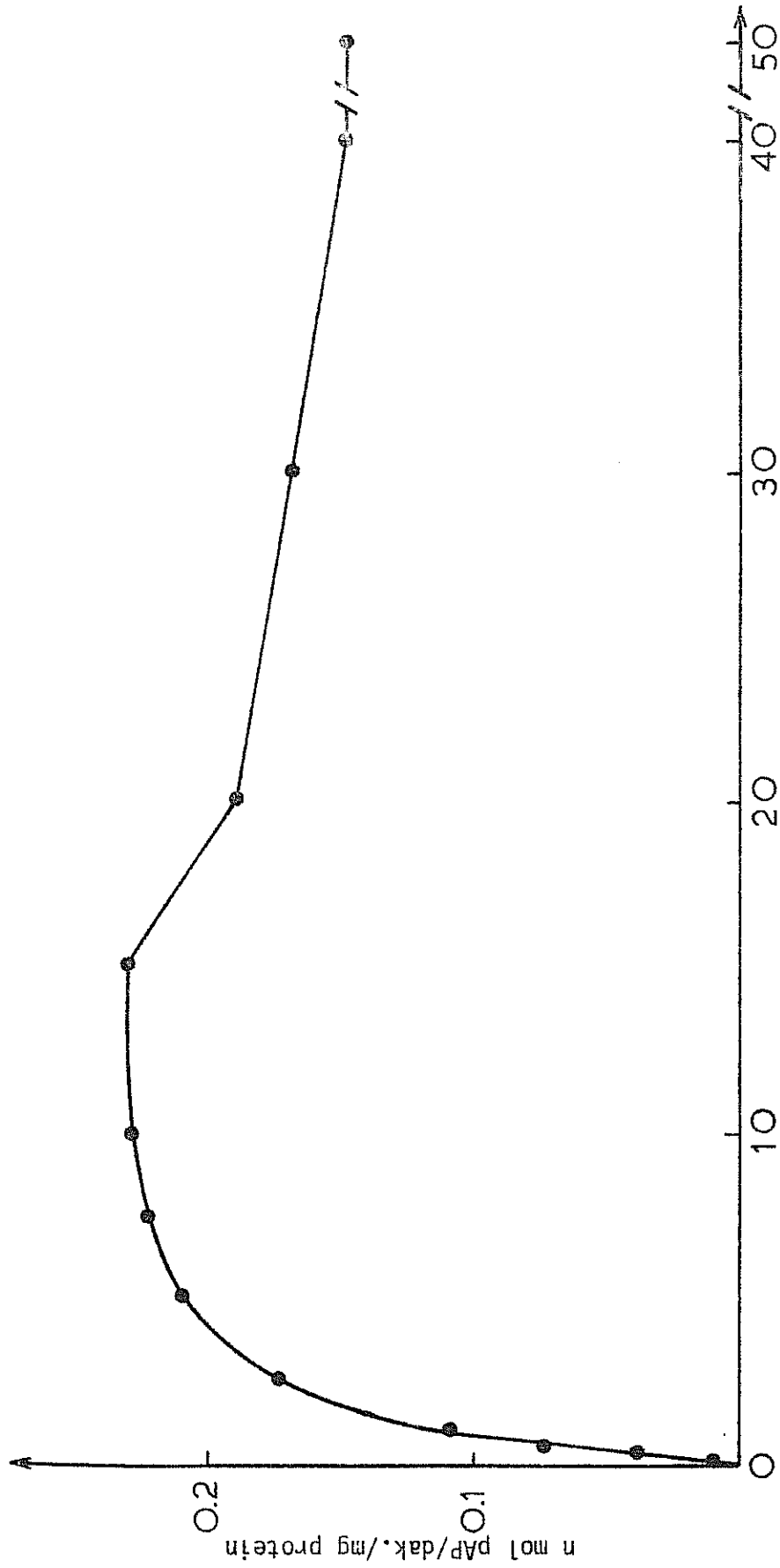
Şekil 6. Substrat konsantrasyonunun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesine etkisi.



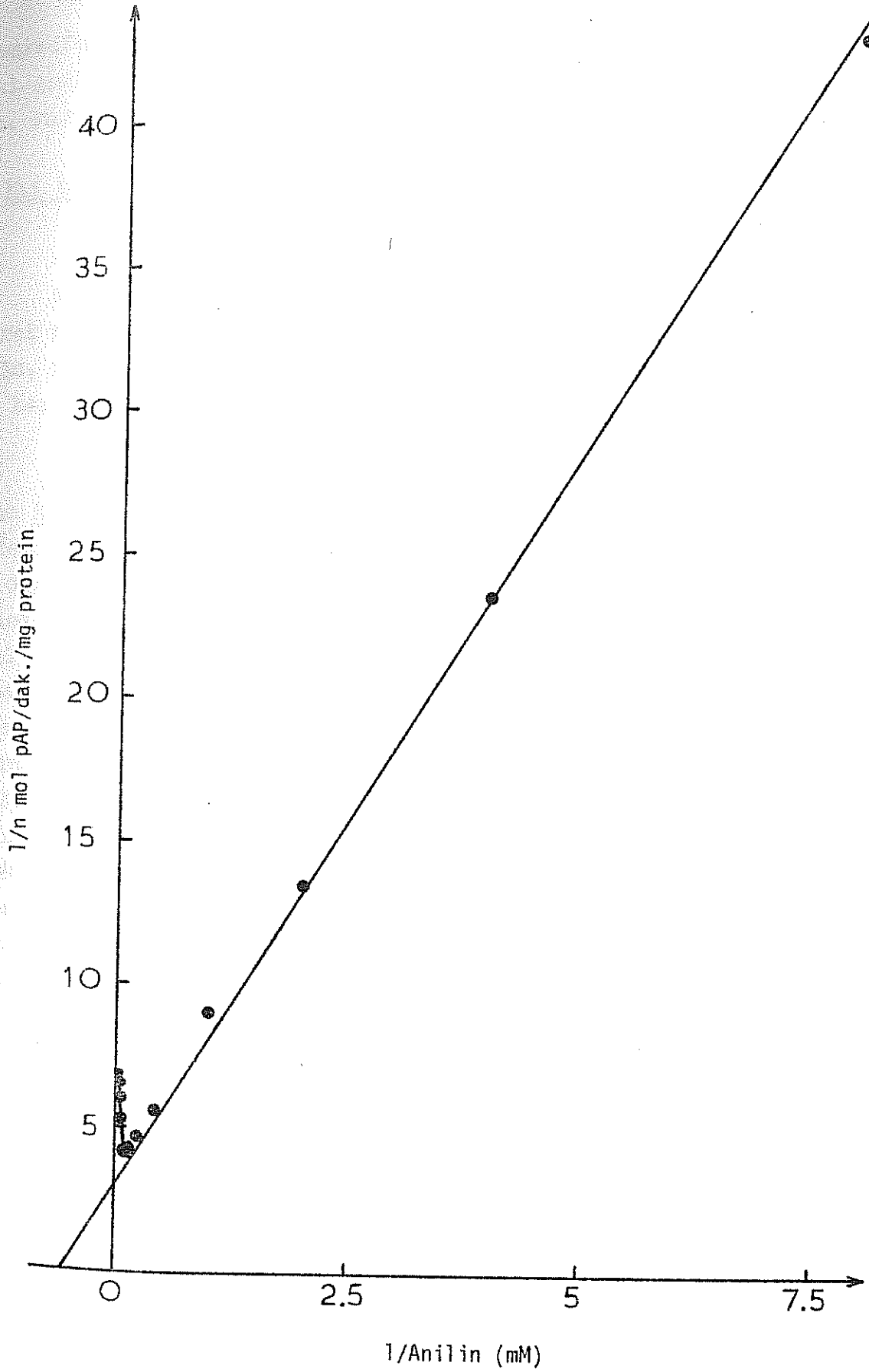
Sekil 7. Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz Enziminin Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 8. Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz Enziminin Eadie-Hofstee grafiği.



Şekil 9. Sübstrat konsantrasyonunun koyun akciğer anilin 4-hidroksilaz aktivitesine etkisi. Akciğerler 1.5 yaşındaki koyunlardan elde edildi.



Şekil 10. Koyun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.

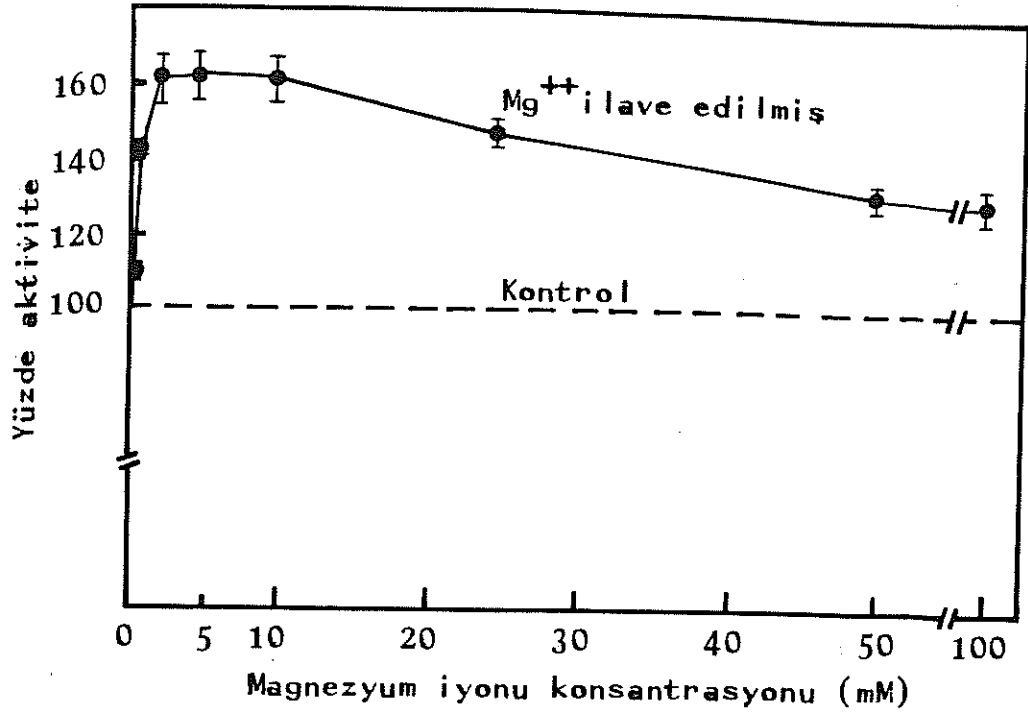
p-aminofenol/dakika/mg protein olarak hesaplanmıştır. Yine aynı grafikten, yüksek konsantrasyonlardaki sübstrat anilinin, enzimin inhibitörü olarak etki ettiği gözlenmektedir.

İki Değerlikli Metal İyonlarının Anilin 4-Hidroksilaz Enzim Aktivitesine Etkileri

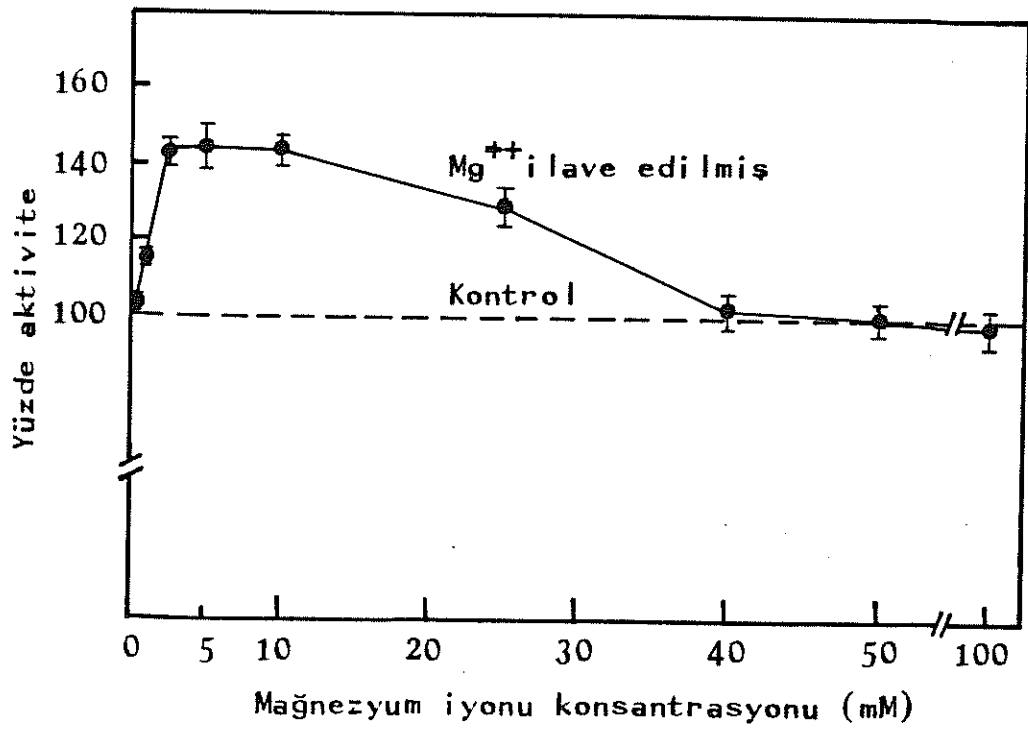
Metal testleri için kullanılan mikrozomlar, endojen olarak bulunması muhtemel olan metallerden arındırılmak amacıyla, 50 mM EDTA içeren 0,013 M HEPES, pH 7,5, tamponu ile bir kez daha yıkandılar.

Mağnezyum İyonlarının Etkisi. Mağnezyum iyonlarının koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimi üzerindeki etkileri, reaksiyon ortamına 0,1 mM'dan 100 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda $MgCl_2$ ilâvesiyle incelendi. Bu deneylerde kofaktör olarak NADPH kullanıldı. Sonuçlar Şekil 11'deki grafikte gösterilmektedir. Bu grafikteki her nokta iki ayrı deney serisinden elde edilen değerlerin ortalamasıdır. Her serideki değerler de çift olarak yapılan numunelerden elde edilen sonuçların ortalamasıdır. Şekil 11 de görüldüğü gibi, mağnezyum iyonunun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi üzerinde hızlandırıcı bir etkisi vardır ve en fazla etki 2,5-10,0 mM mağnezyum iyonu konsantrasyonunda görülmektedir. Mağnezyum iyonu konsantrasyonu 10,0 mM'dan 50,0 mM'a kadar artırıldığı zaman enzim aktivitesinde bir düşüş görülmekle beraber, bu değerlerin kontrola nazaran % 30 kadar fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 11).

Yukarıda belirttiğimiz gibi, inkübasyon ortamına ilâve edilen 2,5-10,0 mM konsantrasyonundaki mağnezyum iyonunun enzim aktivitesini hızlandırıcı bir etkisi görülmüştür. Bu nedenle, optimum karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için, Tablo 1'de elemanları verilen inkübasyon ortamına 2,5 mM $MgCl_2$ ilâve edilmesi öngörülmüştür. Optimum koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları Tablo 4'de verilmektedir.



Şekil 11. Mağnezyum iyonun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, Kofaktor olarak NADPH kullanıldı.



Şekil 12. Mağnezyum iyonunun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, Kofaktor olarak NADPH kullanıldı.

Tablo 4. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılması tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH kullanılan).

Elemanlar	Stok Çözeltisi	İlâve Edilecek Hacim (ml)	1 ml'lik İnkübasyon Karışımındaki Son Konsantrasyon
HEPES Tamponu pH 7,6	200 mM	0,50	100 mM
Anilin	100 mM	0,10	10 mM
Mikrozomlar	2,5 mg prot/ml karaciğer için (veya) 17,5 mg prot/ml akciğer için	0,20 (0,20)	0,5 mg prot 3,5 mg prot
MgCl ₂	100 mM	0,025	2,5 mM
H ₂ O		0,125	
NADPH	10 mM	0,05	0,5 mM

Mağnezyum iyonlarının koyun akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerindeki etkileri de, karaciğer enzimidaki gibi, reaksiyon ortamına 0,1 mM'dan 100 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda $MgCl_2$ ilâvesiyle incelendi. Bu deneylerde de kofaktör olarak NADPH kullanıldı. Sonuçlar Şekil 12'deki grafikte gösterilmektedir. Bu grafikteki her nokta iki ayrı deney serisinden elde edilen değerlerin ortalamasıdır. Her serideki değerler de, diğer deneylerde olduğu gibi, çift olarak yapılan numunelerden elde edilen sonuçların ortalamasıdır. Şekil 12'de görüldüğü gibi, mağnezyum iyonunun, karaciğer enzimidaki gibi, akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerinde hızlandırıcı bir etkisi vardır ve en fazla etki 2,5-10,0 mM mağnezyum iyonu konsantrasyonunda görülmektedir. Mağnezyum iyonu konsantrasyonu 10 mM'dan 100 mM'a kadar artırıldığı zaman enzim aktivitesinde bir düşüş görülmekte, 40 mM mağnezyum iyonu konsantrasyonunda, mağnezyum iyonunun aktiviteyi hızlandırıcı etkisi kalmamakta ve aktivite kontrol ile aynı değere erişmektedir (Şekil 12).

Yukarıda anlatılan deneylerin sonucu olarak, optimum akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için, Tablo 1'de elemanları verilen inkübasyon ortamına 2,5 mM $MgCl_2$ ilâve edilmesi uygun görülmüştür. Optimum akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları Tablo 4'de verilmektedir.

Karaciğer ve akciğer enzim aktiviteleri üzerine, mağnezyum iyonunun etkisi, Tablo 5'de isimleri verilen değişik kofaktörlerin etkisi ile birlikte incelendi. Sonuçlar Tablo 5'de özetlenmektedir. Tablo 5'de görüldüğü gibi, NADPH'den ayrı olarak reaksiyon ortamında, NADPH üreten sistem, NADH veya NADH ile birlikte NADPH kullanıldığı zaman, 2,5, 5,0 ve 10,0 mM konsantrasyonlarındaki mağnezyum iyonlarının hem karaciğer hem de akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerinde hızlandırıcı etkisi vardır.

Anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin tayininde NADPH üreten sistem kullanıldığı zaman, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin optimum aktivitesi için gerekli olan 2,5 mM

Tablo 5. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerine magnezyum iyonlarının, çeşitli kofaktörler ile birlikte etkisi.

Kofaktör	Mg ⁺⁺ mM	Akciğer	Karaciğer
		Enzimi % Aktivite	Enzimi % Aktivite
NADPH	0	100	100
	2,5	146	167
	5,0	150	166
	10,0	148	166
NADPH üreten sistem	2,5	101	110
	5,0	112	138
	10,0	110	139
NADH	0	16,5	19,6
	2,5	22,8	22,7
	5,0	23,0	22,0
	10,0	25,0	22,6
NADH+NADPH	0	110	102
	2,5	116	154
	5,0	120	156
	10,0	121	154

^aİnkübasyon koşulları, Tablo 3'de anlatıldığı gibidir. Yalnız neticeler bir deney dizisinden elde edilen değerlerin ortalamasıdır.

Tablo 6. Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılması tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları (kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılan).

Elemanlar	Stok Çözeltileri	İlâve Edilecek Hacim (ml)	1 ml'lik Inkübasyon Karışımındaki Son Konsantrasyon
HEPES Tamponu pH 7,6	200 mM	0,50	100 mM
Anilin	100 mM	0,10	10 mM
Mikrozomlar	2,5 mg prot/ml karaciğer için (veya) 17,5 mg prot/ml akciğer için	0,20 (0,20)	0,5 mg prot 3,5 mg prot
MgCl ₂	100 mM	0,025	2,5 mM
H ₂ O		0,025	
NADPH üreten sistem:			
Glikoz-6-fosfat	100 mM	0,025	2,5 mM
MgCl ₂	100 mM	0,025	2,5 mM
HEPES Tamponu pH 7,8	200 mM	0,071	14,2 mM
NADP ⁺	10 mM	0,025	0,25 mM
Glikoz-6-fosfat Dehidrojenaz	260 Ü/ml	0,004	1 ünite

mağnezyum iyonuna ilâve olarak inkübasyon ortamına 2,5 ve 7,5 mM konsantrasyonlarında mağnezyum iyonu ilâve edildiği zaman akciğer enziminin aktivitesinde % 10-12 kadarlık bir artma, karaciğer enzim aktivitesinde ise % 38-39'luk bir artış gözlenmiştir (Tablo 5). Halbuki, aynı konsantrasyonlardaki mağnezyum iyonu, inkübasyon ortamında yalnız NADPH kullanıldığı zaman, enzim aktivitelerinde daha yüksek oranda bir artışa neden olmuş, karaciğer enzim aktivitesini % 66-67 ve akciğer enzim aktivitesini ise % 46-50 kadar hızlandırmıştır. Bu farklılığın nedeni anlaşılammıştır.

Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde NADPH üreten sistem kullanıldığı zaman, optimum enzim aktivitesi elde edilebilmesi için Tablo 2'de elemanları verilen inkübasyon ortamına, ayrıca 2,5 mM $MgCl_2$ ilâve edilmesi uygun görülmüştür. Optimum karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları Tablo 6'da verilmektedir.

Nikel İyonlarının Etkisi. Reaksiyon ortamına ilâve edilen değişik konsantrasyonlardaki $NiCl_2$ 'ün karaciğer ve akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerindeki etkisi Tablo 7'de görülmektedir. Nikel iyonlarının karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesini engellediği gözlenmiştir. 0,1 mM nikel iyonu varlığının karaciğer enzim aktivitesini % 89'a, 0,5 mM nikelin % 77'e ve 1 mM nikelin ise % 73'e düşürdüğü saptanmıştır. 5,0 mM nikel iyonunun ise karaciğer enzimini tamamen denatüre ederek, enzim aktivitesini engellediği gözlenmiştir.

0,1 mM, 1 mM ve 5,0 mM konsantrasyonlarındaki nikel iyonunun akciğer mikrozomal hidroksilaz enziminin aktivitesini, sırasıyla % 20, % 35 ve % 45 oranında inhibe ettiği gözlenmiş, 10 mM konsantrasyondaki nikel iyonunun ise enzimin aktivitesini tamamen durdurduğu saptanmıştır (Tablo 7).

Kadmiyum İyonlarının Etkisi. Tablo 7'de görüldüğü gibi kadmiyum iyonlarının mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerindeki önleyici etkilerinin, nikel

mağnezyum iyonuna ilâve olarak inkübasyon ortamına 2,5 ve 7,5 mM konsantrasyonlarında mağnezyum iyonu ilâve edildiği zaman akciğer enziminin aktivitesinde % 10-12 kadarlık bir artma, karaciğer enzim aktivitesinde ise % 38-39'luk bir artış gözlenmiştir (Tablo 5). Halbuki, aynı konsantrasyonlardaki mağnezyum iyonu, inkübasyon ortamında yalnız NADPH kullanıldığı zaman, enzim aktivitelerinde daha yüksek oranda bir artışa neden olmuş, karaciğer enzim aktivitesini % 66-67 ve akciğer enzim aktivitesini ise % 46-50 kadar hızlandırmıştır. Bu farklılığın nedeni anlaşılamamıştır.

Anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesinin tayininde NADPH üreten sistem kullanıldığı zaman, optimum enzim aktivitesi elde edilebilmesi için Tablo 2'de elemanları verilen inkübasyon ortamına, ayrıca 2,5 mM $MgCl_2$ ilâve edilmesi uygun görülmüştür. Optimum karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesi elde edilebilmesi için tavsiye edilen inkübasyon ortamının elemanları Tablo 6'da verilmektedir.

Nikel İyonlarının Etkisi. Reaksiyon ortamına ilâve edilen değişik konsantrasyonlardaki $NiCl_2$ 'ün karaciğer ve akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerindeki etkisi Tablo 7'de görülmektedir. Nikel iyonlarının karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzim aktivitesini engellediği gözlenmiştir. 0,1 mM nikel iyonu varlığının karaciğer enzim aktivitesini % 89'a, 0,5 mM nikelin % 77'e ve 1 mM nikelin ise % 73'e düşürdüğü saptanmıştır. 5,0 mM nikel iyonunun ise karaciğer enzimini tamamen denatüre ederek, enzim aktivitesini engellediği gözlenmiştir.

0,1 mM, 1 mM ve 5,0 mM konsantrasyonlarındaki nikel iyonunun akciğer mikrozomal hidroksilaz enziminin aktivitesini, sırasıyla % 20, % 35 ve % 45 oranında inhibe ettiği gözlenmiş, 10 mM konsantrasyondaki nikel iyonunun ise enzimin aktivitesini tamamen durdurduğu saptanmıştır (Tablo 7).

Kadmiyum İyonlarının Etkisi. Tablo 7'de görüldüğü gibi kadmiyum iyonlarının mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesi üzerindeki önleyici etkilerinin, nikel

Tablo 7. NiCl_2 ve CdCl_2 'ün, *in vitro*, karaciğer ve akciğer anilin 4-hidroksilaz aktiviteleri üzerindeki etkileri.

	Karaciğer Enzimi	Akciğer Enzimi
	% Aktivite	% Aktivite
Kontrol ^a	100,0	100,0
0,1 mM NiCl_2	89,4	80,0
0,5 mM NiCl_2	77,7	70,0
1,0 mM NiCl_2	73,4	65,0
5,0 mM NiCl_2	0,0	55,0
10,0 mM NiCl_2	0,0	0,0
0,1 mM CdCl_2	44,4	68,0
0,5 mM CdCl_2	0,0	8,0
1,0 mM CdCl_2	0,0	0,0

^aKontrol ortamı Tablo 1'de gösterilen kimyasal maddeleri 1 ml'lik hacimde içermektedir.

iyonunun etkisinden daha şiddetli olduğu bulunmuştur. 0,1 mM kadmiyum iyonunun karaciğer enzim aktivitesini % 56 oranında önlediği ve 0,5 mM kadmiyum iyonunun ise hidroksilaz aktivitesini tamamen inhibe ettiği saptanmıştır. 0,5 mM kadmiyum iyonunun akciğer enzim aktivitesini % 92 kadar önlediği ve 1,0 mM kadmiyum iyonunun ise enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği Tablo 7'den görülebilir.

IV. TARTIŞMA ve SONUÇ

Koyun karaciğer ve akciğer mikrozoamlarında bulunduğunu saptadığımız, anilin p-aminofenole dönüşümünü katalize eden anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesinin, çözünürleştirilmiş sitokrom P-450, NADPH bağımlı sitokrom c redüktaz ve sentetik lipid, fosfatadil kolin dilauroyl bulunan ortamda tamamen restore edilebileceği laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (19). Böylece koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin, aynı zamanda monooksijenazlar, karışık fonksiyonlu oksidazlar veya mikrozomal hidroksilazlar ismiyle anılan enzim sisteminin bir üyesi olduğu saptanmıştır (19).

Bu çalışmada kofaktör NADPH'nın gerek akciğer gerekse karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin maksimum aktivitesi için gerekli olduğu ve NADPH üreten bir sistemin de tamamen NADPH yerine kullanılabileceği gösterildi.

Koyun akciğer anilin 4-hidroksilaz özgül aktivitesinin, karaciğer enziminin aktivitesinin ancak % 23'ü olduğu saptandı. Sığırlarda bu değer % 10 (8), kobaylarda % 13 (8) ve tavşanlarda % 64 (8), % 45 (10) ve % 43 (26) olarak bulunmuştur. Aynı şekilde monooksijenazların bir üyesi olduğu saptanan koyun akciğer etilmorfin N-demetilaz özgül aktivitesinin koyun karaciğer enziminin özgül aktivitesinin % 23'ü olduğu saptanmıştır (27).

Laboratuvarlarımızda yaptığımız çalışmalar sonucunda saptadığımız koyun akciğer mikrozomal sitokrom c redüktaz enziminin aktivitesinin (30 ünite/mg protein) ve sitokrom P-450 miktarının (0,20 nmol P-450/mg protein), karaciğer mikrozoamlarının, 1/3'ü ve 1/4'ü kadar olmasının (19), akciğer mikrozoamlarının düşük oranda anilin 4-hidroksilaz aktivitesi içermesine neden olduğunu bize düşündürmektedir.

Koyun akciğer ve karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin substrat doyunluk eğrileri birbirle-

rinden farklı bulunmuştur. 15 mM'un üstündeki anilin konsantrasyonunun akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun 40 mM anilin konsantrasyonunda % 35'e kadar çıktığı gözlenirken (Şekil 9 ve 10), 10 mM'dan 50 mM'a kadar artan konsantrasyonlarda ilâve edilen anilin karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz aktivitesini etkilemediği saptanmıştır (Şekil 6). Akciğer ve karaciğer anilin 4-hidroksilaz enzimleri arasındaki farklılıklar, bu enzimler için çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinde daha da belirli bir hal almıştır. Akciğer anilin 4-hidroksilaz enziminin Lineweaver-Burk grafiğinin lineer olduğu saptanmış ve bu grafikten K_m 1,43 mM anilin olarak hesaplanmıştır.

Karaciğer enzimi için çizilen, gerek Lineweaver-Burk gerekse Eadie-Hofstee grafiklerinin, eğri hatlı olduğu ve bu enzimin Michaelis-Menten kinetiğini takip etmediği saptanmıştır. Şekil 7 ve 8'de gösterilen bu grafiklerden, ortalama olarak, 3,21 mM ve 0,072 mM olmak üzere, karaciğer anilin 4-hidroksilaz enzimi için iki K_m değeri bulunmuştur. Bu grafiklerden elde edilen eğriler, karaciğer mikrozomlarında, anilinden p-aminofenol oluşumunu katalize eden iki ayrı enzimin varlığını veya iki ayrı konformasyonda bulunan bir enzimi, veya bir enzimin iki aktif bölgesinin varlığını göstermektedir.

Bend ve arkadaşları (10) tavşan akciğer ve karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enzimlerinin Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee grafiklerinin eğri hatlı olduğunu bildirmekle beraber hem karaciğer hem de akciğer enzimleri için takriben 1 mM olan bir tek K_m değeri bulduklarını yayınlamışlardır. Makalede (10) grafikler gösterilmediği için, eğri hatlı olduklarını belirttikleri Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee grafiklerinden nasıl bir tek K_m değeri buldukları anlayışlanmamıştır.

Yukarıda belirttiğimiz gibi, bu çalışmada hem karaciğer hem de akciğer mikrozomlarında anilin p-aminofenole dönüşümünü katalize eden enzimin varlığı gösterilmiştir. Anilin ve onun metabolitlerinden biri olan o-aminofenol akut toksisitesi yüksek olan maddeler olmakla beraber,

p-aminofenol, glikuronik asit ve sülfat iyonuyla konjuge olarak vücuttan atılabileceği için toksik bir madde değildir. Koyun karaciğer ve akciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz enziminin mevcut olduğunun saptanması, koyunda adı geçen organlarda bir detoksifikasyon sisteminin varlığını göstermektedir. Ayrıca metal iyonlarının da anilin 4-hidroksilaz enzimi üzerindeki etkilerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullandığımız magnezyum, nikel ve kadmiyum iyonlarının anilin 4-hidroksilaz enzimi üzerindeki etkisi daha önce hiçbir hayvan dokusunda incelenmemiştir. Çalışmanın neticesinde magnezyum iyonunun hem karaciğer, hem de akciğer anilin 4-hidroksilaz aktivitesini uyarıcı, nikel ve kadmiyum iyonlarının ise her iki dokuya ait enzimlerin aktivitesini engelleyici etkisi olduğu saptanmıştır.

Daha önce belirtildiği gibi, anilin 4-hidroksilaz enzimi kimyasal maddeleri ve ilâçları metabolize eden sitokrom P-450'ye bağımlı mikrozomal monooksijenazlar sisteminin bir üyesidir (15-19). Bu bakımdan kimyasal maddelerin ve ilâçların mutajen olup olmadığını inceleyen AMES testinde (28, 29) kullanılan mikrozomların veya test maddelerinin endojen metal iyonu içermeleri testleri olumlu veya olumsuz şekilde etkileyerek yanlış sonuçlar alınmasına neden olabilir.

Nikel ve kadmiyum iyonlarının içme sularında ve kirli şehir havasında bulunduğu saptanmıştır (30). Ayrıca nikelin kanserojen olduğu da bilinmektedir (30). Nikel ve kadmiyum iyonlarının çok düşük konsantrasyonlarda, hem karaciğer hem de akciğer enzim aktivitesini önleyici tesirleri (Tablo 7) anilinin metabolizması bakımından önemlidir. Koyunların hem bu adı geçen metal iyonlarına, hem de aniline aynı zamanda maruz kalmaları halinde karaciğerde ve akciğerde bulunan anilin detoksifikasyon mekanizmasının önemli ölçüde zarar göreceği muhakkaktır. Yetersiz detoksifikasyon sonucunda toksik anilin bileşiklerinin karaciğerde ve akciğerde birikeceği ve vücut için tehlikeli olabileceği düşünülebilir. Böyle bir koyun karaciğerinin insanlar tarafından besin maddesi olarak kullanılması insan sağlığını önemli ölçüde tehdit edecektir.

Yukarıda belirtildiği gibi, çalışmamızda magnezyum

iyonlarının anilin 4-hidroksilaz enziminin aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin hem magnezyum, hem de kadmiyum ve nikel iyonlarının bulunduğu bir ortamda nasıl etkileneceğinin araştırılması, çözümlenmesi gereken başka bir konu olarak kalmaktadır. Eğer muayyen konsantrasyonlardaki nikel ve kadmiyum iyonlarının bulunduğu ortamda, magnezyum iyonları, nikel ve kadmiyum iyonlarının enzim aktivitesini engelleyici etkisini kaldırabilirlerse, magnezyum iyonunun bu etkisinden toksikolojik olarak da yararlanmak mümkün olabilir.

V. KAYNAKLAR

1. Weisburger, J. H.: "Chemical carcinogenesis" sayfa 333-378, Casarett, L. J. ve Doull, J. (Derleyenler), Toxicology, Mac Millan Publishing Co., Inc., New York, 1975.
2. Velicangil, S.: Endüstri Sağlığı ve Meslek Hastalıkları. Yakın ve Ortadoğu Çalışma Enstitüsü Yayınları, No. 3, Dizerkonca Matbaası, İstanbul, 1970.
3. Smith, R. P.: "Toxicology of the formed elements in the blood" sayfa 225-243, Casarett, L. J. ve Doull, J. (Derleyenler), Toxicology, Mac Millan Publishing Co., Inc., New York, 1975.
4. Elkins, B. H.: The Chemistry of Industrial Toxicology. John Wiley and Sons, Inc., 1959.
5. Randomski, J. L.: "The primary aromatic amines: Their biological properties and structure-activity relationships" sayfa 129-157, George, R., Okun, R. ve Cho, A. K. (Derleyenler), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1979.
6. Parke, D. V.: The Biochemistry of Foreign Compounds. Pergamon Press, London, İngiltere, 1968.
7. Parke, D. V.: Studies in detoxication. 84. The metabolism of (14)C-aniline in rabbit and other animals. Biochem. J., 77, 493-503, 1960.
8. Oppelt, W. W., Zange, M., Ross, W. E. ve Remmer, H.: Comparison of microsomal drug hydroxylation in lung and liver of various species. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1, 43-56, 1970.
9. Flynn, E., Lynch, M. ve Zannoni, V. G.: Species differences and drug metabolism. Biochem. Pharmacol., 21, 2577-2590, 1972.
10. Bend, J. R., Hook, G. E. R., Easterling, R. E., Gram, T. E. ve Fouts, J. R.: A comparative study of the hepatic and pulmonary microsomal mixed-function oxidase systems in the rabbit. J. Pharmacol. Exp. Ther., 183, 206-216, 1972.
11. Pohl, R. J., Bend, J. R., Guarino, A. M. ve Fouts, J. R.: Hepatic microsomal mixed-function oxidase activity

- of several marine species from coastal Maine. *Drug Metab. Dispos.*, 2, 545-555, 1974.
12. Bend, J. R., Hook, G. E. R. ve Gram, T. E.: Characterization of lung microsomes as related to drug metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, 1, 358-367, 1973.
 13. Matsubara, T. ve Tochino, Y.: Electron transport systems of lung microsomes and their physiological functions. *J. Biochem.*, 70, 981-991, 1971.
 14. Matsubara, T., Nakamura, Y. ve Tochino, Y.: Electron transport systems of lung microsomes and their physiological functions. *Xenobiotica*, 5, 205-212, 1975.
 15. Lu, A. Y. H., Jacobson, M., Levin, W., West, S. B. ve Kuntzman, R.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogeneous substrates. IV. Hydroxylation of aniline. *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 294-297, 1972.
 16. Fujita, T. ve Mannering, G. J.: Electron transport components of hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.*, 249, 8150-8156, 1973.
 17. Imai, Y. ve Sato, R.: A gel electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome P-450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 8-14, 1974.
 18. van der Hoeven, T. A., Haugen, D. A., Coon, M. J.: Cytochrome P-450 purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: Catalytic activity and other properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 569-575, 1974.
 19. Arınc, E.: "A comparative study on the reconstitution of the hepatic and pulmonary microsomal anilin 4-hydroxylase activities from solubilized components in the lamb" sayfa 207-210, Coon, M. J., Conney, A. H., Estabrook, R. W., Gelboin, H. V., Gillette, J. R. ve O'Brien, P. J. (Derleyenler), *Microsomes, Drug Oxidations, and Chemical Carcinogenesis. Vol. I*, Academic Press, New York, 1980.
 20. Arınc, E. ve Philpot, R. M.: Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *J. Biol. Chem.*, 251, 3213-3220, 1976.
 21. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J.: Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
 22. Imai, Y., Ito, A. ve Sato, R.: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal

- fraction. J. Biochem. (Tokyo), 60, 417-428, 1966.
23. Omura, T. ve Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 239, 2370-2378, 1964.
 24. Omura, T. ve Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. J. Biol. Chem., 239, 2379-2385, 1964.
 25. Masters, B. S. S., Williams, C. H. ve Kamin, H.: "Preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver" sayfa 565-573, Colowick, S. P. ve Kaplan, N. O. (Derleyenler), Methods in Enzymology, New York, Academic Press, Inc., Cilt X, 1967.
 26. Hook, G. E. R., Bend, J. R., Hoel, D., Fouts, J. ve Gram, T. E.: Preparation of lung microsomes and a comparison of the distribution of enzymes between subcellular fractions of rabbit lung and liver. J. Pharmacol. Exp. Therap., 182, 474-490, 1972.
 27. Arınç, E.: Karaciğer ve akciğer mikrozoamlarından çözümlenmiş sitokrom P-450'lerin spektral ve biyokatalitik özellikleri. T. B. T. A. K. VII. Bilim Kongresi, Temel Bilimler Araştırma Grubu Tebliği, Tebliğ basılacak.
 28. Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. ve Lee, F. D.: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 70, 2281-2285, 1973.
 29. Ames, B. N., Mccann, J. ve Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
 30. Beliles, R. P.: "Metals" sayfa 454-502, Casarett, L. J. ve Doull, J. (Derleyenler), Toxicology, Mac Millan Publishing Co., Inc., New York, 1975.