



**GLUTATYON S -TRANSFERAZ ENZİMİNİN
KAZ (*Anser Anser Domesticus*) KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI KİMYASALLARIN VE METALLERİN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yeşim SAYIN
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ
Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA

AĞRI-2022
(Her hakkı saklıdır)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Yeşim SAYIN

GLUTATYON S -TRANSFERAZ ENZİMİNİN
KAZ (*Anser Anser Domesticus*) KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI KİMYASALLARIN VE METALLERİN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

ORTAK DANIŞMAN
Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA

AĞRI-2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLUTATYON S -TRANSFERAZ ENZİMİNİN

KAZ (*Anser Anser Domesticus*) KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI KİMYASALLARIN VE METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yeşim SAYIN

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Danışman: Ramazan DEMİRDAĞ

Ortak Danışman: Emrah YERLİKAYA

Bu tez kapsamında, Kaz karaciğerinde Glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Kaz karaciğer dokusundan GST enziminin saflaştırılması işlemi için afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle enzim 0,121 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip %70,51 verim ile 48,4 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin saflık derecesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiş ve tek bant elde edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 23 kDa olarak hesaplanmıştır.

Enzimin optimum pH'sı 7, optimum iyonik şiddeti 100 mM K-fosfat ve son olarak optimum sıcaklığı 40 °C olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra GSH substratı için K_m sabiti 1,34 mM ve V_{max} değeri 1,14 EÜ/ml, CDNB substratı için K_m sabiti 0,68 mM ve V_{max} değeri 0,5 EÜ/ml olarak hesaplandı. Son olarak kaz karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimine Hg^{+3} , Ag^{+2} , ve Fe^{+2} gibi metal iyonları ile oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enrofloksasin ve doksisiklin hiklat kimyasallarının inhibisyon etkileri incelendi ve bu kimyasallar ile metal iyonlarının IC_{50} değerleri hesaplandı.

2020, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: Metal, Kaz Karaciğer, GST, Saflaştırma, Karakterizasyon, inhibisyon.

ABSTRACT

MASTER THESIS

GLUTATHION S-TRANSFERASE ENZYME PURIFICATION FROM THE LIVER OF GOOSE (*Anser Anser Domesticus*), INVESTIGATION OF CHARACTERIZATION, EFFECTS OF SOME CHEMICALS AND METALS ON ENZYME ACTIVITY

Yeşim SAYIN

Ibrahim Cecen University

Graduate School of Education

Supervisor: Ramazan DEMİRDAĞ

Joint Consultant: Emrah YERLİKAYA

In this thesis, purification and characterization of Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) enzyme in Goose (*Anser Anser Domesticus*) liver and the effects of some chemicals on enzyme activity were investigated. Affinity chromatography method was used for the purification of GST enzyme from goose liver tissue. With this method, the enzyme was purified 48.4 times with a yield of 70.51 % with a protein specific activity of 0.121 EU/mg. The purity of the purified enzyme was checked by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and a single band was obtained. The molecular weight has been calculated to be approximately 23 kDa.

The optimum pH of the enzyme is 7, its optimum ionic strength is 100 mM K-phosphate and finally its optimum temperature is calculated as 40 °C. In addition, the K_m constant and V_{max} value were calculated as 1.14 EU/ml for the GSH substrate, 0.68 mM and V_{max} value of 0.5 EU/ml for the CDNB substrate. Finally, the inhibition effects of metal ions such as Hg^{+3} , Ag^{+2} , and Fe^{+2} as well as oxytetracycline HCl, tylosin tartrate, enrofloxacin and doxycycline hiklate chemicals on the GST enzyme purified from goose liver tissue were examined and the IC_{50} values of these chemicals and metal ions were calculated. **2022, 83 pages**

Keywords: Metal, Goose Liver, GST, Purification, Characterization, İnhibition.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için her türlü şartı sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ ve ortak danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA' ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen ve beni hiç yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

.../02/2022

Yeşim SAYIN

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDNB	1-klor- 2,4- dinitrobenzen
BSA	Bovin serum albumin
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ES	Enzim Substrat kompleksi
GST	Glutasyon S- transferaz enzimi
GSH	Glutasyon
I	İnhibitör
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
KDa	Kilodalton
Ma	Molekül kütlesi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N, N, N'N'-tetrametilendiamin
V_{max}	Maksimum hız

GRAFİK, ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Grafik 4.1: Kantitatif yöntem ile protein tayini yapılırken Bradford yönteminde kullanılan standart grafik.....	39
Grafik 4.2: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine ait afinite kolonunun elüsyon grafiği.....	40
Grafik 4.3: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum sıcaklık değerini bulmak için farklı sıcaklıklar ile ölçülen sıcaklık-aktivite grafiği	42
Grafik 4.4: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH değeri için birbirinden farklı pH değerleri ile ölçülen pH-aktivite grafiği	43
Grafik 4.5: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin CDNB'nin sabit (1mM) konsantrasyonu ile GSH için V_{max} ile K_m değerlerinin bulunmasına ait grafik.....	46
Grafik 4.6: Kaz karaciğerindeki GST enzime Ag^{+2} iyonu' nun inhibisyon etkisi .	47
Grafik 4.7: Kaz karaciğerindeki GST enzime Hg^{+3} iyonu' nun inhibisyon etkisi .	48
Grafik 4.8: Kaz karaciğerindeki GST enzime Fe^{+2} iyonu' nun inhibisyon etkisi ..	49
Grafik 4.9: Oksitetrasiklin HCl'nin Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	50
Grafik 4.10: Tilosin tartarat'ın Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	51
Grafik 4.11: Enrofloksasin'in Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	52
Grafik 4.12: Doksisiklin hiklat'ın Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	53
Şekil 1.1: Enzimlerin Aktivasyon Grafiği	1
Şekil 1.2: Enzimin Yapısı ve Görevleri.....	5
Şekil 1.3: Afinite Kromatografisinin Temel İlkesi	7
Şekil 1.4: Anahtar kilit modeli	8
Şekil 1.5: Glutatyon Molekülünün Yapısı	10
Şekil 1.6: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi	15
Şekil 1.7: Kaz görseli.....	18
Şekil 3.1. GST enziminin aktivitesinin ölçümünü spektrofotometrik yöntemle yapabilmek için kullanılmış olan ürünlerin oluşma sıraları	33

Şekil 4.1: GST enziminin Afinite kromatografisiyle saflaştırıldıktan sonra saflığının SDS-PAGE ile kontrolü	41
Çizelge 3.1: GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan küvetin içerikleri	33
Çizelge 4.1: GST enzime afinite kromatografisinin uygulanması ile oluşan saflaştırma sonuçları.....	40
Çizelge 4.2: Kaz karaciğerindeki GST enziminin optimum sıcaklık değerini bulmak için aktivite ölçüm sonuçları	42
Çizelge 4.3: Kaz karaciğerindeki GST enziminin optimum pH değerini bulmak için aktivite ölçüm sonuçları	43
Çizelge 4.4: Kaz karaciğerindeki GST enziminin 1/GSH ve 1/ V_{max} değerlerinin belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	44
Çizelge 4.5: Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine Ag^{+2} iyonunun etkisi	47
Çizelge 4.6: Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine Hg^{+3} iyonunun etkisi	48
Çizelge 4.7: Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine Fe^{+2} iyonunun etkisi	49
Çizelge 4.8: Oksitetrasiklin HCl'nin kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	50
Çizelge 4.9: Tilosin tartarat'ın kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	51
Çizelge 4.10: Enrofloksasin'in kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	52
Çizelge 4.11: Doksisiklin hiklat'ın kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi	53
Çizelge 5.1: Kaz karaciğerindeki GST enziminin karakterizasyon sonuçları	63
Çizelge 5.2: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzime inhibisyon etkisi yapan metal iyonlarının IC_{50} Değerleri.....	64
Çizelge 5.3: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzime inhibisyon etkisi yapan kimyasalların IC_{50} Değerleri	64

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
GRAFİK, ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzim Üzerine Yapılan Çalışmalar	2
1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	3
1.4. Enzim Saflaştırma	6
1.5. Enzim Aktivite Birimleri	9
1.6. Glutasyon (GSH)	10
1.6.1. Glutasyon S-Transferaz	11
1.7. Kazlar	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Ağır Metaller	26
3.1.3. Kullanılan Metaller.....	27
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.1.5. Kullanılan Cihaz ve Aletler	28
3.1.6. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Şekilleri.....	29
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Proteinin Tayin Edilme Yöntemleri	31
3.2.2. GST Enzimi Aktivitesinin Tayini.....	32
3.2.3. Kaz Karaciğer Dokusundaki GST Enzimi Saflaştırma	34
3.2.4. SDS-PAGE ile Enzimin Saflığını Kontrol Etme.....	35
3.2.5. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimde Alt Birimlerin Molekül Kütlesini SDS-PAGE Yöntemi İle Tayin Etme.....	36
3.3.1. Optimum pH'ın bulunması.....	37
3.3.2. Optimum İyonik Şiddetin Bulunması.....	37

3.3.3. Optimum Sıcaklığın Bulunması	37
3.3.4. GST Enzimine Ait Substratların K_m ve V_{max} Değerlerini Bulma	37
3.3.5. Ag^{+2} , Hg^{+3} ve Fe^{+2} Metal İyonları İle oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enrofloksasin ve doksisiklin hiklatın GST Enzimi Aktivitesinin Üzerine Etkilerinin Bulunması.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.2. Kaz Karaciğerinde GST Enzimini Saflaştırma İşlemleri	40
4.2.1. Afinite Kromatografisi Sonuçları	40
4.2.2. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Saflığının SDS-PAGE İle Kontrolü	41
4.3. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyonu	41
4.3.1. Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması	41
4.3.2. Optimum pH 'ın Bulunması.....	42
4.3.3. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine CDNB ve GSH Substratlarının Uygulanması İle Oluşan V_{max} ve K_m Değerleri	44
4.4. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine Belirlenen Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi.....	46
4.4.1. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine İnhibisyon Etkisi Yapan Metal İyonlarının IC_{50} Değerlerinin Bulunması	46
4.4.2. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine İnhibisyon Etkisi Yapan Kimyasalların IC_{50} Değerlerini Bulma	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKÇA.....	65
ÖZGEÇMİŞ	72

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Görev aldığı metabolik süreçleri seçici olarak yönlendirebilen ve katalize edebilen biyolojik katalizörler enzim olarak adlandırılırlar. Biyokimyasal reaksiyonların hepsinde görevlidirler. Bu reaksiyonlar sırasında reaksiyonun hızını arttırlar, gerekli aktivasyon enerjisini düşürür, yan ürün oluşturmaz ve alınan verimi yükseltir.



Şekil 1.1: Enzimlerin Aktivasyon Grafiği

Enzimi ilk defa 1878’de terim olarak Kühne tanımlamış ve 1897 yılında Buchner ise hücrelerde fonksiyonel durumda olan enzimleri ayırmıştır.

Enzimlerde önemli özellikler ise spesifiklikleri ve katalizleme güçleri olup enerji açısından kullanılabilir formlara dönüştürerek metabolizmadaki tüm olayları yönlendirirler. “Hayat katalizdir” sözünde bu söylediklerimizi kanıtlar niteliktedir.

Enzimlerde Genel Özellikler

- Enzimlerin neredeyse tamamı protein yapısındadır.
- Benzer reaksiyonları çok kez gerçekleştirme kabiliyetleri vardır.
- Aynı enzim her zaman tek çeşit veya tek tip birbirine benzeyen reaksiyonlar katalizler.
- Katalizlemiş oldukları tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürmektedirler.
- Gerçekleşecek olan reaksiyonu çok hızlı dengeye ulaştırırlar.
- Canlı ve cansız ortamlarda görev alabilirler.

Enzimlerin yapısı protein olduğu için proteinlerin sahip olduğu tüm özelliklere ve diğ er moleküller için olan özellikli bağ lanma bölgelerine de sahiptirler. Enzimler kolodyum zarlarından geçemezler büyük molekü llüdürler, ortamın asit veya alkali oluş una karşı duyarlıdır lar ve sıcaklığ ın 0 °C ile yaklaşık 40 °C arasında yükselmesi, enzimin etki hız ını arttırırken bu sıcaklıkların üzerindeki ısı ile çok basit denatüre olurlar. Kimyasal reaksiyonların büyük bir kısm ı mevcut sıcaklıktan çok daha yüksek sıcaklığ a ve enerji düzeyine ihtiyaç ları vardır. Enzimlerde bu düzeyleri minimum seviyesine getirirlerken reaksiyon hız ında arttırır lar ve reaksiyonların hız larını arttırmak amacıyla zayıf bağ lanma özelliğ i enzimlere kolaylık sağlamaktadır. Enzimler reaksiyonlar esnasında fiziksel değ iş ikliğ e uğ ramış da olsalar eski hallerine dönüş ebilirler (Keha ve Küfrevioğ lu 2015; Gözü kara 1997). Bugün enzimoloji biyokimyasal çalışmaların merkezini oluşturmaktadır.

1.2. Enzim Üzerine Yapılan Çalışmalar

Enzim çalışmaları Biyokimya tarihinde çok eskilere dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar 1700 yıllarının sonlarına doğru, mide salgıları ile eti sindirme üzerinedir. 1800 yıllarında ise tükürük ve farklı bitkilerin özütleri ile, nişastadan şekere dönüşüm incelenmiştir (Lehninger ve ark. 2005). Berzellius 1825’de nişastayı sülfirik asitten parçalarken, buğday türünden edinilen enzim karışımının etkisinden fazlaca etkilendi. 1835 yılında ise kimyasal tepkimeleri aktif ve hızlı olmalarında yardımcı olan maddeleri katalizör olarak tanımlamışlardır (Ann-Sofie 2002). L. Pasteur 1850’de şekeri maya aracılığı ile alkole fermentasyonun fermentler ile gerçekleştirilmekte olduğunu ve bu fermentlerin canlı maya hücrelerindeki yapılardan ayıramayacağını söylemiştir. E. Buchner 1897 yılında şekeri alkole maya özütlerinin fermentlemiş olduğunu ve bu olayı fermentasyonun hücreden uzaklaştırılmış olduğu durumda bile halen işlevsel haldeki moleküllerle yapabileceğini bulmuştur. Proteinler enzimleri taşıma işlemlerini yapan moleküllerdir ve kendi başlarına kataliz olaylarını yapamayacağını Nobel ödülü almış olan R. Willstatter ve diğ er bilim adamları söylemiştir. Ancak, enzimolojide en anlamlı gelişme ise 1926’da Sumner tarafından üreaz enzimi “*Jack bean*” bitkisinden elde edilip kristallendirildikten sonra yapısının protein olduğunun saptanmasıdır. Northrop ve Stanley enzimlerin saf proteinler olduklarını sindirimde yardımcı

enzimler olan kimotripsin ve tripsin ile yapmış oldukları deneylerle kesinleştiren bilim adamlarımızdan üç tanesi 1946'da Nobel kimya ödülünün sahibi oldular (Nobel Lecture 1907).

Enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanıda ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılan enzimlerle pek çok kalıtsal bozukluğun ve hastalığın teşhisi konulmakta, hastalığın gelecekteki durumu hakkında bilgiler edinilmektedir (Onat 1996).

1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimlerde reaksiyonların spesifiklikleri ile substrat spesifiklikleri göz önünde bulundurularak bir sınıflama yapılmış ve tanımlanmış 2000'den fazla enzim çeşidi bulunmuştur (Koolman ve Röhm 2003).

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu Enzimleri Sistematik olarak bulundukları kimyasal grubun veya substratın sonuna az eki getirerek isimlendirirler. Katalizlemiş oldukları reaksiyonların çeşitlerine göre enzimleri altı ana gruba ayırmışlardır. Her biri aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir. Gruplarda bulunan her enzim ise 4 rakamdan oluşur ve bir enzim kod numarası olan 'EC' kısaltması ile gösterilmektedir. EC numarasında ilk rakam enzimimizin altı ana gruptan hangisinde bulunmakta olduğunu, ikinci rakamımız ise etki etmekte olduğu kimyasal yapıyı ve fonksiyonel olan grubu, üçüncü rakamımızda alıcı grubu ve dördüncü rakamda o seride bulunduğu sıra numarasını göstermektedir (Yıldırım vd. 2010).

Enzimlerin sınıflandırılması altı ana gruptan oluşur.

1- Oksidoredüktazlar; Yükseltgenme ve indirgenme(redoks) tepkimeleri yani oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerini katalize edebilen enzimlerdir. Oksidaz, polifenol, laktat dehidrogenaz, redüktazlar, oksijenazlar, katalaz ve peroksidazlar vb. enzimleri bu gruba örnek verilebilir.

2- Transferazlar; Substratlar arasındaki hidrojenin dışındaki grupların (C, N ve P) transferlerini katalizleyen enzimler olup; bir atom veya atom grubunu bir molekülden farklı bir moleküle ya da molekül grubuna aktarılmasını sağlar. Kinazlar, transketolazlar, transaldolazlar, alanin

transferaz, hekzokinaz, glukokinaz ve Glutasyon S- transferaz vb. enzimleri bu gruba örnek verilebilir.

3- Hidrolazlar; Bir tane su molekülünün eklenmesiyle eter, P-N, peptid, anhidrit, glikozit, ester veya C-halojenür bağlarının parçalanmakta olduğu hidroliz reaksiyonlarını katalize edebilirler. Tüm proteolitik enzimler, nükleaz, lipaz, fosfataz, esteraz ve glikozidaz vb. enzimleri bu gruba örnek verilebilir.

4- Liyazlar: Oksidasyon veya Hidrolizden ayrı bir yöntemle substratlardan belirli grupları uzaklaştırıp ve çift bağlar oluşturup tepkimeleri katalizlerler. Dehidratasyon ve hidratasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Piruvat dekarboksilaz, adenilat siklaz, Sitrat sentaz enzimleri bu gruba örnek verilebilir.

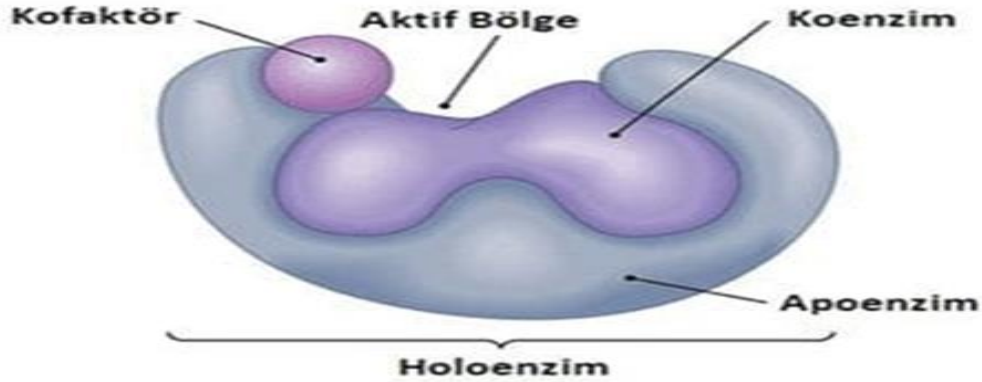
5- İzomerazlar; Moleküllerde değişiklikler meydana getirirler. Molekülün optik, yapısal veya geometrik izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizlemektedirler. Molekülün içinde çifte bağ oluşumunu, oksidasyon-redüksiyonu ve grup transferini yaparlar. Glukoz-6-fosfat izomeraz, triozfosfat izomeraz, Mutaz, rasemaz ve epimeraz enzimleri örnek verilebilir.

6- Ligazlar: GTP ve ATP' ye benzer yüksek enerji içerikli fosfat bileşiklerinden koparılan fosfat bağı ile ortaya çıkan enerjinin kullanılması ile iki molekülün bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimler grubudur. DNA ligaz, sentetazlar, karboksilazlar ve piruvat karboksilaz enzimleri örnek verilebilir.

Canlıların oluşumunda yer alan biyomoleküller kendiliğinden kolay bir biçimde reaksiyon vermezler ve kinetik olarak kararlıdır. Bu sebeple hücrede oluşan tüm kimyasal reaksiyonlarımız enzimlerle gerçekleşir. Enzimin denatüre olması demek katalitik aktivitesinin yok olmasıdır. Enzimler, kendini oluşturmuş olan amino asitlerine dönüşürse, katalitik aktivitesini kaybederken koenzimler ise proteinlerin denatüre olmalarından etkilenmez (Voet ve Voet 1995).

Basit protein yapısına sahip enzimlerde, polipeptid zincirleri aktiviteyi gösteren kısımlarıdır. Bileşik protein yapısına sahip enzimlerde ise, protein kısmına ek kofaktörün yanında protein yapısında olmayan bir küçük molekül daha vardır.

Kofaktör yapıları bulunmayan enzimlerin katalitik aktiviteleride kaybolmaktadır. Enzimlerde kofaktörü bulunmadan aktif hale gelemeyen kısmına apoenzim, kofaktörü bulunursa aktif olabilen haloenzim denmektedir (Trevor 1994).



Şekil 1.2: Enzimin Yapısı ve Görevleri

Protein yapısına kafaktörler bağlanıyor fakat disosiye olmuyor ise Prostatik grup, zayıf biçimde bağlanıp disosiyede olabiliyor ise koenzim olarak isimlendirilir.

Kofaktörler organik yapılysa (NAD^+ , FAD^+ , Koenzim A) koenzim olarak, metal iyonuysa (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} vb.) aktivatör ya da anorganik kofaktör olarak adlandırılırlar Koenzimlerin çoğu ise vitaminlerden ve genellikle B grubu vitaminlerinden oluşmuştur.

Koenzimler ya da prostatik gruplar enzimin etki etmesi gereken kimyasal reaksiyonları belirlerken apoenzim ise enzimin etki edeceği substratı tayin eder. Hidrojenin ayrılması gereken substratı apoenzim belirlemektedir (Özeriş. 1993).

Enzimlerin aktivitelerini arttıran bileşiklere aktivatör denir. Metal iyonlarının aktivatör olanları; kobalt, bakır, iyot, krom, mangan, molibden ve çinkodur. Enzim aktivatörlerimiz çoğunlukla küçük ya da çok büyük olmayan moleküllerden oluşurlar ve kataliz olayına kofaktörler gibi her zaman katılamamaktadırlar (Gözükara. 1989).

Enzimlere etki eden maddeler substratlardır ve ürüne dönüşüm aşamasında da ürün ve enzim olarak sınıflandırılırlar ve bu sırada reaksiyondan sonra oluşan maddelere ise ürün denir. Ürünün oluşum aşamasından sonra ise enzim bir başka subsrat molekülünü ürüne dönüştürmek için yeniden çalışmaya başlar.

Michaelis-Menten eşitliğindeki değerler enzimlerin kinetik özelliklerini gösterir. Eşitlikteki K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini, V_{max} değeri de enzimin katalitik aktivitesini ifade eder.

İzoenzimler; kimyasal ve fiziksel özellikler bakımından farklı fakat aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlerdir. İzoenzimler substratları, inhibitörleri ve kofaktörleri için farklı ilgiye sahiptir. İzoenzimlerde önemli sayılabilecek özellikler ise izoelektrik noktalarının farklılığı, her bir izoenzimin ayrı bir geninin olması, aminoasit sayısı ile sırasının farklılığı ve elektroforetik hareketliliklerin farklılıklarıdır. İzoenzimlere örnek alkalen fosfataz, karbonik anhidraz, laktat dehidrogenaz ve glutatyon S-transferazlar verilebilir (Devlin 2002).

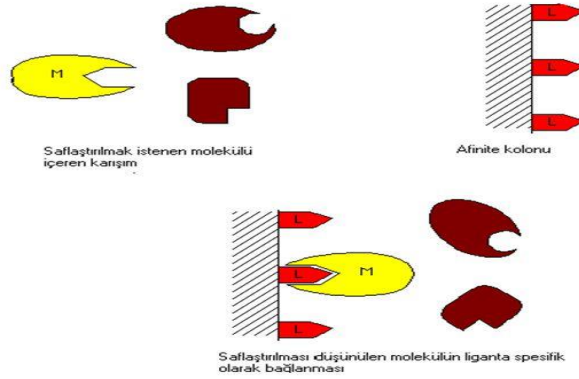
1.4. Enzim Saflaştırma

Enzimler büyük ölçüde protein yapısında olduğu için şartların değişimine çok hassastırlar. Bu sebeple karışımda enzimin bulunması enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyonun sonucunda oluşmuş olan ürün ya da enzimatik reaksiyon için aracılık yapan farklı değişkenlerle tespiti yapılır (Söyüt 2006). Enzimin izolasyon ve saflaştırılma işlemleri meşakkatli işlemler olup özen ve dikkat gerektiren çalışmalardır. Enzim saflaştırma ve izolasyon işlemleri yapılırken enzimin çözünürlüğünün farklılığı, molekülünün büyüklüğü, adsorbsiyon davranış farklılığına ve elektrik yüküne bakılır (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Bugüne kadar yaklaşık 5000 enzim tanımlanmış ve günümüze kadar 1000'in üzerinde enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiş homojen ve saf olarak elde edilmiştir. Çalışmamızda ise, enzimimiz spesifik ligand esasları ile çalışan ve adsorpsiyon kromatografisi türü olan afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde belirlenen molekülü saflaştırma işleminde, matriks adı verilen özel kolon maddesini kovalent bir biçimde immobilizesi yapılmış ligand yani komplementer bağlanma bileşiğine tersinir ve spesifik olacak şekilde bağlar. Matriksin yerine ise biogel, sepharose ve sephadex vb. jeller kullanılabilir. Saflaştırılması düşünülen maddelerde kullanılan ligandda tersinir ve spesifik bağlanma afinitesi bulunmalıdır. Kullanılan ligandların küçük olduğu durumlarda bunları doğrudan matrikse bağlayabilmek için hazırlanmış olan adsorbanlar, ligand ile matrikse bağlanmış olan maddelerin arasında sterik engelleme

yaptığından küçük ayırma kapasitesi gösterirler. Uzantı kolları adı verilen yapılar ise bu gibi durumlarda etkili bir bağlanma için ligand ile matriksin arasında yer alır ve doğrudan bir bağlanmayı sağlar.

Afinite Kromatografisinin Temel İlkesi

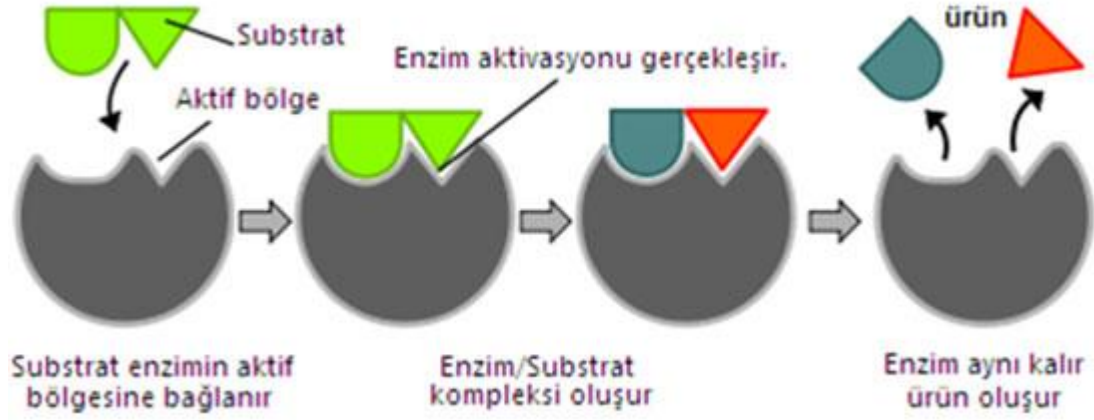


Şekil 1.3: Afinite Kromatografisinin Temel İlkesi

Canlı organizmalardaki reaksiyonlar için enzimatik kataliz mutlaka gerekli olup, biyolojik olarak uygun koşullar sağlandığında ise katalizlenemeyen reaksiyonlar, çok yavaş ilerlemektedirler. Biyolojik moleküller genel olarak; hücre içi sıvı ortamlarında, nötral pH ve orta derece sıcaklıklarda çok fazla kararlı olurlar. Biyokimyasal tepkimelerin çoğunluğunda, reaksiyon için gereken iki veya daha çok molekülün çarpışması ya da kararlı olmayıp yüklü olan aracılardan geçici oluşumları gibi hücre ortamlarında tercih edilmeyen ya da olanaksız olan kimyasal olayları zorunlu kılarlar (Lehninger 2005). Enzim ile katalizlenmiş olan bir tepkimenin ayırıcı özelliği; aktif merkez (aktif bölge) olarak isimlendirilen enzimin üzerinde bulunan sınırlandırılmış olan özel bir cep veya bir bölgenin içerisinde meydana gelmiş olmasıdır. Aktif bölgenin yüzeyini, kimyasal transformasyonu katalizleyen ve yan grupları substrata bağlanmış olan amino asit kalıntılarından oluşmaktadır (Lehninger 2005). Tüm biyokimyasal reaksiyonlarımız bu bölümde gerçekleşmekte ve enzimin etkilemiş olduğu bileşik yine bu bölüme bağlanmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim-substrat (ES) kompleksini, 1880 yılında ilk olarak Wurtz bulmuş ve tanımlamıştır. Enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar, enzim mekanizmalarının

teorik tanımlanmasında ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik hareketlerinin tanımlanmasında yararlanılır (Lehninger 2005).



Şekil 1.4: Anahtar kilit modeli

Kinetikler enzim sistemlerinin çalışmasında önem verilen yöntemlerden biridir ve çoğu enzimin ortak kinetik özellikleri bulunur.

Sabit derişimde olan bir enzimde substratın derişimi arttığı zaman ES kompleksinin oluşumunda yer alan tüm enzimlerde karakteristik ve esansiyel en yüksek hız olan V_{max} 'a yaklaşabilmek amacı ile katalitik aktivitede hiperbolik bir şekilde artmaktadır. V_{max} 'ı yani yarı hızı veren substrat derişiminde bir substratı etkileyebilen her bir enzimde kendine has Michaelis Menten sabitine ise K_m denir. Michaelis Menten eşitliğinde; enzimatik bir tepkimede ilk hızda substratın derişimi ve enzimin substrata olan ilgisini gösteren K_m değeri ile V_{max} ilişkilidir. K_m ile V_{max} her ikisi de ölçülebilmektedir. Bu değerler farklı enzimlerde farklı anlamları ifade eder (Lehninger 2005). Aktivite ve hız enzimatik reaksiyonlarda; sıcaklık, iyonik şiddet, pH, substrat ve enzim konsantrasyonu, aktivatörlerin ve inhibitörlerin olması vb. etkenlerle değişebilir (Yıldırım vd 2010).

Enzim İnhibisyonu; enzimlerde "*in vivo*" ve "*in vitro*" aktivitelerin bazı bileşiklerin kullanılmasıyla azaltma veya yok edilme olayına "inhibisyon" denilirken bu bileşiklere ise "inhibitör" denmektedir. İnhibitörler ise genel olarak molekül kütlesi küçük bileşikler veya iyonlardır. Bu inhibitörler reaksiyonun hızını ES kompleksi oluşumuna engel olarak azaltırlar. Yapılan inhibisyon çalışmalarında aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı, enzimlerin substrat spesifiklikleri,

enzimatik reaksiyonlarda kinetik mekanizmalar ile aktif merkezde rol alan fonksiyonel gruplar hakkında bilgiler edinilmiştir. Enzimatik aktivitelerin inhibisyonu dönüşümsüz ve dönüşümlü olarak ikiye ayrılır. Başlıca görevi ise kontrol mekanizması olarak görev almasıdır. İlaçlar ve zehirli bileşiklerin çoğunluğu fonksiyonlarını bu biçimde yaparlar (Gürdöl ve Âdemoğlu 2010).

Dönüşümsüz inhibisyonda, Tersinmez (irreversible) enzimde işlevsel gruplardan bir ya da birden fazlası etkilenmektedir. Enzime inhibitörler kompleks oluşturabileceği gibi kovalent biçimde bağlanabilir. V_{max} azaldığında, K_m yine değişmez (Özaslan 2014).

Dönüşümlü inhibisyonda, Tersinir (reversible) enzim- inhibitör kompleksi hızlı bir biçimde ayrılabilir ve bir denge hali vardır. Dönüşümlü inhibisyon ise; yarışmasız, lineer karışık tip inhibisyon, yarışmalı ve yarı yarışmalı inhibisyon olmak üzere dört gruptur. (Keha ve Küfrevioğlu 2015). İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesi sırasında da yararlanır.

1.5. Enzim Aktivite Birimleri

Enzimler katıldıkları tüm reaksiyonlarda yan ürün oluşturmada yüksek verimle çalışırlar. Çünkü enzimlerin en önemli özelliği reaksiyona özgünlükleridir. Ürüne dönüştürdüğü substratların ve katalizlemiş oldukları reaksiyonların tipine özgü moleküllerdir. Hücre içinde gerçekleşen bu reaksiyonlar enzimlerin varlığında saniyelik zaman diliminde gerçekleşebilmektedir.

Enzimler ve substratlar, miktar olarak az bulunduklarından ölçümlerde bir o kadar zordur ve optimum şartlar sağlandığında katalizlemiş oldukları reaksiyonların hızlarının ölçümüyle tespit edilir. Oluşmuş olan maddelerin harcanma veya oluşum hızlarının ölçümünde yine bu amaçla kullanılan diğer yöntemlerdir.

Enzimler ve aktiviteleri için kullanmış olduğumuz birimler;

Enzim ünitesi (EU): 1 dakikada, 25 °C sıcaklıkta, optimum şartlarla, 1µmol substratın ürüne dönüşümünü sağlayan enzim miktarına denir.

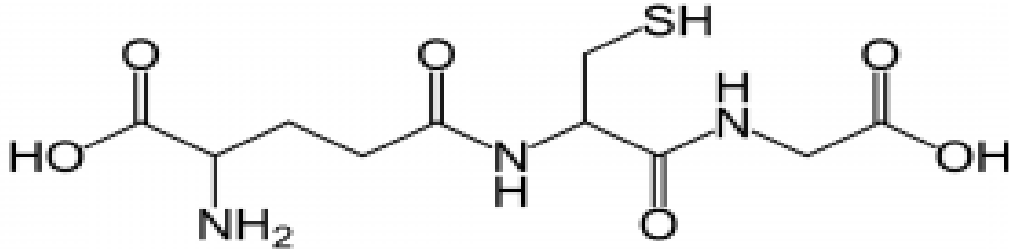
Spesifik aktivite (U/mg protein): 1 mg proteine denk gelen enzimin ünitesidir ve enzimlerin saflık derecelerini ifade eder.

Molar aktivite (Turnover sayısı): 1 saniyede 1 mol enzimin ürüne dönüşmüş substrat molekülü sayısını gösterir ve enzimlerin katalizleme gücünü göstermektedir.

Katal: 1 saniyede, optimum şartlarla, 1mol substratın ürüne dönüşümünü yapan enzim miktarıdır ve enzimdeki saflığı gösterir.

1.6. Glutatyon (GSH)

Glisin, Glutamat ve Sistein aminoasitlerinden oluşan molekül ağırlığı düşük bir tripeptittir. Glutatyona ait bir amino grubu, iki peptid bağı, bir tiyol grubu ile iki karboksil grubu bulunmaktadır. Hücre içerisinde bulunan serbest sülfhidril gruplarında yüksek bir oranda bulunur. 1888 yıllarında maya hücresinde bulunan GSH'ı 1921'de Hopkins saflaştırarak karakterize etmiştir (Açan 1990). İndirgenmiş glutatyon ve okside gultatyon olmak üzere glutatyonun farklı iki formu vardır. Glutatyonun en önemli görevi hücreden zehirli metabolitleri uzaklaştırmak ve redükte formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun sürekliliğini sağlamasıdır (LiebmanandGreenberg 1988).



Şekil 1.5: Glutatyon Molekülünün Yapısı

Toksik bileşiklerde, epoksitlerin ve metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak detoksifiye olmalarına (-SH) grubu neden olur. Genetik bilgi olmaksızın üretilir ve hücrede antioksidan savunmasında görevlidir (Piner 2005; Kanat 2014).

GSH molekülü; nukleus, sitoplazma ile mitokondride fazlaca bulunmakta olan ve hücre bölümlerinde çözünebilir büyük öneme sahip bir antioksidan olarak tanımlanır (Alcher 1989). GSH'ın sisteinin tiyol grubu antioksidan özelliğini kazandırmaktadır. Molekül kütlelerinde küçüklük ile yapısında çok hidrofilik grubun bulunması glutatyon molekülünün sudaki çözünürlüğünü belirler. Bu özellik

molekülde savunma ve kararlılık açısından üstünlük sağlar (Kidd 1999; Kosower 1976).

Toksik etkiler yapabilen maddeler, bulunduğu şekliyle zararlı olamayan formlarına bölünerek safra, ter ve idrar yoluyla vücudumuzdan atılırlar. Burada amaç zararı olabilecek maddelerin polaritesi yükseltilerek su ile çözüldükten sonra ise kolayca atılabilen ürünleri oluşturmaktır (David ve ark. 2010). Bu ürünler atılamaz ve vücudumuzda birikirse doku hasarları, DNA hasarları, hücre yaşlanmaları, kanserler, mutasyonlar şeklindeki kalıtsal ve metabolik hastalıklar meydana gelir (Yu 2004).

GSH molekülü; Karaciğer tarafından sentezlenir ve büyük kısmı merkaptürik asit biçiminde safra yolu ile dışarıya atılır. Aldığımız besinlerde ksenobiyotiklerden vücudumuzu korur, bağırsağın lümeninde lipit peroksidasyonunu önler ve bağırsağın epitelyumunu oksijenin radikallerinden korur (Maher 2008).

GSH'nın görevleri; Singlet oksijen ile OH^- gibi reaktif oksijen türevlerini temizler. Peroksitler ve serbest radikaller ile tepkimeye girip hücrelerimizi oksidatif zarardan korumaktadır. Proteinlerin yapısında bulunan $-SH$ gruplarını indirgenmiş olarak ve demirinde ferröz durumda bulunmasını sağlar bu görevi ile proteinlerin çoğunluğunun ve enzimlerin aktivasyonunun azalmasını durdurur ve yenilenmesini sağlar (Drog 1997; Schröder 2001; Geçkil 2012). Aminoasitlerin taşınmasında görevlidir. Elektrofilik bileşikler detoksifiye ederken GST'ye aracılıkta bir kofaktör görevini üstlenir (Yalçın 1998; Blokhina vd 2002).

Hücre fonksiyonları korumada Glutasyon seviyesinin artması ve azalması önemli bir faktördür. Detoksifikasyon ve oksidatif stres gibi faktörlerin artması ile GSH düzeyi azalır. Çevre kirliliği GSH /GSSG oranına bakılarak belirlenebilir (Zhang 2005; Husak 2016).

1.6.1. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon S-transferaz enzimi E.C.2.5.1.18 olarak isimlendirilir ve GST olarak kısaltılır. Her biri iki alt birimden oluşmuş, GSH ile elektrofilik maddelerin arasında konjugasyonu ve toksik etkisi az olup kolay atılabilen metabolitler oluşturmayı katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzimidir (Hamed ve ark. 2004).

GST'lerin görevleri ise; Kataliz tepkimelerinde glutatyon tripeptidin elektrofilik substratların üzerine nükleofilik atak reaksiyonlarını katalizler. Detoksifikasyonda su ile çözünebilen son ürün merkapturik asitin oluşma reaksiyonlarının birinci basamağını katalizler ve homeostasisi sağlar. GST ile katalizlenmiş reaksiyonların ilk basamağına, GSH ile iç ya da dış kaynaklı hidrofobik elektrofiller bağlanır. GSH, GST enziminin çalışması için tepkimede mutlaka olmalıdır GST enzimi, GSH'a bağımlı çalışması sebebiyle, GSH'a kosubstrat denir (Sheehan ve ark. 2001. Autrup 2000).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada GST enzimine ilk defa karaciğer sitoplazmasında rastlanmıştır. Katalitik aktivenin bulunması GSH'ın CDNB diğer bir ifadeyle 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ile bromosülfotalein'e bağlanması sonucu bulunmuştur (Booth ve ark. 1961; Combes ve Stakelum 1961).

Glutatyon S-transferaz enzimi ile ilgili yapılan bu çalışmalar sonucunda ise; memelilerde, böceklerde, kanatlı hayvanlarda, balıklarda, kuşlarda, bitkilerde, Crustacea'da, Planaria'da, annelid (halkalı kurt), mollusk (yumuşakçalar) ve bazı mikroorganizmalarda varlığı tespit edilmiş ve bu organizmalardaki bazı dokularda da yaygın olarak bulunmuştur. Sıklıkla rastlandığı dokular ise en çok karaciğer olmak üzere kalınbağırsak, böbrek, incebağırsak, plasenta, dalak, eritrosit, testis, solungaç, akciğer ve meme sayılabilir. Bu organlarda GST enzimi organların sitozolünün protein miktarının %5'ini oluşturur bu organlarda oranın yüksek olmasının sebebi; dıştan alınmış olan ksenobiyotiklerle temaslarının tam olmasıdır (Gyamfi 2004; Smith 1981; Hayes 1989; Baş 2006). Toksik maddelerin parçalanmaları ve dışarı atılımlarında böbrekler önemli rol oynarken ve GST'lerde anyonik izoenzimlerin yanı sıra katyonik izoenzimlerde bulunmaktadır (Sherman 1983).

Aminoasitlerin içeriklerinin önemli olmasının sebebi enzimlerin yapılarını oluşturmalarındandır. Sıçan ve insan GST'lerinde en çok bulunan aminoasitler; glutamik asit, lösin ve aspartik asit olarak bilinmektedir. Sistein aminoasitleri ile triptofan sıçan GST'sinde eser miktarda varken insan GST'sinde hiç yoktur (Fleischn 1976; Baş 2006).

1.6.1.1. Glutasyon S-Transferaz Enzimini Sınıflandırma

GST enzimi; proteinin yapısı ile fiziksel özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. GST' ler sitosolik, mikrozomal ve mitokondriyaldir. GST enzimi en çok hücre sitozolünde yer alır fakat GST aktivitesi mikrozomal kısımda da bulunmaktadır. Mitokondriyal ve Sitosolik GST' ler çözünebilir GST grubundadırlar ve yapılarındaki üç boyut ile birbirine benzemektedirler. Tanımlaması en iyi tür Sitosolik GST'lerdir.

Sitosolik GST, Alt birimlerin herbirinin molekül kütlesi 25 kDa ve dimerik yapıda proteindir (Seidegardand Ekström 1997). Endojen bileşiklerde ve ksenobiyotiklerde biyotransformasyon olayını gerçekleştirirler (Wilce ve ark. 1995; Landi 2000). Farklı miktarlar ile farklı dokularda bulunup, çok fazla sayıda izoenzime sahiptir. Aminoasitlerin dizilimi ve izoelektrik noktaları çözünebilir izoenzimlerde birbirinden ayrıdır.

Mikrozomal GST, integral membran proteinleri olup peroksizomlarda bulunur. Araşidonik asit metabolizmasında bulunur ve GSH ile bağımlı izomeras ve transferaz reaksiyonlarını katalizlerler.

1.6.1.2. GST'nin Görevleri

GST enzimi, detoksifikasyon ve biyoaktifliğe katkıda bulunmak için elektrofilik ksenobiyotikler ile glutasyonun konjugasyon olayını katalizlerken aynı zamanda tirozin bozunması ile lökotrienler, prostaglandinler, progesteron ve testosteron biyosentezinde görev alır (Hayes 2005; Awasthi 2006; Espinoza 2012).

Besin yoluyla alınmış zehirli maddeleri, metabolik işlemler esnasında, alınmış olan besinlerin, besinsel değeri kaybolmadan emilimini sağlarken yağ asitleri, safra tuzları ve bilirubin vb nonsubstrat ligandları GSH ile bağlar ve bu maddelerin transfer işlemlerinde yaparlar (Boyer, T. D. 1989).

GST'nin indirgeme özellikleri, membranın komponentlerini lipit peroksidasyon'undan korurken aynı zamanda lipit peroksidasyon'unun aldehit yapıdaki ürünlerinden 4- hidroksi alkenaller ile GSH'ın konjugasyon'unu sağlar. Mikrozomal fraksiyonda olan GST izoenzimleri ise peroksidaz aktivitesi ile lipit peroksitlerin türevlerinden korumaktadır.

Doğal koruyucu sistemlerden biri olarak da kabul edilen GST'ler ilaçlar (laktonlar, alkiler, arilhalidler, kinonlar, epoksitler, herbisid, peptisid, esterler vb), antikanser ilaçlar (sisplatin, fosfomisin, klorambusil, melphalan, siklofosfamid ve mitoksantren vb), kimyasal kanserojenler (adeninpropenal, dopominokren, aminokrom, hidrokarbonlar, etakrinik asit vb) ve çevresel kirlilikler (bütodien, akrolein, etilenoksit vb) gibi maddelerin atılımında görevlidirler (Gyamfi 2004).

GSH'nın çok sayıda farklı bileşikle konjugasyonunu GST enzimi yapar. İzonzim sayısının fazla ve hidrofobik substrat bağlama bölgesinin olması etkilidir. Bu enzim farklı yapıdaki pek çok substratı katalizleyebilmekle birlikte suda kolayca çözünebilir hale getirirler ve sonuç olarak idrar ya da safra yoluyla atılmasında kolaylaştırır (Cnubben 2001; Coşkun 2007; Özaslan 2014).

Böbrekler hem fizyolojik hemde anatomik özellikleri sebebiyle toksik ajanlar için önemlidir. Böbreklerin önemi; ksenobiyotiklerin taşıyıcıları ile onların metabolize olmalarını sağlayan enzimin burada bulunması, bu organa kan akışının fazla olması, ksenobiyotiklerin taşıyıcılarının ve onların metabolize olmalarına neden olan enzimin varlığının idrar üretimi esnasında ksenobiyotik metabolitlerini yoğunlaştırmasıdır (Van Vleet ve Schnellmann 2003).

GST toksik etkili bileşiklerdeki elektrofilik bölgelerin -SH ile etkisizleştirilmesidir. Birçok elektrofilik materyalin inaktivasyon ve aktivasyonu için gereklidir. Merkaptürik asit ürün olarak oluşur ve dışarıya idrar olarak atılmaktadır (Hayes 2005). GST oksidatif stres için geliştirilen savunma mekanizması olan bir antioksidandır ve ROS'u daha az reaktif olan metabolitler haline indirger ve bu sayede organizmayı korur. Günümüzde yapılan çalışmalar ise GSTgeninde meydana gelen bozulmaların olabileceği bunun sonucunda ise çok sayıda hastalığın oluşabileceği sonucuna varılmıştır (Safarinejadetal. 2010).

GST enzimi organları zehirli maddelere karşı korur. GST' nin uyarıcısı olan oltipraz, fenoller, N-heterosiklik bileşikler gibi dithiothiones bileşikler kanser önleyici ve tedavi edici ilaçların birçoğunda bulunmaktadır. Bu kimyasallar hücrelerin ciddi oranlarla oksidatif strese girmesine sebep olabildiği gibi GST'de hücrelerimizi oksidatif stresten koruyor olabilir (Cho ve Kim 2000).

İlaç etkileşimlerinden sebep, GST enzimi kanser ile mücadelede önemlidir. Bu mücadeleyi epoksitlere benzeyen başlatıcı ajanları inaktive ettiği için tümörlerin oluşumunu önleyerek yapabilir ya da kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesine sebep olduğu için dolaylı yol ile kanser hücresine karşı koruma görevini üstlenebilirler (Hayes ve Pulford 1995).

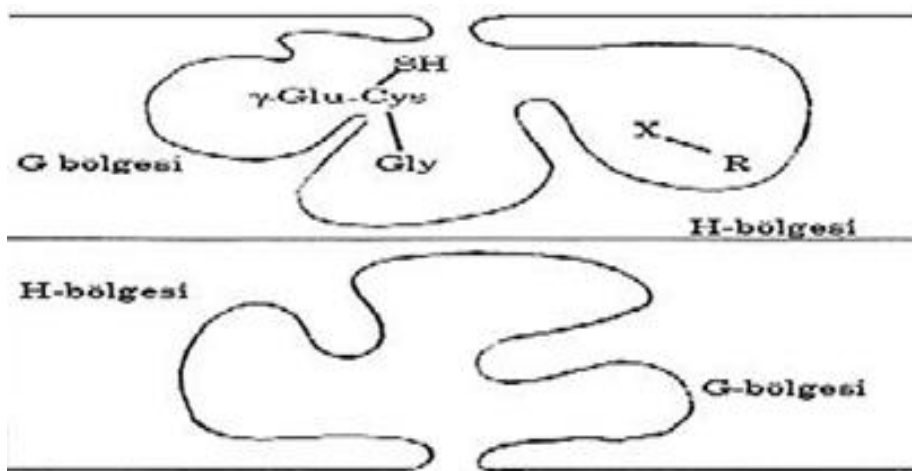
Memelilere ait tümörlü hücrelerde yüksek miktarlardaki GST üretimi ile kimyasal karsinojenler ile antikanser ilaçlara direnç oluşumuna neden olur (Hayes and Pulford 1995). GST'de direnç kazanılmasını düşündüren tümörlü hücrelerde GST Pi' nin miktarının fazla artmasıdır (Aliya ve ark. 2003).

1.6.1.3. GST Bölgeleri

GST enzimleri dimerik ve globular yapıda proteinlerdir. Her bir alt biriminde katalitik bölgeye sahiptir ve alt birimler 200 ile 240 aralığında aminoasit diziliminden oluşur. Molekül ağırlıkları ortalama 23-29 kDa aralığındadır.

GST'de bulunan herbir alt birim; kısa olan bağlayıcı bölgeleri birleştirme görevi gören iki domain' den oluşan polipeptid zincirine sahiptir.

N- terminal domain; 3 α -heliks yapısı ile bir β -tabakası şeklinde yaklaşık 80 aminoasidin birleşmesinden oluşur. G bölgesi yani GSH'ın bağlandığı bölge ve H bölgesi yani hidrofobik olan elektrofillerin bağlandığı bölgedir. C- terminal domain ise 6 veya 5 α - heliks yapısı ile yine aminoasitten oluşur (Tuna 2008).



Şekil 1.6: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi (Ji et al. 1994)

1. G Bölgesi: GSH'ın GST'nin üstünde bağlandığı bir bölge ya da enzim üzerinde bulunmakta olan bir cep şeklinde bir bölgedir. GSH'ın tiyol grubu bu cep şeklindeki bölgenin açık olan kısmına bakacak biçimde yerleşmiştir. Tiyol grubu diğer substratla bağlanabilir özellikte ve enzimin üzerindeki pozisyonu GSH'la konjugasyonu bakımından önemlidir. GSH analogları; L-sistein'in, D-sistein'in, L-penisilamin ve L-homosistein substitusyonu ile oluşmuş olan GST kosubstrat olarak GSH'la yer değiştiremezler. Tiyol grupları GST'nin bağlayabileceği substratta seçicidir ve aktivitenin tam kaybına neden olabilir (Anton ve ark. 1990).

2. H Bölgesi: GST enzimine ait katalitik merkeze bağlanılan bu bölgemiz elektrofilik ve hidrofobik substratların, hidrofobik olan bölgesidir (Nishihira ve ark. 1995). H ve G bölgelerini içeriğinde bulunduran aktif alan ile GSH analogu spesifik olarak bağlanır. Aktif bölgeye ait konformasyonun stabilitesinde C terminali aktif rol oynamaktadır (Lo Bello 1997).

GST enzim aktivitesini etkileyen faktörler: Tür farklılıkları, yaş, cinsiyet, beslenme, doku çeşidi, patolojik durumlar, hormonlar ve kimyasal faktörlerdir.

GST enzimi iki substrat bağlama bölgesine sahiptir. GSH'dan farklı substratlar oldukça fazladır. GST, birden fazla substratı tanıyabilme özelliğinden dolayı kısmi substrat özgüllüğü gösterir ve yapısında kendine has substratın bağlanabildiği bir ya da birden fazla katalitik bölgesi vardır. Bu enzim oksidasyon ile oluşan ürünün ya da dışardan alınmış zehirli maddelerin, vücudumuzda var olan küçük boyutlu moleküllerle birleşimini önleyerek hücre unsurlarına zarar vermeden vücudumuzdan atılımını gerçekleştirir.

GST'nin aktivitesi iki farklı yöntem ile ölçülür. Birincisi spektrofotometrik yöntemdir. GST'nin hücre içi substratı olan GSH'ın konjugasyonu sonucu oluşan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine dayanan yöntemdir. Diğer yöntem ise, serum doku örneklerindeki GST'nin aktivitesinin ölçümünde immüno radyometrik yöntem kullanılır (Howie 1988).

GST izoenzimleri birçok prokaryot ve ökaryot hücrelerde bulunur ve dimer yapıda iki alt üniteden meydana gelir. Mevcut GST tipini ise bu alt üniteler belirtir. Aynı olan GST enzim grubundaki alt birimler aralarında dimer oluşturabilirken farklı

olan grupta yer alan birimler alt birimlerle dimer oluşumu gerçekleştiremezler (Carver ve Hines 2002).

GST'nin alt birimleri mü, teta, pi, alfa, sigma, tau, delta ve beta olmak üzere 8 alt sınıftan oluşur. GST alt birimlerinden sigma prostaglandinin sentezinde, mü ve pi ise ilaç metabolizmasında görevlidir (Rowsey ve ark. 2001). Alt birimlerden pi bitkilerde, teta ve zeta ise hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunmaktır (Dixon ve ark. 2002).

1.7. Kazlar

Hayvansal kökenli üretimlerde kanatlı hayvanlar çok önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'de kanatlı hayvanlar yetiştirilmeleri ve tüketimleri göz önünde bulundurularak öncelik sırasıyla tavuk, hindi, kaz ve ördektir.

Kanatlılardan elde edilen etlerde ucuza üretim ile maliyetin düşük olmasından sebep protein kaynağı olarak hayvansal proteinlerin tüketiminde önceliklidirler. Tüm dünyadaki kanatlı üretimleri ve tüketimlerine bakılarak yapılan sıralamada kaz yetiştiriciliği son sıralarda yer almaktadır. Kaz yetiştiriciliğinin istenen düzeyden az olmasının sebepleri; kaz ürünlerinde talebin az olması, kazın sıcak ve kurak iklimlerde yetiştirilememesi ve kazlardaki üreme yeteneklerinin diğer kanatlılara göre daha düşük olmasıdır (Aksoy ve Arıkan, 1995).

Günümüzde kaz etine istek hızla artmıştır. Kaz yetiştiriciliğine yönelmelerin sebepleri ise; kazların yetiştirilmesinin kırsal alanlara uygun olması, kaz etinin çok daha sağlıklı ve çok daha güvenilir olması, kaz yetiştiriciliği organik üretim için uygun olup kırsal kalkınmada da yarar sağlarlar ayrıca kazların otlanma kabiliyetlerinin çok iyi olması ile yabancı otları tüketebilmeleri kaz yetiştiriciliğinde başlıca tercih sebepleridir (CywaBenko ve ark., 1999; Çelik ve Bozkurt 2009). Ayrıca, hastalıklara ve zor şartlara dayanıklı olmaları, tüketicilerdeki farklı lezzetleri arayışlar ile besi performanslarının fazla oluşları da kazları tercih etmede önemli etmenlerdendir. (Labatut 2002).

Kaz yetiştirilmek istendiğinde; bol su kaynaklarının bulunduğu ve iklimlerin soğuk olduğu bölgeler seçilmelidir. Kaz yetiştiriciliği; kazlardan et, ciğer ve tüy gibi ürünler elde etmeye yönelik amaçlarla yapılmaktadır. Türkiye'de kaz yetiştiriciliğine

hemen her bölgede rastlanır. Bölge olarak en yaygın Güney Anadolu, Kuzey Doğu Anadolu, Orta Anadolu ve Batı Karadeniz'dir. İl olarak ise; Muş, Ardahan ve Kars'tır (Boz ve ark., 2014; Taşkın ve ark., 2017).

Dünyada bazı ülkeler ticari manada üretim yaparken ülkemizde üretim maliyetlerinin düşük olması sebebiyle kırsal bölgelerde ve geleneksel tipte yani daha çok besleyen ailelerin et ihtiyacını karşılamaya yönelik olarak yapılmakta ve ticari yönü bulunmamaktadır (Kırmızıbayrak 2001).



Şekil 1.7: Kaz görseli

Bu çalışmada bölgemizde yetiştirilen kaz türünün karaciğer dokusunda mevcut olan GST enzimi saflaştırıldı, karakterizasyon işlemleri yapıldı. Bazı kimyasalların ve metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Böylelikle doğada zamanla artmakta olan kimyasal maddelerin özellikle bu tür üzerindeki etkilerinin sınırlarının çizilmesi adına katkılar sağlandı. Sonuçta elde edilen verilerle de mevcut tür üzerindeki riskleri gösteren bilgiler edinilmiş oldu.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Detoksifikasyonda son aşama ve son ürün merkaptürik asit oluşumudur. Bu metabolik yolda ilk enzim ise Glutasyon S- transferaz Enzimi homeostasisi sürdürmede işlevseldir. Detoksifikasyonda ksenobiyotiklerin GSH (Glutasyon) ile konjugasyonunu sağlamaktadır (Andersson 1988; Arı 2003).

Bu işlemleri GST'nin yapabilir olmasına sebep ise yapısında spesifik olmayan hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin bulunması ile fazla sayıda izoenziminin var olmasıdır. Buna sebep olarak izoenzimleri karsinogenik bileşikler, çevresel kirleticiler, çok sayıda bileşiği ve ilaç kalıntısını substrat olarak kullanabilmesini göstermişlerdir. Bir başka sebep olarak ise izoenzimlerinden her biri iki protein yapıda alt birimden oluşan bu proteinlere ait GSH bağlanma bölgesi olan G bölgesi ve elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesinin bulunmasıdır (Cnubben vd 2001).

GST enziminde saflaştırma proteinlerde yapı ve dizilimler esas alınarak yapılır. GST yapıları esas alınarak alfa, epsilon, beta, theta, zeta, tau, pi, mu, sigma, nu, omega, phi ve delta sitozolik sınıfta yer alır. GST mitokondrial bakımdan ise kappa sınıfındadır (Joseph 2010; Oekley 2011; Eaton ve Bammler 1999).

Sıçan karaciğerinde yapılan bir araştırmada GST ilk defa tanımlanır ve sonrasında GST'nin sınıflanmaları farklı substrat spesifitelerine göre aralkil transferaz, epoksit transferaz, aril transferaz, alken transferaz ve alkil transferaz olmak üzere 5 sınıftadırlar (Both 1961; Boyland ve Chasseaud 1969).

GST'nin izoenzimleri farklı şekillerde sınıflandırılırlar ve izoelektrik noktalarına göre de nötral, asidik ve bazik olarak ayrılırlar. İzoenzimler dimerik yapıya sahip ve alt birimleri 26,7 kDa, 24,8 kDa ve 26 kDa'dır (Tüken 1993).

GST Enziminin hücrelerimizi kanserojenler, pestisitler ve ilaçlar gibi yabancı maddelerden koruduğu düşünülmektedir (Huston 1976).

Tümörlü ve tümörsüz İnsan midesinden saflaştırmış oldukları GST enzimine belirlenmiş olan ağır metaller uygulanmış ve inhibisyon etkileri incelenmiştir. Sonuç

olarak ise metal iyonlarının farklı derişimler de GST'yi inhibe etmiş olduğu belirlenmiştir (Demirdağ vd. 2013).

İnsanın karaciğerinde yapılan bir araştırmada katyonik ve anyonik GST izoenzimlerini saflaştırmışlar alt birimlerde molekül ağırlıkları 24,5kDa ve 22,5kDa olarak bulunmuştur. GST' nin katyonik olanında %80 amonyum sülfat doygunluğu, GST anyonik olanda ise %65 amonyum sülfat doygunluğuna ulaşıldıktan sonra sülfatla fraksiyonlama işlemi yapılmıştır. Saflaştırmada sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi, izoelektrik fokuslama ve DEAE- selüloz anyon değışim kromatografisi gibi yöntemlerle saflaştırılmışlardır (Awasthi ve ark. 1980).

Kefal balığında karaciğerde GST' ye ait 14 izoform saflaştırılmış ve dimerik yapıya sahip alt birimlerin molekül ağırlıkları 28kDa ve 23kDa olarak bulunmuştur (Barcena ve ark. 1997).

Sıçanlarda karaciğere insülin uygulandığında mikrozomal GST aktivitesinde bir değışiklik yoktur ve sitozolik GST aktivitesinde %56 artış gözlenmiştir. Glukagon uygulandığında ise mikrozomal GST aktivitesinde değışiklik yoktur ve sitozolik GST aktivitesinde %43 azalma gözlenmiştir (Carillo ve ark. 1995).

Thonningia sanguinea'den saflaştırılmış antioksidan olduğu bilinen thonningianin A, *in- vitro* olarak karaciğerden alınan sitozolik GST' ye uygulandığında inhibitör etkisi vardır (Gyamfi 2004).

Kefal balığından alınan karaciğer dokusu ile yapılan çalışmada GST enzimine ait 14 izoformu Anyon değışimi kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Dimerik yapıda bulunan GST izoformlarından her birine ait molekül ağırlığı 28kDa ve 23kDa olarak tespit edilmiştir (Martinez-Lara ve ark. 1997).

Plesentada yapılmış olan bir çalışmada plasental GST %0,5 verim ile 16 kat saflaştırılıp proteinin spesifik aktivitesi 2,628 EÜ/mg olarak bulunmuştur. Substratlarını incelediğimizde ise GSH ve CDNB için sırası ile K_m 'si si 2 mM ve 0,55 mM'dir. GST- π 'nin saflaştırılması, karakterizasyonu ve inhibisyonu yapılmıştır. Ampisilin isimli ilacın enzimi inhibe ettiğı belirlenmiştir (Çelik ve ark. 2003).

Bactroceraxın türü bir sinekte yapılan çalışmada gelişim evrelerinde karakterizasyon ve saflaştırma çalışmaları yapılmış ksenbiyotiklerin inhibisyon etkileri araştırılmış ve sonuçları belirlenmiştir (Chen Er-Hu 2012).

Hindilerde yapılan çalışma ile karaciğer dokusundan sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış molekül ağırlığı 53kDa bulunmuştur. Saflaştırmada SDS-PAGE kullanıldığında ise molekül ağırlığı 26kDa'dır. Saflaştırılan GST enzimine inhibisyon işlemleri uygulanmış ve sonuçları belirlenmiştir (Akkemik ve ark. 2012).

İnsan eritrositlerinde ve sıçan karaciğerinde indometazin grubu ilacın GST'ye *in-vitro* etkileri araştırılmış ve ilacın GST'ye inhibisyon etki yaptığı gözlenmiştir (Nicholls and Ahokas 1984; Wu and Mathews 1983), fakat insan eritrositlerindeki izoenzimlerdeki aktivitelerini artırmıştır (Orhan 1994).

Lactuca sativa ile yapılan çalışmada GST enzimini glutatyon- sepharose kolon kromatografisi ve DEAE-sephacel yöntemiyle %9,6 verim ile tahminen 403 kat saflaştırmış ve molekül kütlesini jel filtrasyon kromatografisi ile 48kDa iken SDS-PAGE yöntemiyle 23kDa bulmuşlardır (Hee-Joong ve ark. 2005).

Gökkuşığı alabalığının karaciğerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin izoformlarını da SDS- PAGE ve HPLC yöntemleri ile bulmuşlardır. Bulunan bu izoformlara ait molekül kütlelerini HPLC çalışması ile 23kDa ve 25,5kDa bulunmuştur. (Riol ve ark. 2001).

İnsan cenin karaciğerinden afinite kromatografisi ile kromotofocuslama yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. GST'nin bu asidik formu homodimer yapıdadır ve alt birime ait molekül kütlesi 23kDa' dır. GST asidik formu yetişkin insan ve cenin karaciğeri ile karşılaştırıldığında farklı özellikler gösterdiği gözlenmiştir (Kashiwade vd. 1991).

Sıçan karaciğerinden amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE- selüloz anyon değişim kromatografisi, hidroksilepatit kolonu ve CM- selüloz katyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 4,1 EÜ/mg bulunmuştur. Enzimin yapısı homodimerdir, molekül ağırlığı 45kDa'dır ve fosfat tamponu pH 7'de sabittir. K_m sabiti GSH için 0,02mM iken CDNB için 0,006mM'dır (Pabst vd 1974).

İnsanlarda kan serumundan GST enzimini saflaştırmış ve karakterize etmiştir. GST’de optimum pH’yı 5,5 optimum sıcaklığı 65°C ve optimum iyonik şiddet 2mM potasyum fosfat tamponu olarak bulunmuştur. Aktiviteyi ölçmede kullandığımız CDNB ve GSH substratları için K_m ve V_{max} değerleriyse sırası ile 2,8mM ve 0,43 nmol/dk.mg; 4,11mM ve 0,23 nmol/dk.mg protein bulunmuştur (Türkanoglu vd 2005).

Sığır beyni kullanılarak yapılan çalışmada GST enzimini; DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi, kalsiyum fosfat jeli, GSH-sepharose afinite yöntemi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemlerini kullanarak yaklaşık 500 kat saflaştırmışlardır. GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlesi 22kDa-24kDa ve izoelektrik pH’ları $7,39 \pm 0,02$ bulunmuştur. Yapılmış olan inhibisyon çalışmaları uzun zincirli yağ asitlerinin GST enzime etkili bir inhibitör olduğunu göstermiştir (Young ve Briedis 1989).

Tilapya bir diğer adıyla *Oreochromis niloticus* balığının karaciğerinden elde edilen GST enziminin saflaştırılma işlemi glutatyon- sepharoz afinite kolonu ile yapılmıştır. GST enziminde optimum pH’ı 8 ve alt birimine ait molekül ağırlığını ise SDS- PAGE yöntemiyle 25,46 kDa bulmuşlardır. GST ‘nin substratları olan CDNB ve GSH’ın K_m değerlerini 0,42 mM ve 0,35 mM olarak belirlenmesinde Michaelis-Menten grafiğinden yararlanılmıştır (Hamed vd 2004).

İnsan kanı serumu ile yapılan çalışmada optimum sıcaklık 65 °C, optimum pH 5,5 ve optimum iyonik şiddet 2 mM K-fosfat tampon olarak bulunmuştur. GST enzimi saflaştırılıp CDNB ve GSH substratları için K_m ve V_{max} sabitleri bulunmaya çalışılmıştır (Türkanoglu 2007).

E. coli bakterisi %7,5 verim ile 2300 kat saflaştırılarak molekül kütlesi 45kDa tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık değerimiz 50°C ve pH 7,0’dır. CDNB ile GSH substratlarına bakıldığında K_m ’leri 1,43mM ve 0,33mM’dır. (Iizuka ve ark. 1989).

İnsan akciğerinde yapılan bu çalışmada GST’nin katyonik ve anyonik formlarının alt birimleri homodimerdir ve molekül ağırlıkları sırasıyla 24 kDa ve 22 kDa’dır. İzoelektrik pH’ları ise sırası ile 9,2 ve 4,9 iken toplam GST aktivitesinin ise sırasıyla %2 (akciğerdeki proteinlerin %28 oluşturur) ve %98 gösterdiği tespit edilmiştir (Catherine vd. 1984).

İnsan karaciğerinde yapılan bir araştırmada kromatofocuslama yöntemi ve glutatyon- afinite kromatografisi kullanılarak gst enzimi saflaştırılmış ve izoelektrik pH'ı 8,9 ile 4,9 aralığında olduğu belirlenmiştir. GST'deki farklı 13 form CDNB'ye benzer aktivite göstermiş ve spesifik aktivitesi 33-94 EÜ/mg aralığında bulunmuştur. Bu farklı 13 form kümen hidroperoksitl ile peroksidaz aktivitesi göztermiş ve spesifik aktivitesi 1,5-8,3 EÜ/mg aralığında bulunmuştur (Jaght vd. 1985).

Sığır eritrositleri ile yapılan bu çalışmada saflaştırılmış GST' yi %97 verim ile 6800 kat saflaştırılmış ve molekül ağırlıkları 27kDa olarak bulunmuştur. Stabil pH'ı 6,5, Optimum pH'ı 7, optimum iyonik şiddet 0,1 M ve optimum sıcaklığı ise 20°C bulunmuştur. CDNB ve GSH substratları için K_m sırasıyla 0,186mM ve 0,423mM' dir. V_{max} ise sırasıyla 116EU/ml ve 192EU/ml' dir (Güvercin 2008).

Monopterus albus türü bir balığın solungacından glutatyon- sepharoz 6B afinite kolonu ve afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. GST enzimini %14 verim ile yaklaşık olarak 300 kat ve spesifik aktivitesi 13,07µmol/mg olarak bulmuşlardır. GST'de optimum pH 7-7,5 aralığında iken optimum sıcaklık ise 45 °C'dir. Homodimer yapıdaki molekül kütlesi 26kDa bulunmuş ve saflık derecesi SDS-PAGE ile ölçülmüştür. GST'nin substratları CDNB ve GSH için K_m değerleri 0,28mM ve 0.20mM'dir (Huang 2008).

Holstein olarak anılan siyah alaca sığırın karaciğerindeki GST enzimi HEK yöntemi ve Sepharose jeli kullanılarak saflaştırılmış ve saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapılmıştır. V_{max} ve K_m değerleri Linewear-Burk yöntemi ile GSH ve CDNB substratları kullanılarak belirlenmiştir. GSH' da 1,11mM ve CDNB' de 3,06EÜ/ mL' dir (Aksoy 2018).

Atlantik somonu ile kahverengi alabalığa ait böbrek ve karaciğer dokuları kullanılarak yaptığımız bu çalışma ile sitozolik GST saflaştırılarak ve karakterizasyonu yapılmıştır. Atlantik somonu ile kahverengi alabalığa ait böbrek ve karaciğer dokularından sitozolik GST'yi saflaştırmak için glutatyon- agaroz aginite kromatografisi ile HCPLC yöntemi uygulanmıştır. Atlantik somonuna ait karaciğer dokusunda sitozolik GST enzimi %70,58 verimle 57,2 kat saflaştırılmış ve proteinin spesifik aktivitesi $0,26 \pm 0,081$ EÜ/mg olarak bulunmuştur. Atlantik somonuna ait böbrek dokusunda sitozolik GST enzimi %86,9 verimle 187 kat saflaştırılmış ve

proteinin spesifik aktivitesi $37,50 \pm 5,39$ EÜ/mg olarak bulunmuştur. Kahverengi alabalığın karaciğer ve böbrek dokularından sitozolik GST'yi saflaştırmak için glutatyon- agaroz afinite kromatografisi ile HCPLC yöntemi uygulanmıştır. Kahverengi alabalığa ait karaciğer dokusunda sitozolik GST enzimi %74,54 verimle 42,66 kat saflaştırılmış ve proteinin spesifik aktivitesi $7,69 \pm 3,34$ EÜ/mg olarak bulunmuştur. Kahverengi alabalığa ait böbrek dokusunda %67,48 verimle 56,30 kat saflaştırılmış ve proteinin spesifik aktivitesi $21,96 \pm 4,531$ EÜ/mg olarak bulunmuştur (Novoa-Valinas 2002).

İnsan eritrositlerinden alınan örnekte GST enzimi glutatyon- agaroz afinite kromatografisi ile %80 verimle 1143 kat saflaştırılmış ve proteinin spesifik aktivitesi 16,00 EÜ/mg olarak bulunmuştur. Gemciabine, paclitaxel ve cyclophosphamide ilaçları için IC_{50} değerleri sırası ile 6,35 mM, 0,23 mM ve 5,75 mM'dir. K_i sabitleri sırası ile 6,71 mM, $0,182 \pm 0,028$ mM, $6,97 \pm 0,49$ mM'dir (Erat and Şakiroğlu 2013).

E. coli bakterilerinde yapılan bir çalışmada GST enzimi glutatyon- agaroz afinite kolonu ve DEAE sephacel yöntemi uygulanarak %11 verim ile 800 kat saflaştırılmış olup enzimin homodimer yapıda ve molekül ağırlığının ise 24kDa olduğu tespit edilmiştir. GST enziminde optimum pH 7,5 iken optimum sıcaklığı ise 35°C'dir. GSH ve CDNB için K_m değerleri sırası ile 0,25mM ve 1,5mM bulunmuştur. Ayrıca EDTA'nın da enzimin aktivitesini %30 kadar artırdığı tespit edilmiştir (Arca ve ark. 1990).

Kedi balığında bağırsak mukozasından alınan numuneden afinite kromatografisi ile elde edilen GST enzimi %87 verimle 100 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 107 EÜ/mg olarak bulunmuştur. Elektroferez işlemi sonucunda homodimer yapıda olduğu ve molekül ağırlığı 26,7kDa olarak bulunmuştur. GST'nin substratları olan GSH ve CDNB için K_m sabitleri sırasıyla 0,19mM ve 0,43mM'dir (Gadagbui ve ark. 2000).

Eritrositlerden elde edilen GST'ye kadmiyum, alüminyum ve kurşun metalleri uygulanmış ve *in vitro* etkilerine bakılmıştır. Bu metallerin yüksek derişimleri GST'de inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir (Orhan vd. 1994)

Gökkuşığı alabalığının eritrositleri afinite kromatografisi ile GST'yi saflaştırmışlar ve belirlenen metal iyonlarını ve antibiyotikleri GST'ye uygulamışlardır. Uygulanan metaller aktivitede azalmaya sebep olmuştur. Uygulanan antibiyotiklerin küçük dozları bile GST' nin inhibe olmasına neden olmuştur (Çomaklı 2011).

İnci Kefali balığının karaciğerinden glutatyon agaroz afinite kromatografisi ile %37,36 verimle 316,11 kat saflaştırılmış ve Habig metoduyla 340nm' de yapılmış ölçüm ile enzimin spesifik aktivitesi 29,304 EÜ/mg olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisiyle GST'nin molekül kütlesi 62,35kDa'dır. Alt birimlerine ait molekül kütlesi ise SDS-PAGE yöntemiyle sıralı olarak 28 kDa ve 33,8 kDa'dır. K_m sabiti CDNB 0,891 mM GSH 0,060 mM'dir. Cu^{+2} , Ag^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} metal iyonları GST enzimine inhibisyon etkisi göstermiştir (Özaslan. 2014).

Yapılan bir çalışmada GST enzimi pirinçten jel filtrasyonu ile afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış üzerine Cd^{+2} uygulanmış yaptığı etkiler incelenip inhibisyon yapıp yapmadığı tespit edilmiştir (Chun-hua Zhang ve ark. 2013).

Sığırların karaciğerinde orange-A agaroz afinite kromatografisi yöntemi ile DEAE- sephacel kullanılarak iki en temel izoenzimi ayrıştırılmış olup pH'lar 6,7 ve 6,1 bulunmuştur. Hg^{+3} , Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonları bu izoenzimlere uygulandığında inhibe ettikleri gözlenmiştir. Molekül kütlesi SDS- PAGE ile 27 kDa, jel filtrasyon ile 49 kDa bulunmuştur. Sonuç olarak her iki alt birimde birbirine nonkovalent bağla bağlıdırlar (Asaoka 1984).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada karaciğer dokusundaki GST enziminin aktivitesine Cd^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının etkisi incelendiğinde enzim aktivitesini %36 artırdıkları gözlenmiştir (Casalino ve ark. 2004).

İnsan kanında yapılan bir çalışmada GST enziminin aktivitesinin üzerine Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+3} metal iyonlarının etki durumlarına bakıldığında GST enzimini inhibe ettikleri gözlemlenmiştir (Türkanoglu 2007).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılan çalışmalarımızda kullanılmış olan Sephadex G-150, indirgenmiş glutatyon (GSH), TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin), akrilamid, amonyum persülfat, coomassie brilliantblue G-250, N,N'-metil bisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS) , glutatyon agaroz, trihidroksimetilaminometan, NaOH, glisin, HCl, gliserin, H₃PO₄, NaCl, sodyum asetat, izopropanol, potasyum bisfosfat, KH₂PO₄, potasyum klorür, potasyum asetat, sodyum asetat, etanol, metanol, asetik asit, brom timol mavisi, beta merkaptotanol ve diğer kimyasal maddeler Ağrı Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.2. Ağır Metaller

Günümüzde artan nüfus, kentleşme ve endüstrileşme nedeniyle tüm canlıların yaşadığı çevrede ağır metal düzeyleri artmış ve çoğu canlı dokusunda ağır metal düzeylerinde yükselme olmuştur.

Biyolojik süreçler açısından yaşamsal ve yaşamsal olmayanlar olarak iki grupta incelenirler. Çinko, kobalt, vanadyum, selenyum, krom, nikel, demir, bakır, mangan ve molibden vb. sınırlı miktarları yaşam için mutlaka gerekliyen artan miktarları ise toksisiteye sebep olmaktadır. Bu metallerin sınırlı miktarları tepkimeler için gerekli olduklarından besinlerle sürekli olarak alınmalıdır. Yaşamsal olmayanlar; bizmut, talyum, arsenik, kurşun, alüminyum, krom, kalay, kadmiyum, antimon, titanyum, uranyum ve civa vb biyolojik işlevleri yoktur ve her derişimde zehirlidirler. Buna en iyi örnek ise civadır.

Farklı metabolik yollar kullanılarak canlıların bünyelerine alınmış olan ağır metaller tüm doku ve organlarımızda değişik düzeylerde birikmekte ve geri dönüşümsüz büyük hasaralar oluşturmaktadır. Vücudumuz için fizyolojik olarak gerekli metaller vücudumuzda ihtiyaçları kadar depolanmakta ve fazlası ise uygun yollarla dışarı atılmaktadır. Vücuttan atılamayarak birikip toksik etkiler yapabilir veya enzimlerimizin yapılarını bozabilir (Yazkan ve ark. 2004).

Ağır metallerde toksik etkiler molekülün üstünde aktif olmayan bir bölgeye bağlanma ile ya da enzimde aktif bölgede faydalı olan bir metal ile yer değiştirme sonucunda meydana gelir (Viarengo 1985).

Ağır metaller proteinlerin yapısında yapmak istedikleri farklılıkları proteinlerde yapıyı oluşturan amino asitlerde bulunan histidinin imidazol, tirozinin hidroksil (-OH), sisteinin sülfidril (-SH), aspartik ve glutamic asitlerin karboksilat (-COOH) gibi fonksiyonel olan grupları ile yaparlar. Enzimlerin aktif merkezinde bulunan sistein aminoasitler ile ağır metal iyonlarının birleşmesi merkaptan bileşiklerini oluşturur merkaptan bileşiği ise enzimin aktivitesini bitirmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Ağır metallerin sebep olduğu zehirlenmelerin şiddetini pH, çözünen oksijen miktarı, sıcaklık ve çözelti içinde olan diğer maddeler, kazların büyüklüğü ile çözeltin hacminin oranı, sinerjik etki ve çözeltinin yenilenme frekansı gibi etmenler belirler.

3.1.3. Kullanılan Metaller

Civa (Hg): gümüş beyaz renkli ve oda sıcaklığında sıvı olan tek metal olup, doğada; su, sanayi, atmosfer, toprak, insan ve balık döngülerinde bulunur. Hg sahip olduğu bazı özellikleri sebebiyle endüstri alanında kullanıldığı için önemli çevre kirleticileri arasında bulunur. Civa bileşikleri en çok karaciğer ile beyinde önemli hasarlar yapar.

Demir (Fe): Toprakta bol miktarda bulunur ve birçok endüstri dalında da sıklıkla kullanılır. Bu sebeple doğayı kirleten elementlerden birisidir. Canlılarda ise miyogloblin, sitokromlar ve hemoglobin gibi birçok yapının işlevsel olabilmesi için gerekli temel bir elementtir. Fe gerektiğinden fazla alınır ise tüm dokularımızda önemli hasarlara sebebiyet verir. Toksisite sınır değeri 4-6 mg/m³'dir

Gümüş (Ag): beyaz renkli ve ışığı yansıtıklarından parlaktırlar. Isı ile elektriği iletirler ve dövülebilme özelliği sebebiyle işlenebilen bir metaldir. Kullanıldığı alanlar ise takı yapılması, elektronik eşyaların üretimi, süs eşyaları, para üretimi, diş malzemeleri, su filtreleri ve fotoğrafçılıktır.

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

Enrofloksasin: 100 mg enrofloksasin içeren enjeksiyonluk çözeltidir.

Tilosin Tartarat: 100 gram tilosin tartarat içeren enjeksiyonluk çözeltidir.

Doksisiklin hiklat: 100 mg doksisikline eşdeğer doksisiklin hiklat içerir.

Oksitetrasiklin HCl: 200 mg oksitetrasiklin baza eşdeğer oksitetrasiklin dihidrat içerir.

3.1.5. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Aşağıda listelenen cihaz ve aletler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Karıştırıcı (Vorteks)	: WiseMix
Spektrofotometre	: SHIMADZU UV-1800
Manyetik Karıştırıcı	: CHILTERN HOTPLATE HS31 - BioCote
pH Metre	: OHAUS STARTER 3100
Peristaltik Pompa	: GILSON MINIPUS 3
Su Banyosu	: JENOTECH BS11
Soğutmalı Santrifüj	: THERMOSL 16R
MeterCG840 Elektroforez Tankı	: CONSORT EV265
Karıştırıcı (Shaker)	: COMBI-Shaker
Hassas Terazî	: OHAUS pioneer
Otomatik Pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: İsoLab
Saf Su Ölçüm Cihazı	: UltraPure Water (Typ1)
Güç Kaynakları	: Apparatus - Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolabı (Corporation EC)	: Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	: Arçelik

3.1.6. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Şekilleri

Çözeltilerin tamamında hazırlama aşamasında saf su kullanılmıştır.

3.1.6.1. Saflaştırılan enzimin aktivitesinin ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1M KH_2PO_4 : 5,224 gr KH_2PO_4 tartılıp 180ml saf su kullanılarak çözüldükten sonra pH 7,4 olarak ayarlandı. Daha sonra hacim toplamı 300 ml olacak şekilde saf su eklendi.

2. 20mM'lık GSH: 0,488 gr GSH tartılarak yaklaşık 40 ml saf su ile çözüldü ve sonrasında saf su kullanılarak toplam hacim 80 ml'ye getirildi.

3. 25mM'lık CDNB: 0,404 gr CDNB tartılarak 32 ml %95'lik etanolde çözüldü ve daha sonra toplam hacim yine etanol ile 80 ml'ye getirildi.

3.1.6.2. Dokudan homojenat eldesinde kullanılan çözelti

1. 50 mM Tris-HCl Tamponu: 0,30 gr Tris 40 ml saf su içerisinde çözüldü, pH 7,4 olacak şekilde ayarlanmış ve toplam hacim 50 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3.1.6.3. Afinite kolonu ile GST enzimi saflaştırmada kullanılan çözeltiler

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl (Kolonun yıkanması, paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan çözelti): 0,34 gr KH_2PO_4 ve 2,150 gr NaCl tartılarak 200ml saf suda çözüp pH 7,4 olarak ayarlanmış ve toplam hacmi saf su kullanılarak 250ml' ye tamamlanmıştır.

2. 0,1M H_3BO_3 ile 0,5M NaCl (Afinite kolonunun yenilenmesi yani rejenerasyonu için kullanılan tampon) (Borat Tamponu): 3,72 gr H_3BO_3 ve 17,52 gr NaCl tartılarak 480 ml saf suda çözülmüş ve pH 8,5 olacak şekilde ayarlanıp toplam hacmi saf su kullanılarak 600ml' ye tamamlanmıştır.

3. 0,1M NaCH_3COO ile 0,5M NaCl (Afinite kolonunun yenilenmesi yani rejenerasyonu için kullanılan diğer tampon) (Asetat Tamponu): 1,23 gr NaCH_3COO

ve 5,8 gr NaCl tartılarak 120 ml saf suda çözülmüş ve pH 4,5 olacak şekilde ayarlandı ve toplam hacmi saf su kullanılarak 150 ml' ye tamamlanmıştır.

4. %0,02 NaN₃ çözeltisi (Kromatografi kolon malzemelerini bakteriler ve etkilerinden korumada kullanılır): 0,4 mg NaN₃ alınıp bir miktar saf su içinde çözülmüş ve toplam hacmi yine saf su kullanılarak 20ml' ye tamamlanmıştır.

5. 2,5, 5 ve 10 mM'lık GSH çözeltisi içeren pH'sı 9,5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu (kolonda tutunan GST enzimi elüsyonu için yararlanılan tampon): 50 mM'lık Tris- HCl çözeltisinde katı halde bulunan indirgenmiş glutatyonun uygun miktarlarda çözülerek 3 tüpten meydana gelen gradientle en düşük derişimli olandan başlanarak sırayla kolona uygulandı.

3.1.6.4. Bradford yöntemiyle protein tayininde kullanılan çözeltiler

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg reaktifin, 50 ml ve %95'lik etanol içerisinde çözüldükten sonra mevcut çözelti içerisine 50 ml ve %95'lik fosforik asit (H₃PO₄) eklenmesiyle elde edilen çözelti. Çözeltinin toplam hacmi saf su eklenerek 1000 ml yapıldı. Hazırlanmış olan çözeltinin ışık almayacak şekilde muhafazası sağlandı.

3.1.6.5. Elektroforez sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 1 M Tris-HCl: 12,11 gr Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldükten sonra pH'ı 8,8 olarak ayarlandı ve toplam hacmi saf su ilave edilerek 100 ml yapıldı.

2. 1M Tris- HCl: 12,11gr Tris tartılıp 80ml saf su içinde çözüldükten sonra pH 6,8 olarak ayarlandı ve toplam hacmi saf su ilave edilerek 100ml yapıldı.

3. %0,8Bisakrilamid- %30Akrilamid çözeltisi:15 gr akrilamid ve 0,4 gr bisakrilamid tartılıp, 34,6 ml saf su kullanılarak çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

4. %10'luk sodyum dodesil sülfat çözeltisi: 2 gr SDS reaktifi tartılarak 18 ml saf su içerisinde çözülüp toplam hacim saf su ile 20 ml' ye tamamlandı.

5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 2 gr amonyum persülfat tartılarak 18 ml saf su içerisinde çözülüp toplam hacim saf su ile 20 ml' ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponumuz için 1,51 gr Tris ile 7,51 gr glisin tartılıp 450 ml saf su içerisinde çözülüp öncesinden hazırlanan %10'luk SDS çözeltisin'den ise 5 ml eklenip çözeltideki pH 8,8 olarak ve toplam hacmi 500ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

7. Numune tamponu: %100'lük gliserinden 2 ml, pH'sı 13,6 olan 1 M Tris-HCl'den 1,3 ml, %0,1'lik bromtimol mavisinden 2 ml ve %10'luk SDS'den 2 ml ve alındı, saf su kullanılarak ile hacim 20 ml yapıldı. Hazırlanan bu çözelti kullanılmaya başlamadan önce 100 µl β-merkaptotanol eklenmiştir. Bu oran 1900 µl numuneye karşılık gelen orandır.

8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel içerisinde proteinlerin yürütülürken sabitlenmesi amacıyla %10 TCA, %40 su ve %50 izopropanol içeriğe sahip karışım hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 20 ml asetik asit, 80 ml su ve 100 ml metanol karışımı içerisinde 0,2gr Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözündürülmesiyle elde edildi.

10. Jelin yıkandığı çözelti: 20 ml asetik asit, 80 ml su ve 100 ml metanolün karıştırılmasıyla hazırlanan çözelti.

11. %0,1'lik bromtimol mavis: 0,01 M ve 32 ml sodyum hidroksit içerisinde 0.2 gr indikatörün çözünmesi ve toplam hacmin saf su ilave edilerek 200 ml yapılmasıyla hazırlanan çözelti.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Proteinin Tayin Edilme Yöntemleri

3.2.1.a. Proteinin kalitatif yöntemle tayin edilmesi

Tirozin, triptofan ile fenil alanin aminoasitleri 280nm'de yapısında bulundukları proteinlerin en yüksek absorbands performansı göstermesini sağlar. İşte bu esasa dayanılarak kalitatif protein tayini, 280 nm'de absorbands değerlerinin ölçülmesi ile yapılır (Segel 1968). Sözü edilen bu metot ile kromatografi sonrası gradientli elüsyon yapıldı ve fraksiyon toplayıcısıyla eşit hacimler alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini gerçekleştirildi. Bu işlem esnasında kuvars

küvetlere alınan fraksiyonların, spektrofotometre cihazıyla köre karşı absorbans değerleri okunarak kaydedildi.

3.2.1.b. Proteinin Bradford yöntemi ile tayin edilmesi

Kromatografi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki proteinin miktarı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Proteine coomassie birillat blue G-250'nin bağlanması prensibine dayanan bu yöntemle gayet sağlıklı sonuçların elde edildiği önceki çalışmalardan görülmüştür. Böylelikle 595 nm'de maksimum absorbans gösteren bir yapı meydana gelmektedir. Boya ile proteinin birbirlerine bağlanması hızlı bir şekilde gerçekleşir ve yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

Protein tayini yapılırken yapılan işlemler sırası şu şekildedir: Kullanılan standart sığır albümin çözeltisinin 1 ml'si 1 mg protein ihtiva etmektedir. Bu çözeltiden numaralandırılmış tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konulmuştur. Daha sonra bütün tüplerin hacmi saf su kullanılarak 100 µl'ye tamamlanmış ve 4,9 ml reaktif (G-250) tüplerin içerisine ilave eklenmiş ve tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. 10 dk'lık beklemenin ardından tüpler 595 nm'de köre karşı 3 ml'lik küvetler kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Kullanılan kör 0,1 ml aynı tampon ve 4,9 ml G-250 renklendirme reaktifinden meydana gelen çözeltidir. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilmiş ve protein tayini yapılan numunelerin absorbans değerleriyle gerekli hesaplamalar yapılarak miktarlar tayin edilmiştir.

3.2.2. GST Enziminin Aktivitesinin Tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir aromatik elektrofille bir glutasyon molekülünü katalizler. Sıklıkla tercih edilen aromatik elektrofil CDNB'dir. CDNB'nin kullanılmasıyla oluşan DNB-SG (dinitrobenzen S-glutasyon) ürün 340 nm dalga boyunda en yüksek absorbans performansı verir (Şekil3.1). Böylelikle bahse konu dalga boyunda ise absorbans artışından yararlanılmasıyla aktivitesi ölçülebilir. Bu metoda göre yapılan çalışmalarda aktivite ölçümleri yapıldı.

Bir Enzim Ünitesi: Bir dakikalık sürede, optimal koşullarda 1 µmol substratın tamamını ürüne dönüştürebilen enzim miktarı, bir enzim ünitesi şeklinde tanımlanır. Enzim üniteleri hesaplanmasında aşağıda verilen denklem kullanıldı.

$$E\ddot{U} = (\Delta OD / 9,6) * (VT / VE) * SF$$

EÜ: 1 ml'nin enzim ünitesi

ΔOD: 1 dk'lık absorbands değışim farkı

9,6: 1 mM DNB-SG'nin oluşturduğu absorbands değeri (Ekstinksiyon katsayısı)

VT: Ölçüm yapılan küvet toplam hacmi

VE: Ölçümün yapıldığı küvete eklenen enzim numunesi hacmi

SF: Seyreltilen örneklerde kullanılan seyreltme faktörü

3.2.3. Kaz Karaciğer Dokusundaki GST Enzimi Saflaştırma

3.2.3.a. Karaciğer dokusu temin edilmesi ve homojenatın hazırlanışı

Deneylerde kullanılan kaz bölgeden temin edildi. Karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı ve soğuk zincir kuralı ile Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirildi. Çalışmaların başlayacağı zamana kadar -80 °C' de muhafaza edildi. Kaz dokuları parçalara ayrıldıktan sonra 6 gr doku tartıldı ve çok daha minik parçalara bölünerek sıvı azot dökölüp harmanlandı ve havan yardımıyla bulamaç kıvamına getirildi. Herbir gram için 3 ml Tris-HCl tamponuyla süspanse edildi. Oluşan karışım tülbent yardımıyla süzölldü ve sonrasında 12.000rpm'de 30dk santrifüjü yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan üstte bulunan berrak kısım alınıp dibe çöken tortulu kısım ise atıldı ve böylelikle homojenatımız elde edilmiş oldu. Tüm bu işlemler ise +4 °C' de yapıldı.

3.2.3.2. Afinite jelini hazırlama ve GST enzimini saflaştırma

Glutasyon-Agaroz jeli 1 gram tartıldı ve 200ml saf su ve dengeleme tamponu ile safsızlıkları uzaklaştırmak için birkaç defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu esnada jelin şişirilmesi tamamlanmış oldu. Su trompu ile vakum yapılarak şişirilen jelde bulunan hava alındı. Elde edilen ve hazırlanmış olan jel, 1x10 cm ebatlarındaki kolona

paketlendi. Sistem kapalı sistem olarak hazır hale getirildi. Hazırlanan dengeleme tamponu peristaltik pompa yardımıyla kolona uygulandı. Tampon ve elüatın 280nm'deki absorbanslarına ve pH'larına bakılarak kolonun dengelendiği anlaşıldı. Afinite kolonu hazır hale getirildi (Güvercin ve ark. 2008, Toribio ve ark. 1996).

Hazırlanmış olduğumuz homojenatı ise yine hazır halde bulunan ve dengelenen afinite kolonuna uygulandı. 280nm dalga boyuyla elde edilen elüsyonlardaki absorbans farkları yaklaşık olarak 0,05 oluncaya kadar kolon dengeleme tamponu kullanılarak yıkandı. Bu işlem numunenin kolondan geçirilmesinden sonra yapıldı. Önceden hazırlanan tamponlar (2,5, 5, 10 mM'lık GSH çözeltisi içeren tamponlar) yardımıyla gradientli elüsyon yapıldı ve elüatlar toplanarak 340 nm'de spektrofotometre ile absorbansları ölçüldü ve kaydedildi. Ölçüm sonucunda aktivite varlığı olan elüsyonlar sonraki işlemler için birleştirilerek uygun koşullarda saklandı.

3.2.4. SDS-PAGE ile Enzimin Saflığını Kontrol Etme

Enzim saflaştırılma işleminin hemen ardından %3-8 kesikli SDS-PAGE kullanılmıştır. Bu işlem Laemmli metodu uygulanarak enzimin saflık derecesinin kontrolü de yapılmıştır (Laemmli 1970).

Yapılan bu işlem için elektroforez cihazının plakaları öncelikle su sonra ise alkol kullanılarak iyice yıkandı. Düz bir plaka ve her kenarında aralık oluşturunca bir plaka tam olarak üst üste gelecek şekilde yerleştirildi ve kışkaçlar kullanılarak birbirine sabitlendi. Birbirine tutturulan plakalar, içinde sızmayı önleyen sünger bulunan özel jel hazırlama bölümüne kondu. Mevcut plakaların üst kısmından 1-2 cm kalıncaya kadar hazırlanan ayırma jeli enjektör yardımıyla dolduruldu. Yaklaşık iki saat kadar bu ayırma jelinin donması beklendi, ayırma jelinin tamamen donarak katılaştığı tespit edildikten sonra yığma jeli ayırma jelinin üst kısmında kalan boşluğu dolduruldu. Numunelerin yükleneceği kuyucukların oluşması için tarak olarak adlandırılan parça dikkatlice yerleştirildi. Hazırlanan yapının kurumasını önlemek amacıyla ıslatılan süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı. Bu sırada yığma jelinin de katılaşıp setleşmesi beklendi. Yığma jelinin katılaşmasıyla birlikte tarak adı verilen parça dikkatli ve yavaş bir şekilde çıkarılarak numunelerin yüklemesinin yapılacağı kuyucuklar oluşturulmuş oldu. Pipetlenen jeller ile enzim örnekleri

yaklaşık olarak 10 µg protein bulunduracak şekilde hazırlandı. 50 µl toplam hacim oluşturularak 1'e 1 oranda numune tamponu eklendi. Yaklaşık olarak 3 dk kadar kaynar su banyosunda inkübe edildi.

Hazırlanan kuyulara dikkatlice yüklenen standart proteinler ve enzim örnekleri ile jel plakaları elektroforez tank bölümüne yerleştirildi. Tankın üst ve alt bölümlerine yürütme tamponu dolduruldu. Tank kapatıldı ve üst bölümden- (katot), alt bölümden + (anot) yerleştirildi. İlk olarak 80 volt gerilim altında yaklaşık olarak 30 dk kadar yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar ilerleyip yığılma yaptı. 120 volt gerilimin uygulandığı durumda ise numuneler jelin en alt sınırına gelene kadar yürütüldü.

Bu işlem esnasında numunelerin mesafelerinin takibi numune tamponuna eklenen brom timol mavisi sayesinde gerçekleşti. Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından akım kesildi ve plakalar arasında bulunan jel özenle çıkarıldı. Çıkarılan jel sabitleştirme çözeltisi içerisine kondu. Yaklaşık 20 dk kadar sabitleştirme çözeltisinde bekletilen jel, çıkarıldı ve boyama çözeltisi içerisine konuldu. Çalkalayıcı kullanılarak boyama çözeltisi içerisinde iki saat kadar bekletilen jel boyama işleminden sonra çıkarıldı ve yıkama çözeltisine kondu. Renginin açılıp protein bantlarının belirginleşmesi için çalkalayıcıda yıkanan jel, daha sonra çözeltiden çıkarıldı ve fotoğraflandı.

3.2.5. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini

Molekül kütlesi tayininde standart proteinler olarak, 75 kDa, 50 kDa, 25 kDa ve 20 kDa' lık standart olan proteinler kullanıldı. Kaz karaciğer dokusundan saflaştırılmış GST için yapılan elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin ve örneğin Rf değerleri hesaplanmış sonrasında log MA-Rf standart grafikleri çizilmiştir. Kaz karaciğer dokusundan elde edilen GST enziminin yani örneğin Rf değeri standart grafikte yerine konularak hesaplamalar yapılmış ve enziminin log MA'sı belirlemiştir. Bu değer antilogaritması alınmış ve numuneye ait molekül kütlesi bulunmuştur (Laemmli 1970).

Proteinlerde Rf değeri; $Rf = X_e/X_{boya}$ Formülü ile yapılan hesaplamalar sonucunda belirlendi. (X_e = Proteinin jelde yürüdüğü uzunluk X_{boya} = Boyanın jelde yürüdüğü uzunluk)

3.3. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Aşamaları

3.3.1. Optimum pH'ın bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu pH' ı belirleyebilmek için uygun iyonik şiddet değerine sahip farklı pH (5), (5.5), (6), (6.5), (7), (7.5) değerlerinde tamponlar hazırlandı. Her bir tamponda enzimin aktivitesi ölçüldü. Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH' ı 7 olarak belirlendi.

3.3.2. Optimum İyonik Şiddetin Bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzime optimum aktivite verdiği düşünülen iyonik şiddetin belirlenebilmesi amacıyla 0,001M, 0,005M, 0,01M, 0,03M, 0,05M, 0,07M, 0,1M, 0,13M, 0,15M, 0,17M ve 0,2M fosfat tamponları hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri daha önceki çalışmalarda bulunan optimum pH değerine ayarlanarak her bir çözelti için aktivite ölçümleri yapılarak kaydedildi.

3.3.3. Optimum Sıcaklığın Bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum sıcaklığını bulabilmek için elektronik olarak kullanabilen ısıtma-soğutma özellikli su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklığı belirleyebilmek amacıyla optimum iyonik şiddet ve optimum pH' da çözeltiler hazırlandı. 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C'deki sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapılarak kaydedildi.

3.3.4. GST Enzime Ait Substratların K_m ve V_{max} Değerlerini Bulma

Kaz karaciğer dokusundaki GST enziminde CDNB ve GSH substratları için K_m ve V_{max} değerlerini belirleyebilmek amacı ile GSH'ın sabit (1 mM) konsantrasyonunda CDNB beş farklı konsantrasyonuyla (5 mM, 2,5 mM, 1,67 mM, 1,25 mM ve 1 mM) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler ışığında $1/V - 1/[CDNB]$ Lineweaver- Burk grafiği çizilmiştir. Çizilen bu grafikten yararlanılarak

CDNB' nin v ile $V_{\max}$ değerleri belirlenmiş oldu. Aynı yöntem kullanılarak CDNB'nin sabit (0,5 mM) konsantrasyonunda GSH'ın beş farklı konsatrasyonu (2 mM, 1 mM, 0,67 mM, 0,5 mM ve 0,4 mM) ile aktivite ölçümleri yapıldı ve $1/V-1/[GSH]$ grafiği çizildi. Bu grafikte GSH için K_m ve $V_{\max}$ değerleri belirlendi.

3.3.5. Ag^{+2} , Hg^{+3} ve Fe^{+2} Metal İyonları ile Oksitetrasiklin HCl, Tilosin Tartarat, Enrofloksasin ve Doksisiklin Hiklatın GST Enzimi Aktivitesi zerine Etkilerinin Bulunması

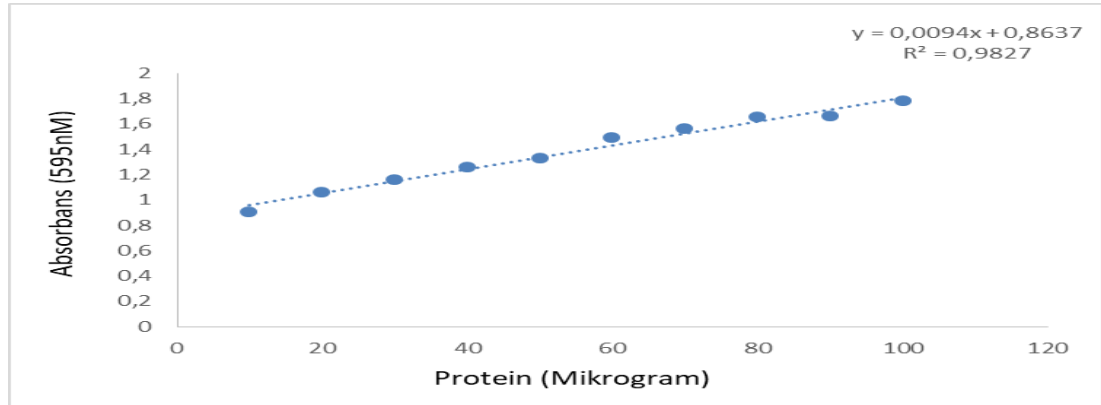
Metal iyonları ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerini değerlendirmek için metal iyonları ve kimyasalların farklı derişimleri kullanılarak GST enzimi ile aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibitörü olmayan koşullara ait aktivite değerleri yüzde yüz olarak kabul edilerek inhibitörü bulunan ortamlardaki aktivite ise bağıl yüzde olarak hesaplanmıştır. İnhibitörü konsantrasyon değerine denk gelen aktivitelerinin yüzde grafiklerini çizerek enzimlerin aktivitelerinin yarıya indikleri inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Yöntem ile Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemiyle, afinite kolonundan elde edilen enzim çözeltileri içeriğindeki protein kantitatif protein tayini yapılarak tespit edildi. Veriler kullanılarak hazırlanan standart grafik (Grafik 4.1) yapılan hesaplamalarda istenen verilerin bulunmasını sağladı.

Protein (µg)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Absorbans	0,902	1,056	1,16	1,259	1,327	1,486	1,557	1,649	1,657	1,777

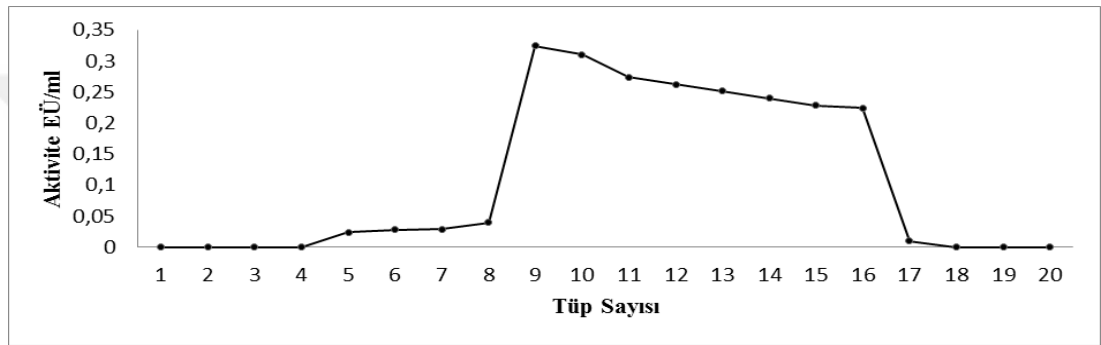


Grafik 4.1: Kantitatif yöntem ile protein tayini yapılırken Bradford yönteminde kullanılan standart grafik

4.2. Kaz Karaciğerinden GST Enzimini Saflaştırma

4.2.1. Afinite Kromatografisi Sonuçları

Hazırlanan homojenat dengelenen afinite kolonuna yüklendi. Kolon uygun tampon çözeltisi ile yıkandı ve yıkama işlemi sonucunda enzim gradientli elüsyon marifetiyle %70,51 verimle ve 48,4 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 0,121 EÜ/mg olarak elde edildi. Saflaştırma işlemine ait basamaklar Grafik 4.2'de gösterildi. Elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri ölçülerek Grafik 4.2'de gösterilen elüsyon grafiği çizildi.



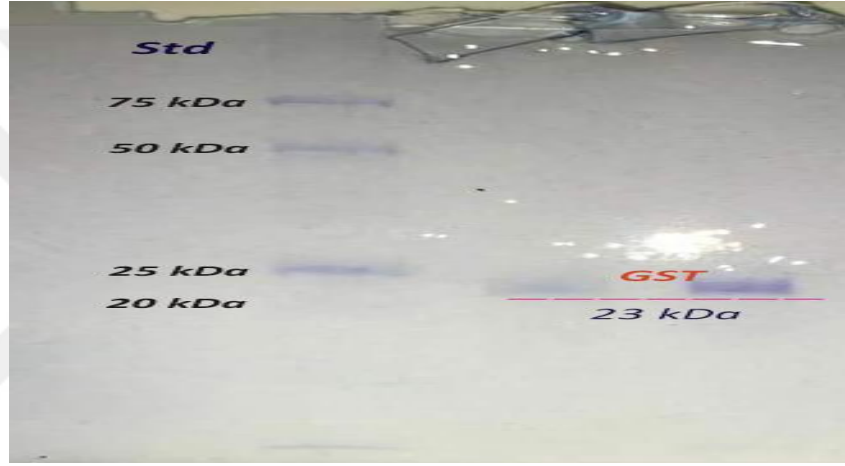
Grafik 4.2: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzime ait elüsyon grafiği

Çizelge 4.1: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enzime ait saflaştırma tablosu

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	18	1,65	64,2	1155,6	29,7	0,00257	100	1
Afinite Kromatografisi	6	3,49	28,84	173,04	20,94	0,121	70,51	48,4

4.2.2. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Saflığının SDS-PAGE ile Kontrolü

Kaz karaciğer dokusundan afinite kromatografisi ile alınan elüatlar içeğirindeki GST enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemi ile yapıldı. Saflık kontrolünün yapılabilmesi için anlatıldığı gibi elektroforez sistemi kuruldu ve enzim numuneleri ile diğer proteinler sırasıyla kuyulara uygulandı. Uygulama sonucu proteinlerin jel içerisindeki yürüme mesafeleri ölçülerek kaydedildi. Sonuçta oluşan bantları gösterir fotoğraf Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1: GST enziminin Afinite kromatografisiyle saflaştırıldıktan sonra saflığının SDS-PAGE ile kontrolü

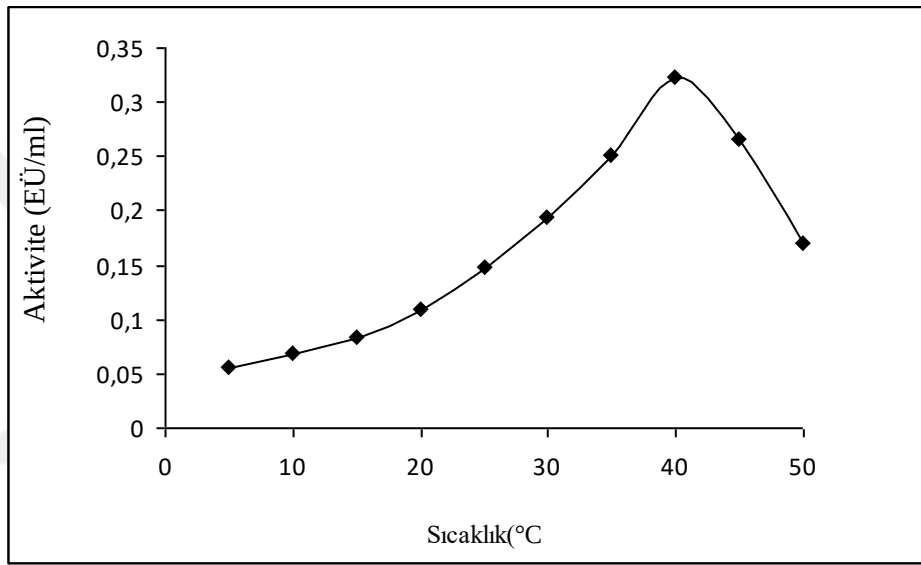
4.3. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1. Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum iyonik şiddet ve pH'da tampon kullanıldı. 5°C ile 50 °C arasında her 5 °C'de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler ışığında Kaz karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi için optimum sıcaklık Çizelge 4.2 ve Grafik 4.3'te gösterildiği gibi 40°C olarak bulundu.

Çizelge 4.2: Kaz karaciğerindeki GST enziminin optimum sıcaklık değerini bulmak için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Aktivite (EÜ/ml)	0,056	0,068	0,083	0,109	0,148	0,194	0,25	0,323	0,266	0,17



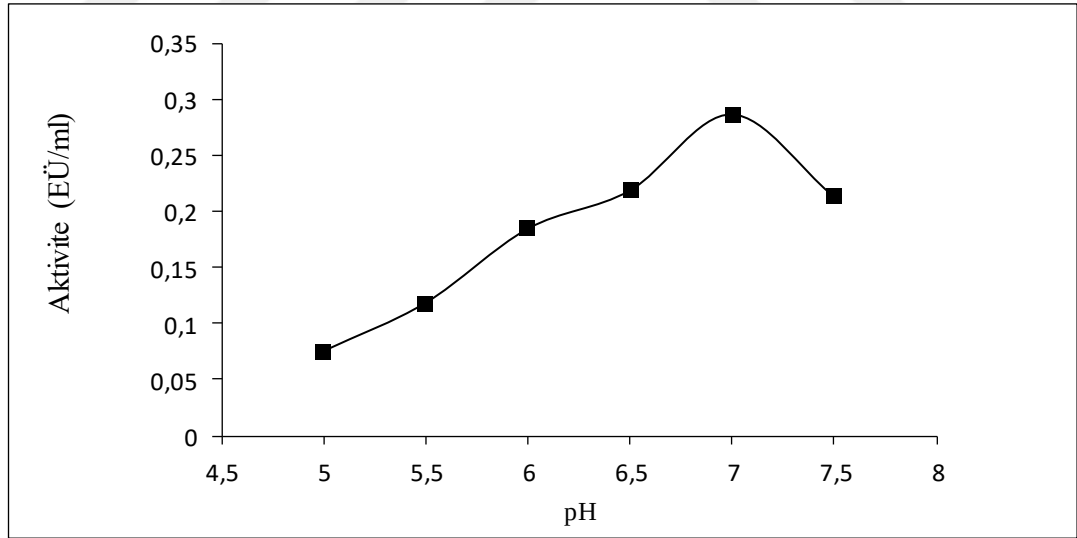
Grafik 4.3: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum sıcaklık değerini bulmak için farklı sıcaklıklar ile ölçülmüş olan sıcaklık_aktivite grafiği

4.3.2. Optimum pH 'nın Bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu pH' ı bulabilmek amacıyla uygun iyonik şiddet değerine sahip farklı pH (5), (5.5), (6), (6.5), (7), (7.5) değerlerinde tamponlar hazırlandı. Her bir tamponda enzimin aktivitesi ölçüldü ve GST'nin optimum pH değeri Çizelge 4.3 ve Grafik 4.4'te de gösterildiği üzere pH: 7 olarak belirlendi.

Çizelge 4.3: Kaz karaciğerindeki GST enziminin optimum pH değerini bulmak için aktivite ölçüm sonuçları

KH₂PO₄ tamponu için optimum pH çalışması	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5	0,075
5.5	0,118
6	0,184
6.5	0,218
7	0,286
7.5	0,213



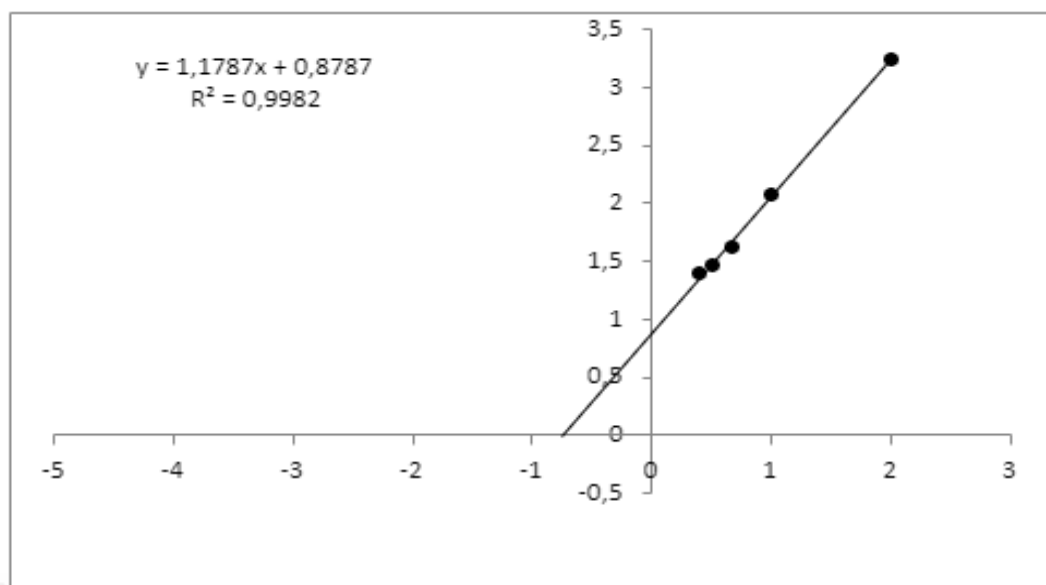
Grafik 4.4: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH değeri için birbirinden farklı Ph değerleri ile ölçülmüş olan pH _aktivite grafiği

4.3.3. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin CDNB ve GSH Substratlarının Uygulanması ile V_{max} ve K_m Değerlerinin Bulunması

Kaz karaciğerinden saflaştırılarak elde edilen GST enzimine CDNB ile GSH substratlarının kullanımı ile oluşan V_{max} ile K_m sabitlerinin belirlenebilmesi için 1 mM'lık sabit GSH konsantrasyonuna karşın CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonuyla (8,47 mM, 6,41 mM, 4,24 mM, 3,56 mM, 2,91 mM) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerle $1/V-1/[CDNB]$ grafiği oluşturuldu ve oluşturulmuş olan grafikten yararlanılarak CDNB'nin V_{max} ile K_m sabitleri bulundu. Yine aynı yöntemle CDNB için de sabitlenmiş 1 mM'lık konsantrasyonuna karşın GSH'ın 5 farklı konsantrasyonuyla (3,24 mM, 2,07 mM, 1,62 mM, 1,46 mM, 1,39 mM) aktivite ölçümleri yapıldı ve $1/V-1/[GSH]$ grafiği çizildi ve GSH için V_{max} ve K_m değerleri belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda CDNB'nin K_m değeri 0,68 mM ve V_{max} değeri 0,5 EÜ/ml olarak; GSH için ise K_m :1,34 mM ve V_{max} :1,14EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri yapılırken optimal şartlarda yapıldı. Elde edilen grafikler Çizelge 4.4 ve Grafik 4.5'te gösterildi.

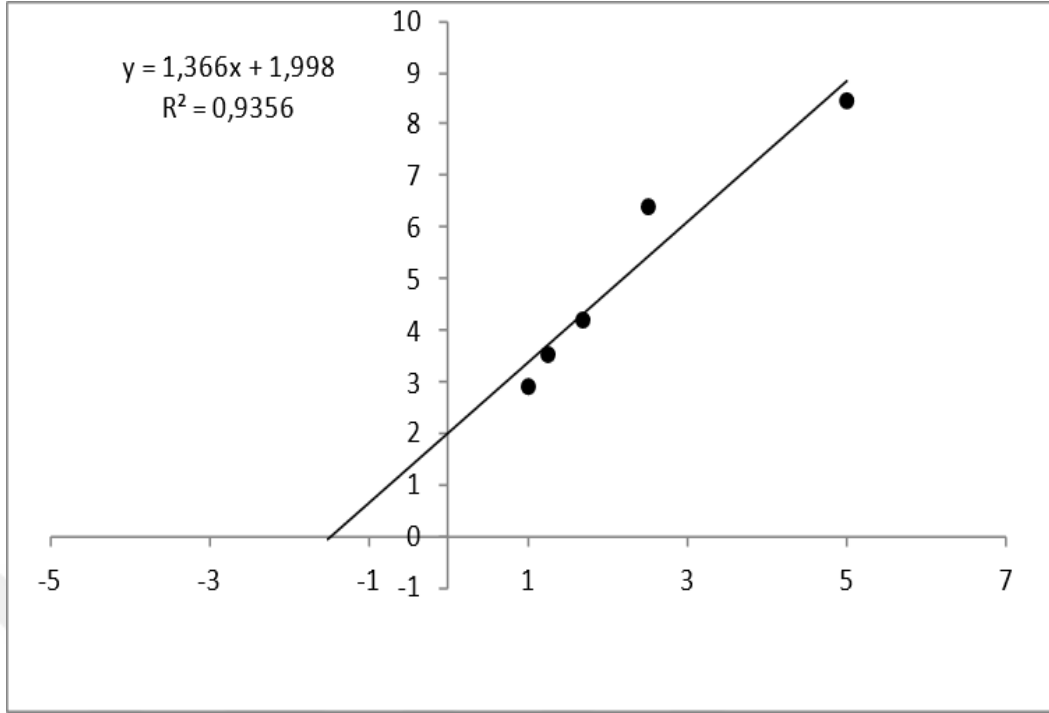
Çizelge 4.4: Kaz karaciğerindeki GST enziminin sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

1/GSH	1/ V
2	3,24
1	2,07
0,67	1,62
0,5	1,46
0,4	1,39



$V_{max}: 1,14$ $K_m: 1,34$

1/CDNB	1/ V
5	8,47
2,5	6,41
1,67	4,24
1,25	3,56
1	2,91



V_{max}:0,5 K_m:0,68

Grafik 4.5: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin CDNB'nin sabit (1mM) konsantrasyonu ile GSH için V_{max} ile K_m değerlerinin bulunmasına ait grafik

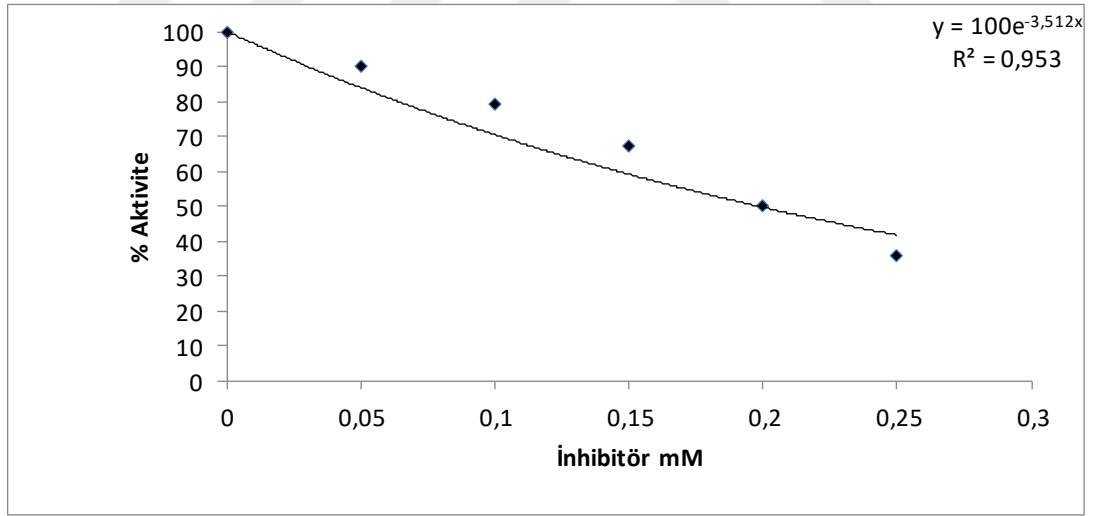
4.4. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine Belirlenen Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi

4.4.1. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzimine İnhibisyon Etkisi Yapan Metal İyonlarının IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Çalışma yapılan ağır metallerden, kaz karaciğer dokuları GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenlerin en az 4 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteleri bulunarak % Aktivite-[I] değerleri hesaplanmış, grafikler çizilmiş ve söz konusu metal iyonları için IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamaların ardından Ag⁺², Hg⁺³ ve Fe⁺² metal iyonları için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.200, 0.015 ve 0.280 mM olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5: Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine Ag^{+2} iyonu'nun etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine 0,05 M Ag^{+2} iyonunun etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,05	90
0,1	79
0,15	67
0,2	50
0,25	36

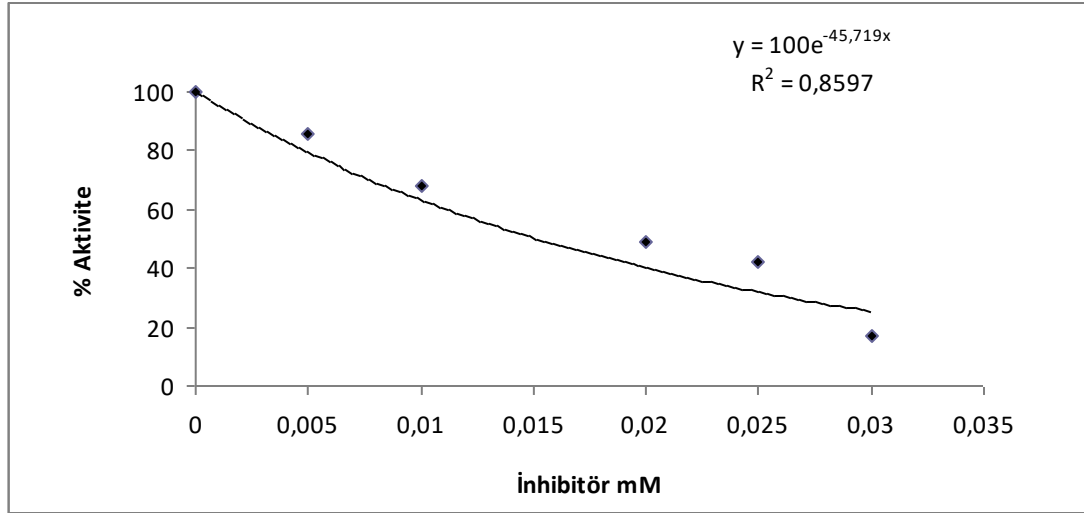


IC_{50} :0,2 mM

Grafik 4.6: Kaz karaciğerindeki GST enzimine Ag^{+2} iyonunun inhibisyon etkisi

Çizelge 4.6: Kaz karaciğerindeki GST enzimine Hg^{+3} iyonunun inhibisyon etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine 0,05 M Hg^{+3} iyonunun etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,005	86
0,01	68
0,02	49
0,25	42
0,03	17

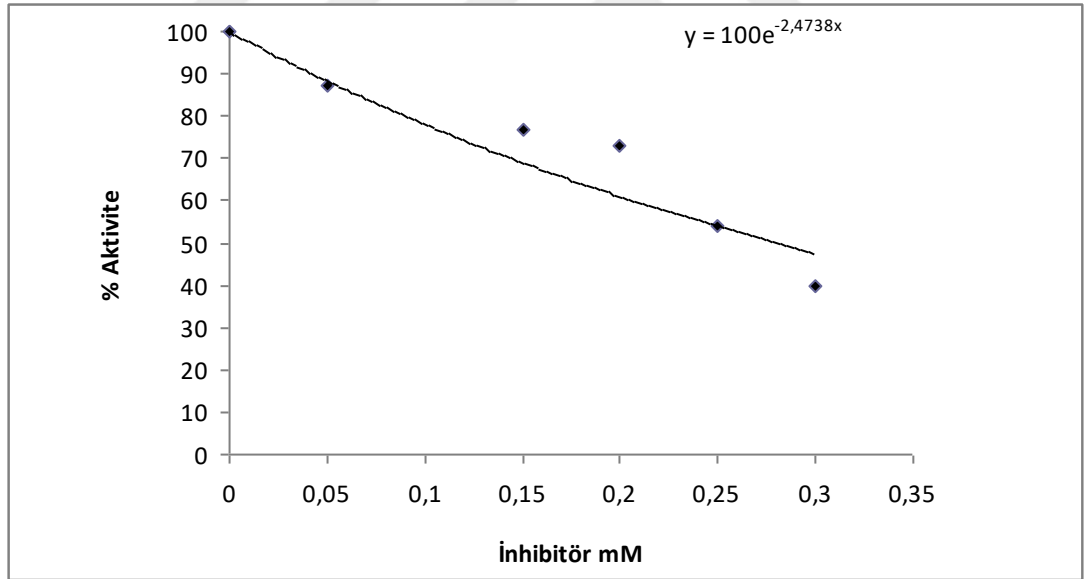


IC₅₀:0,015mM

Grafik 4.7: Kaz karaciğerindeki GST enzimine Hg^{+3} iyonunun inhibisyon etkisi

Çizelge 4.7: Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine Fe^{+2} iyonunun etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enziminin aktivitesine 0,05 M Fe^{+2} iyonunun etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,05	87
0,15	77
0,2	73
0,25	54
0,3	40



IC_{50} :0,28 mM

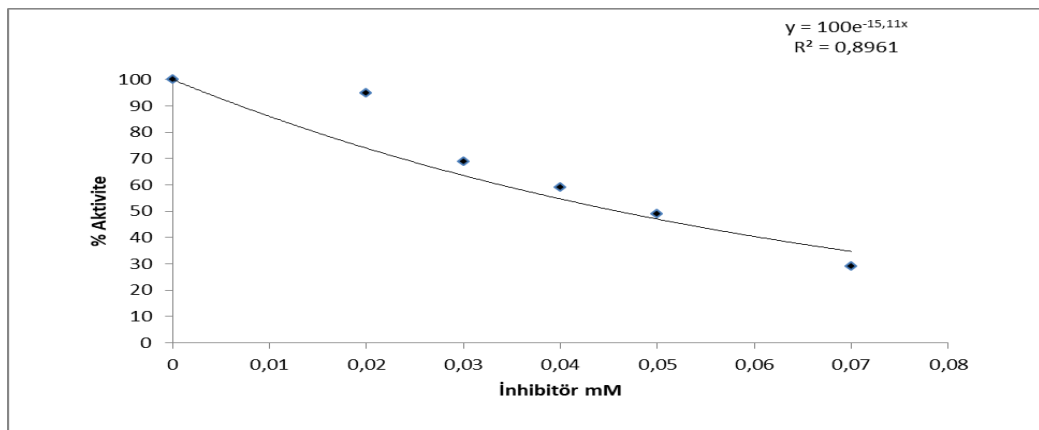
Grafik 4.8: Kaz karaciğerindeki GST enzimine Fe^{+2} iyonunun inhibisyon etkisi

4.4.2. Kaz Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enzime İnhibisyon Etkisi Yapan Kimyasalların IC₅₀ Değerlerini Bulma

Çizilen grafikler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda, oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enrofloksasin ve doksisisiklin hiklat kimyasallarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.046, 3.5, 4.3 ve 0.46 mM olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8: Oksitetrasiklin HCl'nin Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enzimi üzerine oksitetrasiklin HCl' nin etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,02	95
0,03	69
0,04	59
0,05	49
0,07	29

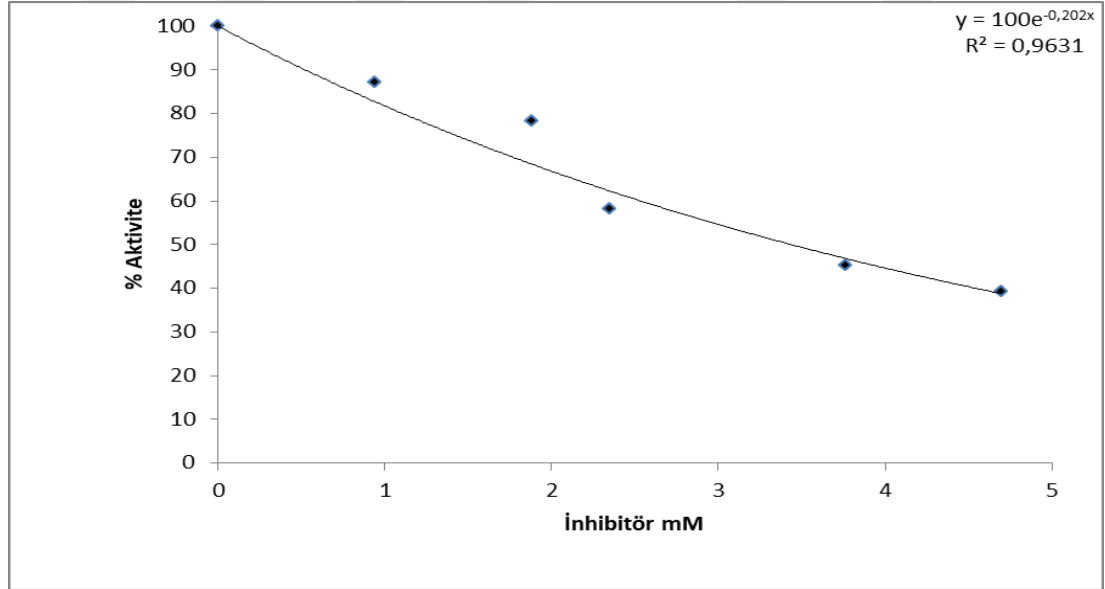


IC₅₀:0,046mM

Grafik 4.9. Oksitetrasiklin HCl'nin kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi

Çizelge 4.9: Tilosin tartarat'ın Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enzimi üzerine tilosin tartarat'ın etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,94	87
1,88	78
2,35	58
3,76	45
4,7	39

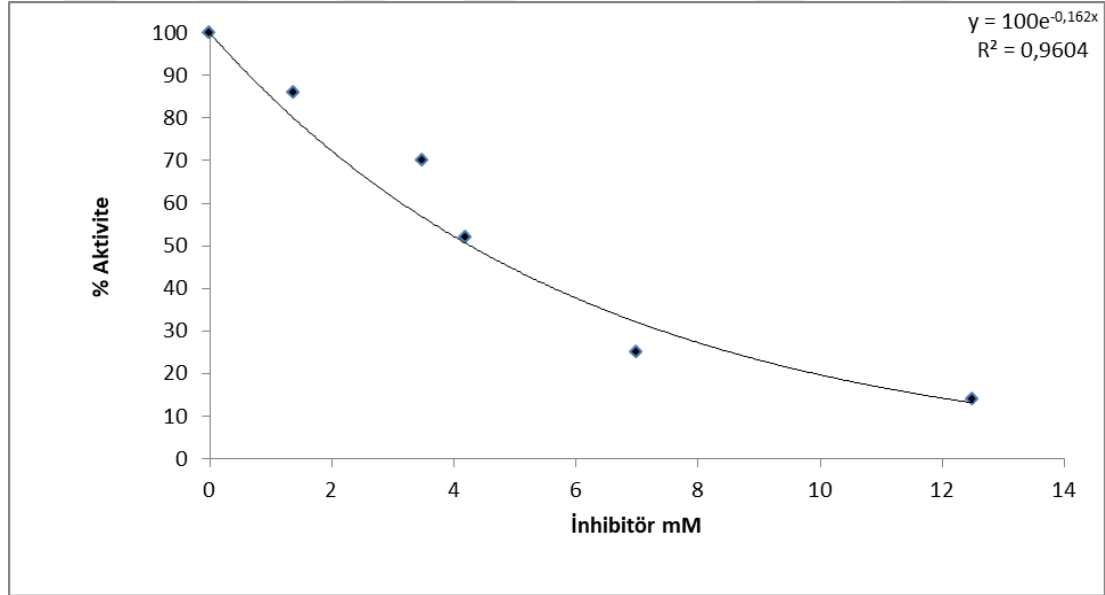


IC₅₀:3,5 mM

Grafik 4.60: Tilosin tartarat'ın kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi

Çizelge 4.50: Enrofloksasin'in Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enzimi üzerine enrofloksasin'nin Etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
1,39	86
3,5	70
4,2	52
7	25
12,5	14

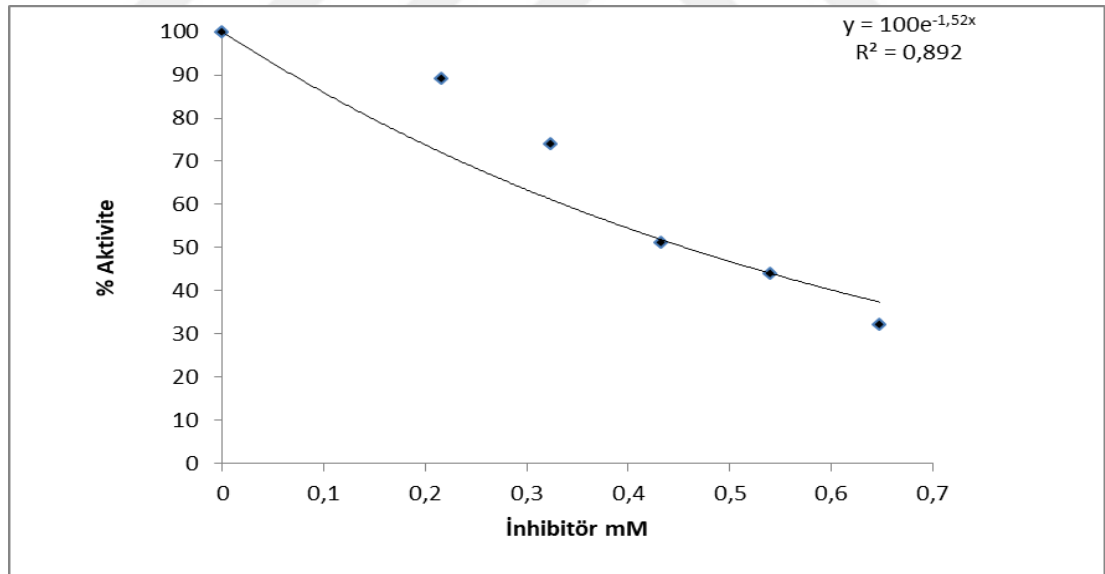


IC₅₀:4,3mM

Grafik 4.71: Enrofloksasin'in kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi

Çizelge 4.61: Doksisisiklin hiklat'ın Kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kaz karaciğerindeki GST enzimi üzerine doksisisiklin hiklat'ın Etkisi	
İnhibitör kons (mM)	% Aktivite
0	100
0,216	89
0,324	74
0,432	51
0,54	44
0,648	32



IC₅₀:0,46 mM

Grafik 4.82: Doksisisiklin hiklat'ın kaz karaciğerindeki GST enzim aktivitesinin üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nüfus popülasyonundaki yükseliş, kentleşmenin giderek artmasının yanında teknolojik gelişmelerle birlikte çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak ekosistemdeki canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Artan nüfusa karşılık endüstriyel tarım bir gereklilik haline gelmiştir. Bununla birlikte teknolojik gelişmeler, sanayileşme ve kentleşmede aynı şekilde vazgeçilmez unsurlar arasındaki yerini almıştır. Önemli olan nokta ise mevcut bu unsurları kullanırken doğaya ve canlı yaşamına verilen zararı minimuma indirebilmektir. Aksi halde doğadaki tüm canlıların sağlığını tehdit eden ve her geçen gün artan bir tehlikeyle karşı karşıya kalınması kaçınılmazdır.

Antioksidanların canlılardaki işlevleri çok önemlidir. GST ve glutatyon redüktaz (GR) antioksidan enzimleri ve çeşitli dokularda mevcuttur. GST izoenzimleri aynı anda çeşitli dokularda bulunur, dolayısıyla çok işlevli bir etkiye sahiptirler. GST'nin %10 nu oluşturan sitolojik proteinler, oksidatif işlev sağlarlar, ksenobiyotik ve toksik bileşiklerin konjugasyon reaksiyonlarını katalizler.

Böylece GST, oksidanlara karşı koruma sağlar ve bu bileşiklerin metabolizmasının oluşumunu kolaştırır. (Mazzetti, A.P ve ark. 2015, Türkan ve ark. 2018, Türkan ve ark. 2019).

Yaptığımız çalışmada canlıların sağlıklı bir hayat sürmeleri adına metabolizmada hayati fonksiyonu olan GST enziminin kaz karaciğeri dokusundan afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapılarak, bazı kinetik özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra metal iyonlarının ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda kaz çiftliğinden elde edilen karaciğer soğuk zincir şartları ile üniversite laboratuvarına getirilmiş küçük parçalara ayrılarak homojenizasyon yöntemlerinden en etkili olan sıvı azot ile parçalandı. Sonrasında ise gram başına 2ml tampon çözelti ilave edilip iyice karıştırıldı. Tülbent ile süzülüp kaba atıklar uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan homojenat 12500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj ile çöktürülen hücre atıkları atılarak elde edilen supernatant elde edildi.

Saflaştırma işlemi, Chun-hua Z. ve ark. (2013), Güvercin ve ark. (2008) ile Çomaklı (2011) uyguladığı aşamalara göre yapıldı. İlk olarak homojenat hazırlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından afinite kolonu hazırlandı. Kolon dengelendikten sonra supernatant yüklenmesiyle saflaştırma gerçekleştirildi. Enzime ait saflaştırma tablosu hazırlandı. Afinite kromatografisi kullanılarak GST'lerin saflaştırılması, saflaştırma süresinin kısa olması ve aktivite kaybını düşük seviyede tutması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu saflaştırma basamaklarının gerçekleştirilmesiyle, GST enzimi afinite kromatografisi ile %70,51 verimle, 0,121 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve 48,4 kat saflaştırıldı.

GST enzimi farklı kaynaklardan farklı yöntemler kullanılarak saflaştırılmıştır. 1986'da Loscalzo ve Freedman insan trombositinden GST enzimini saflaştırmışlardır. Söz konusu çalışmada CM-selüloz, Sephadex G-75, afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi gibi yöntemler kullanmışlardır. İzoelektrik pH'sı 4,6 ve molekül ağırlığı 48 kDa olarak bulunan enzimi 7,5 EÜ/mg spesifik aktiviteyle 1071,4 kat saflaştırmışlardır. Aynı çalışmada enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemiyle 25 kDa olarak bulunmuştur. GST enzimi *E. coli*'den Arca vd (1990) tarafından DEAE sephagel ve glutatyon agaroz afinite kolunu kullanılarak saflaştırılmıştır.

Huang ve ark. (2008) GST enzimini Asya bataklık yılan balığı (*monopterus albus*) solungacından başka bir afinite kolonu ile saflaştırmışlardır ve karakterize etmişlerdir. Enzimi 13,07 EÜ/mg spesifik aktivite ile %14 verim ile 300 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 26 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Enzimdeki optimum pH'sı 7,0-7,5 aralığında, optimum sıcaklığını ise 45°C belirlemişlerdir. Yapılan kinetik çalışmalarda da enzimin substratları olan GSH ile CDNB'nin K_m değerleri sırası ile 0,20mM ve 0,28mM' dir. V_{max} ise 7,57µmol/mg ve 15,68µmol/mg'dır.

Tak 2018 yılında yapmış olduğu yüksek lisans tezinde GST enzimini Broyler'in karaciğer dokusundan hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırmıştır. Bu nedenle hidrofobik bir jel sentezlemiştir (Tak, T 2018). Aksoy 2018 yılında yapmış olduğu yüksek lisans tezinde GST enzimini, Holştayn

karaciğerinden hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) ile saflaştırmıştır (Aksoy, A. S).

GST enziminin saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanılan glutatyon-agaroz afinite kolonu bu çalışmada kullanıldı. Saflaştırma süresinin kısa olması, saflaştırma sırasında enzimin aktivite kaybetmemesi, kolonun tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Çomaklı Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinden GST enzimini aynı yöntemle 16,54 EÜ/mg proteinin spesifik aktivitesi %59 verim ile 11026 kat saflaştırmıştır (Çomaklı 2011). Balcı 2015 yılında yapmış olduğu doktora tezinde yaban mersini meyvesinden GST enzimini saflaştırmıştır. Afinite ve jel filtrasyon kromatografileriyle ayrı ayrı saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Taysı 2018 yılında yapmış olduğu yüksek lisans tezinde GST enziminin bıldırcın karaciğerinden 15,86EÜ/mg protein spesifik aktivitesiyle %12,36 verim ile 46,1 kat saflaştırmıştır (Taysı, M. Ş. 2018). Zariç 2018 Van Gölünden temin edilen İnci Kefal Balığının solungacından GST enzimi glutatyon_agaroz afinite kromatografi yöntemi kullanılıp 11344,83EÜ/mg proteinin spesifik aktivitesini ve %82,25 verim ile 1543,51kat saflaştırmıştır (Zariç, Y 2018). Duran 2019 yılında yapmış olduğu yüksek lisans tez çalışmasında GST enziminin Siraz Balığının karaciğer dokusundan afinite kromatografisi yöntemiyle 36,1EÜ/mg proteinin spesifik aktivitesi ve %73,6 verimle 55,70kat saflaştırmıştır. Afinite kromatografisi ile Kaz karaciğerinden saflaştırdığımız GST enzimi %70,51 verimle 48,4 kat saflaştırılmıştır.

Kaz karaciğerinden saflaştırdığımız GST enzimi üzerine 5-7,5 aralığında KH_2PO_4 tamponu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin optimum pH'ı pH:7 olarak bulundu. Huang ve ark. (2008) Asya Bataklık Yılanbalığı (*monopterus albus*) solungacından saflaştırdıkları GST enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH'ı 7,0-7,5 civarında bulmuşlardır. Nil Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının solungacından saflaştırılan GST enzimin optimum pH'sını, Hamed ve ark. (2004) yılında 8,0 olarak belirlemişlerdir. Taysı 2018 yılında yaptığı yüksek lisans tezinde Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enzimin optimum pH'sını, Tris-HCl tamponu kullanarak 8,5 olarak bulmuştur. Balcı 2015 yılında yaptığı doktora tezinde Yaban mersini meyvesiden GST enzimini saflaştırmış ve enzimin optimum pH'sını

KH₂PO₄ tamponunda 7,2 olarak bulmuştur. 2018 yılında Khoshnaw tarafından yapılan yüksek lisans tezinde sıçan eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH potasyum fosfat tamponu pH=8 olarak bulunmuştur.

2021 yılında Ahmadi ve arkadaşları tarafından levkit balığından 2 tane GST isoformu klonlanıp, saflaştırıp ve karakterize edilmiştir, RkGSTA ve RkGSTM için optimum pH sırasıyla pH:9 ve pH:8,5 olarak bulunmuştur. Akkemik ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada hindi karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sı pH:7,3 olarak bulunmuştur. Çomaklı ve arkadaşları 2015 yılında Ağrı Balık Gölü alabalığının karaciğer ve solungaç dokularından GST enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Bu çalışmada solungaç ve karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimlerinin optimum pH'sını pH:7,5 olarak bulmuşlardır. Güven ve Soydan (2020) Eşkina balığının kas dokusundan saflaştırılan GST enzimiminin optimum pH'sını pH:7 olarak bulmuşlardır.

Kaz karaciğerinden saflaştırdığımız GST enziminin maksimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet optimum pH'da Fosfat tamponunda 100 mM olarak belirlenmiştir. Aynı enzimin optimum sıcaklığı 5 ile 50 °C aralığında 5 °C aralıklarla ölçüldü. Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C olarak bulundu. Enzimlerin aktiviteleri belirli bir sıcaklığa kadar genellikle artar ancak sıcaklık artırılmaya devam ettiğinde aktivite azalır hatta yüksek sıcaklıklarda enzimler denatüre olurlar. Yapılan çalışmalarda Huang ve ark. (2008) (*monopterus albus*) Asya Bataklik yılan balığı solungacından saflaştırdığı GST enziminin optimum sıcaklığını 35 °C, Çomaklı (2011) Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi için optimum sıcaklık 30°C olarak bulmuşlardır.

Taysı 2018 yılında yaptığı yüksek lisan tezinde Bildircin karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında; optimum sıcaklığı 55 °C optimum iyonik şiddeti Tris-HCl tamponu 1,4 M olarak bulmuştur. Balcı 2015 yılında yaptığı doktora tezinde Yaban mersini meyvesiden GST enzimini saflaştırmış ve enzimin optimum sıcaklığını 50 °C optimum iyonik şiddeti 1,0 M olarak bulmuştur. 2018 yılında Khoshnaw tarafından yapılan yüksek lisans tezinde sıçan eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddeti potasyum fosfat tamponunda 0,2 M; optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur.

2021 yılında Ahmadi ve arkadaşları tarafından levkit balığından 2 tane GST isoformu klonlanıp, saflaştırıp ve karakterize edilmiş olup, RkGSTA ve RkGSTM için optimum sıcaklık sırasıyla 35 °C ve 30 °C olarak bulunmuştur. Akkemik ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada hindi karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddeti 600mM optimum sıcaklığı 50oC olarak bulunmuştur. Çomaklı ve arkadaşları 2015 yılında Ağrı Balık Gölü alabalığının Karaciğer ve solungaç dokularından GST enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Bu çalışmada solungaç ve karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimlerinin optimum iyonik şiddetini sırasıyla 0.008M ve 0,1M olarak bulmuşlardır. Güven ve Soydan (2020) Eşkına balığının kas dokusundan saflaştırılan GST enzimiminin optimum iyonik şiddet 20mM olarak bulmuşlardır.

Literatür incelendiği zaman farklı kaynaklardan elde edilen GST enziminin molekül kütlesinin belirlenmesi amacıyla yapılmış pekçok çalışmanın olduğu görülecektir. Levkit balığından 2 tane GST isoformu klonlanıp, saflaştırıp ve karakterize edilmiş olup, RkGSTA ve RkGSTM için molekül ağırlığı sırasıyla 25 ve 24 kDa olarak bulunmuştur (Hamid 2021). Hindi karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE sonucu 26 kDa ve 24 kDa ağırlığında 2 bant bulmuşlardır. Sephadex G 100 jel fitrasyon kromatografisi ile enzimin molekül ağırlığını yaklaşık 53 kDa olarak bulmuşlardır (Akkemik ve ark 2012). Ağrı Balık Gölü alabalığının karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığı sırasıyla yaklaşık 27 ve 24,3 kDa bulunmuştur (Çomaklı ve ark. 2015). Örneğin; alabalık (gökkuşağı) karaciğeri GST enziminin molekül kütlesini 23 kDa ve homodimer şekilde tespit etmişlerdir. (Riol ve ark. 2001). Alabalık (gökkuşağı) eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE'yle yaklaşık olarak 23kDa, Jel filtrasyon kromatografisiyle ve yine yaklaşık olarak 47kDa bulmuşlardır. Enzimin homodimer olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada *E. coli*' den izole edilen GST enziminin molekül kütlesinin yaklaşık olarak 22,5 kDa olduğu bildirilmiştir. Literatürde yılan balığı karaciğerinden elde edilen GST enziminin molekül kütlesinin 22,3 kDa (homodimer) olduğu görülmüştür (Novoa ve ark. 2004). *Lactobacillus plantrum*'dan saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığı 25 kDa olarak SDS-PAGE de görülmüştür (Lamiaa A. ve ark. 2020).

Japon Bildircin karaciğerinden saflaştıran GST enziminin molekül ağırlığı 25,1 kDa olarak bulunmuştur (Taysı, M. Ş 2018). Van Gölü balığının karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE sonucunda 28 ile 33.8 kDa ağırlığında 2 bant bulunmuştur, enzimin tabii molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 62,35 kDa olarak belirlenmiştir (Özaslan, S 2014). Sıçan eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığı 25,2 kDa olarak hesaplanmıştır (Luqman Qader, A.K.2018). Sığır eritrositlerinden saflaştırılması glutatyon s-transferaz enziminin molekül ağırlığı 27 kDa olarak bulunmuştur (Güvercin 2006). Sıçan ince bağırsak glutatyon s-transferaz 2 izozimini saflaştırılmıştır, Alt birimlerin molekül ağırlığı 25 kDa (α izozimi) 24 kDa (π izozimi) olarak hesaplanmıştır (Tuna, G 2008). Sığır karaciğer dokusundan saflaştırılan glutatyon s-transferaz enziminin molekül ağırlığı 70-55 kDa aralığında olduğunu bulmuştur (Aksoy, A.S.2018). Broyler karaciğerinden saflaştırılan glutatyon s-transferaz enziminin molekül ağırlığı 35-40 kDa aralığında bulunmuştur (Tak, T 2018). GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerini belirlemek için denatüre edici faktörlerin ortamda bulunduğu SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Kaz karaciğerinden saflaştırdığımız GST enziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 23 kDa olarak bulundu.

Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi için GSH için K_m 0.259 mM V_{max} 0.0655 EU/mL CDNB için K_m 0.0395 mM V_{max} 0.0328 EU/mL olarak bulunmuştur (Çomaklı ve ark. 2013). Sığır eritrosit GST enziminin GSH ile CDNB için K_m ve V_{max} değeri sırası ile 0,423mM, 192EU/ml ve 0,186mM, 116EU/ml olarak bulunmuştur (Güvercin, S 2006). Van Gölü Balığı karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için K_m ile V_{max} değerleri CDNB'nin K_m değeri 0,891mM iken V_{max} ise 1,245EÜ/ml'dir. GSH'ın ise, K_m 'si 0,060mM iken V_{max} ise 0,562EÜ/ml olarak tespit edilmiştir (Özaslan, M.S. 2014). Yaban mersini meyvesinden Glutatyon S-transferaz enzimi için GSH'ın ve CDNB'nin sırası ile K_m değerleri 1,57mM; 0,17mM, V_{max} değerleri 0,048EÜ/mL, 0,0159EÜ/mL bulunmuştur (Balcı, N 2015). Sığır Karaciğer GST enzimindeki K_m ve V_{max} değerleri CDNB ve GSH substratları kullanılıp Linewear- Burk yöntemi ile bulunmuştur. Değerler ise GSH için sırası ile 1,11mM, 3,06EÜ/ mL; CDNB için 1,34mM, 1,89EÜ/ mL' olarak bulunmuştur (Aksoy, A.S.2018). Broyler karaciğerinden saflaştırılan glutatyon s-transferaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri K_m ve V_{max} değerleri GSH ve

CDNB için sırasıyla 0,97 mM, 1,36 EÜ/ml ve 8,77 mM, 1,36 EÜ/ml olarak belirlenmiştir (Tak, T 2018). Sıçan eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimine ait iki substrat olan GSH ve CDBN için K_m ve V_{max} değeri sırasıyla GSH için 1,22 mM ve 1,21 EÜ/ mL, CDBN için 0,374 mM ve 3,614 EÜ / mL olarak bulunmuştur (Luqman Qader, A.K. 2018). Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak GSH substratı için K_m , 0,114mM, V_{max} 0,672EÜ/mL; CDBN substratının ise K_m , 0,048mM, V_{max} , 0,047EÜ/mL olarak hesaplanmıştır (Taysı, M.Ş.2018). Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak GSH substratı için K_m , 1,34 mM, V_{max} 1,14EÜ/mL'dir. CDBN substratının ise K_m , 0,68mM, V_{max} , 0,5EÜ/ mL olarak hesaplandı.

Çalışmamızda bazı metallerin (Ag^{+2} , Hg^{+3} ve Fe^{+2}) inhibisyon etkileri incelendi. Kaz karaciğeri GST enzimi metal inhibitörlerinin IC_{50} değerlerini belirlemek amacıyla %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Metal iyonlarındaki IC_{50} değerleri sırası ile Hg^{+3} iyonunda 0,015 mM, Ag^{+2} iyonunda 0,2 mM ve Fe^{+2} iyonunda 0,288 mM olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi en kuvvetli inhibisyon gösteren metal iyonunun, IC_{50} değeri en küçük olan (0,015mM) Hg^{+3} iyonunun olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada Kaz karaciğeri dokusundan saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerine oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enroflaksasin ve doksisisiklin hiklat kimyasallarının *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enroflaksasin ve doksisisiklin hiklatın inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Kaz karaciğeri GST enzimi ilaç inhibitörlerinin IC_{50} değerlerini belirlemek amacıyla %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. İlaçların IC_{50} değerleri sırasıyla oksitetrasiklin HCl 0,046 mM tilosin tartarat 3,5mM, enroflaksasin için 4,3 mM, doksisisiklin hiklat için 0,46 mM olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi en kuvvetli inhibisyon gösteren kimyasalın, IC_{50} değeri en küçük olan (0,046 mM) oksitetrasiklin HCl olduğu tespit edilmiştir.

Farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimi üzerine metallerin inhibisyon etkilerinin literatürde birçok örneği bulunmaktadır. Van Gölü Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine gümüş (Ag^{+2}), krom (Cr^{+2}), bakır (Cu^{+2}), kadmiyum (Cd^{+2}), kobalt (Co^{+2}), demir (Fe^{+3}) ve çinko (Zn^{+2}) iyonlarının *invitro* etkileri araştırılmıştır. Metal iyonlarında IC_{50} değerleri sırası ile Ag^{+2} iyonunu 0,208 μM , Cu^{+2} iyonunu 0,163 mM, Cd^{+2} iyonunu 0,235 mM ve Co^{+2} iyonunu 0,446 mM değerini hesaplamışlardır (Özaslan, M.S. 2014). Balcı (2015) Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine Cd^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında $\text{Mg}^{+2} < \text{Cd}^{+2} < \text{Ca}^{+2} < \text{Ni}^{+2} < \text{Cu}^{+2}$ şeklinde olduğu görülmüştür. Araştırmacılar tarafından enzim aktivitesi üzerine metal iyonların inhibisyon etkileri sürekli incelenmektedir. Çomaklı ve ark. (2011) bazı metal iyonlarının alabalık (gökkuşuğu) eritrositleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Söz konusu iyonlarının IC_{50} değerleri sıralandığında $\text{Ag}^{+2} < \text{Cd}^{+2} < \text{Cr}^{+2} < \text{Mg}^{+2}$ şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bozkurt (2017) de yaptığı çalışmada farklı sığır ırklarından elde edilen sperm GST enzimleri üzerine ağır (Ag^{+2}), (Cd^{+2}), (Cu^{+2}), (Ca^{+2}), (Co^{+2}), (Mn^{+2}), (Fe^{+2}), (Pb^{+2}), (Hg^{+3}), (Zn^{+2}) ağır metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Akkemik ve ark. (2012) hindi karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cu^{+2} , Hg^{+3} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} ve Mn^{+2} metallerinin etkilerini incelemişlerdir. Ağrı Balık gölü alabalığı karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine metallerin etkileri incelenmiştir. Karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Hg^{+3} , Cu^{+2} , Se^{+4} , Al^{+3} metalleri inhibisyon etkisi gösterirken solungaç dokusundan saflaştırılan GST üzerine Hg^{+3} , Cu^{+2} , Se^{+4} metallerinin yanında Zn^{+2} metali inhibisyon etkisi gösterirken Al^{+3} metalinin inhibisyon etkisi görülmemiştir (Çomaklı et.al.2015). Güven ve Soydan (2020) Eşkina balığının kas dokusundan saflaştırılan GST enzimimi üzerine Cd^{+2} ,

Fe^{+2} , Ag^{+2} , Cu^{+2} metallerinin IC_{50} değerlerini sırasıyla 0.1112, 0.6113, 0.727 ve 0.7774 mM olarak bulmuşlardır.

Yapılan tez kapsamında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

1. Kaz karaciğer dokusundan GST enziminin saflaştırılması işlemi için afinite kromatografisi (glutatyon-agaroz) yöntemi kullanılmış ve enzim saf bir şekilde elde edilmiştir.

2. GST enzimi kaz karaciğer dokusundan 0,121 E/mg protein spesifik aktiviteyle, %70,51 verimle 48,4 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforez yapılarak kontrol edilmiştir ve enzime ait tek bant görülmüştür.

3. Karakterizasyon alışmaları yapılmış ve enzimin optimum pH değeri 7,0; optimum iyonik şiddet değeri 100 mM KH_2PO_4 ve optimum sıcaklığı ise 40 C olarak belirlenmiştir.

4. Kaz karaciğeri GST enzimi üzerine bazı kimyasalların (oksitetrasiklin HCl, tilosin tartarat, enroflaksasin ve doksisisiklin hiklat) ve metal iyonlarının (Hg^{+3} , Ag^{+2} ve Fe^{+2}) inhibisyon etkileri incelenmiştir.

5. IC_{50} değerleri yukarıda anılan kimyasallar ve metal iyonları için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu inhibitörlerin düşük dozlarda bile GST enzimini inhibe ettiği görülmüştür. GST enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda canlıların hayatlarında doğrudan veya dolaylı olarak tehlikeli sonuçlara neden olabilir. Bu tip çalışmalarda enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması önem arz etmektedir.

Özellikle evre kirliliğinde büyük bir paya sahip ağır metallerin ve tedavi amaçlı olarak kullanılan kimyasalların çok düşük dozlarda bile enzimi inhibe etmelerine dair elde edilen bulgulara bakıldığında yaptığımız çalışmanın literatüre önemli derecede katkı sağlayacağı görülmektedir. Ayrıca GST enzimi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Kazların su ihtiyaını karşılayan kaynakların ağır metal içeriği bakımından analiz edilmesi, hayvanların tedavisinde kullanılan kimyasalların doz içeriğine dikkat edilmesi gerekir.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir;

Çizelge 5.1: Kaz karaciğerindeki GST enziminin Karakterizasyon sonuçları

Çalışma Tipi	Sonuç
Optimum pH'ın hesaplanması	7.0
Optimum İyonik Şiddet'in hesaplanması	100 Mm KH ₂ PO ₄
Optimum Sıcaklık değerinin hesaplanması	40°C
Mol Kütlesi'nin bulunması	23 kDa
GSH'ın K _m değeri	1,34 mM
GSH'ın V _{max} değeri	1,14 EÜ/mL
CDNB'nin K _m değeri	0,68 mM
CDNB'nin V _{max} değeri	0,5 EÜ/mL

Çizelge 5.2: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine inhibisyon etkisi yapan metal iyonlarının IC₅₀ Değerleri

Metal	IC₅₀ (mM)
Hg ⁺³	0.015
Ag ⁺²	0,2
Fe ⁺²	0.288

Çizelge 5.3: Kaz karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine inhibisyon etkisi yapan kimyasalların IC₅₀ Değerleri

Kullanılan Kimyasallar	IC₅₀ (mM)
Oksitetrasiklin HCl	0,046
Doksisiklin hiklat	0,46
Tilosin tartarat	3,5
Enrofloksasin	4,3

KAYNAKÇA

- Açan L. 1990. Koyun beyini glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 100s
- Ahmadi, S., Ghafouri, H., Tarazi, S., Sarikhan, S., Saberi Kh., O.K. (2021). Cloning, Purification And Biochemical Characterization Of Two Glutathione S-Transferase Isoforms From Rutilus Frisii Kutum. Protein Expression And Purification, 179; 105-800.
- Akkemik, E., Taşer, P., Bayındır, A., Budak, H., Çiftçi, M., (2012). Purification And Characterization Of Glutathione S-Transferase From Turkey Liver And Inhibition Effects Of Some Metal İons On Enzyme Activity. Environmentaltoxicologyandpharmacology, 34;888–894.
- Aksoy, A.S. (2018). Bazı Flavonoidlerin Sığır Karaciğer Glutatyon S- Transferaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Aksoy, T., Arıkan, F. 1995. Tekirdağ bölgesinde yetiştirilen kazlarda kesim sonuçlarına ilişkin bir araştırma. Hayvancılık 96 Ulusal Kongresi, 18-20 Eylül, İzmir.
- Alcher, R.G., 1989. Biosynthesis And Antioxidant Function of Glutathione in Plants, Physiol, Plant, 77, 457-464.
- Aliya, S., Reddanna, P., Thyagaraju, K., 2003. Does Glutathione S-Transferase Pi (Gst-Pi) A Marker Protein For Cancer? Molecular And Cellular Biochemistry 253: 319–327
- Ann-Sofie, J., 2002. Exploring The Functional Plasticity Of Human Glutathione Transferases. Biyokimya Programı (Doktora Tezi) Acta Universitatus Upsaliensis, Uppsala, 1-56
- Anton, E.P., Johannes, B., Arne Vander G., Gerard J.M., 1990. The Glutathione-Binding Site İn Glutathione S-Transferases. Biochem, 265,47-54.
- Arca, P., Garcida, P., Hardisson, C. and Suarez, J.E., 1990. Purification and study of a bacteril glutathione S- transferase Area de Microbiologia, Faeultad de Medicina 1, 77-79.

- Asaoka, K., 1984. Affinity Purification and Characterization of Glutathione S-Transferases from Bovine Liver. *J. Biochem.*, 95, 685-696.
- Autrup, H., 2000. Genetic Polymorphism İn Human Xenobiotica Matebolizing Enzymes As Susceptibility Factors İn Toxic Response. *Mutation Research*, 464,65-76.
- Awasthi, Y.C., Dao, D.D., Saneto, R.P., 1980. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem J* 191: 1-10
- Balcı, N. 2015. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Doktora Tezi Yaban Mersin'i Meyvesinden (*Vaccinium Arctostaphylos* L.) Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Mersin.
- Barcena, J. A. E., Martinez-Lara, S. G., George, J. Lopez-Barea. 1997. Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver. *CMLS, Cell. Mol. Life sci.*, 53, 759–768.
- Baş, O., 2006. Dinitroresol'ün (Rat *Rattus Norvegicus*) Sıçan Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.
- Blokhina, O., Virolinen, E. and Fagerstedt, Kv., 2002. Antioxidants, Oxidative Damage And Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals Of Botany* 91: 179-194
- Booth, J., Boyland, E. And Sims, P., 1961. *Biochem. J.*, 79, 516-524.
- Boyer, T.D., 1989. The Glutathione S-Transferases: An Update *Hepatology*, 9(3),486-96.
- Boz, M.A., Sarıca, M., Yamak, U.S. 2014. Yozgat İlinde kaz yetiştiriciliği. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 11(1): 16-20.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-251
- Carver, D.G., Hines, R.N., 2002. The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms. *The*

- American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET 300: 361-366
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200, 29-38.
- Chen, E.-H., Dou, W., Hu, F., Tang, S., Zhao, M., Wang, J.J., 2012. Purification and Biochemical Characterization of Glutathione S-Transferases in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 95(3), 593-601.
- Cho, M. K., Kim S.G., 2000. Induction Of Class Alfa Gst By 4-Methylthiozale In Rat Liver: Role Of Oxidative Stress. *Toxicol Lett.* 115, 107-115.
- Chun-Hua Z., W. Ze-Ying, J., Ting, G., 2013. Purification And Identification Of Glutathione S-Transferase In Rice Root Under Cadmium Stress. *Ying, Rice Science*, 20(3), 173-178.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J., 2001. The Interplay Of Glutathione-Related Processes In Antioxidant Defense. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Combes, B. And Stakelum, G.S., 1961. *J. Clin. Invest.*, 40, 981-988.
- Coşkun, G., 2007. Glutathione-S-transferase enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Cywa- Benko, K., Wezyk, S., Krawczyk, J., Knapik, J., Bielinska, H., Rosinski, A. 1999. The possibility of using Usg technique for muscle and fatness testing in geese. 12th European Symposium on Waterfowl, Adana, Turkey.
- Çelik, B. Bozkurt, Z., 2009. Muş yöresi yerli kazlarında kesim ve karkas özellikleri. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 49: 37-46.
- Çelik, V.K., Armutcu, F., Aker, A., 2003. Human Placental Glutathione-S-Transferase: Isolation, Kinetic Properties and in vitro Interactions with Several Drugs. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 25(4), 187-192.
- Çomaklı, V., 2011. Glutathione S-Transferase Enziminin Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve

- Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. (Doktora Tezi) Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant Glutathione S-Transferases. *Genome Biology*, 3(3) Reviews 3004.1-3004.10.
- Demirdağ, R., Yerlikaya, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T. 2013. Heavy metal ion inhibition studies of human, sheep and fish α -carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28-2, 278-282.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry With Clinical Correlations*. Kanada.
- Drog, F., 1997. Plant Glutathione S-Transferases, A Tale Of Theta And Tau. *J. Plant Growth Regul*, 16, 95-107.
- Duran, G. (2019). Siraz (*Capoeta Umbla*)'ın Karaciğer Dokusundan Glutatyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ağrı.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci. Jun*; 49 (Suppl 2),156-64.
- Erat, M. and Şakiroğlu, H., 2013. The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28(4): 711-6
- Espinoza, H. M., C. R. Williams, And E. P. Gallagher. 2012. Effect Of Cadmium On Glutathione S-Transferase And Metallothionein Gene Expression İn Coho Salmon Liver, Gill And Olfactory Tissues. *Aquatic Toxicology* 110–111: 37–44.
- Fleischn, Gk., Kamisaka, Im., Arias, 1976. Immunoloanalysis Of Rats And Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism And Function*, 229.
- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., Di Biasio, P. ve Focardi, S.E., 2012. “Hexavalent Chromium Reduction By Whole Cells And Cell Free Extract Of The Moderate Halophilic Bacterial Strain *Halomonas Sp.* Ta-04,” *Int. Biodeter. Biodegr.*, 66, 63-70.

- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49, 27– 7.
- Geçkil, H., 2012. *Biyokimya I. İnönü Üniversitesi*, 137.
- Gözükara, E., 1989. *Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti*, ss.572-576, Ankara.
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul*, 1225.
- Gürdöl, F. ve Âdemoğlu E., 2010. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri 2.Baskı, İstanbul*.
- Güven, N. and Soydan, E., 2020. Characterization Of Glutathione S-Transferase Enzyme From Brown Meagre (*Sciaena Umbra*) And İnhibitory Effects Of Heavy Metals. 2020 International Union Of Biochemistry And Molecular Biology, Inc. Volume 00, Number 0, Pages1–4.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination Of Some Kinetic And Characteristic Properties Of Glutathione S-Transferase From Bovine Erythrocytes. *Protein & Peptideletters*15(1)6-12.
- Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., 2004. İnhibition Of Glutathionestransferases By Thonningianin A, İsolated From The African Medicinal Herb, Thonningia Sanguinea, İn Vitro. *Food And Chemical Toxicology*, 42, (9) 1401-1418.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G., 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326, 131-142
- Habig, W. H., Pabst, M. J and Jacoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*, 249:7130-7139.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M. And.Guinidi, R.A.M., 2004. Glutathione And Its Related Enzymes İn The Nile Fish. *Fish Physiology And Biochemistry*, 30, (3-4) 189-199.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 45, 51-88.

- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation Of Gst And The Contribution Of The Isoenzymes To Cancer Chemoprotection And Drug Resistance. *Crc Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600.
- Howie, Af., Hoyes, Jd., Beckett, Gj., 1988. Purification Of Acidic Glutathione Stransferase From Human Lung, Placenta And Erythrocyte And The Development Of A Specific Radioimmunoassay For Their Mesaurment. *Clinica Chimica Acta* 177: 65-76
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q.Y., 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 147, 96-100.
- Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Maksymiv, I.V., Storey, J.M., Storey, K.B. and Lushchak. V.I. 2016. Oxidative Stress Responses In Gills Of Goldfish, *Carassius Auratus*, Exposed To The Metribuzin-Containing Herbicide Sencor. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 45: 163-169.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K., Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, Nov, 6039-6042
- Josephy, P.D., 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology, *Hum. Genomics Proteomics* 876940.
- Kanat, N. ve Coşansu Akdemir, S., 2014. Bakterilerde Glutasyon ve Önemi, Sakarya Üniversitesi, Pamukova Meslek Yüksekokulu, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Saü. Fen Bil. Der. 18. Cilt, 2. Sayı, s.111-117.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Sirkeci/İstanbul.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2015. *Biyokimya*. Aktif Yayınları, Erzurum.
- Kırmızıbayrak, T. 2001. Kars ilinde kaz yetiştiriciliği ve ekonomik önemi. *Çiftlik Derg.*, 206: 62-64.
- Kidd, P.M., 1999. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative And Free Radical Damage. *Ph.D. Alternative Medicine Review*.
- Koolman, J. and Röhm, K.H., 2003. *Renkli Biyokimya Atlası*. Tavaslı Matbacılık Savaş Ciltevi, İstanbul, 122

- Kosower, E.M., 1976. Chemical Properties Of Glutathione. In *Glutathione Metabolism And Function*, Ed.
- Labatut, M.C. 2002. Goose production in Chile and South America. Eds: Buckland R and Guy G: *Goose Production*. FAO Animal Production and Health paper No: 154, Rome, Italy.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Lajmanovich, R.C., Andre's, M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M.,
- Lamiaa, A. Al-Madboly, Safaa M. Ali, Esmail M. El Fakharany, Amany E. Ragab, Eman G. Khedr And Khaled M. Elokely., (2020). Stress-Based Production, And Characterization Of Glutathione Peroxidase And Glutathione S-Transferase Enzymes From *Lactobacillus Plantarum*. *Frotiers In Bioengineering And Biotechnology*. Published: 27 February.
- Lehninger, Principles Of Biochemistry, 2005. Worth Publishers Inc., New York, 1152 p.
- Liebman, Jf ve Greenberg, A., 1988. Mechanistic Principles Of Enzyme Activity Vch Publishers, New York.
- Lo Bello, M., Oakley, A. J., Battisiti A., Mazzetti A.P., Nuccetelli M., Mazzaresse G., Rossjohn J., Parker M. W., Ricci G., 1997. Multifunctional Role of Tyr 108 in the Catalytic Mechanism of Human Glutathione Transferase P1–1. *Crysallographic and Kinetic Studies on the Y108F Mutant Enzyme*. *Biochem. (U.S.)*, 36 (20), 6207–17.
- Loscalzo, J., Freedman, J., 1986. Purification And Characterization Of Human Platelet Glutathione-S Transferase By Guest On 67: 1595-1599
- Luqman Qader Ahmed Khoshnaw (2018). Master's Thesis Purification, Characterization And Investigation The Effect Of Some Drugs On Glutathione S-Transferase (Gst) Enzyme From Rat Erythrocyte Republic Of Turkey Bingöl University Institute Of Science.
- Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JI., 2008., A Novel Approach To Enhancing Cellular Glutathione Levels. *J Neurochem*; 107: 690-700.
- Mazzetti, A.P., Piorile, M.C., Primavera, A., Lo Bello, M., (2015). Glutathione Transferases And Neurodegenerative Diseases, *Neurochem. Int.* 82; 10–18

- Nicholls, F.A. and Ahokas, J.T., 1984. Inhibition of purified glutathione S-transferases by indomethacin. *Biochem Biophys Res Commun*, 119, 1034-8.
- Nishihira, J., Sakai, S. M., Nishi, Hatanaka, Y., 1995. Identification Of The Elecktrophilic Substrate-Binding Site Of Glutathione S-Transferase P By Photoaffinity Labelling. *Eur. J. Biochem.* 232(1), 106-10.
- Nobel Lecture, 1907. James Eat The Right Time? From The Nobel Lecture (1974) G.E. Palade Act [İng] As The Overseers”- Nobel Lecture.
- Novoa-Valinas, M.C., Perez-Lopez, M., Melgar, M.J., 2002. Compparative Study Of The Prufication And Characterization Of The Cytosolic Glutathione S-Transferase From Two Salmonid Species: Atlantic Salmon (*Salmo Solar*) And Brown Trout (*Salmo Trutta*) *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C* 131, 207-213.
- Oakley, A., “Glutathione transferases: a structural perspective”, *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151, (2011).
- Onat, T., 1996. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T Ed. *Temel Biyokimya* Izmir, Saray Medikal Yayıncılık, 865-879
- Orhan, H., 1994. Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi. *Ankara Bilim Uzmanlığı Tezi*. Ankara.
- Özaslan M.S., 2014. Glutatyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü Balığı (*Chalcalburnustarichipallas*) Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özeriş, S., 1993. *Temel Organik Kimya*. İstanbul.
- Piner, P., 2005. Fenthion İçeren Ortamda Bso ve Nac'nin *Oreochromis Niloticus*'da Beyin Dokusunda Glutatyon Metabolizması, Lipid Peroksidasyonu ve Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G. And López, M.P., 2001. Glutathione S-Transferases From Rainbow Trout Liver And Freshly İsolated

- Hepatocytes: Purification And Characterization. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 128, (2) P: 227-235
- Rowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B.T., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D., 2001. Mammalian class sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. Biochem J., 359, 507- 516.
- Safarinejad, M., 2010. Hosseini SY Safety and efficacy of citalopram in the treatment of premature ejaculation: a double-blind placebo. Controlled, fixed dose, randomized study. IntJImpotRes 2006;18: 164-169
- Schröder, P., 2001. The Role Of Glutathione And Glutathione S- Transferases in Plant Reaction And Adaption To Xenobiotics, Significance Of Glutathione To Plant Adaptation To The Environment Plant Ecophysiology, 2, 155-183.
- Seema, D., Sharma, R., Sharma, A., Zimniak, P., Ceci, Jd., Awasthi, Yc., Boor. Pj., (2006. The Course Of Ccl₄ Induced Hepatotoxicity Is Altered In Mgsta4-4 Null (-/-) Mice. Toxicology; 218(1) 58-66
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Seidegard, J. and Ekström, G., 1997. The Role Of Human Glutathione-S-Transferases And Epoxide Hydrolases In The Metabolism Of Xenobiotics. Environmental Health Perspectives 105: 791-799.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, Vm., Dowd, Ca., 2001. Structure, Function And Evolution Of Glutathione Transferases: Implications For Classification Of Nonmammalianmembers Of An Ancient Enzyme Superfamily. Biochem J 360, 116
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus Mykiss*) Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Erzurum.
- Tak, T. (2018). Broyler Karaciğerinden Saflaştırılan Glutasyon S-Transferaz Enzimi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

- Taşkın, A., Karadavut, U., Camcı, Ö. 2017. Kırşehir ilindeki damızlık kaz yetiştiriciliğini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 4(2): 138-144.
- Taysı, M.Ş. (2018). Japon Bildırcın (*Coturnix coturnix japonica*) Karaciğerinden Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Bingöl.
- Toribio, F., E. Mart'inez-Lara, P. Pascua, and J. L'opez-Barea. 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. Journal of Chromatography B 684:77–97
- Trevor, P., 1994. Enzim Bilgisi. Bilim ve Teknoloji Yayınları Çeviri Vakfı.
- Tuna, G. 2008. Sıçan İnce Bağırsak Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması ve İzozimlerinin Hiperisin Bileşiğı ile Bağlanma Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, H.Ü.B.A.B. 06. D06. 101. 1001
- Türkan, F., Huyut, Z., Huyut, M.T., Calımlı, M.H., (2019). In Vivo Biochemical Evaluations Of Some B-Lactam Group Antibiotics On Glutathione Reductase And Glutathione S- Transferase Enzyme Activities. Life Sciences, 231; 116-572.
- Van Vleet, T.R., Schnellmann, 2003. Toxic Nephropathy: Environmental Chemicals. Seminars İn Nephrology, 23: 500-508.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 16, 153–158
- Voet, D. and Voet, J.G., 1995. Biochemistry, (Second Edition), New York, p.346-350.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W. 1994. Structure And Function Of Glutathiones-Transferases, Biochim. Biophys. Acta. 1205: 1-18.
- Wu, C. Mathews, K.P., 1983. Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases. Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 980-985.
- Yalçın, A., 1998. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 11: 342-346

- Yazkan M., Özdemir., F. Gölükçü, M., 2004. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacean in the Gulf of Antalya. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 95-100.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., 2010. Moleküler Biyoloji. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.
- Yu, S.J., 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pestic Biochem. Physiol. 80, 113–122.
- Zariç, Y., 2018. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü İnci Kefali Balığı (*chalcaburnus Tarichi*) Solungacından Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Metal ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi Biyokimya Anabilim Dalı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı.
- Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C. and Xue, Y.Q. 2005. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-Dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19: 185-190.

