

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİNİN TAYİNİ ÜZERİNE DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

Orhan Canbolat* Ömer Akyol* Mustafa Kavutcu*
Zühal Yurtaslan* İlker Durak*

Canlı organizmadaki reaksiyonların bir çoğunda radikal yapısına sahip ara ürünler oluşmaktadır. Aerobik organizmalarda moleküler oksijen (O₂) çok yaygın olarak kullanılmakta ve hücrelerde oluşan reaksiyonlar sonucunda çok miktarda oksijen türevi serbest radikaller meydana gelmektedir. Organizma açısından en önemli radikaller süperoksit (O₂) ve hidroksi (OH) radikalleridir (3).

Serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği hasarlar sebebiyle bu metabolizma son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır (1,4). Serbest radikal metabolizmasıyla ilgili hücre içi enzimatik savunma mekanizmaları olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) enzimleri araştırmacılar tarafından çeşitli tip hastalık gruplarında incelenmiştir. Bu enzimlerden süperoksit dismutaz aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir.



SOD, bu şekilde süperoksit radikalinden hücreyi korumaktadır. Günümüzde SOD aktivitesinin tayini için direkt ve indirekt olmak üzere çeşitli metodlar kullanılmaktadır. İndirekt metodların prensibi, oluşturulan serbest radikallerin tüketilme hızına dayanmaktadır (2). Bu tip metodlardan biri olan Yi-Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metodda reaksiyonu durdurmak amacıyla 0.8 mM CuCl₂ çözeltisi kullanılmaktadır (5).

Biz çeşitli hastalıklarda SOD aktivitesinin tayini amacıyla Yi-Sun ve arkadaşlarının metodunu kullanarak çalışmalar yaptık. Bu çalışmalar esnasında bazı numunelerin absorbanans değerlerini köre çok ya-

* A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

kın, bazılarının absorbands değerlerini ise körün verdiği absorbands değerlerinden daha yüksek bulduk. Bu durum, numunelerdeki SOD aktivitesinin tayininde bazı problemlerin olduğu düşündürmüştür.

Metodun prensibine göre körün absorbandsının numunenin absorbandsından düşük olması mümkün değildir. Bu hatanın kaynağını tespit edebilmek amacıyla kullandığımız metodla ilgili bir çalışma yapmayı düşündük. İlk olarak bu absorbands farklılıklarının seyreltmeye bağlı olup olmadığını anlamak amacıyla körün ve numunenin absorbandslarını CuCl ilavesinden önce ve sonra okuduk ve CuCl_2 ilavesinden sonra seyrelmeye bağlı absorbands değişimleriyle ilişkili olmayan absorbands değerleri elde ettik. Neticede, CuCl_2 ilavesi ile bakır'ın (Cu^{++}) proteinlerin peptid bağlarıyla metodda kullanılan pH'da biüre reaksiyonu verdiği ve buna bağlı olarak absorbands değerlerinde artış yaparak hatalı sonuçlara yol açtığı sonucuna vardık.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada SOD aktivitesinin tayini için çeşitli hasta serumlarının karıştırılmasıyla elde edilen pool serum kullanılmıştır. Serum üzerine Kloroform-Etanol (3/5 v/v) karışımından 1/1 oranında ilave edildikten sonra $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5.000 g'de, 2 saat santrifüj edildi. Üstteki berrak faz çalışma numunesi olarak alındı. SOD tayin metodu olarak Yi-Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metod kullanılmıştır (5). Bizim çalışmamızda bu metod test edilmiştir.

Metodun Prensibi : Reaksiyon ortamında enzimatik olarak üretilen süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeme-sinin, ortamda bulunan SOD tarafından engellenmesi esasına dayanır. Serbest radikal üretimini bu metod'da Ksantin Oksidaz sağlamaktadır. Üretilen serbest radikaller ortamdaki NBT'yi indirger ve oluşan formazonun absorbandsı 550 nm'de okunur. Numunedeki SOD'nin üretilen serbest radikalleri dismutasyona uğrattığı oranda NBT redüksiyonu azalmakta ve buna bağlı olarak absorbands değerleri düşmektedir. Absorbans değerleri arasındaki farktan da SOD aktivitesi hesaplanmaktadır. Bu metodda üretilen serbest radikallerin NBT'yi indirgeme-siyle serbest radikallerin SOD tarafından ortadan kaldırılması bir yarış halindedir.

Reaktifler

Ksantin stok çözeltisi	:	3 mmol/l
EDTA	»	0,6 mmol/l
NBT	»	150 µmol/l
Na ₂ CO ₃	»	400 mmol/l
BSA	»	1 g/l
CuCl ₂	»	0,8 mmol/l
Ksantin oksidaz (XO)		
Enzim çözeltisi	:	16,66 Ü/ml aktiviteye sahip XO enzim çözeltisinden 20 µl alınıp üzerine 2 ml. 2 M'lik amonyum sülfat konup karıştırılır.

Reaktif karışımı : 40 ml, 10 kat seyretilmiş ksantin stok çözeltisi, 20 ml EDTA, 20 ml NBT, 12 ml Na₂CO₃ ve 6 ml BSA, 250 ml'lik bir erleninde karıştırılır.

Deney Şeması :

Reaktifler (µl)	Kör (µl)	Numune (µl)
Reaktif karışım	2900	2900
Numune	—	50
Bidistile Su	50	—
XO çözeltisi	50	50

25 °C de 20 dk. inkübasyondan sonra üzerine 0.8 mM CuCl₂'den 1 ml konur. 560 nm'de numune ve kör'ün absorbands değerleri bidistile suya karşı okunur.

$$\% \text{ inh} = \frac{\text{Kör'ün Absorbansı} - \text{Numune'nin Absorbansı}^*}{\text{Kör'ün Absorbansı}} \times 100$$

1 SOD ünitesi = NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak kabul edilir. Yani % 50 inhibisyon = 1 Ü dir.

Bu çalışmada ilk olarak Yi-Sun metodunda reaksiyonu durdurmak amacıyla kullanılan 0.8 mM CuCl₂ yerine diğer elementlerin kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmış, ayrıca CuCl₂'nin değişik konsantrasyonları incelenmiştir. İncelenen maddeler ve konsantrasyonları aşağıda belirtilmiştir.

NiCl₂ = 0.8 mM'lık çözeltisinden 200 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 1000 µl'lik miktarları.

PbCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, FeCl₃, CdCl₂, HgCl₂, CrCl₂, CaCl₂'nin ise 0.8 mM lık çözeltilerinden 1000 µl'lik miktarları.

CuCl₂ = 0.8 mM'lik çözeltisinden 100 µl, 200 µl, 600 µl, 1000 µl'lik miktarları kullanılmıştır. İncelenen her konsantrasyon için 3 er numune ile çalışılmış ve bunların ortalaması sonuç olarak verilmiştir.

Bakır iyonlarının peptid bağlarıyla etkilenmesini incelemek için ortama değişik miktarlarda serum konularak deneyler tekrarlanmıştır. Aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda protein içeren her serum numunesi ile 10 ar deney yapılarak ortalamaları alınmıştır.

Deney tüpündeki son protein konsantrasyonları aşağıda belirtilmiştir.

Serum miktarı (µl)	Numunedeki protein miktarı (µg)	Reaktif karışımındaki protein miktarı (BSA µg)
50	430	178
100	860	178
200	1720	178

Elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1,2,3 ve 4 de verilmiştir.

Sonuçlar :

Reaksiyonu durdurmak amacıyla kullanılan değişik metallerle aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

NiCl₂'nin 200 µ, 400 µl, 500 µl, 300 µl, 700 µl, 1000 µl'lik miktarlarının reaksiyonu durdurmadığı gözlenmiştir.

PbCl₂, CdCl₂, HgCl₂ gibi ağır metaller, protein denatürasyonuna bağlı olarak bulanıklık oluşturduğu için okuma yapılamamıştır.

FeCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl'lik çözeltisi reaksiyonu inhibe etmiş ve ΔOD'de ise % 20'lik artışa,

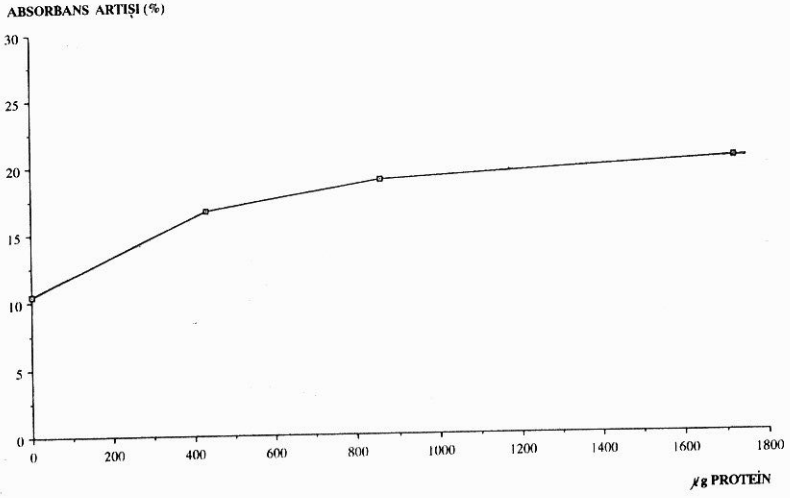
MnCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl'lik çözeltisi reaksiyonu inhibe etmiş ve ΔOD'de ise % 36 azalmaya,

MgCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl'lik çözeltisi reaksiyonu inhibe etmiş ve ΔOD'de ise % 22 azalmaya,

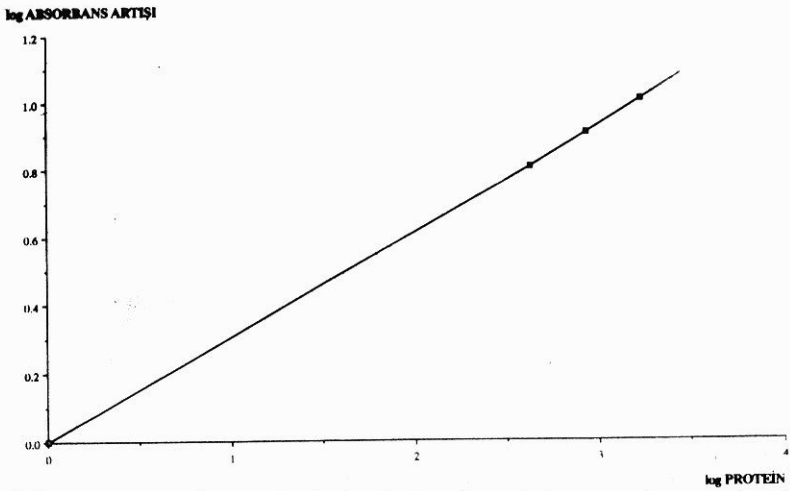
ZnCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl'lik çözeltisi reaksiyonu inhibe etmiş ve ΔOD'de ise % 51 artışa,

CrCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl'lik çözeltisi reaksiyonu inhibe etmiş ve ΔOD'de ise % 26 azalmaya neden olmuşlardır.

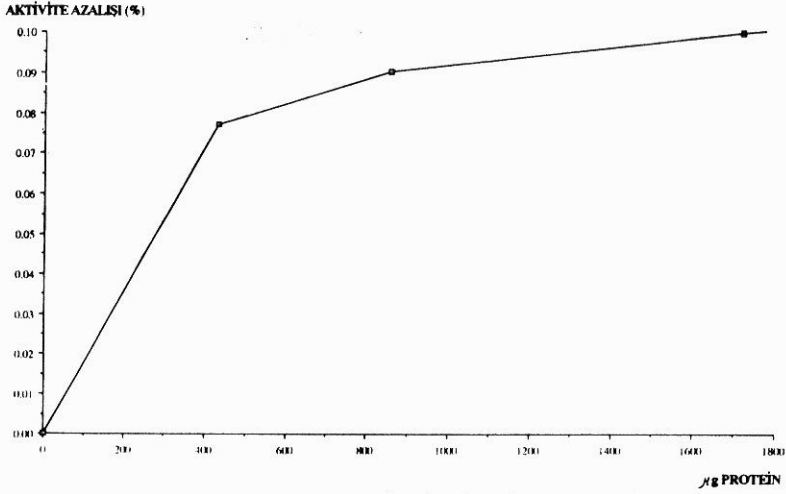
*Kör'ün absorbanı - Numunenin absorbanı ΔOD olarak gösterilmiştir.



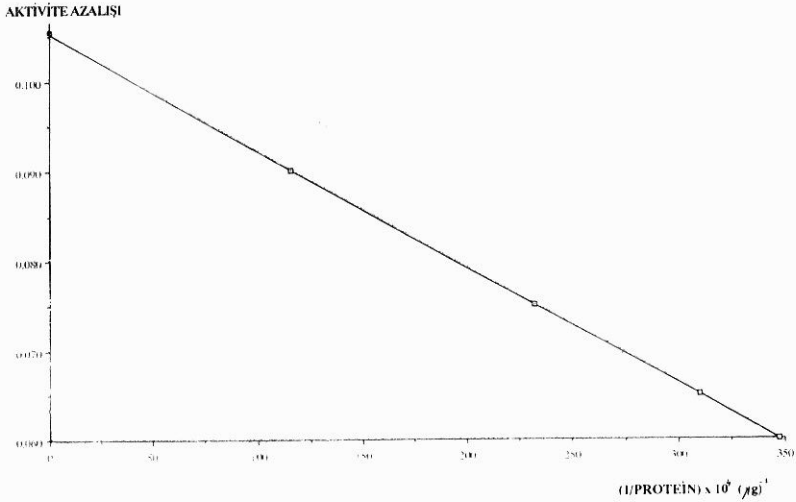
Şekil 1 : Protein miktarına bağlı olarak absorbans değişimi (%)



Şekil 2 : Protein miktarına bağlı olarak absorbans değişiminin logaritmik ilişkisi



Şekil 3 : Protein miktarına bağlı olarak SOD aktivitesindeki azalış (%)



Şekil 4 : 1/Protein miktarına bağlı olarak SOD aktivitesindeki azalma

CaCl₂ (0.8 mM) : 1000 µl miktarı reaksiyonu durdurmamıştır.

CuCl₂'nin 200 µl, 400 µl, 600 µl'lik miktarları reaksiyonu inhibe etmemiştir.

CuCl₂'nin metotta verilen konsantrasyonundan daha düşük miktarları ile çalışıldığı zaman reaksiyonun inhibe olmadığı tespit edilmiştir.

Reaksiyonu durdurmak için en uygun konsantrasyonun orjinal metotta verilen miktar (0.8 mM CuCl_2 de 1000 μl) olduğu sonucuna varılmıştır.

Değişik konsantrasyonlarda protein içeren serum numunesi ile yapılan deneyler sonucunda CuCl_2 ilavesinden önce ve sonra okumalar yapılarak aktiviteler hesaplandığı zaman bu iki değer farklı olduğu tesbit edilmiştir. Muhtemelen Cu-peptid bağı etkileşmesine bağlı olarak CuCl_2 ilavesinden sonra enzim aktivitesinde azalma olduğu gibi bir sonuç ortaya çıkmaktadır. Bu deneylere ait sonuçlar Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1 : Aktivite ve absorbands üzerine CuCl_2 ilavesinin etkileri

Kör	Protein	1	2	3	4	5	6	7
	(μg)							
	—	0.610 \pm 12	0.457	0.510 \pm 18	10.39	—	—	—
n=10								
n ₁ (10)	430	0.321 \pm 10.1	0.241	0.288 \pm 10.4	16.32	0.948	0.871	0.077
n ₂ (10)	860	0.262 \pm 13.5	0.197	0.242 \pm 11.5	18.60	1.141	1.051	0.090
n ₃ (10)	1720	0.246 \pm 14.2	0.185	0.232 \pm 17.3	20.30	1.193	1.090	0.103

1 : CuCl_2 ilavesinden önceki absorbands değerleri

2 : Seyretmeden sonra beklenen absorbands değerleri

3 : CuCl_2 ilavesinden sonraki absorbands değerleri

kolon 3 - kolon 2

4 : % Absorbans artışı = $\frac{\text{kolon 3} - \text{kolon 2}}{\text{kolon 3}} \times 100$

5 : CuCl_2 ilavesinden önceki absorbands değerlerinden elde edilen aktivite değerleri

6 : CuCl_2 ilavesinden sonraki absorbands değerlerinden elde edilen aktivite değerleri

7 : CuCl_2 ilavesinden önce ve sonra elde edilen aktivite değerleri arasındaki aktivite farkları = (Kolon 5 deki değerler - Kolon 6 daki değerler)

TARTIŞMA

Tablo 1 de görüldüğü gibi kör ve numunelerin absorbandsları CuCl_2 ilavesinden önce ve sonra okunduğu zaman CuCl_2 eklendikten sonra absorbandslarda düşme olmaktadır. Bu düşüşe CuCl_2 nin ilavesiyle mey-

dana gelen seyrelmenin yol açabileceği düşünülerek önce seyrelmeden ileri gelebilecek absorbands değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 1, sütun 2). Ancak okunan değerleri (Tablo 1, sütun 3) seyrelme hesabı ile bulunan absorbands değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüş ve absorbandsdaki artış yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 1, sütun 4). Bu hesaplamalar sonucunda numunelerin absorbandslarındaki artış yüzdelerinin köre göre daha fazla olduğu ve numunedeki protein konsantrasyonları ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir.

Elde edilen absorbands değerleri kullanılarak hesaplanan aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise, CuCl_2 kullanılmadan önce hesaplanan aktivite değerlerinin, CuCl_2 kullanıldıktan sonraki aktivite değerlerinden protein konsantrasyonlarına bağlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Absorbansda gözlenen bu artış ve sonuçta aktivitenin düşük hesaplanması büyük ölçüde Cu^{++} — peptid etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum ise hatalı sonuçlara yol açmaktadır.

Bu problemin çözümü için iki yol önerilebilir.

Birinci yol : CuCl_2 gibi reaksiyonu durdurucu ajanların hiçbirini kullanmadan absorbands değerleri ölçülüp aktivite değerleri hesaplanabilir. Bu durumda inkübasyon süreleri sonunda hemen absorbands değerleri ölçülmelidir. Bu yol çok fazla numuneye yapılan çalışmalarda yorucudur ve pratik değildir.

İkinci yol : 0,8 mM konsantrasyonundaki CuCl_2 'ün SOD reaksiyonunu durdurmak için uygun olmasına rağmen, peptid bağları ile biüre reaksiyonu vermesi hatalara sebep olmaktadır. Bu hata analitik olarak düzeltilebilir. Bu amaçla, protein miktarıyla absorbands artışı ve buna bağlı olarak da aktivite azalışı arasında matematiksel ilişkiler kurmaya çalıştık. Bunun için 4 değişik grafik çizilmiştir. Şekil 2 ve 4'den elde edilen sonuçlar kullanılmak suretiyle düzeltilmiş doğru değerleri elde etmek mümkündür.

Şekil 2 deki grafik kullanılarak Absorbans değerlerindeki düzeltme aşağıdaki şekilde yapılabilir.

X : Numunedeki total protein miktarı (μg)

$$y : \% \text{ Absorbans artışı} = \frac{\text{kolon 3} - \text{kolon 2}}{\text{kolon 3}} \times 100$$

$$\log y = 0.43 \log X \quad (\text{Şekil 2 den})$$

$$\text{Düzeltilmiş Absorbans} = \text{Gözlenen Absorbans} - [\text{Gözlenen Absorbans} \times 0,01 (\text{antilog } y)] \quad (\text{kolon 3})$$

Şekil 4 deki grafik kullanılarak aktivite değerlerindeki düzeltme aşağıdaki şekilde yapılabilir.

X : Numunedeki total protein miktarı

Z : Aktivite azalması = Kolon 5- Kolon 6

$$Z = -1,3 \cdot \frac{1}{x} + 0,105 \quad (\text{Şekil 4 den})$$

$$\text{Düzeltilmiş Aktivite} = \text{Tayin edilen aktivite} + z$$

Bu şekilde aktivite değerleri yukarıdaki düzeltme faktörleri kullanılmak sureti ile doğru olarak hesaplanabilir.

Biz SOD tayininde Yi-Sun ve arkadaşlarının tarih ettiği gibi, reaksiyon durdurucusu olarak CuCl_2 'nin kullanıldığı bir metodla çalışıldığında hataların ortadan kaldırılması ve doğru bir analiz yapabilmesi için yukarıdaki analitik hesapların kullanılmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

ÖZET

Bu çalışmada Süperoksit Dismutaz aktivitesinin tayini için kullanılan bir metod değişik açılardan incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Metodda reaksiyonu durdurmak için kullanılan CuCl_2 'in peptid bağlarıyla etkileşmesi sebebiyle hatalı sonuçların elde edilebileceği tesbit edilmiş ve bu hatanın ortadan kaldırılabilmesi için analitik bir çalışma yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Süperoksit Dismutaz, Bakır (II) Klorür.

SUMMARY

An Experimental Study on Superoxide Dismutase (SOD) Activity Determination

In this study, a method given on Superoxide Dismutase activity determination was investigated from various points of view and results were evaluated.

It has been established that faulty results may obtain due use of to CuCl_2 solution, which give reaction with peptide bonds of the proteins, to end the assay and suggested that an analytical study should be performed to correct the fault.

Key Words : Superoxide Dismutase, Copper (II) Chloride.

KAYNAKLAR

1. Cerutti PA : Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227 : 375-381, 1985.
2. Flohe L Ötting F : Superoxide Dismutase, *Methods in Enzymology* (Colowick S.P., Kaplan, N.O. Ed.) Academic Press, Florida. Vol. 105 : 93-104, 1984.
3. Freeman BA Crapo JD : Free radical and tissue injury. *Lab. invest* 47 : 412-416, 1982.
4. Mery P Winyard PG Morris CJ Grctsweld M Blake DR : Oxygen Free radicals, inflammation and synovitis, the current status. *Ann. Rheum Dis.* 48 : 864-870, 1989.
5. Yi-Sun, Larry W Oberley and Ying Li : A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 34/3 : 497-500, 1988.