



**İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi*) BALIĞI BÖBREK DOKUSUNDAN GLUTATYON S-
TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

AYŞE YILMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Veysel ÇOMAKLI
AĞRI-2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI

AYŞE YILMAZ

**İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi*) BALIĞI BÖBREK
DOKUSUNDAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

AĞRI-2019



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

İNÇİ KEFALİ (*CHALCALBURNUS TARİCHİ*) BALIĞI BÖBREK DOKUSUNDAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI danışmanlığında, Ayşe YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 24/06/2019 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliğı~~ / ~~oy~~ ~~çokluğ~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

ye : Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

İmza :

ye : Dr. Öğr. Üye. Emrah YERLİKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 22/06/2019 tarih ve 19. 29-3 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başıka kaynaklardan yapılan bildirış, izelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans tezi

**İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi*) BALIĞI BÖBREK DOKUSUNDAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN**

İNCELENMESİ

Ayşe YILMAZ

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Veysel ÇOMAKLI

Bu çalışmada, İnci Kefali (*Chalcalburnustarichi*) böbrek dokusundan GST (EC.2.5.1.18) enzimi saflaştırıldı. Saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerindeki yüksek toksisiteli metil cıva, bazı ağır metal iyonları ve pestisitlerin etkileri incelendi. Saflaştırma işlemi, homojenat hazırlanması ve Glutatyon-Agaroz afinite kromatografisi olmak üzere iki safhada gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi Awasthi yöntemine göre 340 nm'de absorbans artışına göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim, %89'luk bir verim ile 335 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapıldı. Saflaştırılan enzimin her bir subsrat için K_M ve V_{max} değerleri çalışıldı. GSH subsratı için K_M : 0,276 mM, V_{max} ise 0,161 EÜ/ml olarak CDNB substratı için K_m : 0,429mM, CDNB V_{max} ise 0,207 EÜ/ml olarak belirlendi. Enzim aktivitesine etki eden Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Metil cıva, atrazine, diniconazole ve methomyl IC_{50} değerleri sırasıyla 2,4 μ M-1,5 μ M-0,15 mM-10 μ M-63 μ M-34,5 mM, 9,8 μ M-1,3 μ M-2,67 μ M olarak bulundu.

2019, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-transferaz, Ağır Metal, Saflaştırma, İnhibisyon

ABSTRACT

Master's thesis

**THE INVESTIGATION OF GLUTATHETIC S-TRANSFERASE ENZYME
AND THE EFFECTS OF SOME CHEMICALS ON ENZYME ACTIVITY OF
PEARL MULLET(*Chalcalburnus tarichi*)**

Ayşe YILMAZ

AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTİ

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMİSTRY

Supervisor: Assoc. Dr. Veysel ÇOMAKLI

In this study, GST (EC.2.5.1.18) enzyme was purified from Pearl Mullet (*Chalcalburnustarichi*) kidney tissue. Effects of high toxicity methyl mercury, some heavy metal ions and pesticides on purified GST enzyme activity were investigated. Purification was carried out in two stages: homogenate preparation and Glutathione-Agarose affinity chromatography. Enzyme activity was measured spectrophotometrically monitoring the increase in absorbance at 340 nm according to Awasthi method. The enzyme was purified 335-fold in a 89% yield. SDS-PAGE was performed to check the purity of the enzyme. K_m and V_{max} values for each substrate of the purified enzyme were studied. For GSH substrate, K_M : 0.276 mM, V_{max} was determined as 0.161 EU / ml, for CDNB substrate, K_M : 0.429 mM, CDNB V_{max} was determined as 0.207 EU / ml. The IC_{50} values of Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , methyl mercury, atrazine, diniconazole and methomyl that affect enzyme activity are 2,4 μ M-1,5 μ M-0,15 mM-10 μ M-63 μ M-34,5 mM- 9,8 μ M-1,3 μ M- 2,67 μ M respectively.

2019, 78 pages

Keywords: Glutathione S-transferase; heavy metal; purification; inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için bana her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında maddi ve manevi yardımları ile bana yardımcı olan hocalarım Sayın Doç. Dr. Kani ZİLBEYAZ, Sayın Doç. Dr.Murat ŞENTÜRK, Doç. Dr.Murat GÜNEY ve değerli aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayşe YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELERDİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Enzim İnhibisyonu.....	2
1.3. Enzim Aktivlik Birimleri.....	3
1.4. Glutasyon (GSH).....	4
1.5. Detoksifikaasyon.....	5
1.6. Glutasyon S-Transferaz	7
1.7. Ağır Metaller.....	11
1.8. Pestisitler.....	15
1.9. İnci Kefali.....	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
3. MATERYAL ve METOD.....	31
3.1. Materyaller.....	31
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	31
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	32

3.1.3.a. GST Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.1.3.b. Homojenatın Hazırlanması İçin Kullanılan Çözelti.....	32
3.1.3.c. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.1.4. Protein Tayininde (Bradford yöntemiyle) Kullanılan Çözelti.....	33
3.1.5. Elektroforezde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Aktivite Tayini.....	35
3.2.2. Protein Tayini.....	36
3.2.2.a. Kalitatif Protein Tayini.....	36
3.2.2.b. Bradford Yöntemi İle Protein Tayini.....	36
3.2.3. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan GST Enziminin Saflaştırılması.....	37
3.2.3.a. Homojenatın Hazırlanması.....	37
3.2.3.b. Afinite Jelinin Hazırlanması.....	37
3.2.3.c. Enzimin Glutasyon Agaroza Kolonu İle Saflaştırılması.....	38
3.2.4. SDS-PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	38
3.2.5. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışması (Molekül Ağırlığının SDS-PAGE İle Tayini).....	39
3.2.6. Kinetik Çalışmalar.....	40
3.2.7. Kimyasalların <i>İn Vitro</i> Etkileri.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	41
4.2. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan GST Enziminin Saflaştırılmasının Sonuçları.....	42
4.2.1. Afinite Kromatografisi Sonuçları.....	42

4.3. SDS-PAGE ile GST Enziminin Saflığının Kontrolü.....	42
4.4. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları (SDS-PAGE İle Molekül Ağırlığının Belirlenmesi)	43
4.5. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin GSH ve CDNB Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar.....	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDNB	1-Kloro,2,4-Dinitrobenzen
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ES	Enzim substrat kompleksi
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
MAPEG	Glutasyon metabolizmasında membrana bağlı proteinler
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
RNA	Ribonükleik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
K_M	Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonu
V_{max}	Maksimum hız
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitor konsantrasyonu
MDA	Malondialdehit
ROS	Serbest oksijen radikalleri
EPA	Çevre koruma ajansı
RUP	Sınırlı kullanım pestisiti
TSE	Türk standartları enstitüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. GSH'ın moleküler yapısı	4
Şekil 1.2. GST enziminin 3-D yapısı	8
Şekil 1.3. GST enzimlerinin katalizlediği konjugasyon reaksiyonu.....	9
Şekil 1.4. Atrazine molekül yapısı.....	17
Şekil 1.5. Methomyl molekül yapısı	18
Şekil 1.6. Diniconazole molekül yapısı	18
Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.	43
Şekil 4.3. SDS-PAGE sonucu çizilen R_f -log M_A grafiği	44
Şekil 4.4. GST enzimi ile 0,5mM sabit GSH konsantrasyonunda CDNB için K_m ve V_{max} değerlerinin grafiği.....	45
Şekil 4.5. GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (mM) GSH için K_m ve V_{max} değerlerinin grafiği.....	45
Şekil 4.6. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Demir(Fe^{+3}) metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafiği.....	47
Şekil 4.7. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine krom(Cr^{+3}) metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	48
Şekil 4.8. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Çinko (Zn^{+2}) metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	49
Şekil 4.9. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Bakır Cu^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	50
Şekil 4.10. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Magnezyum (Mg^{+2}) metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafiki.....	51
Şekil 4.11. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Metil Cıvanın inhibisyon etkisini gösteren grafiği.....	52
Şekil 4.12. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Methomyl pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafik	53
Şekil 4.13. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Atrazine pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafiki	54

Şekil 4.14. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Diniconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafik	55
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan aletler ve cihazlar	31
Çizelge 3.2. GST enziminin aktivitesini ölçümünde kullanılan prosedür	35
Çizelge 4.1. İnci kefali balığının böbrek dokusundan GST saflaştırma sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. İnci Kefali alabalık böbrek dokusu GST enziminin GSH ile CDNB substratları için Km ve Vmax değerlerinin kinetik çalışmaları	46
Çizelge 4.3. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Demir(Fe^{+3}) metal iyonunun inhibisyon etkisi	47
Çizelge 4.4. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine krom Cr^{+3} metal iyonunun inhibisyon etkisi	48
Çizelge 4.5. İnci kefali balığının böbrek dokusundan GST enzimi üzerine Çinko Zn^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisi	49
Çizelge 4.6. İnci Kefali alabalık böbrek dokusu GST enzimi üzerine Bakır Cu^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisi	50
Çizelge 4.7. Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Magnezyum (Mg^{+2}) metal iyonunun inhibisyon etkisi	51
Çizelge 4.9. İnci kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Metil Cıvanın inhibisyon etkisi	52
Çizelge 4.10. İnci Kefali alabalık böbrek dokusu GST enzimi üzerine Methomyl pestisitinin inhibisyon etkisi	53
Çizelge 4.11. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Atrazine pestisitinin inhibisyon etkisi.....	54
Çizelge 4.12. Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Diniconazole pestisitinin inhibisyon etkisi	55
Çizelge 4.13. GST enzimi için metal iyonları ve pestisit inhibitörlerine ait IC_{50} değerleri	56

GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler canlıda meydana gelen biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki maddelerdir. Tüm enzimler protein yapısındadırlar sadece küçük bir grup olan katalitik RNA molekülleri protein yapısında değildirler. Protein yapısında oldukları için proteinlerdeki aminoasitlerin dizilimi, enzimlerin belirli bir konformasyon almalarında ve üç boyutlu şekilde bulunmalarında önemli bir role sahiptirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Protein yapısında olan enzimlerin bir çoğunun katalik olarak aktif olmaları kofaktör adı verilen metal iyonları ve organik moleküller tarafından sağlanır. Aktivitesi için bir kofaktöre ihtiyaç duyan enzimden bu grubun ayrılmasıyla oluşan yapıya apoenzim denir. Kofaktörüyle bulunan enzime ise holoenzim adı verilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Katalitik güçleri oldukça yüksek olan enzimlerin etki ettikleri maddelere substrat adı verilmektedir. Enzimler substratlarına etki ederek %100 verimle ve yan ürün oluşturmada reaksiyonları gerçekleştirirler. Enzimin **aktif merkez** denilen özel bir bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeye enzimin etki ettiği bileşik bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar burada gerçekleşir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Aynı canlı türünde aynı tepkimeyi katalizleyen ancak amino asit dizileri, optimal pH'leri, kinetik özellikleri gibi kimyasal ve fiziksel özellikler bakımından farklı olan enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, inhibitörlerine ve kofaktörlerine ilgileri farklıdır. Bu tez kapsamında çalışılan Glutatyon S-transferaz enzimin GST alfa(α), sigma(σ), mü(μ), pi(π), zeta(ζ), teta (Θ), kapa(κ) ve omega(ω) olarak 8 alt sınıfı bunların da kendi içlerinde birçok izoenzimi tespit edilmiştir (Strange *et al.* 2001).

Enzimler, ilk zamanlarda katalitik etkilerini üzerlerinde gösterdikleri ve "substrat" adı verilen bileşiklerin adlarının sonuna, "az" eki getirilerek belirlenebiliyordu. Yeni enzimlerin keşfedilmesi bilim insanlarının enzimlerin adlandırılmasında enzimlerin katalizledikleri reaksiyon türleri dikkate alınarak yeni bir adlandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Sistematik adlandırmaya göre tepkimeler ve onları katalize eden enzimler 6 grup olarak ayrılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler katalizledikleri tepkime türlerine göre 6 grupta incelenirler.

1. Oksidoredüktazlar; Oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri, yani yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalize eden enzim grubudur. Polifenol oksidaz, laktat dehidrojenaz enzimleri bu gruba örnek verilebilir.

2. Transferazlar; Bir atomun ya da atom grubunun bir molekülden başka bir molaküle ya da molakül grubuna aktarılmasını sağlayan enzim grubudur. Glutatyon S- transferaz buna örnek verilebilir.

3. Hidrolazlar; Bağların, su katılarak koparıldığı enzimlerdir. Karbonhidrazlar, proteazlar ve lipazlar örnek verilebilir.

4. Liyazlar; Oksidasyon ve hidroliz dışındaki başka yollarla bağları koparan veya oluşturan enzimler grubudur. Sitrat sentaz, piruvat dekarboksilaz ve adenilat siklaz enzimleri bu gruba örnektir.

5. İzomerazlar; Molekül içerisinde değişiklik yaparak molekülün optik, geometrik veya yapısal izomerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Glukoz-6-fosfat izomeraz, triozfosfat izomeraz enzimleri örnek verilebilir.

6. Ligazlar ve Kinazlar; İki molekülün birbirine bağlarken enerji kullanan enzim grubudur. DNA ligaz buna örnektir.

1.2. Enzim İnhibisyonu

Bazı bileşik ve kimyasalların enzim aktivitelerini “*in vivo*” veya “*in vitro*” olarak azaltmaları ve hatta yok etmeleri olayına “inhibisyon” denir. İnhibisyona neden olan bileşikler de “inhibitör” olarak adlandırılır. İnhibitörler, enzim-substrat (ES) kompleksinin normal şekilde oluşmasına engelleyerek reaksiyon hızının

azalmasına neden olurlar. İnhibisyon çalışmasıyla enzimin substrat spesifikliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı, aktif merkezde rol alan fonksiyonel gruplar ve enzimatik reaksiyonların kinetik mekanizmaları hakkında bilgi edinilebilir. 2 tip inhibisyon vardır;

Tersinmez (irreversible) inhibisyon: İnhibitor, aktif merkeze kovalent bağlarla bağlanarak enzimi inaktif eder.

Tersinir (reversible) inhibisyon: 3 çeşittir; Yarışmalı (competitive) inhibisyon, Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon ve Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon

a) Yarışmalı (competitive) inhibisyon: İnhibitor (I), molekül yapısı bakımından substrata (S) benzer ve enzimin aktif merkezine, substratın bağlanmasını engelleyecek şekilde bağlanarak, enzim-inhibitor (EI) kompleksini oluşturur. EI kompleksi ürüne dönüşemeyeceği için enzimin aktivitesini azaltır. Ortamdaki substrat konsantrasyonunun arttırılması ile enzimin inhibitöre olan ilgisi azaltılarak inhibisyon ortadan kaldırılabilir. Böylece V_{max} değişmezken K_M artar

b) Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon: İnhibitörün direkt enzime değil de ES kompleksine bağlandığı inhibisyon tipidir. Bu tip inhibisyonda kompleksin yapısı bozulur ve ürün meydana gelmez. İnhibitör, serbest haldeki enzime veya ES kompleksine bağlanarak reaksiyonu yavaşlatır.

c) Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon: Bu tür inhibisyonda inhibitor ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığı için inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan etkilenmez, bu nedenle enzimin V_{max} değeri azalırken K_m değerinde bir değişim olmaz.

1.3. Enzim Aktivite Birimleri

Enzimler biyolojik ortamda çok az bulunurlar ve miktarının ölçümü oldukça zordur. Ancak optimum şartlarda katalizledikleri reaksiyon hızları ölçülerek tayin edilebilir. Genellikle ortamda enzime yetecek kadar substrat bulunduğu için, substratın azalma miktarını ölçmek zordur. Bunun yerine oluşan maddenin harcanma veya oluşma hızının ölçülmesi tercih edilir. Optimum şartlarda birim zamanda, belirli miktardaki substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına **enzim aktivitesi** denir.

Enzim aktivitelerini ifade etmede kullanılan birimlerden bazıları şunlardır;

Enzim ünitesi: 25 °C de, optimum şartlarda altında, 1 dakika sürede, 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. U ile gösterilir.

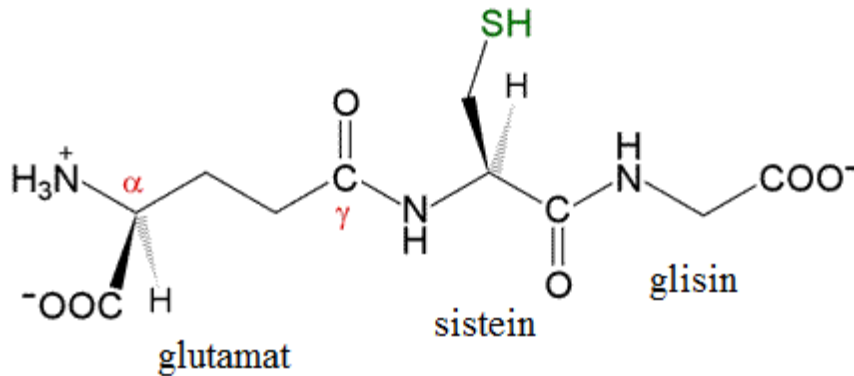
Spesifik aktivite: Enzimin saflık derecelerini gösteren spesifik aktivite 1 mg protein denk gelen enzim ünitesi olarak tanımlanır. U/mg protein olarak ifade edilir.

Molar aktivite (turnover sayısı): Tek bir enzim molekülünün 1 saniyede ürüne dönüştürdüğü substrat molekülünün sayısıdır.

Katal: 1 mol substratı 1 saniyelik sürede ve optimum şartlarda ürüne dönüştürecek olan enzim miktarı olarak tanımlanır.

1.4. Glutasyon (GSH)

L-glutamat, L-sistein ve L-glisin aminoasitlerinden meydana gelen düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir (Kanat vd. 2014). Ayrıca prokaryodik ve ökaryodik hücrelerde, hücre içi serbest haldeki sülfhidril gruplarının büyük bir kısmını oluşturan en önemli tiyoldür. Diğer peptitlerden farklı şekilde birleştiğinden dolayı protein yapısında değildir. (-SH) grubu, toksik bileşiklerin, metabolitlerin ve epoksitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları detoksifiye eder (Parkin 2005). Genetik bilgiye ihtiyaç duymadan sentezlenen glutasyon organizmada serbest radikallerin ve çeşitli toksik maddelerin zararsız hale getirilmesini sağlayarak hücrenin antioksidan savunmasında görev yapmaktadır (Piner 2005; Kanat 2014).



Şekil 1.1. GSH molekülünün yapısı

GSH seviyesindeki artış ve azalış, hücresel işlevlerin korunmasında önemli bir role sahiptir. GSH düzeyi detoksifikasyon durumunda ve oksidatif stresin yükselmesi halinde azalabilmektedir. Oksidatif stresin devam etmesi halinde GSH /GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisiyle oksidatif strese karşı koyabilmek için artışa geçebilir. Bundan dolayı da GSH, çevresel kirliliğin etkilerini belirlemek için bir parametre olarak kullanılmaktadır (Zhank 2005; Husak 2016).

GSH molekülü daha çok karaciğerde sentezlenmekte ve %40'a yakın miktarı merkaptürik asit olarak safra yoluyla dışarı atılmaktadır. GSH diyetteki ksenobiyotiklere karşı vücudu koruduğu gibi, bağırsak lümenindeki lipid peroksidasyonunu da önlemekte ve bağırsak epitelyumunu oksijen radikallerine karşı savunmaktadır (Maher 2008).

1.5. Detoksifikasyon

Toksik maddeler, epoksitler ve metabolitler gibi ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinin çeşitli enzim veya moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan atılımının gerçekleştirildiği mekanizmalardır. Detoksifikasyon tepkimeleri; faz I, faz II ve faz III olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (Hayes *et al.* 2005).

Karsinojenler, sırasıyla Faz I reaksiyonları ile ya reaktif olmayan ürünlere yıkılarak vücuttan doğrudan atılırlar ya da Faz II konjugasyon reaksiyonlarıyla daha reaktif metabolitlere uğratarak idrar, safra ve ter yoluyla vücuttan dışarı atılırlar (Kılıç 2013).

Faz I reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz olaylarını içerirken; Faz II reaksiyonları ise çeşitli konjugasyon ve sentez olaylarını içermektedir (Nejat *et al.* 2009) Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın temel amacı bu zararlı bileşiklerin polaritesini arttırarak suda çözünebilen ve safra ile böbreklerden daha kolay atılmalarını sağlayan ürünler haline dönüştürmektir (David *et al.* 2010).

Ksenobiyotiklerin atılmayıp vücutta birikmesiyle DNA hasarı, doku hasarı,

mutasyon, hücre yaşlanması, kanser gibi metabolik ve kalıtsal rahatsızlıklar ortaya çıkar. Faz II tepkimelerinde GST enzimi tarafından faz I'de oluşturulan maddeler hidrofilik maddelere çevrilip vücuttan atılmaktadırlar (Yu 2018). Faz III'te ise genel olarak suda daha çok eriyebilen polar olmayan ksenobiyotikler ile daha az toksik olan metabolitlerin hücreler tarafından eliminasyonu gerçekleşir (Yu 2008; Yüksel 2015). Enzimatik bir süreç olan detoksifikasyon, zehirli maddelere karşı vücudu korumanın doğal yoludur. Ksenobiyotiklerin nötralizasyonu için iki aşamada gerçekleştirilerek daha az zararlı hale getirir (Jaiswal 2012).

Çok reaktif ve stabil olmayan serbest radikaller diğer moleküllerle elektron alışverişi yapabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Mercan 2004). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona bulunduran, kararsız yapılı, kısa ömürlü, molekül ağırlıkları düşük olmasına rağmen çok etkili olan moleküllerdir. Çevresel kirleticilerin önemli bir parçası olan bazı metal iyonları kendileri doğrudan radikal değildir ancak serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşan bu serbest radikallerin oksidan denge lehine bozulmasıyla canlılar için birçok patolojik durumun oluşumuna sebep olan oksitadif hasarın meydana gelmesini sağlarlar (Abdollahi 2003, 2004).

Serbest radikaller vücuttan atılmadıklarında çok büyük hasarlara sebep olabilmektedirler. Bu hasarlardan bazıları; hücre membranı proteinlerini yıkıp hücreleri öldürmek, membran lipid ve proteinlerini yok edip hücre membran esnekliğini azaltmak, hücre fonksiyonlarını engellemek, çekirdek membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok edip veya onların fonksiyonlarını bozup etkisiz hale getirerek bağışıklık sisteminin etkisini azaltmak olarak verilebilir (Sarybayev 2013).

Serbest radikaller; ilaç ve toksinlerle oluşan tepkimeler, kurşun zehirlenmesi, ağır metal nefrotoksisitesi, aminoglikozit nefrotoksisitesi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, hepatit B, iskemi ve reperfüzyon, Vit E eksikliği, kanser, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis ve

romatoid artrit gibi bir çok hastalığın patolojisinde etkilidirler (Cross 1987; Özdem 1994; Mercan 2004). Ayrıca oksidatif stres insanlarda alzheimer, parkinson, romatoid artrit, diabetes mellitus gibi rahatsızlıklar meydana getirir ve vücutta birikmesiyle de hücrenin tamir yeteneğini bozup yaşlanmaya da sebep olur (Çaylak 2011).

1.6. Glutasyon S-Transferaz (GST) (EC.2.5.1.18)

Detoksifikasyon metabolizmasındaki son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyip homeostasiyi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Faz II enzim ailesin bir üyesi olan GST enzimi ksenobiyotiklerin metabolizmasında önemli bir göreve sahiptir. Endojen ve ekzojen toksinlerin uzaklaştırılmasını veya değişime uğratılmasını sağlar (Espinoza *et al.* 2012; Özaslan 2017; Aksoy 2018).

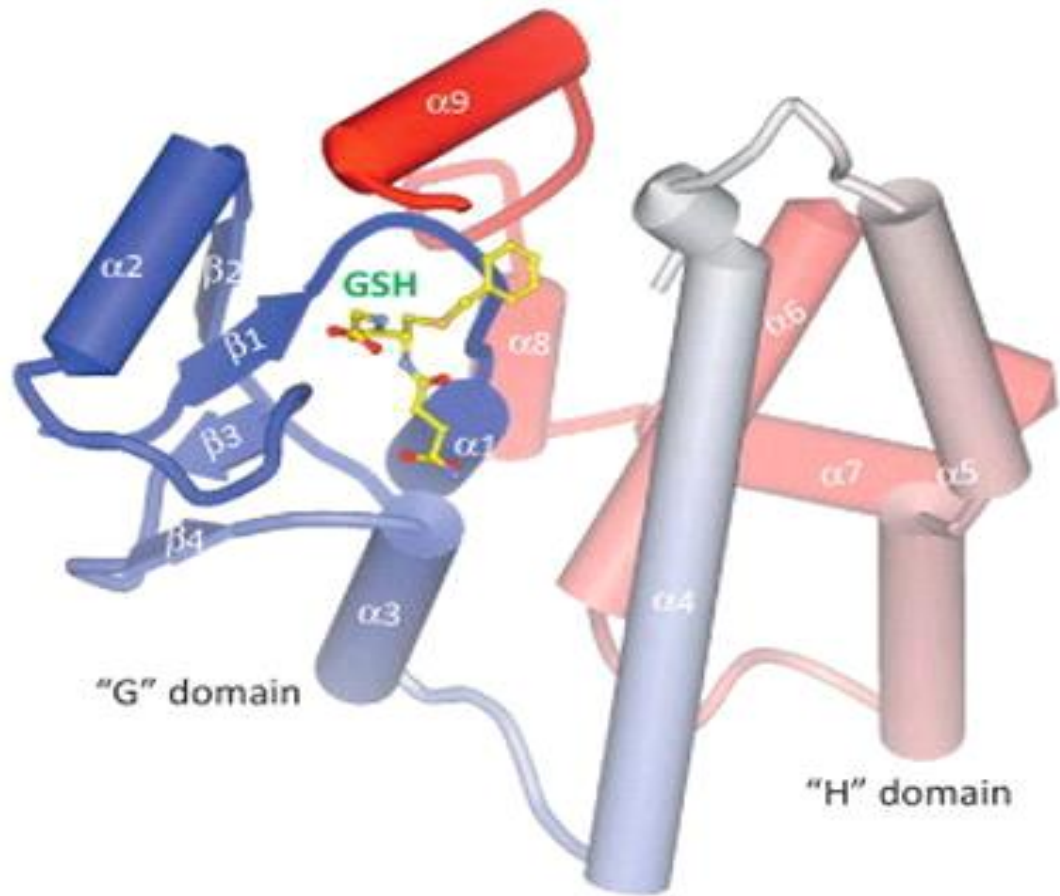
GST enzimi, glutasyonun ROS gibi elektrofilik ksenobiyotiklere konjugasyonunu katalize ederek detoksifikasyona ve biyoaktivliğe katkıda bulunurlar. Ek olarak, GST'lerin lökotrienlerin, prostaglandinlerin, progesteronun ve testosteronun biyosentezinin yanı sıra tirozin bozunmasında da görev yapar. (Hayes *et al.* 2005; Awasthi 2006; Espinoza *et al.* 2012)

İlk kez Boyland ve arkadaşları tarafından sıçan karaciğerinde saflaştırılarak tanımlanmış olan GST enzimi 20.000-25.000 dalton molekül ağırlığına ve her biri 200-240 aminoasitten oluşan alt birimlere sahiptir (Hayes *et al.* 2005).

GST enzimi, çevresel kaynaklı ve doğal olarak oluşan toksik maddelerin elimine edilmesini ve substrat olmayan ligandları GSH molekülüne bağlayarak taşınmalarını sağlar. Ayrıca aynı tür bileşiklerin birbirine kovalent bağlanmasını sağlayarak reaktif elektrofilik bileşiklerin vücutta zarar vermesini, önleyebilmektedir. (Eaton And Bammler 1999; Kolobe *et al.* 2004; Aksoy 2018)

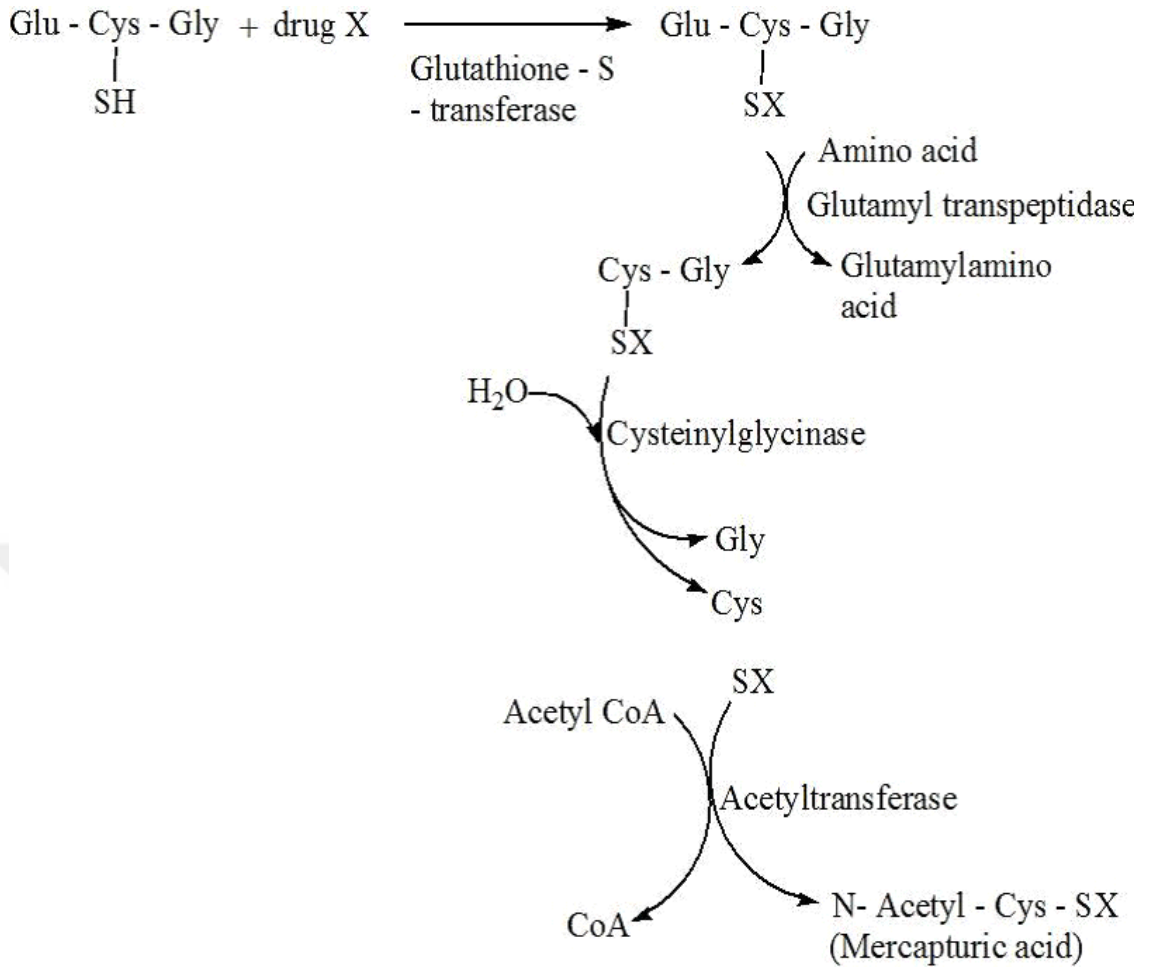
GST enzimi hidrofobik substrat bağlama bölgesine ve çok sayıda izoenzime sahip olduğu için birçok farklı bileşiğin GSH ile konjugasyonunu sağlar. Bu enzim

farklı yapıdaki pek çok substratı katalizleyebilmektedir: Karsinojenik bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçlar; laktonlar, alkilleri, arilhalidler, kinonlar, epoksitler, esterler gibi. Bu substratların çoğu elektrofilik birer merkez taşırlar ve hidrofilik yapıda bulunurlar (Cnubbenet *et al.* 2001; Coşkun 2007; Özaslan 2014). Bu özelliğinden dolayı çok fazla araştırmaya konu olmaktadır. Elektrofilik substrat için H bölgesi, glutatyon için G bölgesi olmak üzere birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt biriminden oluşmuştur (Cnubben *et al.* 2001; Özaslan 2014)



Şekil 1.2. GST enziminin 3-D yapısı (Wu and Dong, 2012).

GST birçok elektrofilik materyalin aktivasyon ve inaktivasyonu için gereklidir. Bu enzim toksik bileşiklerin elektrofilik bölgelerinin indirgenmiş glutatyonun (-SH) grubuyla etkisizleştirir. Ürün olarak oluşturduğu merkaptürik asit vücuttan idrar yoluyla atılır. (Hayes 2005).



Şekil 1.3. GST enzimlerinin katalizlediği konjugasyon reaksiyonu (Magoma 2013).

GST, oksitif strese karşı primer savunma antioksidan sistemidir ve organizmayı korumak için ROS (serbest oksijen radikalleri)'u daha az reaktif metabolitlere indirgemektedir. Son yıllardaki araştırmalar, oksidatif strese karşı korunmanın GST genindeki polimorfizmlerle bozulmuş olabileceğini ve geniş bir hastalık yelpazesinin geliştirilmesine neden olabileceğini göstermiştir (Safarinejad *et al.* 2010)

Glutasyon S-Transferaz Enziminin Sınıflandırılması; Glutasyon S-transferazlar; bulundukları bölgeye göre mitokondriyal, sitosolik ve mikrozomal olarak sınıflandırılırlar (Özaslan 2017). Sitosolik GST enzimleri en iyi tanımlanmış ve en geniş türüdür. Ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin

biyotransformasyonunda görevlidirler (Wilce *et al.* 1995; Landi 2000). Diğer bir türü olan mikrozomal GST' ler (MAPEG), araşidonik asit metabolizmasından yer alan GSH'a bağımlı transferaz ve izomeraz reaksiyonlarını katalizleyen integral membran proteinleridir. Mitokondriyel GST'ler peroksizomlarda lokalize olmuşlardır. Mitokondriyal GST'ler ile sitosolik GST'ler üç boyutlu yapıları bakımından benzerler ve çözünebilen GST enzimleri olarak adlandırılırlar. Sitosolik GST'ler farklı dokularda ve miktarlarda bulunabilen pek çok sayıda izoenzime sahiptirler çözünebilen GST izoenzimlerinin izoelektrik noktaları ve aminoasit dizilimleri birbirlerinden farklıdır. Mikrozomal GST'ler, (MAPEG) çözünebilen gruplara yapısal benzerlik göstermezler, bu yüzden mitokondriyel GST formları ve primer yapıları farklıdır. (Mannervik *et al.* 2005)

GST izoenzimleri iki alt ünitelerden oluşan dimer yapısındadır. Bu alt üniteler hangi GST tipinin mevcut olduğunu tanımlar. İnsanlarda bulunan GST enzimlerinden GST alfa (GSTA), GST mü (GSTM), GST teta (GSTT), GST pi (GSTP), GST zeta (GSTZ), GST sigma (GSTS) ve GST omega (GSTO) sitozolik; GST kappa (GSTK) ise mitokondriyel ve perokzizomal olup toplam 8 alt sınıfta incelenirler. (Strange *et al.* 2001; Board *et al.* 2000; Ladner *et al.* 2004; More *et al.* 2004).

Alfa, pi, ve mü GST alt birimleri ilaç metabolizmasında; sigma alt birimi ise prostoglandin sentezinde görevlidir. Zeta ve teta formları bitkilerde ve hayvanlarda bulunurken tau ve pi formları ise sadece bitkilerde bulunmaktadır (Rowsey *et al.* 2001 and Dixon *et al.* 2002).

Anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı böbrek dokusu çevresel kirleticiler ve ksenobiyotikler için hedef organlardan biridir. Böbreklerde kan akışının fazla olması, ksenobiyotik taşıyıcılarının ve onları metabolize eden enzimlerin varlığı ile idrar üretimi sırasında ksenobiyotik metabolitlerinin yoğunlaştırılması böbreğin hedef organ olmasının başka sebepleridir (Van Vleet and Schnellmann 2003). Böbrek dokusunun bu özellikler çalışmamızda kullanmamızda etkili olmuştur.

1.7. Ağır Metaller

Ağır metaller doğal dengeyi bozan en etkili çevresel faktörlerdendir. Ağır metaller genellikle sanayi alanında kullanıldıktan sonra atık olarak doğaya terk edilmektedir. Son yıllarda artan endüstriyel gelişmeler deniz çevrelerinin ağır metaller ile kirletilmesine ve bu kirliliğin besin zincirine de yansımaya sebep olmuştur. Canlıların su ve besinler yoluyla bünyelerine aldıkları ağır metaller birikerek bütün yaşam faaliyetlerine zarar vermekte ve canlının metabolizmasını değiştirebilmektedir (Hu 2000).

Canlı bünyesine farklı metabolik yollarla alınan ağır metaller bütün organ ve dokularda farklı düzeylerde birikir ve büyük hasralar meydana getirir. Vücut için fizyolojik önemi olan metaller vücudun ihtiyacı kadarı depolanırken fazlası dışarı atılır veya birikerek toksik etki yapar ve enzimlerin yapısını bozar (Yazkan *et al.* 2004).

Dışarıdan bir etki olmadığı sürece ağır metallerin doğadaki oranı düşüktür. Gümüş, cıva, kurşun, kadmiyum ve bakır vb. ağır metaller doğadaki oranları arttığında organizmalarda toksik etki yaparak enzimlerde inhibisyona neden olurlar. Bazı metaller belli konsantrasyonlarda olmak koşuluyla enzimatik faaliyetlerde gereklidir. Organik maddelere bağlı olan metaller metabolik süreçte kullanılır ve organik maddelerin bozulmasıyla çözünerek tekrar serbest hale geçerler (Balkıs and Algan 2005).

Ağır metaller, subletal ortam derişimlerinden dolayı balıkların metal metabolizması ve detoksifikasyonu ile ilgili olan organları olan karaciğer, böbrek ve dalakta yüksek oranda birikmektedir. Balıklarda, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin azaltılmasında görevli olan metallothionein ile glutatyon gibi metal bağlayıcı moleküller en çok karaciğerde sentezlenir.

Cıva: İnsanlık tarihinde 3000 yıllık bir geçmişi olan cıva ve bileşikleri pek çok kaynakta yaygın olarak kullanılmaya devam ediyor. Doğada; sanayi, atmosfer,

toprak, su, fitoplankton, zooplankton, balık ve insan döngüsü içinde yer alır.

Cıva balıklarda yüksek oranda birikir özellikle de turna, mezgit gibi karnivor balıklarda birikir. Balıklarda en fazla karaciğerde biriken cıvanın çok küçük dozları bile toksik etki yapar. Farklı kimyasal formları farklı düzeyde toksik etki oluşturur. Organik cıva bileşikleri genelde organizmaya gıda yoluyla alınıp akümülyasyondan sonra kronik toksik bozukluklar ortaya çıkarırlar. Balıkların solungaçlarıyla çok çabuk ve büyük miktarlarda anorganik cıva tuzlarını alır ve akut toksik etkisine maruz kalırlar (Dökmeci 2001; Seçer ve Bozkurt 2001; Kaya ve Akar 2002; Dural 2007)

Metil cıva (MeHg): Elementel haldeki cıvanın sucul ortamda bazı mikroorganizmalar tarafından oluşturduğu organik ve daha toksik olan cıva bileşiğidir. Yağda çözündüğünden dolayı besin zincirinde yüksek oranda birikir. İnsanlarda nöro-davranışsal yani, motor bozukluklara sebep olan tehlikeli bir çevresel kirleticidir. Ayrıca neden olduğu zehirlenmelerde oksidatif stresin oluşumunda önemli bir etki yaptığı belirtilmiştir (Santos *et al.* 2018).

MeHg gastrointestinal sistemden emilir ve tüm organlarla sistemlere dağıtılır, ancak merkezi sinir sistemi MeHg'nin neden olduğu toksisiteye en duyarlı organdır (Zareba *et al.* 2007) Bundan dolayı yetiştirme çağındaki çocuklarda daha fazla etkili olur. Bazı epidemiyolojik araştırmalara göre doğum öncesi ve doğum sonrası maruziyetten sonra ciddi bilişsel bozukluklar oluşmaktadır (Tatsuta *et al.* 2017).

Çinko (Zn): Bütün canlılarda çok düşük miktarlarda esansiyel bir iz element olmasına karşın sucul organizmalarda genellikle yüksek konsantrasyonlarda toksiktir (Kruger 2002).

300'den fazla enzim ile protein için gerekli bir metal olan çinko prokaryodik ve ökaryodik canlılarda transkripsiyondan sorumlu olan enzimlerle RNA polimeraz fonksiyonu için esansiyeldir (Falchuk 1998).

Çinko, DNA polimeraz ve timidin kinaz gibi pek çok enzimin de kofaktörüdür. Bundan dolayı derişimindeki hafif bir artış, DNA sentezini uyarmaktadır. Eksikliğinde ve fazlalığında DNA sentezinde inhibisyona neden olur (Brando 1995; Cangul 2002).

Çinko, protein sentezi ile karbonhidrat sentezine katılır. Enzim aktivasyonu, fotosentez, solunum ve biyolojik membran stabilitesine etki etmektedir (Rout ve Das 2003).

Magnezyum (Mg): Yeryüzünde en fazla denizlerde bulunan magnezyum metali toprakta farklı bileşikler halinde bulunmaktadır. Havada parlak bir ışıkla yanabilen, beyaz ve çok hafif bir metaldir. Bu metal denizlerde yaklaşık % 0,13 oranında $MgCl_2$ şeklinde bulunur. Yeraltı tuz birikintilerinde ve göllerde önemli magnezyum rezervleri bulunmaktadır (TE-TA Ltd. Şti, Magnezyum, manyezit ve magnezyum bileşikleri. Türkiye sınaî kalkınma Bankası yayınları, kimya sektörü araştırması, Yayın no: Kimya-2 1979, Ankara).

Magnezyumun sulardaki kullanılabilir normal değeri 50-150 mg arasındır. Asit yağmurları ve gübrelerin etkisiyle toprakta bulunan magnezyum metali barsaklardan emilemeyecek tuzlar haline gelmekte ve besinlerle alımı azalmaktadır. (www.diyetce.com/beslenme/vitaminler/magnezyum1.html)

Bakır: Bakır, enzim aktivasyonunda, lipid metabolizmasında ve bitkilerde karbonhidrat metabolizmasında görev alan bir elementtir (Kacar ve Katkat 2006). Bakır kirliliğinin pek çok sebebi olmakla beraber en etkili olanlar atmosferik depositler, pestisid kullanımı, kanalizasyon atıkları, çeşitli gübreleri, kömür ve maden yataklarıdır.

Bakırın canlılara olan etkisi, canlının büyüklüğüne ve bulunduğu kimyasal forma bağlıdır. Küçük ve basit yapıli canlılarda düşük konsantrasyonda bile toksik etki yaparken daha büyük yapıli canlılarda düşük konsantrasyonlarda esansiyeldir. Bundan dolayı bakır ile bakır bileşikleri insektisit, fungusit, mollusid, biosit,

antibakteriyel madde olmak üzere farklı formlarda tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı kullanılır. Bakır alaşımlarından yapılan bazı maddeler bakırın antiseptik özelliği sayesinde mikroorganizmaların yayılmasını engeller (Kahvecioğlu vd. 2004).

Bakır sucul canlılar için esansiyel bir metal olmasına rağmen sularda en çok bulunan toksinlerdenden birdir. Sucul ortamda yüksek düzeyde bakıra maruz kalan canlılarda üzerindeki bazı etkileri;

- Balıklar üzerinde biyokimyasal, anatomik, fizyolojik ve davranışsal değişiklik meydana getirir.
- Büyümde yavaşlığa,
- Hücrelerde yağ peroksidasyonuna,
- Omur hasarları ve nörolojik bozukluklara,
- Kalp atışında yavaşlama buna bağlı olarak da hızlı oksijen alımı ve anemiye,
- Solungaç mukozalarında birikerek strese, solungaçta iyon transferinin yavaşlamasına ve hatta ölüme yol açan solunum sorunlarına neden olur.
- Kan ve karaciğerde enzim aktivitelerini, hematolojik parametreleri ve plazma iyon konsantrasyonunu etkiler. (Kruger 2002).

Krom: Doğada çok fazla bulunan krom metali canlı vücudunda insulinin hareketini sağlayıp karbonhidrat, su ve proteinlerin metabolizmalarını etkilemektedir (Kahvecioğlu vd. 2006).

Düşük seviyelerdeki krom maruziyetlerinde, cilt rahatsızlıkları ve ülser oluşurken uzun süreli krom maruziyetlerinde böbreklerde, karaciğerde, kan dolaşım sisteminde ve sinir dokularında hasar meydana gelir. Krom daha çok sulu ortamlarda ve sucul canlılarda bulunan bir metaldir. Yüksek düzeyde kroma maruz kalan balıkların tüketilmesi oldukça tehlikelidir (Kahvecioğlu vd. 2006).

Kromun Cr^{+6} iyonu Cr^{+3} iyonuna göre daha çok toksik etkiye sahiptir. Cr^{+6} iyonunun hava yoluyla alınması burun akımlarına, kanamalarına, üst solunum yollarında delinmelere, kaşıntıya, astımı rahatsızlığı olanlarda astım krizlerine ve

alerjik reaksiyonlara sebep olur (Kahvecioğlu vd. 2006).

1.8. Pestisitler

Pestisitler tarımda yabancı otlar ve zararlılarla mücadele etmede çok sık kullanılan kimyasal ajanlardır. Ayrıca üretimin arttırılmasında da kullanılmaktadırlar. Pestisitler ve diğer kimyasal ilaçlar, düşük konsantrasyonlarda bile kullanılsalar hedef organizmayı ve aynı habitatteki diğer organizmalar için olumsuz etkilere neden olmaktadır (Morgan *et al.* 2005)

Pestisitler, başta balıklar ve memeliler olmak canlılarda antioksidant enzimler ile lipid peroksidasyonunu olumsuz etkileyip oksidatif strese sebep olurlar (Piancini *et al.* 2015; Golombieski *et al.* 2016).

Pestisidlerin toksisitelerinde serbest radikallerde rol oynarlar. Pestisidler, oksidatif strese, serbest radikal üretimine ve antioksidanlarda değişime neden olurlar. Lipid peroksidasyon, pestisidlerin sebep olduğu zehirlenme mekanizmalarındandır. Fazla miktarda reaktif oksijen grubunun açığa çıkması, glutatyon tükenmesine yol açılması, selenyum (Se) ve bakır (Cu) gibi bazı metallerin eksikliği ya da fazlalığı bu yeteneği değiştirebilir. Böylece açığa çıkan reaktif oksijen türleri hücre zarları, DNA, protein gibi biyomoleküllerin yapılarında hasar meydana getirir (Kehrer 1993; Mercan 2004).

İnsektisitler, serbest radikal oluşturarak ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak enzimlerin yapısında değişikliğe ve sonuç olarak oksidatif stres oluşmasına neden olmaktadır (Giordano *et al.* 2007).

Pestisitler organizmada enzimatik olaylara katılırlar. Faz I aşamasında oksidasyon, redüksiyon ve kopma; faz II aşamasında ise konjugasyon reaksiyonlarına katılırlar. Faz I aşamasında karaciğerde sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından oksidasyona uğrayarak biyolojik yarı ömrü kısa ve polar bileşiklere dönüştürülmektedirler. Faz II aşamasında ise değişime uğrayan pestisitler

sudaki polariteleri yüksek olan glukuronik asitle veya glutatyonla konjuge edilmektedir.

Pestisit biyotransformasyonu sonucu biyoaktivasyona uğrayan pestisit metabolitleri doku makromoleküllerine (DNA, protein) kovalent olarak bağlanarak biyolojik yarı ömürlerini artırırlar. Pestisit metabolitlerinin DNA gibi önemli hücresel makromoleküler veya nörolojik önemi olan esterazlara bağlanmasıyla onkojenik ya da nörotoksik anormallikleri hızlandırmaktadır.

GST enzimi pestisitlerin toksikolojisinin biyotransformasyonunda; sitotoksik ve karsinojenik ajanlara karşı hücreyi korumakla görevlidir. Pestisit metabolitleri, glutatyonla konjuge olup inaktifleşirler. GST'nin "mü" izoenzimine pestisitler kolaylıkla bağlanabilirler. Pestisitlerin çevresel kirleticilerin, kemoterapide kullanılan ilaçların ve oksidatif ürünlerin detoksifikasyonunda da GST izoenzimleri rol almaktadır (Kitchin 1984; Kurutaş ve Kiliç 2003).

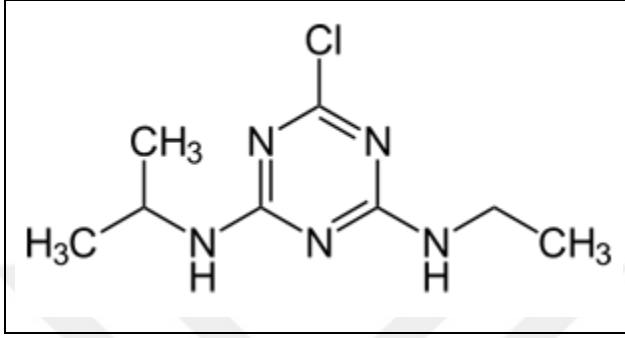
Sucul ortamlardaki herbisitlerin hücre membranında birikmesiyle lipid yapısında bozulmalar meydana gelir. Protein ile lipid arasındaki hidrofobik etkileşimin bozulmasından dolayı enzim aktiviteleri de değişebilmektedir (Fernandes 2013).

Atrazine: $C_8H_{14}ClN_5$ molekül formülüne ve 215,68 g/mol molekül ağırlığına sahip bir pestisit grubudur. Suda iyi çözünen kokusuz, beyaz bir tozudur. Reaktif, yanıcı ve çok uçucu değildir. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Sorgum, mısır, şeker kamışı, lupinler, çam ve okaliptus tarlaları triazin toleranslı kanola gibi bitkilerin yetiştiği alanlarda yetişen geniş yapraklı yabancı otlarla mücadele etmede kullanılan triazin sınıfından bir herbisittir. (pmep.cce.cornell.edu)

Atrazine, Sınırlı kullanım pestisitidir (RUP), herkesin kullanımına açık değildir. EPA tarafından kullanımı sınırlandırılmış ve 2004 yılında Avrupa

Birliği'nde yeraltı suyu kirliliği sınırların aşılanması nedeniyle yasaklanmıştır. Avrupa Birliğinde yasaklanmış olmasına rağmen, hala dünyadaki en yaygın kullanılan herbisitlerden biridir. Atrazine endokrin sistemi bozarak hormonal dengesizliğe ve doğum kusurlarına sebep olmaktadır.(pmep.cce.cornell.edu)

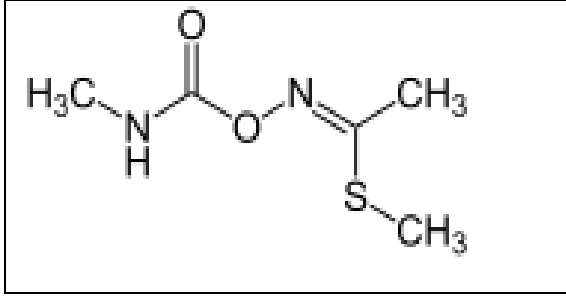


şekil 1.4. Atrazine molekül yapısı

Methomyl: $C_5H_{10}N_2O_2S$ molekül formülüne, 162.207 g/mol molekül ağrılığına ve 1,2946 g/cm³ yoğunluğa sahip geniş spektrumlu bir böcek ilacıdır. Hafif, kükürt benzeri bir kokusu olan beyaz kristal bir katıdır.(Wang vd.2010)

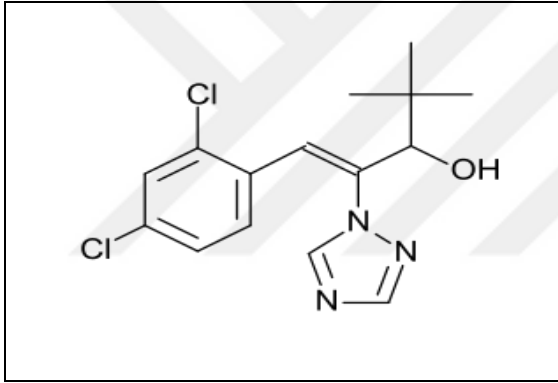
Karbamat sınıfıdan bir insektisittir. Karbamatlar, sinir sisteminin düzgün çalışması için gerekli bir enzim olan kolinesterazı inhibe ederek çalışırlar. Methomyl temel bir sinir sistemi enzimi olan yüksek oranda toksik bir kolinesteraz inhibitörüdür. (pmep.cce.cornell.edu)

Methomyl solunduğunda zehirlidir ve solunum yolunun mukozaları yoluyla emilebilir, sistemik zehirlenme ve kolinesteraz inhibisyonu ile sonuçlanabilir. Tozun veya aerosolün solunması, göğüste sıkışma, bulanık görme, yırtılma, hışırtı ve maruz kaldığında ortaya çıkan baş ağrıları gibi tahrişe, akciğere ve göz sorunlarına neden olabilir. Kolinesteraz inhibisyonunun diğer sistemik semptomları birkaç dakika veya birkaç saatlik maruziyette ortaya çıkabilir (Berg 1986)(pmep.cce.cornell.edu)



Şekil 1.5. Methomyl molekül yapısı

Diniconazole: $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O$ Molekül formülüne ve 326.221 g / mol molekül ağırlığına sahiptir. Zirai ilaç etken maddesi olan diniconazole Fungisitler grubunda bulunmaktadır. Külleme, pas, rastık, yaprak lekesi gibi hastalıklara tedavi olarak ya da uzun süreli koruma için kullanılır(<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



Şekil 1.6. Diniconazole molekül

1.9. İnci kefali

Cyprinidae familyasından olan inci kefali (*Chalcalburnustarichi* Pallas, 1811) havza sularında yaşayan endemik bir balık türüdür (Akgül 1980). Van Gölü havzasında, başta Van Gölü olmak üzere akarsu ve göllerde yaşamakta ve önemli düzeyde avcılığı yapılmaktadır (Duyar 2000; Sarı vd. 2004). İnci kefali 12,000 ton/yıl avcılığı ile ülkemiz iç su balıkları üretiminin % 27'sini oluşturmaktadır (Anonim 2008a).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Merkaptürik asit oluşumu detoksifikasyon metabolik yolunun son ürünüdür. Bu metabolik yolun ilk enzimi olan Glutatyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18) homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Enzim detoksifikasyon metabolizmasındaki rolünü hücrelerdeki ksenobiyotikleri Glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu sağlayarak yapmaktadır (Andersson 1988; Arı 2003).

GST izoenzimleri ilk defa sıçan karaciğerinden saflaştırılmış olup sınıflandırılmaları substrat spesifikliklerine göre yapılmıştır. GST'lerde yapılan sınıflandırma katalizledikleri reaksiyonlardaki substratların fonksiyonel gruplarına göre epoksit, alken, alkil, aril ve aralkil transferazlar olarak gruplandırılmışlardır. (Both *et al.* 1961; Boyland and Chasseaud 1969). GST'nin pekçok formunun saflaştırılıp yapısal özelliklerinin incelenmesi sonucu iç içe geçmiş substrat spesifiklerinin varlığı belirlenmiştir (Pabst *et al.* 1973; Askelöf *et al.* 1975; Özslan 2014).

Mitokondrial, sitozolik ve mikrozomal GST enzim formlarının sınıflandırılmasında aminoasit dizisi ve proteinin üç boyutlu konformasyonundaki farklılıklar önemli bir kriterdir. Sitozolik GST süperailisinin sekansı % 40'tan fazla benzerlik gösterirken diğerleri de %20 benzerlik göstermektedirler. Yapıları bakımından sitozolik GST enzimleri alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, ve omega olarak alt sınıflara ayrılmışlardır. Mitokondrial GST enzimleri kappa sınıfında bulunurlar. Mikrozomal GST süper ailesi (MAPEG) aminoasit dizileri I-IV arası alt gruptan oluşur ve benzerlik oranları %20'nin altında bulunur. İnsan sitozolik GST enzimi alfa, zeta, theta, mu, pi, sigma ve omega sınıfında bulunurlar. Geriye kalan izoenzimler MAPEG süperailisinin I, II ve IV. sınıfında bulunurlar (Eaton and Bammler 1999; Josephy 2010; Oakley 2011).

Çomaklı ve arkadaşlarının Ağrı Balık Gölü alabalığı (*Salmo trutta labrax*) üzerine yaptıkları çalışmada karaciğer ve solungaç dokularından Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi glutatyon-agarose afinite kolonu kullanarak saflaştırıp

karakterize ederek bazı ağır metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının inhibisyon gücünü belirlemek için her bir inhibitör için IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri belirlenmiştir. Çalışmada karaciğer dokusundan saflaştırılan enzimin GSH substratının K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,385 mM ve 0,76 EU / mL olmak üzere; CDNB substratının K_M ve V_{max} değerleri 0,231 mM ve 0,376 EU / mL. Ağır metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla Hg^{2+} 0,137 μ M, Cu^{2+} 0,159 μ M, Se^{4+} 0,239 μ M, Al^{3+} 4,08 μ M; K_i değerleri sırasıyla Hg^{2+} 0,038 μ M Cu^{2+} 0,044 μ M Se^{4+} 0,066 μ M Al^{3+} 1,134 μ M olarak belirlenmiştir. Solungaç dokusundan saflaştırılan enzimin GSH substratının K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.035 mM ve 0.203 EU / mL ve CDNB'nin ise sırasıyla 0.41 mM ve 0.62 EU/mL olarak belirlenmiştir. Uygulanan ağır metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla Hg^{2+} 0,137 μ M, Cu^{2+} 0,140 μ M, Zn^{2+} 0,187 μ M, Se^{4+} 0,388 μ M ; K_i değerleri sırasıyla Hg^{2+} 0,0046 μ M, Cu^{2+} 0.0047 μ M, Zn^{2+} 0,0063 μ M, Se^{4+} 0,0131 μ M olarak belirlenmiştir. K_M enzimin substrata olan ilişkisini gösterdiği için solungaç dokusunda GSH'nin GST için daha iyi bir substrat olduğu belirlenmiştir, Karaciğer dokusundaki enzim için CDNB'nin daha iyi bir substrat olduğu belirtilmiştir. Ağır metal iyonlarının her iki dokudan saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri karşılaştırılmış olup en düşük IC_{50} ve K_i değerlerine sahip metal iyonun Hg^{+2} olduğu bulunmuştur. Bu bulgulara göre en güçlü inhibisyon etkisini Hg^{+2} iyonunun gösterdiği tespit edilmiştir (Comakli *et al.* 2015).

Hamed (2004) tarafından Tilapia (*Oreochromis niloticus*) balığı karaciğer dokusundan glutatyon-sepharoz afinite kolon kromatografisi yöntemiyle GST enzimi elde edilmiştir. Elde edilen enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini yapılmış ve 25,460 kDa protein alt birim olarak; enzime ait optimum pH ise 8 olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten grafiğinden yararlanarak GSH ile CDNB substratlarının K_M değerleri sırasıyla 0,35 mM ve 0,42 mM olarak belirlenmiştir.

Canlılardaki antioksidant savunma mekanizmalarına ait parametrelerden olan glutatyon seviyesi, GR aktivitesi ve GST aktivitesindeki değişikliklerin, sucul organizmalarda çevresel kirliliği belirlemede kullanılabilecek önemli biyomarkırlar olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Doyotte *et al.*1997).

Bioaktif bir molekül olarak bilinen curcuminin sucul canlılar için etkisinin *in vivo* olarak araştırıldığı bir çalışmada, gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) farklı dozlarda curcumin uygulaması yapılarak böbrek ve dalak dokusundaki lipid peroksidasyon (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyi ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiş ve curcumin uygulanan balıklarda MDA düzeyinin düştüğü, GSH-Px, GR ve GST aktiviteleri ile GSH düzeyinin ise arttığı ifade edilmiştir (Yonar vd. 2014).

GST enzimi insan eritrositlerinden glutatyon-agaroz afinite kolon yöntemiyle, %80 verimle ve 1143 kat saflaştırılmıştır. Spesifik aktivitesi 16,00 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir. Elde edilen enzimin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu kimyasallardan Paclitaxel, cyclophosphamide ve gemciabine için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,23 mM, 5,75 mM ve 6,35 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmada inhibisyon etkisi gösteren kimyasalların GSH substratı varlığında inhibitör sabitlerini ifade eden K_i sabitleri de belirlenmiştir. Paclitaxel ait K_i sabiti 0,182 ± 0,028 mM, cyclophosphamide ait K_i sabiti 6,97 ± 0,49 mM ve gemciabine ait K_i sabiti 6,71 mM olarak hesaplanmıştır (Erat ve Şakiroğlu 2012).

Van Gölü Balığı karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi 29,304 EÜ/mg protein spesifik aktivitesi ve %37,36 verim ile 316,11 kat saflaştırılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm’de Habig metoduna göre ölçülmüştür. Enzimin molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisiyle 62,35 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 28 kDa ve 33,8 kDa olarak tespit edilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH’sı Tris/HCl tamponunda pH 7,8, optimum iyonik şiddeti 100 mM Tris/HCl, optimum sıcaklık 30°C ve stabil pH ise fosfat tamponunda pH:5,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin substratları için K_M ve V_{max} değerlerine bakılmıştır. CDNB substratının K_M sabiti 0,891 mM ve V_{max} değeri 1,245 EÜ/ml olarak; GSH substratının ise, K_M sabiti 0,060 mM ve V_{max} değeri 0,562 EÜ/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca sucul ortamda yaşayan canlılar için

toksik olan metallerin saflaştırdıkları enzim aktivitesi üzerine etkileri de incelenmiştir. Metal iyonlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla Ag⁺ iyonu için 0,208 µM, Cu⁺² iyonu için 0,163 mM, Cd⁺² iyonu için 0,235 mM ve Co⁺² iyonu için 0,446 mM olarak hesaplanmıştır. K_i sabitleri Ag⁺ için 1,96±0,69 µM(yarışmasız) Cd⁺² için 0,117 ± 0,031 mM (yarışmalı), Cu⁺² için 0,049 ± 0,009 mM (yarışmalı), Co⁺² için 0,893±0,3 mM (yarışmalı), olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri en küçük olan Ag⁺ (0,208 µM) iyonun en yüksek toksik etki yaptığı rapor edilmiştir (Özaslan 2014).

Van Gölü balığı üzerine yapılan bir başka çalışmada Glutatyon redüktaz, (Glutatyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7, GR) enzimi, Van Gölü balığının (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) karaciğer ve eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. GR enzimi karaciğerden ve eritrositlerden sırasıyla 4552 ve 7619 kat olarak saflaştırılmıştır. Karaciğer ve eritrosit GR enzimleri için optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri araştırılmış ve sonuçları sırasıyla 40-60°C; 8.0-8.0 ve 50-50 mM olarak bulunmuştur. Enzimlerin alt birimlerinin molekül ağırlıkları SDS-PAGE ile yapılmış ve 55 kDa olarak hesaplanmıştır. Ayrıca amikasin, sefazolin, ivermektin ve kanamisin ilaçlarının Van Gölü balığı karaciğer ve eritrosit GR enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Yarışmasız inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçların K_i sabitleri ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Van Gölü balığı karaciğer GR enzimi için IC₅₀ değerleri sırayla 1,63x10⁻² mM, 3,66x10⁻² mM, 5,04x10⁻⁴ mM, 1,88x10⁻² mM ve K_i değerleri sırasıyla 1.39x10⁻² M, 1.84x10⁻² M, 6.54x10⁻⁴ M, 1.12x10⁻² M olarak hesaplanmıştır. Eritrosit GR enzimi için IC₅₀ değerleri sırayla 2x10⁻² mM, 3,04x10⁻² mM, 7,87x10⁻⁴ mM, 3,18x10⁻² mM olarak ve K_i değerleri sırayla 2.32 x10⁻² M, 4.64 x10⁻² M, 1.19 x10⁻³ M, 3.64 x10⁻² M olarak hesaplanmıştır (Altun 2010).

İnci kefali (*Chalcalburnus tarichi*, PALLAS 1811) balığı ile ilgili yapılan bir çalışmada Van Gölü su, sediment ve balık örneklerinde Zn, Cd, Cu ve Pb ağır metal konsantrasyonları 2006 ve 2007 yıllarında incelenmiştir. Araştırma sonunda, ağır metal konsantrasyonunun sediment > balık > su şeklinde sıralandığı ve ağır metal birikiminin en çok karaciğer dokusunda olduğu gözlenmiştir. Kullanılan ağır metallerden çinkonun en yüksek konsantrasyonu gösterdiği ve diğer ağır metallerin ise su, sediment ve balık örneklerinde değişim gösterdiği belirlenmiştir. Su ve balık

örneklerinde bulunan Zn, Cd, Cu, ve Pb metallerinin kabul edilebilir değerlerin altında olduğu belirlenmiştir. Gölü besleyen su kaynakları ve atık su deşarjlarının ağır metal yönünden incelenmesi gerektiği düşünülmüştür (Türkoğlu 2008).

Glutasyon S-Transferaz enzimi Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden glutasyon –agarose afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Bazı metal iyonları ve antibiyotiklerin enzimin aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Enzim 16,54EÜ/mg protein spesifik aktivite ve %59 verimle 11.026 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri GSH ve CDNB için ayrı ayrı belirlenmiştir. GSH substratının K_m ve V_{max} değerleri sırasına göre 0,0395 ve 0,0328 EÜ/ ml; CDNB için K_m ve V_{max} değerleri sırasına göre 0,259 ve 0,0655 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır. İn vitro inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat, sefuroksim sodyum, amikasin sülfat antibiyotiklerinin IC_{50} değerleri 0,568, 1,104 ve 7,637 mM K_i sabitleri $1,506 \pm 0,176$ (yarışmasız), $0,915 \pm 0,490$ (yarışmalı) $6,43 \pm 3,627$ (yarışmasız) olarak belirlenmiştir; Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} , Mg^{+2} metal iyonlarının IC_{50} değerleri (0,0348), (0,171), (1,042), (46,33) ve K_i sabitleri $0,0243 \pm 0,009$ (yarışmasız) $0,1114 \pm 0,052$ (yarışmasız) $2,506 \pm 1,104$ (yarışmasız), $65,73 \pm 17,378$ (yarışmasız) olarak belirlemişlerdir (Çomaklı 2011).

Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusunda yapılan bir çalışmada GST enzimi afinite kromatografisi metoduyla saflaştırılmıştır. Elde edilen enzimin izoformları HPLC cihazı ve SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. HPLC’den alınan sonuçlara göre enzimin farklı izofomlarının molekül kütleleri 25,5 kDa ve 23,0 kDa olarak belirlenmiştir (Riol *et al.* 2001).

Akkemik (2012) tarafından yapılan bir çalışmada hindi karaciğeri kullanılmıştır. Hindi karaciğer dokusundan afinite kromatografisi metodu kullanılarak GST enzimi saf halde elde edilmiştir. Elde edilen enzimin aktivitesi üzerindeki bazı metal iyonlarının inhibisyon etkilerine bakılmıştır. SDS-PAGE metoduyla enzimin izoformlarının molekül kütleleri 26 kDa ve 24 kDa olarak belirlenmiştir. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak enzimin

doğal halinin molekül kütlesi 53 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin karakterizasyon çalışmaları yapıp sonuçlar rapor haline getirilmiştir.

Demirdağ (2013) yaptığı çalışmada tümörlü ve tümörsüz insan midesinde saflaştırdıkları GST enzimi üzerine bazı ağır metallerin inhibisyon etkilerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda metal iyonlarının farklı konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Gadagbui (2000) kedi balığı bağırsak mukozasından elde ettiği GST enzimi ile çalışmıştır. Saflaştırma yöntemi olarak afinite kromatografisi kullanılmış ve karakterizasyon yapılmıştır. Glutasyon-agaroz afinite kolonundan enzim 107µmol/mg protein spesifik aktivite ve %87 verim ile 100 kat saflaştırmıştır. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak molekül kütlesi tayini yapılmıştır. İki alt birimin de 26,7 kDa olduğu bulunmuştur. Enzim kinetiği çalışmaları sonucunda GSH için K_M değeri 0,19 mM ve CDNB için K_M değeri 0,43 mM olarak belirlenmiştir.

Van Gölü (İnci Kefali) balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine yapılan çalışmada, glutasyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak enzim % 82,25 verimle 1543,51 kat saflaştırılmıştır. Enzimin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ile bazı pestisitlerin etkileri incelenmiş ve inhibisyon etkisi gösteren Al^{+3} , B^{+3} , Ba^{+2} ve Se^{-2} iyonları ile Oxamyl, Diniconazole, Carbofuran, Tebuconazole ve Atrazine pestisitleri için IC_{50} değerleri ve K_i sabitlerini hesaplamıştır. CDNB için K_M değeri 1,0574 mM ve V_{max} değeri 0,0373 EÜ/ml olarak; GSH için ise K_M değeri 0,1590 mM ve V_{max} değeri 0,0854 EÜ/ml olarak belirlenmiştir. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla Al^{+3} 0,072 mM, B^{+3} 0,100 mM, Ba^{+2} 0,082 mM, Se^{-2} 0,083 mM olarak belirlenmiştir. IC_{50} değer en küçük olan metal iyonu ise 0,072 mM değerle Al^{+3} olmuştur. Pestisitler için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla Oxamyl 0,062 mM, Diniconazole 1,604 mM, Carbofuran 0,0415 mM, Tebuconazole 0,056 mM, Atrazine 0,750 mM ve K_i değerleri Oxamyl 0,0024mM, Diniconazole 0,0644mM, Carbofuran 0,0016mM, Tebuconazole 0,0022 mM, Atrazine 0,0301mM olarak belirlenmiştir (Zariç 2017).

Pestisitlerin GST enziminin aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya göre; iribaşlara konsantrasyonu 1,85-240 mg/L arasında değişen glifosat uygulanmıştır. Çalışmada glifosatın asetilkolin esterase, butirilkolin esterase, karboksil esterase ve GST aktivitesi üzerine etkisine bakılmış, kontrolle kıyaslandığında tüm enzimlerin inhibe olduğu görülmüştür. GST tükenmesinin oksidatif strese ve pro-oksidan ksenobiyotiklerin stotoksitesiyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Hazarika *et al.* 2003).

Luschchok *et al.* (2009)'un yaptığı çalışmaya göre pestisitlerin etkisiyle zehirlenen ve oksidatif strese maruz kalan balıklarda GST aktivitesi %29-34 oranında azaldığı belirtilmiştir (Lajmanovich *et al.* 2011).

Metal iyonlarının insan eritrositleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada ve *in vitro* ortamda Cr^{+6} metal iyonunun glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini artırdığı, glutatyon redüktaz enzimin aktivitesini azalttığı GST ve katalaz enzimlerinin aktivitelerinde ise herhangi bir değişiklik oluşturmadığı tespit edilmiştir (Al-Mustafa 2006).

Bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitlerinin GST aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya göre; Brombenzen ve karbontetraklorür kimyasalları ratlara uygulanmış ve GST enziminin aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Sonuç olarak karaciğer dokusu GST enzim aktivitesinin azaldığı ve serum GST enzimi aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir (Çetinkaya vd. 1993).

Antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA) bitkisi, *Thonningia sanguinea*'dan izole edilmiş ve *in vitro* şartlarda karaciğer sitozolik GST enzimiyle etkileştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu bu bitkinin GST enzimi üzerinde çok güçlü inhibisyon etkisi yaptığı belirlenmiştir (Gyamfi *et al.* 2004).

Ağır metal zehirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada Cd^{+2} ile Mn^{+2} metal iyonları sıçan karaciğer GST enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. $CdCl_2$ (2,5 mg/kg) veya $MnCl_2$ (2,0 mg/kg) miktarları tek doz halinde uygulandığında, bir gün

sonra enzim aktivitesinde %36 oranında artış gözlenmiştir (Casalino *et al.* 2004).

Ağır metaller doğrudan sudan alınabildiği gibi dolaylı olarak balıklar, omurgasızlar ya da bitkisel besinlerden de alınabilmektedir. Akuatik ortamda serbest halde bulunan metaller, balıklarda fizyolojik sorunlara yol açabilir ve balıkların kan parametrelerine de etki edebilirler. Genellikle ağır metaller balıkları negatif yönde etkileyip oksidatif strese sebep olur ve çoğunlukla balık ölümüyle sonuçlanır (Çelik 2006).

Yapılan bazı çalışmalarda diyetteki MeHg'nin %23'e yakını inorganik cıva (Hg) olarak , balıklar tarafından emilir. dört aylık diyetle 5 ve 10 ppm MeHg içeren besinlerle beslenen balıkların kaslarında sırasıyla 1.1 ve 1.3 ppm düzeylerinde MeHg biriktiği tespit edilmiştir. Atlantik somonları için eşik toksik düzeyleri diyetle 0,5 ppm MeHg biriktiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmaya göre Et kafalı Golyan balıkları, yumurtlama parametrelerinde MeHg eşik düzeyinin 0,88 ppm'den küçük olduğu görülmüştür (Coppock and Nation 2007; Pillay and Kutty 2005).

MeHg'nin hem hayvan hücrelerinde hem de hücre kültürü sistemlerinde GSH'yi bağladığını gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da gösteriyor ki MeHg maruziyeti GSH tükenmesine neden olmaktadır. MeHg, GSH ile etkileşime girerek, dışarı atılabilen GSH-MeHg kompleksi oluşturur. Ayrıca GSH ve sentezi ile ilgili enzimler MeHg'nin neden olduğu gelişimsel nörotoksisitenin önemli hedefleridir (Khan *et al.* 2012; Stringari *et al.* 2008; Franco *et al.* 2006).

Sıçan böbrek dokusu üzerine yapılan bir çalışmada cıva ve bileşiklerin böbrekler için oldukça toksik olup nekroza sebep olduğu belirtilmiştir (İbrahim *et al.* 2018).

Atrazine pestisiti üzerine yapılan çalışmalar sonucu şu bilgilere ulaşılmış; oral orta öldürücü dozun (LD₅₀) atrazin için 3090 mg / kg olduğu , sıçanlarda 1750 mg / kg , farelerde de, 750 mg / kg tavşanhamsterlarda ve 1000 mg / kg. dermal LD₅₀ tavşanlarda 7500 mg / kg ve farelerde daha büyük 3000 mg / kg'dır. 1 saat

inhalasyon LC₅₀ daha büyük 0.7 mg / sıçan L. 4 saatlik inhalasyon LC₅₀ 5.2 mg / L, sıçanlarda. Maksimum kirletici düzeyi 0.003 mg / L, ve referans dozu 0.035 mg / kg / gündür. (pmep.cce.cornell.edu)

Ölümöl konsantrasyon (LC₅₀), belirli bir süre boyunca kendisine maruz bırakılan deney hayvanlarının yarısını öldüren havadaki veya sudaki bir kimyasal maddenin konsantrasyonudur. Sıçanlarda metomil için LD₅₀ 12-48 mg/kg, farelerde 10 mg/kg ve gine domuzlarında 15 mg/kg'dır. Tavşan derisine uygulandığında dermal LD₅₀, 5.880 mg/kg'dır. Erkek sıçanlar için inhalasyon LC₅₀ 0.3 mg / litredir. (Berg 1986) (pmep.cce.cornell.edu).

Anyon değişimi kromatografisi yöntemi kullanılarak Kefal balığının karaciğer dokusundan GST enzimin 14 izoformu saf elde edilmiştir. Saflaştırılan dimerik yapıdaki enzim izoformlarının her birinin molekül kütlesi 23 kDa ve 28 kDa olarak belirlenmiştir (Martinez-Lara *et al.* 1997).

Flavonoidlerin GST enzimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada GST enzimi, Holştayn (siyah alaca sığır) karaciğerinden hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde Sepharose 4B-L-tirozin-9- naftilamin jeli kullanılmıştır. Enzimin saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile sağlanmıştır. Holştayn GST (hGST) enziminin Km ve Vmax değerleri, 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile glutatyon (GSH) substratları kullanılarak Linewear-Burk yöntemine göre tespit edilmiştir. Bu değerler GSH için sırasıyla 1,11 mM, 3,06 EÜ/ mL; CDNB için 1,34 mM, 1,89 EÜ/ mL olarak belirlenmiştir. GST izoenzimi olan hGST 'nin de aktivitesindeki değişim de gözlenmiştir. IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak en güçlü inhibitör 2,1 mM IC₅₀ değeri ile 4'-(4-nitrofeniltiyoürenil)-6-hidroksi-apigenidin olarak saptanmıştır (Aksoy 2018).

Özaslan (2014) yaptığı tez çalışmasında; Van gölünden almış olduğu İnci Kefali balığının karaciğer dokusundan GST enzimini saflaştırmış ve elde ettiği enzimin aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin yaptığı etkiyi incelemiştir. Saflaştırma işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta homojenat hazırlanmış ikinci basamakta ise glutatyon agaroz afinite kromatografisi uygulanmıştır. %37,36

verimle 316,11 kat saflaştırılmış olan enzimin 29,304 EÜ/mg protein spesifik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Habig metoduna göre ve 340 nm’de Enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 62,35 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi SDS-PAGE ile sırasıyla 28 kDa ve 33,8 kDa olarak bulunmuştur. Enzim için optimum pH Tris/HCl tamponunda pH 7,8, optimum iyonik şiddet 100 mMTris/HCl, optimum sıcaklık 30°C olarak stabil pH ise fosfat tamponunda pH 5,5 olarak bulunmuştur. Ayrıca CDNB için K_M sabiti 0,891 mM ve V_{max} değeri 1,245 EÜ/ml olarak; GSH için ise, K_M sabiti 0,060 mM ve V_{max} değeri 0,562 EÜ/ml olarak tespit edilmiştir. Uygulanan Ag^+ , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Co^{+2} metal iyonları inhibisyon etkisi göstermiş ve bu iyonların Lineweaver-Burk grafikleri çizilip K_i değerleri sabitleri hesaplanmıştır. K_i sabitleri Ag^+ için $1,96 \pm 0,69 \mu M$, Cd^{+2} için $0,117 \pm 0,031$ mM, Cu^{+2} için $0,049 \pm 0,009$ mM, Co^{+2} için $0,893 \pm 0,3$ mM, olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden Ag^+ iyonunun inhibisyon tipinin yarışmasız olduğu, Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının inhibisyon tipinin yarışmalı olduğu belirlenmiştir.

İnci Kefali balığı üzerine yapılan başka bir çalışmaya göre Van Gölü havzasından alınan balıklar üzerine metil paration (MP) pestisitinin akut ve kronik toksik etkileri incelenmiştir. Akut denemede, 6.45-15.00 mg/L arasında 9 farklı MP konsantrasyonu uygulanmış olup MP’nin bütün konsantrasyonlarında balıklarda davranış bozuklukları gözlenmiştir. 13.50 mg/L konsantrasyonun uygulanmasından sonra ilk ölüm gerçekleşmiştir. MP’nin 4.28 mg/L konsantrasyonunda karaciğer hücrelerinde yağ birikimi, damarlarda genişleme ve genellikle damar etrafında lokal nekroz, sarı damlalar ve eozinofilik hücre gruplarının varlığı gözlenmiştir. Solungaç yapılarında primer lamella epitelinde kalınlaşma ve sekonder lamellerin uç kısmında kıvrılma ve epitel tabakada kopmalar belirlenmiştir. Ovaryumlarda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmazken testislerde kanlanmalar, özellikle mitotik safhadaki üreme hücrelerinde bozulmalar, folikül lümeninde genişleme gözlenirken mitotik safhaya girmeyen testiste intersititiyal dokuda eozinofilik hücre gruplarının varlığı gözlenmiştir. Karaciğer ve kas dokusunda asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin değişmediği bununla birlikte beyin dokusunda azaldığı ($P < 0.05$), butirilkolinesteraz (BChE) aktivitesinin ölçülen dokularda değişmediği belirlenmiştir. Bazı morfolojik, histolojik, hematolojik ve biyokimyasal kriterler baz alındığında

MP'nun inci kefali için akut ve kronik toksik bir madde olduğu belirlenmiştir (Kankaya 2008).

Yapılan bir çalışmaya göre farklı sıcaklıklardaki suların uygulanmış olduğu pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında çörek otu yağının GST enziminin aktivitesi, MDA seviyesi ve GSH seviyesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 20°C, 24°C ve 28°C sıcaklıklardaki sularda bekletilen balıkların yemlerine çörek otu yağı 10 mg/kg yem olacak şekilde verilmiştir. 24°C sıcaklıktaki tutulan balıklar kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 10 gün boyunca yapılan çalışma sonunda balıkların karaciğer ile böbrek dokularından numuneler alınıp incelenmiştir. Yapılan işlemler sonucunda 20°C ile 28°C'de bulunan balıklarda MDA düzeyinin önemli oranda artış gösterdiği GSH düzeyi ve GST aktivitesinde de azalma olduğu belirlenmiştir. Çörek otu yağının uygulaması MDA düzeyinde istatistiksel olarak yüksek düzeyde azalma ve GSH düzeyi ile GST aktivitesinde ise yüksek oranda artma belirlenmiştir. Bu sonuçlar çörek otu yağının balıklardaki sıcaklık farklılıklarından ötürü oluşan strese karşı antioksidan görevi görebileceğini göstermiştir (Yonar 2017).

E. Coli ekstraktları üzerine yapılan bir çalışmada glutatyon S-transferaz enzimi %7,5 verim ile 2300 kat olarak saflaştırılmıştır. İki eş alt biriminden oluşan enzimin Molekül ağırlığı 45 kDa olarak belirlenmiştir. CDNB substratının K_M değeri 1,43 mM ve GSH substratının K_M değeri 0,33 mM; Enzime ait optimum (pH 7,0), optimum sıcaklık 50°C ve stabil pH 5-11 aralığında bulunmuştur (Iizuka *et al.* 1989).

Monopterus albus türü balık karaciğerinden glutatyon S-transferaz enzimi glutatyon-sepharoz-6B afinite kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Enzim 13,07 µmol/ mg protein spesifik aktivite ve %14 verim ile 300 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE yöntemiyle molekül ağırlığı tayin edilmiş ve her biri 26 kDa ağırlığında olan iki alt birimden oluşan (homodimer) olduğu belirlenmiştir. Enzim 7,0-7,5 aralığında optimum pH ve 45°C optimum sıcakta bulunmuştur. Yapılan kinetik çalışmalara göre GSH substratının K_M değerinin 0,20 mM ve V_{max} değerinin 7,57 µmol/mg protein; CDNB substratının K_M değerinin 0,28 mM V_{max} değerinin 15,68 µmol/mg protein olduğu tespit edilmiştir (Huang *et al.* 2008).

GST enzim ailesi böceklerin insektisitlerden ve pestisitlerden korunmalarında ve detoksifikasyonda önemli bir göreve sahiptir (Yu 2004). İnsektisit maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan toksik etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla pekçok böcekte GST enzim aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Vontas *et al.* 2001). GSH molekülü ve GST enzimi, ROS'un konjugasyonu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu ile oksidatif zararın önlenmesinde (Singh *et al.* 2001), konukçu bitkilerden salınan allelokimyasalların (Yu 1993) metabolik detoksifikasyonunda, ROS'un toksik etkisinden böcekleri korumada (Vontas *et al.* 2001), aynı zamanda prostaglandinlerin ve bazı hormonların biyosentezinde (Kanaoka *et al.* 2000), hücre içi iyon kanallarının düzenlenmesinde önemli role sahiptirler (Dulhunty *et al.* 2001).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanmış olduğumuz; Glutasyon-Agaroz, GSH (indirgenmiş glutasyon), CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen), protein ölçüm reaktifleri ve elektroforez için kullanılan kimyasallardan standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), β -merkaptotanol, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-150 Sigma Chemical Company'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, sodyum klorür, hidroklorik asit, amonyum persülfat, sodyum azotür, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E. Merck AG'den temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Çözeltileri hazırlamak için saf su ve deiyonize su kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. kullanılan aletlerle cihazlar

Alet ve Cihazlar	Markası
Santrifüj	ThermoSL 16R
Spektrofotometre	SHIMADZU (UV-1800)
pH Metre	İnoLab pH-
Meter CG840 Elektroforez tankı	Consort EV265
Peristaltik pompa	GILSON
Karıştırıcı (Shaker)	COMBI-Shaker
Karıştırıcı (Vorteks)	WiseMix
Çalkalayıcı	İsoLab
Hassas terazi	OHAUS pioneer

Magnetik karıştırıcı	BioCote
Saf su cihazı	Ultra Pure (Typ1) Water
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac3000
Eppendorf Otomatik Pipetler	(1x10),Sigma(ABD)
Corporation EC Buzdolapları	Arçelik
Derindondurucu (-20°C)	Arçelik

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.1.3.a. GST enzim aktivitesini ölçmek için kullanılan çözeltiler

1. 0,5 M KH_2PO_4 (pH=7,4) 13,61 g KH_2PO_4 (0,1 mol) tartılıp 180 ml saf suyun içinde çözülüp pH=7,4'e ayarlandı. Hacim saf suyla 200 ml 'ye tamamlandı.
2. 20 mM GSH çözeltisi: 122,9 mg indirgenmiş glutatyon(GSH) (04 mmol) alınarak bir miktar saf suyun içinde çözüldü ve hacmi suyla 20 ml ye tamamlandı.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi 101,3 mg 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (0,5 mmol) alınarak bir miktar etanolde (%95 'lik) çözüldü ve hacmi etanol ile 20 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Homojenatın hazırlanması için kullanılan çözelti

50mM Tris-HCl (pH: 7, 4) Tamponu: 0, 3g Tris 40 ml suda çözüldü daha sonra pH 7,4'e ayarlanarak ve hacmi saf suyla 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

Dengeleme Çözeltisi: Kolonun dengelenmesi ve paketlenmesi için kullanılan tampondur. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, pH=7,4 0,4g KH_2PO_4 (3 mmol) ve 2,61g NaCl (45 mmol) alınıp 250 ml su içerisinde çözülüp pH=7,4' e getirildi ve toplam hacim destile suyla 300 ml'ye tamamlandı.

Yıkama tamponu: Numune kolona tatbik edildikten sonra afinite kolonunun

yıkınması amacıyla kullanılan tampondur. 10 mM KH_2PO_4 /0,1M KCl, pH=8,0 1,36 g KH_2PO_4 (0,01 mol) ve 7,45 g KCl (0,1 mol) karışımın hacmi destile suyla 800 ml'ye tamamlayıp pH=5,0'e ayarlanarak toplam hacim destile suyla 1L 'ye tamamlandı.

Elüsyon çözeltisi: 50mM Tris-HCl Çözeltisi, pH=9,5: 9,082 g Tris (74mmol) alınarak 1,450L saf suda çözüldü, pH=9,5'e ayarlandı ve toplam hacim destile suyla 1,5 L'ye tamamlandı. Hazırlanmış olan 50 mM Tris-HCl çözeltisinden 20 ml alıp içine 0,01229 g GSH (glutatyon) ilave edilerek hazırlandı.

Rejenere-1 çözeltisi (Borat tamponu): Afinite kolonun rejenerasyonunda kullanılır. 0,1M H_3BO_3 ve 0,5 M NaCl, pH=8,5 0,31 g H_3BO_3 (5 mmol ve 1,46 g NaCl (25 mmol) alınarak 40 ml saf suda çözüldü, pH= 8,5'e ayarlanarak hacmi destile suyla 50 ml'ye tamamlandı.

Rejenere-2 çözeltisi (Asetat tamponu): Afinite kolonun rejenerasyonu için kullanılır. 0,1 M NaCH_3COO ve 0,5 M NaCl, pH=4,5 0,41 g NaCH_3COO (5 mmol) ve 1,46 g NaCl (25 mmol) alınarak 40 ml saf suda çözüldü ve pH=4,5 'e ayarlanarak hacmi destile suyla 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.4. Protein tayininde (Bradford yöntemiyle) kullanılan çözelti

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: %95 'lik etanol içerisinde 100 mg CoommassieBrillant Blue G-250 reaktifi çözülüp %95 'lik 100 ml H_3PO_4 eklenerek hacmi saf suyla 1L'ye tamamlandı.

3.1.5. Elektroforezde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1.1M Tris-HCl: 24,22 g Tris (0,2 mol) alınıp 160 ml'lik saf suyun içinde çözülerek pH=8,8'e ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 200 ml'ye tamamlandı.

2. 1M Tris-HCl: 24,22 g Tris (0,2 mol) alınıp 160 ml saf suyun içinde

özölerek pH=6,8'e ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 200 ml'ye tamamlandı.

3. % 30 akrilamid, % 0,8 bisakrilamid çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid, 69,2 ml saf su içinde çözölerek toplam hacim saf suyla 50 ml'ye tamamlandı.

4. % 10'luk SDS özeltisi: 1g sodyum dodesil sülfat 9 ml saf su içerisinde özölüp hacmi saf suyla 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat 9 ml saf suda çözölerek hazırlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g tris (12,5 mmol) ve 7,51g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml eklenip pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1M Tris-HCl (pH=6,8'den) 0,65 ml, % 10'luk SDS'den 1ml %100'lük gliserinden 1ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile toplam hacim 10 ml'ye tamamlandı.

8. Sabitleştirme özeltisi: Jel üzerinde yürütölen proteinleri sabitlemek için %50 izopropanol, % 40 su ve % 10 TCA içeren bir karışım hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 100 ml etanol, 80 ml saf su ve 20 ml asetik asit içerisinde 0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250 özölerek hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 100 ml metanol, 80 ml saf su ve 20 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Glutasyon S-transferaz (GST) enziminin aktivite tayini

Bir çok başka substrat kullanılabilse de, aromatik elektrofil CDNB, GST enzim aktivitesini belirlemek için en sık kullanılanlardan biridir. Bu alt-tabaka, dinitrobenzen, S-glutasyon (DNB-SG) kullanımı ile elde edilen ürün, 340 nm 'de en yüksek absorbansı gösterir. Buna göre aktivite ölçümleri 340 nm dalga boyundaki absorbans artışı kullanılarak gerçekleştirildi (Comakli *et al.* 2015).

CDNB, GSH'ın olmadığı ortamda glutasyon S-transferazı hızlı bir şekilde inaktive eder. Bundan dolayı reaksiyon CDNB ile başlatılır. Aktivite ölçümü yapmak amacıyla Çizelge 3.2. da verildiği gibi hacmi 1ml olan çözelti hazırlandı. Küvetler spektrofotometreye yerleştirildi ve sonuçlar okundu. Kronometre kullanılarak başlangıç ve her bir dakikada birkez olmak üzere üç dakika boyunca absorbansları ölçüldü ve kayıtlar alındı (Habig *et al.* 1974).

Çizelge 3.2. GST enziminin aktivitesini ölçmek için kullanılan prosedür

Küvet İçeriği	Kör	Numune
0,5 M aktivite tamponu	200 µl	200 µl
25 mM CDNB	20 µl	20 µl
20 mM GSH	50 µl	50 µl
Su	730 µl	710 µl
Enzim	-	20 µl

$$E\ddot{U} = (\Delta OD / 9,6) \times (V_T / V_E) \times SF$$

EÜ: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: Absorbansın 1 dk'daki değişimi

9,6: 340 nm'de 1 mM DNB-SG'nin ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümü yapılan küvetin toplam hacmi

V_E : Ölçümü yapılan küvete eklenen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

Enzim ünitesi yukarıdaki formülle hesaplandı.

3.2.2. Protein Tayini

3.2.2.a. Kalitatif Protein Tayin Yöntemi

Bu yöntem, proteinin yapısındaki triptofan ve triozin aminoasitlerinin 280 nm'de en yüksek absorbensı göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işleminde eşit hacimde alınmış olan her bir fraksiyonda kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler içerisine alınan fraksiyonların absorbens değerleri spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2.b. Bradford Tayin Yöntemi

Bu yöntemle afinite kromatografisiyle saflaştırılmış olan enzim ve homojenattaki protein miktarları bulundu. Bu yöntemin esası Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanmasıdır. Oluşan kompleksin 595 nm'de en yüksek absorbensına bakılır. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı gerçekleşir. Protein ile boyadan oluşan kompleksin çözeltilerde uzun süre kalması büyük bir avantajdır. Bu yöntem 1-100 µg arasında hassasiyet gösterir (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür izlendi; 1ml'sinde 1 mg protein içeren standart homojenat çözeltisi tüplere sırası ile 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl olacak şekilde konuldu. Tüplerin hacimleri saf suyla 100 µl'ye tamamlandı. Tüplere 4,9 ml renklendirici eklendi ve vorteks ile birlikte karıştırıldı. İnkübasyonda 10 dakika bekletilmesinin ardından 595 nm'de 2 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbens değerlerine bakıldı. Karışımın içinde 4,9 ml renklendirici ve kör olarak 100 µl saf su vardı ve absorbens değerlerine denk olan mg protein değerleri, standart grafik olarak çizildi. Numune çalışmaları için, 10 kat seyreltilmiş böbrek

homojenatı ve afinite kromatografisinden elüe edilen saflaştırılmış enzim çözeltilerinden aynı şekilde tüpler hazırlandı. Vorteks ile karıştırılan tüpler 10 dakikalığına inkübasyona bırakıldı. Absorbans değerleri 595 nm'de okundu. 3 defa tekrarlanan bu işlemde 3 farklı ölçüm elde edilmiş ve bu ölçümlerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Protein miktarları standart grafik sayesinde belirlendi.

3.2.3. İnci Kefali Balığı böbrek dokusundan GST enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması

Van gölünden temin edilen İnci Kefali balığı soğuk zincir kurallarına göre Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirildi ve -80 °C'de donduruldu. Dondurulmuş balık böbreği, sıvı nitrojenle dolu amortar içinde toz haline getirildi ve toz, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA ve 1 mM fenilmetilsülfonil fluorür (PMSF) içeren 50 mM tris HCl (pH: 7,5) içinde süspanse edildi. Homojenat 1 saat süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve daha sonra çökelti çıkarıldı (Comakli *et al.* 2015). Böylece homojenat oluştu. Bu işlemlerin tümü yaklaşık +4°C de gerçekleştirildi.

3.2.3.b. Afinite Jelinin Hazırlanması

Enzim saflaştırmada afinite kromatografisi yöntemi kullanıldı. Glutasyon-agaroz jeli 1 gram tartılarak safsızlıkları uzaklaştırmak için 200 ml saf su ile birkaç kez yıkandı. Yıkama sırasında jel şişirilmiştir oldu. Hazırlanan jel, 1x10 cm'lik kolona yüklendi. Jelin çöküşü ile birlikte peristaltik pompa ve dengeleme tamponuyla dengelendi. Elüat ve tamponun 280 nm'de absorbans edilmesinden ya da pH'larının eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu farkedildi. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu (Güvercin *et al.* 2008; Toribio *et al.* 1996).

3.2.3.c. Enzimin glutatyon-agaroz kolunu ile saflaştırılması

Hazırlanan homojenat hazırlanmış olan glutatyon-agaroz afinite kolonuna doğrudan uygulandı. Ardından kolon, içerisinde 10 mM KH_2PO_4 ve 0.1M KCl (pH: 8.0) geçirilerek yıkandı. Yıkama prosedürü, eşit kör absorbans değerleri vasıtasıyla bir spektrofotometre üzerinde izlendi. Kolon stabilize edildikten sonra, enzim gradientli yıkama ile saflaştırılmıştır. Elüsyon solventi, 50 mM tris HCl ve 1.25-10 mM GSH (pH: 9.5) bulunduğu bir solvent gradyandan hazırlandı. Elüsyonlar 1,5 ml tüplere aktarıldı ve aktiviteleri, 340 nm'de absorbans artışı izlenerek ölçüldü. Bir peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 20 ml/s olarak ayarlandı. Saflaştırma işlemi $+4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi (Comakli *et al.* 2015)

3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

Saflaştırılan enzimin saflık derecesinin kontrol edilmesi amacıyla % 3-15 kesikli SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metodu dikkate alınarak uygulandı (Laemmli 1970). İlk olarak elektroforez plakaları yıkandı. Düz bir plaka ile kenarlarda aralık oluşturmayı sağlayacak bir plaka üst üste koyularak kısıkaçlar ile sabitleştirildi. Bu plakalar sızdırma önleyici sünger içeren jel hazırlama kabinine yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra enjektör yardımı ile iki plakanın arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Jelin donması için iki saat beklendikten sonra ayırma jelinin katılığı kontrol edilip yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan jel üst bölgedeki boşluğu dolduracak şekilde koyuldu ve örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması amacı ile tarak yerleştirildi. Kuyucukların oluşması için jelin katılaşması beklenirken kurumanın önlenmesi amacıyla ıslak süzgeç kağıdı ile sistemin üstü kapatıldı. Katılaşmanın ardından tarak yavaş ve dikkatli şekilde çıkartıldı. Kuyucuklara eklenecek hacim 50 μL olacak şekilde enzim örneği ile bire bir oranda önceden hazırlanmış olan örnek tamponu eklendi. İnkübasyon için üç dakika sıcak su banyosunda bekletildi.

Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu doldurulduktan sonra enzim örnekleri ve standart proteinler numune kuyucuklarına yüklendi.

Elektroforez tankı kapatıldıktan sonra alt kısmından (+) anot, üst kısmından da (-) katot yerleştirildi. İlk olarak 80 voltta 30 dakika örneğin yürümesi beklendikten sonra örnek ayırma jeline kadar ulaştı. Bu aşamanın ardından gerilim 120 volt'a yükseltilerek örneklerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütülmesi sürdürüldü. Örneklerin jel üzerindeki ilerlemesi örnek tamponuna ilave edilmiş olan brom timol mavisi ile sağlandı. Örneklerin yürütülmesi tamamlandıktan sonra akım kesildi ve plakalar arasındaki jel yavaş ve dikkatlice çıkarıldı. Jel, sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra boyama çözeltisi içerisinde çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Jelin boyanmasından sonra boyama çözeltisinden çıkarılıp yıkama çözeltisine koyuldu. Protein bantları belirginleşip, rengi açılana kadar yıkanan jel, çalkalayıcıdan çıkartıldı ve fotoğrafı çekildi.

Yığma jeli: 5 ml 1M Tris-HCl (pH:8,8), 4,4 ml %30'luk akrilamid %0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su ile karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

Ayırma jeli: 0,41 ml 1M Tris-HCl (pH:6,8), 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2,45 ml saf su ile karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

3.2.5. İnci Kefali Balığı Böbrek dokusundan saflaştırılan GST enzimiyle ilgili yapılan karakterizasyon çalışması (molekül ağırlığının SDS-PAGE ile tayini)

Molekül ağırlığı tayini Laemmli (1970) metoduna göre yapıldı. Standart protein olarak, 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 15 kDa,'lık proteinler kullanıldı. İnci Kefali balığı böbrek dokusu için elektroforez işlemleri uygulandı. Standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanıp R_f-logM_A grafiği, çizildi. Saflaştırılmış olan GST enziminin R_f değeri hesaplandı ve bu değerler standart grafikte yerine konularak log M_A belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunenin molekül ağırlığı tespit edildi. Proteinlerin R_f değerleri şu formülün

kullanılmasıyla belirlendi;

$$R_f = X_e / X_{boya}$$

X_e = Proteinin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.6. Kinetik Çalışmalar (GSH ile CDNB Substratlarının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması)

GSH ile CDNB substratlarının K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver ve Burk(1934) eğrileri ile hesaplandı. Etkinlikler CDNB'nin sabit bir konsantrasyonu ile beş farklı GSH konsantrasyonlarda test edildi ve aynı deneyler de sabit bir GSH konsantrasyonunda, beş farklı CDNB konsantrasyonlarında yapıldı. (Lineweaver and Burk at al. 1934)

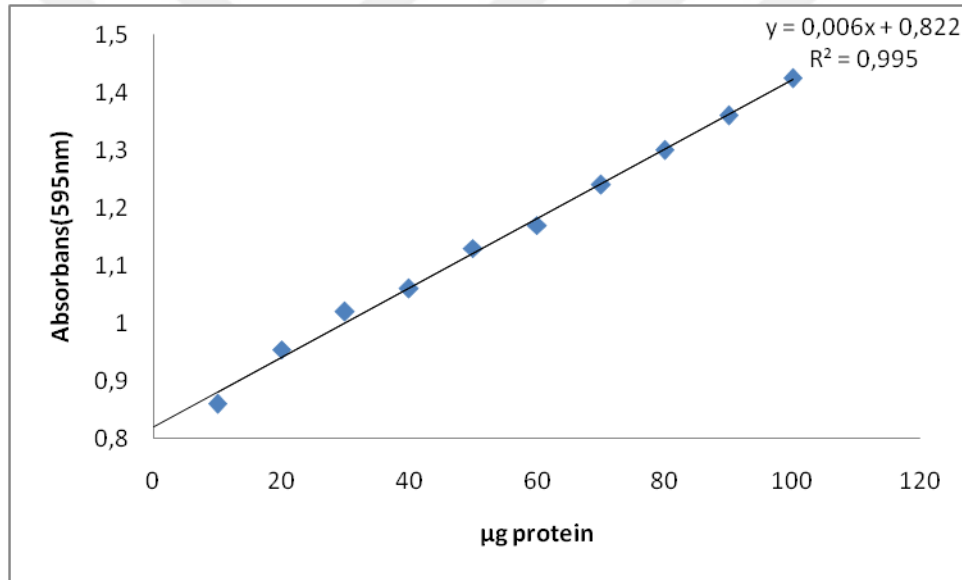
3.2.7. Kimyasalların *in vitro* etkileri

Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , metil cıva, İnci Kefali balığı böbrek dokusu GST enziminin aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için çalışıldı. Deneyler Fe^{3+} (2 μ M- 30 μ M), Cr^{+3} (0,1 mM-5 mM), Zn^{+2} (0.05 mM- 0,25mM), Cu^{+2} (1 μ M- 3.5 μ M), Mg^{+2} (10 μ M- 60 μ mM) ve metil cıva (10 nM-67 nM) konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. Kullanılan pestisitlerden methomyl (1-5 nM), atrazine (2,3-17 μ M), diniconazole (0,9-2,8 μ M) konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. İnhibisyon olmayan koşuldaki aktivite değeri %100 olarak kabul edildi ve inhibitör bulunan ortamlarda aktiviteler bağıl yüzde olarak belirlendi. İnhibitör konsantrasyonuna karşı gelen aktivite yüzdelерinin grafikleri çizildi. Enzim aktivitesinin yarıya indiğı inhibitör konsantrasyonları (IC_{50} değeri) hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Bradford metoduna göre çözeltiler için kantitatif protein tayini yapıldı ve standart grafik (Şekil 4.1.) oluşturuldu. Hazırlanmış olan enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayinleri çizilmiş olan standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekilde (4.1.) gösterildi.



Şekil 4.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusu GST Enziminin Saflaştırılmasının Sonuçları

4.2.1. Afinite Kromatografisi Sonuçları

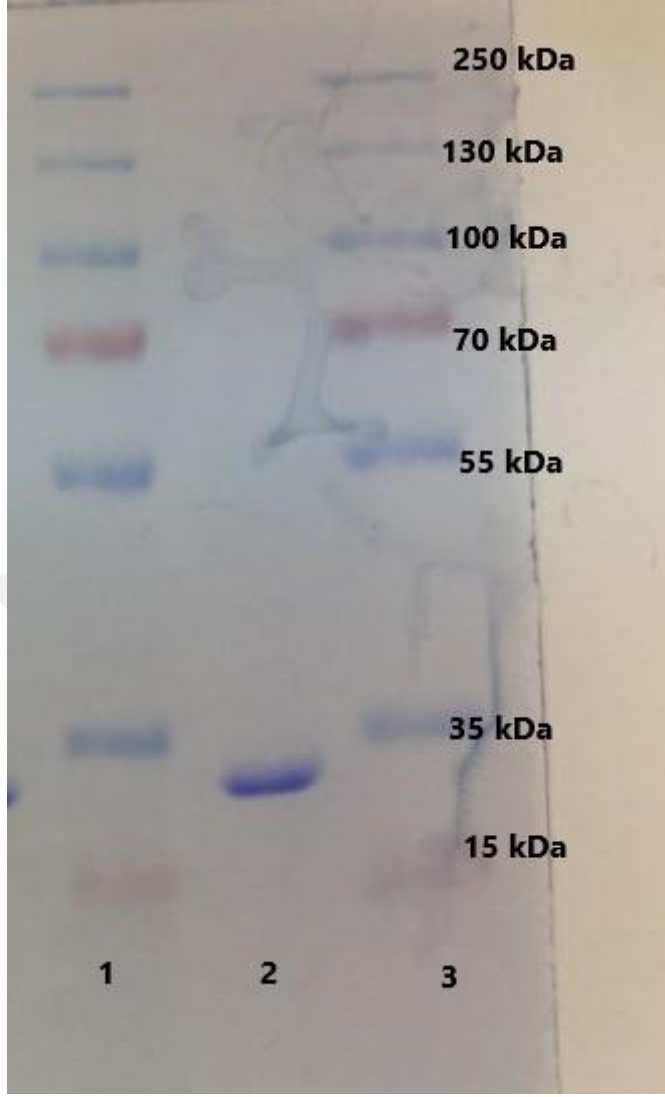
Hazırlanan homojenat süzülüp afinite kolonuna tatbik edildi. Kolon uygun tamponla yıkandıktan sonra çözelti elüsyonu yapıldı. Elüatlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Elüatlarda 340 nm'de enzim absorbansları ölçüldü.

Çizelge 4.1. İnci kefali balığının böbrek dokusundan GST enziminin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	22	0,121	1,46	32,12	2,662	0,0828	100	1
Afinite	3	0,799	0,0233	0,086	2,397	27,8	89	335

4.3. SDS-PAGE Yöntemiyle GST Enziminin Saflık Kontrolü

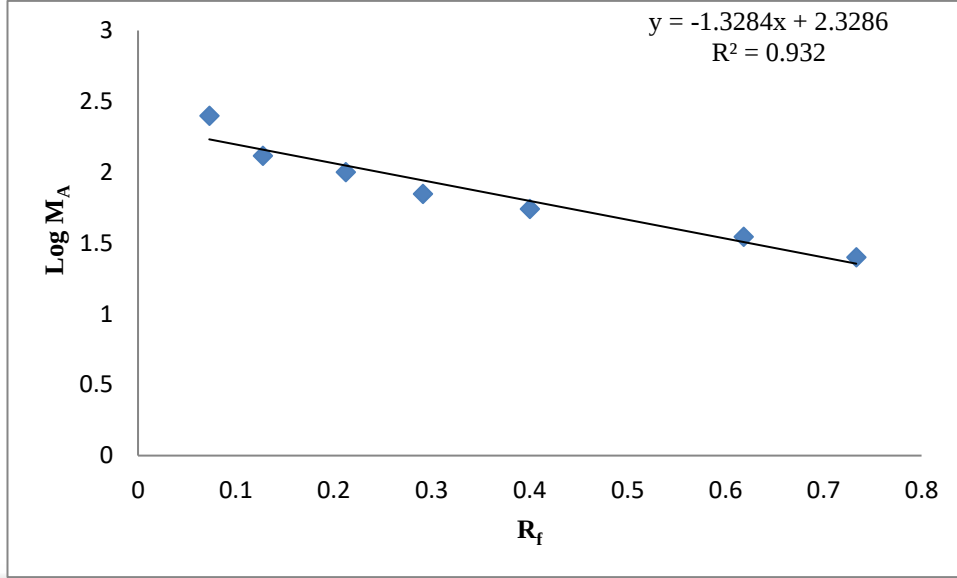
Afinite kromatografisi ile alınmış olan elüatlarda bulunan GST enziminin saflık kontrolünde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Yapılan işlem 3.2.4. bölümde anlatılanlara uygun bir şekilde yapıldı. Anlatılmış olan elektroforez sistemi kurularak enzim örnekleri sırayla kuyucuklara konuldu ve yürütme işlemi yapıldı. Sonuç olarak ortaya çıkan bantların fotoğrafları alınıp şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Afinite kromotografisiyle saflaştırılmış olan GST enziminin SDS-PAGE yöntemiyle saflığının kontrolü. 1. ve 3. kuyular standart proteinler 2. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen GST enzimine aittir.

4.4. İnci Kefali Balığı Böbrek Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları (SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesi)

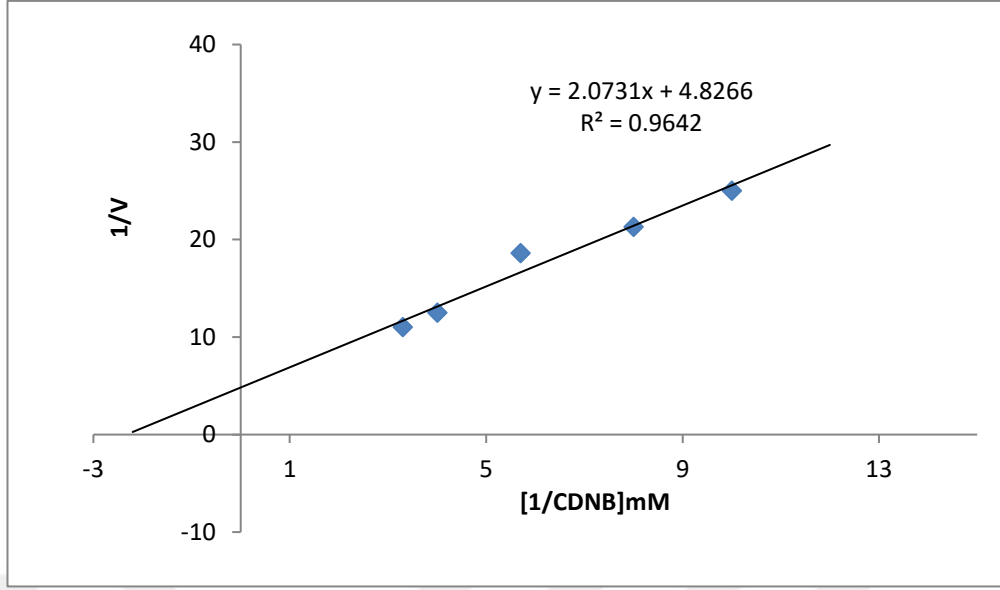
Afinite kolonundan alınmış olan enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.2.) Standart proteinlerle enzimin jeldeki yürüme mesafeler ölçüldü ve Rf değerleri hesaplandı. Rf değerleri-log MA grafiği çizildi (Şekil 4.3.) Molekül ağırlığı 28 kDa kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.3. SDS-PAGE sonucu çizilen R_f- log M_A grafiği

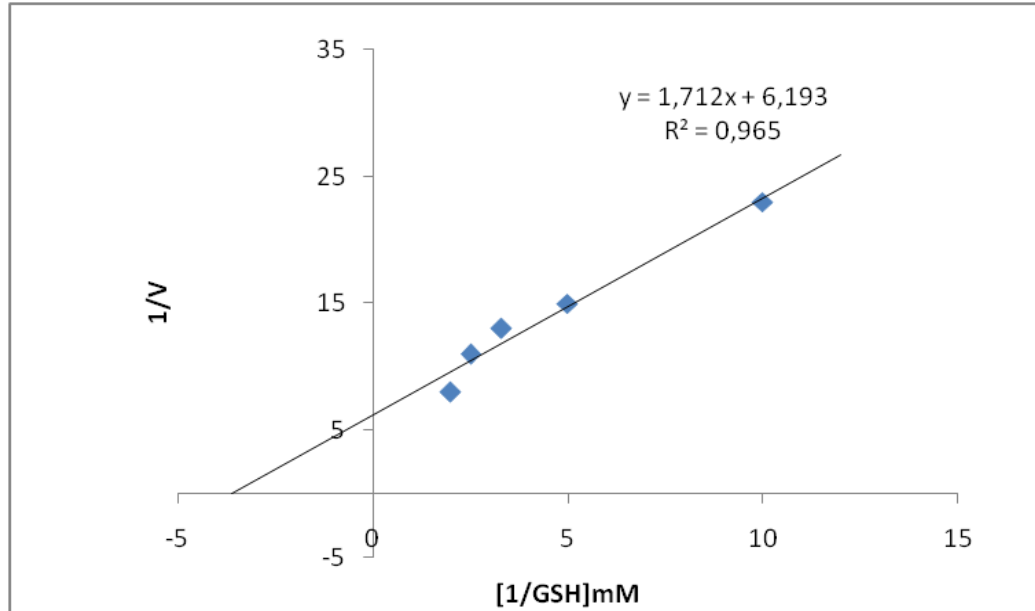
4.5. İnci Kefali Balığının Böbrek Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin GSH ve CDNB Substratlarına Ait K_M ve V_{max} Değerlerini Belirleme Çalışma Sonuçları

Saflaştırmış olduğumuz GST enziminin GSH ile CDNB substratları nın K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla 1mM'lık sabit GSH konsantrasyonuna karşılık 5 ayrı CDNB konsantrasyonunun aktivitesi ölçüldü. Elde edilen değerler ile 1/[CDNB]-1/V Lineweaver–Burk grafiği çizildi. Bu grafikten faydalananarak CDNB'nin K_M ile V_{max} değerleri belirlendi.



Şekil 4.4. GST enzimiyle 1 mM sabit GSH konsantrasyonuna karşı CDNB'nin K_M ve V_{max} değerlerinin grafiği.

0,5 mM'lık CDNB konsantrasyonuna karşılık da 5 farklı GSH konsantrasyonun aktivitesi ölçüldü ve alınan değerlere göre $1/[GSH]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve GSH'nin K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.



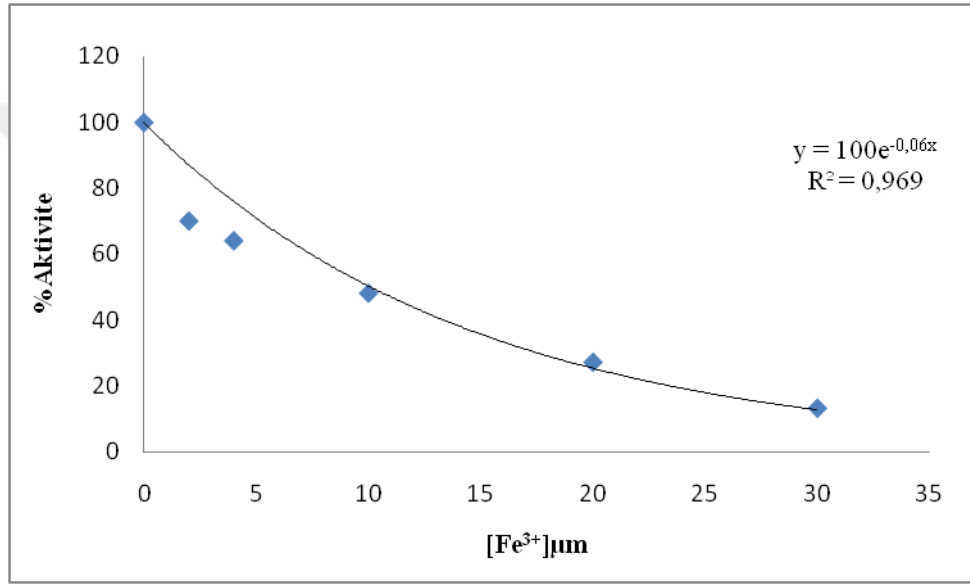
Şekil 4.5. GST enzimiyle 0,5mM sabit CDNB konsantrasyonuna karşı GSH'nin K_M ve V_{max} değerlerinin grafiği

Çizelge 4.2. İnci Kefali balığı böbrek dokusundan saflaştırılan GST enziminin GSH ile CDNB substratlarına ait K_M ve V_{max} değerlerinin kinetik çalışmaları

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
GSH	0,429 mM	0,207 EU/ml
CDNB	0,276 mM	0,161 EU/ml

Çizelge 4.3. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Fe^{+3} metal iyonunun inhibisyon etkisi

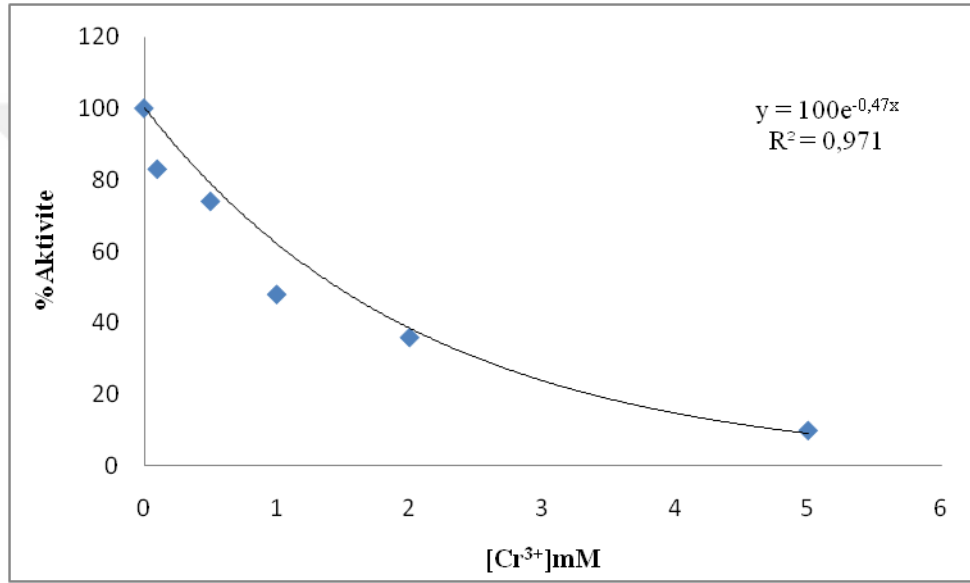
Konsantrasyon (μM)	0,000	2	4	10	20	30
% Aktivite	100	70	64	48	27	13



Şekil 4.6. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Fe^{+3} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafiği

Çizelge 4.4. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Cr^{+3} metal iyonunun inhibisyon etkisi

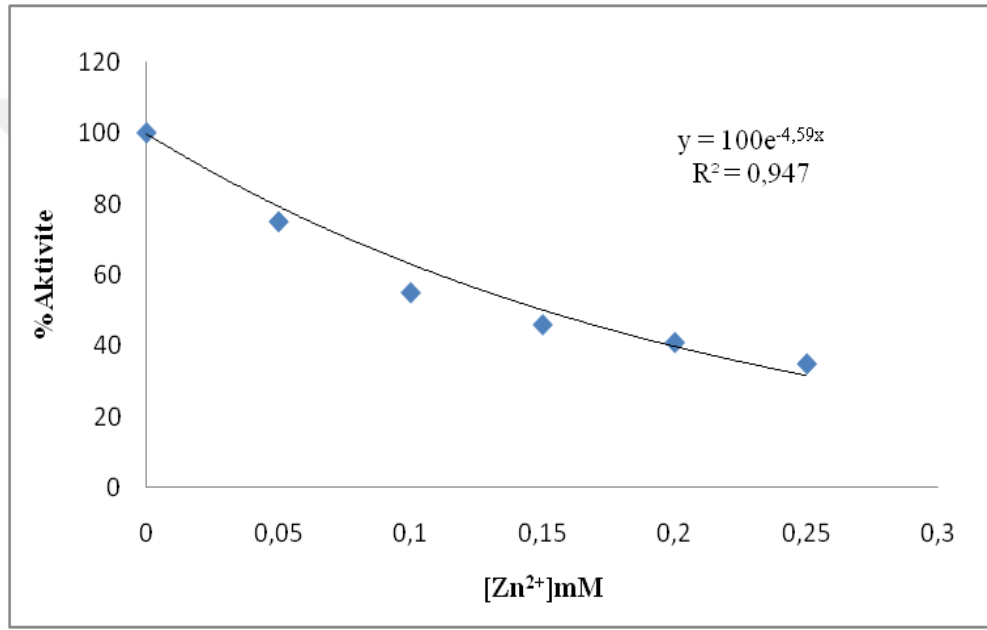
Konsantrasyon (mM) Cr^{+3}	0,000	0,1	0,5	1	2	5
% Aktivite	100	83	74	48	36	10



Şekil 4.7. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Cr^{+3} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.5. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Zn^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisi.

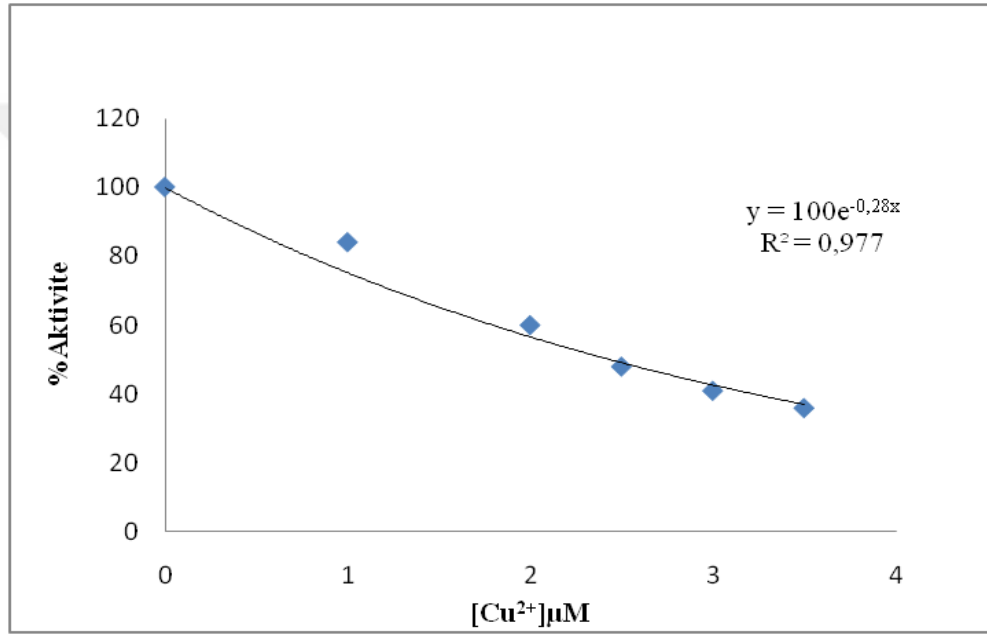
Konsantrasyon (mM)	0,000	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
% Aktivite	100	75	55	46	41	35



Şekil 4.8. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Zn^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.

Çizelge 4.6. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Cu^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisi.

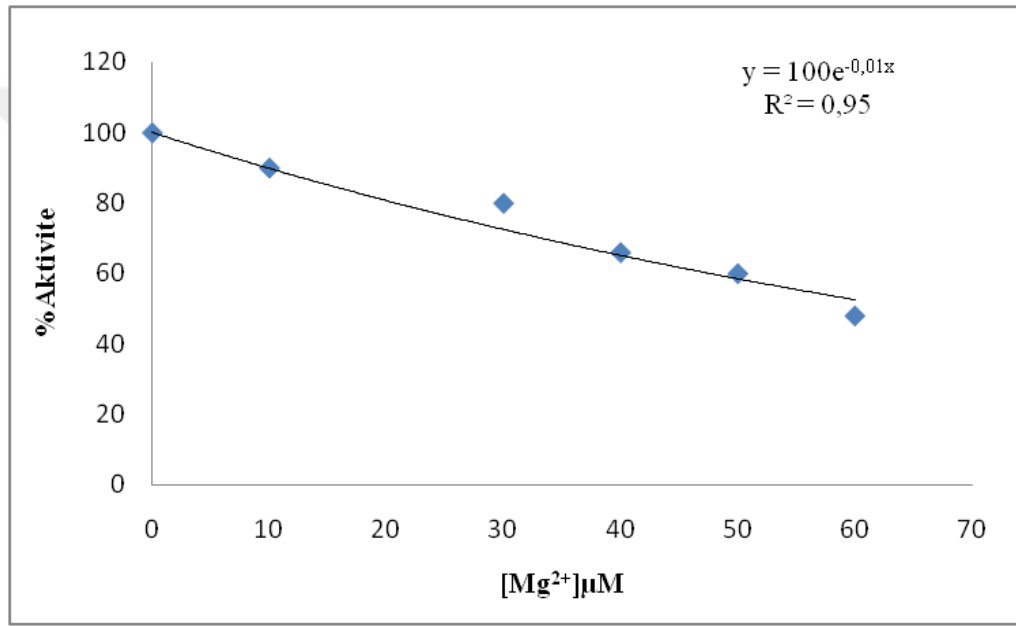
Konsantrasyon (μM) Cu^{+2}	0,000	1	2	2,5	3	3,5
% Aktivite	100	84	60	48	41	36



Şekil 4.9. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Cu^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.

Çizelge 4.7. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Mg^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisi.

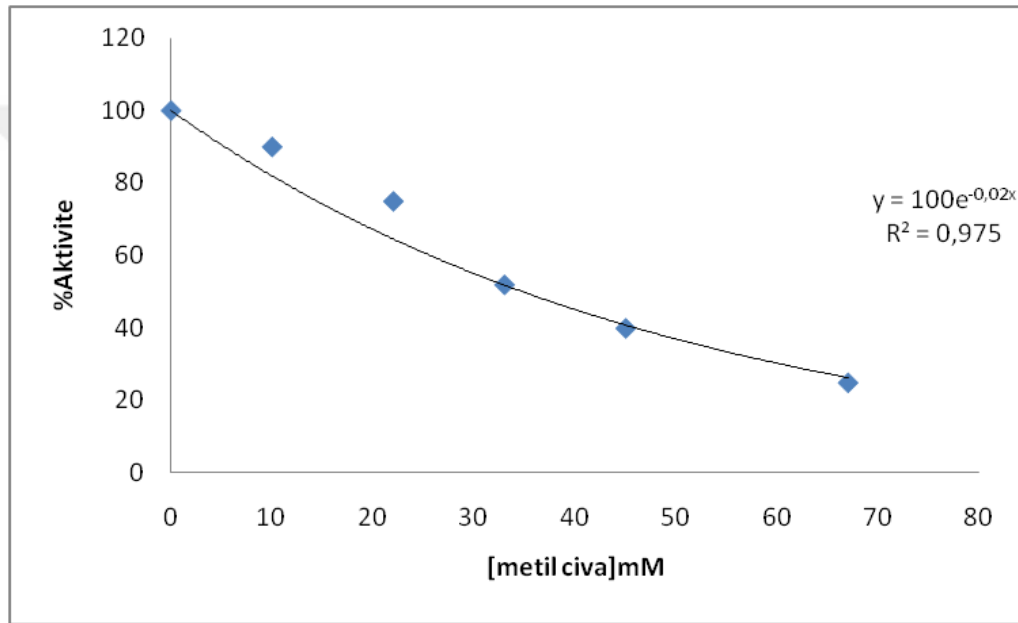
Konsantrasyon (μM)	0,000	10	30	40	50	60
% Aktivite	100	90	80	66	60	48



Şekil 4.10. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Mg^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.8. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine Metil Cıvanın inhibisyon etkisi.

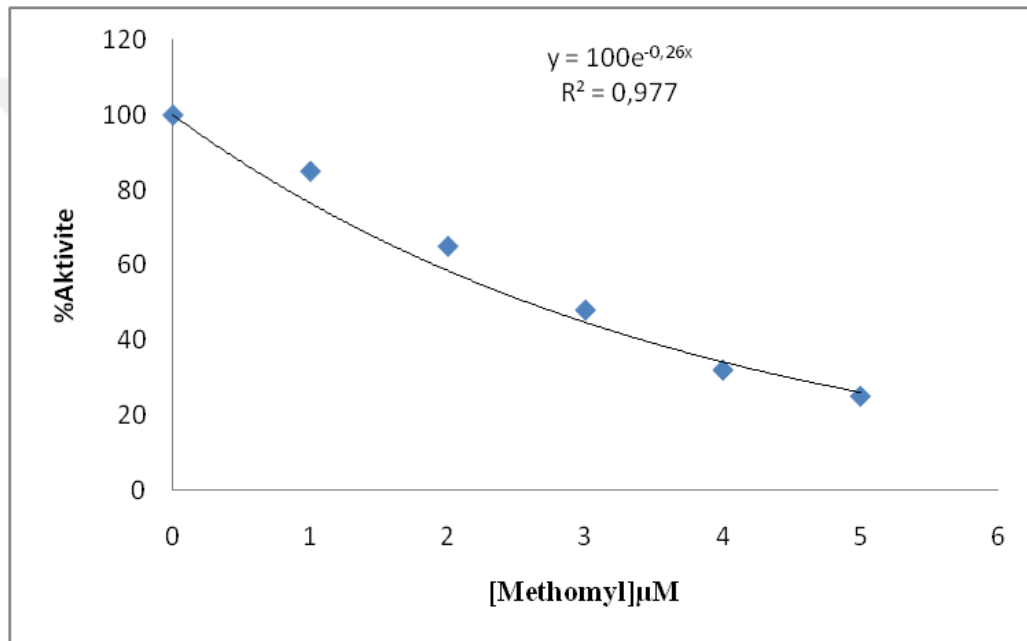
Konsantrasyon (mM)	0,000	10	22	33	45	67
% Aktivite	100	90	75	52	40	25



Şekil 4.11. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine metil cıvanın inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.9. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine methomyl pestisitinin inhibisyon etkisi.

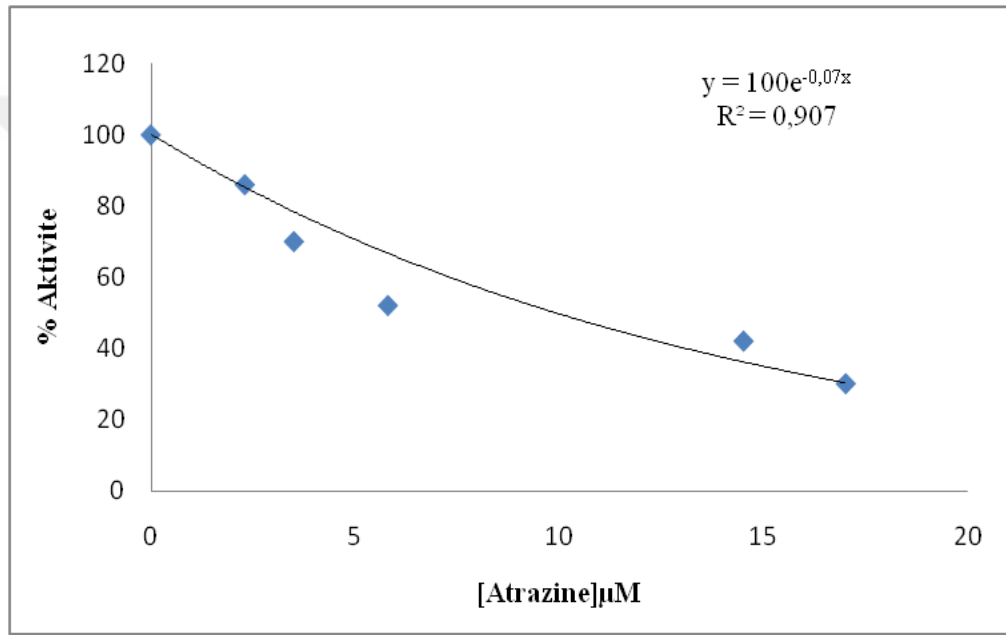
Konsantrasyon (µM)	0,000	1	2	3	4	5
% Aktivite	100	85	65	48	32	25



Şekil 4.12. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine methomyl pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.10. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine atrazine pestisitinin inhibisyon etkisi.

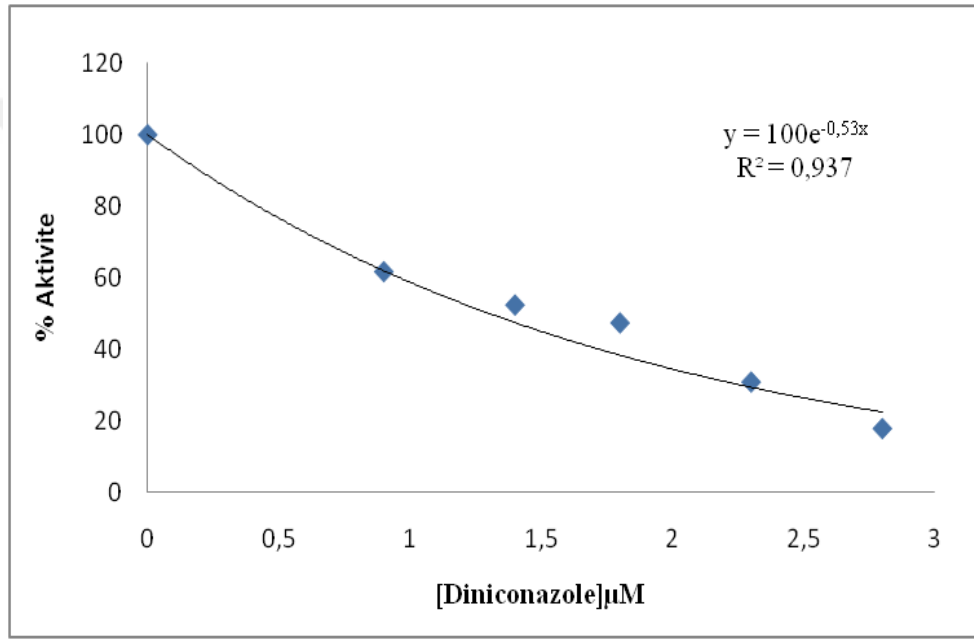
Konsantrasyon (µM)	0,000	2,3	3,5	5,8	14,5	17
% Aktivite	100	86	70	52	42	30



Şekil 4.13. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine atrazine pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.11. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine diniconazole pestisitinininhibisyon etkisi.

Konsantrasyon (µM)	0,000	0,9	1,4	1,8	2,3	2,8
% Aktivite	100	61,8	52,6	47,5	31	18



Şekil 4.14. İnci Kefali balığının böbrek dokusu GST enzimi üzerine diniconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.12. GST enzimi için metal iyonları ve pestisit inhibitörlerine ait IC₅₀ değerleri

İnhibitör	IC₅₀
Cu⁺²	2,4 µM
Cr⁺³	1,5 µM
Zn⁺²	0,15 mM
Fe⁺³	10 µM
Mg⁺²	63 µM
Metil Cıva	34,5 mM
Atrazine	9,8 µM
Diniconazole	1,3 µM
Methomyl	2,67 µM

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde hızlı nüfus artışı ve teknolojik ilerlemeler çevre kirliliğinin en önemli nedenlerinden biri haline gelmiştir. Çevre kirliliğini oluşturan ağır metaller, kimyasal maddeler, pestisit ve insektisit gibi maddeler canlı vücuduna doğrudan veya dolaylı olarak toksik etki oluşturlar. Canlılar, kirleticilerin oluşturacakları toksik etkileri azaltmak için savunma sistemlerinde görev alabilecek birçok enzimi barındırmaktadırlar. Bunların en önemlileri ksenobiyotiklerin detoksifiyesinden sorumlu enzimlerinden biri olan Glutatyon S- Transferaz (GST) enzimidir.

GST enzimi dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin veya canlı metabolizması sırasında oksidasyonla oluşan ürünlerin, canlıların yaşamsal fonksiyonunu gerçekleştiren biyomoleküllerle etkileşimini önler hücre yapısına zarar vermeden atılımını gerçekleştirir (Hayes *et al.* 2005).

Canlılar için hayati fonksiyona sahip olan GST enzimi ilk kez sıçan karaciğerinde tanımlanmış olup sonrasında fare, insan ve sığırların değişik dokularından saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Both *et al.* 1961; Boyland and Chasseaud 1969).

Bu çalışmada, hemen hemen tüm canlı organizmalarda yaygın bir şekilde bulunan ve birçok metabolik olayda hayati önem taşıyan Glutatyon S-Transferaz enzimi endemik bir tür olan İnci Kefali balığının böbrek dokusundan afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılıp bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı ağır metaller ile bazı pestisitlerin enzimin aktivitesi üzerine yaptıkları inhibisyon etkileri araştırıldı.

Bu araştırma amacıyla Van gölünden alınan balıklar soğuk zincir kuralına uygun bir şekilde Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilerek böbrek dokuları alınıp (Comakli *et al* 2015)' in uyguladığı prosedüre göre homojenatın hazırlanması ve afine kromatografisi olmak üzere iki safhada gerçekleştirildi. Homojenizasyon yöntemlerinden en etkili olan sıvı azotla

parçalama yöntemi uygulandı. Parçalanmış doku uygun bir tampon içerisine alınarak 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda çöken hücresel atıklar atılıp süzüntü kısmı glutatyon-agarozafinite kolonuna yüklenerek saflaştırıldı. Glutatyon-agarozafinite jeli ile enzimlerin yüksek verim ve katsayı ile aktivite kaybetmeden kısa sürede saflaştırma avantajlarından dolayı çalışmada bu afinite yöntemi kullanıldı. Uyguladığımız saflaştırma prosedürü sayesinde enzimi 5-6 saat süre içerisinde 27,8 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip % 89 verimle 335 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1). Afinite kolonundan elde edilen enzimin saflığının kontrolü SDS-PAGE ile kontrol edilerek tek bant gözlemlendi (Şekil 4.2.) Standart proteinler ve saflaştırılan enzimin jelde yürüme mesafeleri hesaplanarak R_f -log MA grafiği çizilerek enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 28 kDa olduğu belirlendi. GST enziminin farklı kaynaklardan elde edilen molekül ağırlıklarının belirlediğimiz molekül ağırlığı ile uyumlu olduğu görülmektedir (Riol *et al.* 2001; Novoa *et al.* 2004, Güvercin *et al.* 2008; Comakli *et al.* 2015).

Literatür araştırmalarına göre molekül kütlesinin belirlenmesi yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bazılarına göre; Gökkuşluğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi 23 kDa (homodimer) olarak belirlenmiştir (Riol *et al.* 2001). Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 32,21 kDa olarak hesaplanmıştır (Zariç 2017). Van Gölü Balığında yapılan başka bir çalışmaya göre ise karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin heterodimer olduğu bulunmuş ve alt birimlerinin R_f değeri 0,443 ve 0,539 olarak, molekül kütleleri ise yaklaşık 33,8 -28 kDa olarak hesaplanmıştır (Özaslan 2014).

Tez çalışmamızda İnci Kefali balığının böbrek dokusundan saflaştırılan GST enziminin substratları olan GSH ve CDNB'nin K_M ve V_{Max} değerleri belirlendi. Bunun için sabit CDNB konsantrasyonuna karşılık 5 farklı GSH aktivite değeri belirlendi. Linevaewer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten GSH substratı için K_M ve V_{Max} değerleri sırasıyla 0,429 mM ve 0,207 EU/ml olarak hesaplandı. CDNB substratı için de sabit GSH konsantrasyonuna karşılık 5 farklı CDNB konsantrasyonu belirlenip spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi belirlendi. Linevaewer-Burk grafiği çizildi

ve bu grafikten CDNB substratı için K_M ve V_{Max} değerleri sırasıyla 0,276 mM ve 0,161 EU/ml olarak hesaplandı. Enzim kinetik çalışmalarında enzimin substrata olan ilgisinin göstergesi olan K_M değeri CDNB de daha düşük olduğu için enzim bu substrataafinitesinin daha fazla olduğu belirlendi. Ancak, Çomaklı 2011'deki çalışmasında gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırdıkları GST enziminin substratları GSH ve CDNB için K_M değerlerini sırasıyla 0,0395 mM ve 0,2590 mM olarak belirlemişlerdir. Tilapya (*Oreochromis Niloticus*) balığı üzerine yapılan bir çalışmada balığın solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin kinetik çalışmalarında GST enziminin substratları olan GSH ve CDNB'nin K_M değerleri sırasıyla 0,35 mM ve 0,42 mM olarak belirleyerek (Hamed *et al.* 2004) enzimin GSH substratına daha fazla ilgili olduğu belirtilmiştir.

Doğal denge için zararlı olan kirleticiler (ağır metaller, pestisitler, organik kirleticiler..vs) farklı yollarla sucul ortamlara katılırlar. Bu kirleticiler doğrudan veya dolaylı olarak besin zinciri yolu ile canlıların yaşamsal fonksiyonunu olumsuz etkilemektedirler. Özellikle bu kirleticilerin en önemlilerinden olan ağır metaller protein yapısında olan enzimlerin –SH ve –OH gruplarına bağlanarak enzim aktivitelerinde azalmaya sebep olmaktadır (Kakkar and jaffery 2005; Parkin 2005). Bütün canlılar (insanlar, balıklar, bitkiler..vs) ağır metal ve pestisit gibi kirleticilere maruz kalmaya karşı oldukça duyarlıdır. Bu canlılar insanlar tarafından tüketildiğinde besin zinciri yolu ile organizmaya girerek biyobirikime neden olurlar. Bundan dolayıdır ki toksik maddelerin detoksifiye edilmesinde görev alan biyomoleküllerin bu kirleticilerden nasıl etkilendiğini anlamak oldukça önemlidir.

İnci kefali balığı böbrek dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin ve pestisitlerin inhibisyon etkileri incelendi. Bir inhibitörün, inhibisyon etkisini gösteren en önemli parametrelerden biri IC_{50} değeridir (Akyüz *et al.* 2004). IC_{50} değeri enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda metil civa, Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ve Mg^{2+} iyonları ile atrazine, diniconazole ve methomyl pestisitleri inhibisyon etkisi gösterdiği tesbit edildi. Bu kimyasalların IC_{50} değerlerini belirlemek için % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.6-4.14). Grafiklerdeki denklemler kullanılarak IC_{50}

değerleri hesaplandı. Metal iyonlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla şu şekildedir; Cu²⁺ iyonu 2,4µM, Cr³⁺ iyonu 1,5µM, Zn²⁺ iyonu 0,15mM, Fe³⁺ iyonu 10µM, Mg²⁺ iyonu 63µM, Metil cıva için 34,5mM; Pestisitlerin IC₅₀ değerleri ise methomyl 2,67 µM, atrazine 9,8 µM ve diniconazole 1,3µM olarak belirlendi. Belirlenen IC₅₀ değerleri bu kimyasallara çok düşük konsantrasyonuna maruz kalındığında bile biyomakromoleküller üzerine toksik etki gösterebileceği belirlendi.

Literatür araştırmalarına yapılan çalışmalarda ağır metallerin genel olarak enzimleri inhibe ettiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GR (glutatyonredüktaz) enzim aktivitesi üzerine Pb²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Fe³⁺ ve Al³⁺ metal iyonlarının inhibisyon etkisi araştırılmış ve bu iyonların enzimi 0,011mM ile 0,229 mM arasında IC₅₀ değeri ile inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (Çoban *et al.* 2007). Yapılan başka bir çalışmada kurşun, bakır, kobalt ağır metallerinin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi oluşturduğunu belirlemişlerdir (Ekinci *et al.* 2007).

Bu çalışmamızda detoksifikasyon reaksiyonları için oldukça önemli olan glutatyon S-transferaz enziminin önemli çevresel kirleticiler olan metal iyonlarının ve bazı pestisitlerin enzimi çok düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği sonucuna varıldı. Dolayısıyla inhibitörler için belirlenen IC₅₀ değerlerinin dikkate alınması metabolizmada hayati görevleri gerçekleştiren biyo-makromoleküller için önemli olacaktır.

Sonuç Olarak;

1. İnci Kefali (Van Gölü) Balığı böbrek dokusundan GST enziminin saflaştırılmasında glutatyon-agarozafinitekromatografisi yöntemi kullanılmış ve bu yöntemle enzim saf olarak elde edilmiş ve saflaştırma sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

2. Çalışma sonucunda İnci Kefali Balığı böbrek dokusundan GST enzimi %89 verimle 335 kat saflaştırılmış ve 0,0828 EÜ/mg protein spesifik aktivitesi belirlendi. Enzimin saflığı elektroforez yöntemiyle tek bant elde edilerek belirlendi.

3. İnci Kefali Balığı böbrek dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Metil civa, Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ve Mg^{2+} metal iyonları ile methomyl, atrazine ve diniconazole pestisitinin inhibisyon etkileri incelendi.

4. Metal iyonları ve pestisitler için IC_{50} değerleri hesaplandı. İnhibisyon çalışmaları sonucunda pestisitlerin ve metal iyonlarının düşük dozlarda bile GST enziminin aktiviteisini azalttıkları belirlendi.

5. Yapılan araştırmalara göre ağır metal ve pestisitlere maruz kalan canlıları tüketen insanların bile risk altında olduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla GST enziminin inhibisyonu ile ilgi yaptığımız bu çalışma literatüre araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

6. Ayrıca balıkların alınmış olduğu Türkiye'nin enbüyük ve sodalı gölü olan Van gölüne dökülen akarsuların, kentsel ve endüstriyel atık suların ağır metal ve pestisit yükleri bakımından analiz edilmesi, bu yükün kaynağının ortaya konularak azaltma veya önleme çarelerinin bulunması gereklidir.

7. Bu tez literatürdeki benzer çalışmalara uygun yapılmış ve sonuçları da literatüre uygun bulunmuştur. Tezimizin bir kısmı da ICANAS da sunulmuş ve bilimsel dergilerde yayınlanmıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için de iyi bir kaynak olması bekleniyor.

KAYNAKLAR

- Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarinet K, (2003) Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336.
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A, (2004) : Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
- Adem, Ş., 2006. İnsan eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adiloğlu S. , Sağlam M.T., Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi 2015: 12 (02)
- Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H., Ciftci M., 2012. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 34, 888-894.
- Aksoy A.S., 2018. Bazı Flavonoidlerin Sığır Karaciğer Glutatyon Stransferaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Akyuz, M., Erat, M., Ciftci, M., Gumustekin, K., Bakan, N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19:361–5.
- Al-Mustafa, A.H., 2006. In vitro Study Involving the Comparative Effect of Heavy Metal Ions on Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxide Levels in Human Erythrocytes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2, 9 (14), 2586-2592.
- Altun M. 2010, Van Gölü Balığından (*Chalcalburnus Tarichi*, P-1811) Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı İlaç Ve Kimyasal Maddelerin Etkilerinin Araştırılması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van.
- Andersson C., Soderstrom M., Mannervik B., *Biochem J.*, 1988, 249, 819-823.
- Anonim, 1993. Guidelines for Drinking-Water Quality. Second Edition. World Health Organization, Geneva. 260.

- Anonim, 2006. Bakır. <http://www.foodinfo.net/tr/min/copper.htm>.
- Arı, F., Dere ,E., C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi (2003)Cilt 24 Sayı 1
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10, (1) 2-18.
- Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of two glutathione S- aryltransferase activities from rat liver, *Biochem.J.* 147, 513.
- Autrup. H., 2000. Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Matebolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research*, 464,65-76
- Awasthi YC, Dao DD, Saneto RP. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human-liver. *Biochem J* 1980;191:1–10.
- Balkıs, N., Algan, O., (2005), Marmara Denizi yüzey sedimentlerinde metallerin birikimi ve denetleyen mekanizmalar. *Deniz Kirliliği*, 21, TÜDAV Yayınları, İstanbul.
- Belitz, H.D.,Grosch,W.,Schieberle. 2004. *Food Chemistry*. 3rd revised Edition.
- BenAmeur W., DeLapiente J., El Megdiche Y., BarhoumiB. , TrabelsiS. , CampsL., et al. *Mar. Pollut. Bull.* 2012, 64, 241–251.
- Berg G.L.1986. *Farm Chemicals Handbook*. Willoughby,OH: Meister publishing Company.
- Beydemir S., Demir Y.,J. *Biochem. Mol. Toxicol.* 2016, <https://doi.org/10.1002/jbt.21889>
- Board P.G, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermin LS, et al. 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275:24798–806
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P., 1961. *Biochem. J.*, 79, 516-524.
- Boyer, T.D., Kenney, W.C., 1985.Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes*. New York: John Wiley&Sons Inc., 297-363.

- Boyland, E. and Chasseaud, L.F., 1969. The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol.*, 32,173-219.
- Bradford 1976 (A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding MARION M. BRADFORD)
- Brando-Neto J, Stefan V, Berenice B, Mendonca M D, Bloise W, The essential role of zinc in growth. *Nutricion Research* 1995 ;15 (3): 335-358.
- Bucciarelli, T., Sacchetta P., Pennelli A., Cornelio L., Romagnoli R., Melino S., Petruzzelli R., Di Ilio C., 1999. Characterization of Toad liver Glutathione Transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1431, 189-198.
- Cabagna, M.C., 2011. Arch Environ Contam Toxicol, Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors, 60, 681–689.
- Cangul H, Broday L, Salnikow K, Sutherland J, Peng W , Zhang Q, Poltaratsky V, Yee H, Zoruddo M A, Costa M, Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Toxicology Letters* 2002,127,69-75.
- 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.
- 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, .J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Comakli, V., M. Ciftci, and O. I. Kufrevioglu. 2013. Effects of some metal ions on Rainbow Trout erythrocytes glutathione S-transferase enzyme: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28:1261–1266.

- Coppock, R.W., Nation, P.N. 2007. Aquatic Toxicology. p: 709-713. Ramsh C. Gupta [eds.], Veterinary Toxicology: Basic and Critical Principles, Elsevier.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D, (1987) : Oxygene radicals and human disease. Ann. Intern. Med., 107: 526-545.
- Cuatrecasas, P., Fuchs S. and Anfinsen C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology, 159, 417-419
- Çaylak, E. Sağlık Yüksekokulu, Biyokimya AD, Çankırı Karatekin Üniversitesi 18200, Çankırı/ TürkiyeTıp Araştırmaları Dergisi: 2011: 9 (1) : 73-83
- Çelik, E.S. (2006). The Effect of Heavy Metals on Fish Blood Parameters, (in Turkish). E.Ü. Su Ürünleri Derg., 23(1/1): 49-55.
- Çelik, E.Ş., (2006), Balıkların kan parametreleri üzerine ağır metallerin etkisi. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, 23: 49-55.
- Çetinkaya, S., Pınarbaşı, H., Pınarbaşı, E., Çetinkaya, Ö., Atalay, A., 1993. Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon S-transferaz aktiviteleri. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 15 (2).
- Çinkıloğlu E., Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Anabilim DalıÇukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007
- Çoban, T.A., Şenturk, M., Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. Prot. Peptide Letters 14,1027–1030.
- Çomaklı V., M. Çiftçi, Ö. İ. Küfrevioğlu / Hacettepe J. Biol. & Chem., 2011, 39 (4), 413–419
- Çomaklı, V., 2011. Glutatyon S-transferaz Enziminin Gökkuşaağı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. (Doktora Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.
- Çomaklı, V., Kuzu, M., Demirdağ, R.2015. Characterization and Purification of Glutathione S-Transferase from the Liver and Gill Tissues of Ağrı Balık Lake Trout *Salmo trutta labrax* and the Effects of Heavy Metal Ions on Its

- Activity. Journal of Aquatic Animal Health, 0899-7659 (Print) 1548-8667 (Online) Journal homepage: <http://afs.tandfonline.com/loi/uahh20>
- Çoşkun, G., 2007. Glutation-S-transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. Annals of Botany 91, 179-194.
- Das, J.; Ghosh, J.; Manna, P.; Sil, P.C. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. Biochem. Pharmacol. 2011, 81, 891–909.
- David, J.P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. The Anopheles gambiae detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 4080–4084.
- Demirdag, R., Yerlikaya, E., Kufrevioglu, O.I., Gundogdu, C., 2013. Purification of glutathione S-transferase isoenzymes from tumour and nontumour human stomach and inhibitory effects of some heavy metals on enzymes activities. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 28(5): 911-915.
- Demirdağ, R., E. Yerlikaya, M. Şentürk, Ö. İ. Küfrevioğlu, and C. T. Supuran. 2011. Heavy metal ion inhibition studies of human, sheep and fish carbonic
- Demirkol, O., Ercal, N. 2012. Glutathione, In: Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods, Editors: L.M.L. Nollet, F. Toldra, CRC Press, Taylor & Francis, 978-1- 4398-1588-5, pp.69-86.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione S-transferases. Genome Biology, 3(3) reviews 3004,1-3004,10.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babutb, M., Vaseural, P., 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in The Gills and The Digestive Gland of The Freshwater Bivalve Unio Tumidus. Aquatic Toxicology, 39: 93-110.
- Dökmeci, İ. 2001. Zehirler ve Zehirlenmeler, S: 249-692, İ.Dökmeci [eds.], Toksikoloji, 3. Baskı İstanbul: Nobel.

- Drog, F., 1997. Plant Glutathione S-Transferases, a Tale of Theta and Tau. *J. Plant Growth Regul.*, 16, 95-107.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. 2001 The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodinereceptorcalciumreleasechannelmodulator.*J. Biol.Chem.*276:3319–23
- Dural,M., Göksu,M.Z.L., Özak, A.A. 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry* 102: 415–421.
- Duyar, H.A., 2000. İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Kas ve Yumurtasının Kimyasal Kompozisyonu ve Kroket Yapımı Üzerine Bir Araştırma (doktora tezi, basılmamış). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology, *Toxicol. Sci.*, 49, (2) 156–64.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2006-2007. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin in vitro inhibisyon etkilerinin etkilenmesi. II. Afinite Teknikleri Kongresi, Zonguldak.
- Erat, M. and Şakiroğlu, H., 2013.The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes.*Journal of Enzyme İnhibition and Medicinal Chemistry*, 28, (4) 711-6.
- Eroglu A., Dogan Z., Kanak E. G. , Atli G., Canli M.,2015. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism, *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 22, Issue 5, pp 3229–3237
- Espinoza, H. M., C. R. Williams, and E. P. Gallagher. 2012. Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in Coho Salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquatic Toxicology* 110–111: 37–44.
- Falchuk K H, The molecular basis for the role of zinc in developmental Biology. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 188: 41-48.
- Falchuk K H, Zinc Transcription Factors in Cellular Differentiation and Organogenesis. *The journal of TraceElements in Experimental Medicine*

1998; 11: 89-102.

Franco, J.L.; Teixeira, A.; Meotti, F.C.; Ribas, C.M.; Stringari, J.; Garcia Pomblum, S.C., Moro, A.M., Bohrer, D., Bairo, A.V., Dafre, A.L., et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ. Res.* 2006, 102, 22–28. [CrossRef] [PubMed]

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.

Giordano, R., Arata, P., Rinaldi, S., Ciaralli, L., Giani, M., Rubbiani, M., Costantini, S., (1989), Mercury, cadmium and lead levels in marine organisms (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Italian coasts. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*, 25: 511-516.

Golombieski, J.I., Sutili, F.J., Salbego, J., Seben, D., Gressler, L.T., Arruda da Cunha, J., Gressler, L.T., Zanella, R., Vaucher, R.A., Marchesan, E. & Baldisserotto, B. 2016. Imazapyr imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128: 91-99.

Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul. 1225.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1997. *Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynaklar Dizisi No:52, İlköz Matbaası, Ankara.* 173.

Güvercin, S., 2008. Glutasyon S-transferaz Enziminin Sığır Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.

Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., 2004. Inhibition of glutathione S-transferases by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 42, (9) 1401-1418.

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 in 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.
- Hazarika, A., Sarkara, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185, 1–8.
- Hee-Joong, P., Hyun-Young, C. and Kwang-Hoon, K., 2005. Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 232-237.
- <http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>
- Hu, H., (2000), Exposure to metals. *Occupational and Environmental Medicine*, 27: 983-996.
- Kalay, M., Karataş, S., (1999), Kadmiyumun *Tilapia nilotica*'da kas, beyin ve kemik (omurga kemiği) dokularındaki birikimi. *Turkish Journal of Zoology*. 23: 985-991.
- 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. & 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.
- Ibrahim S., Noordin, Mustapha M., Abdullah R., Shazili M.A.N., 2018. Repeated Intravenous Mercury Chloride Administration Induces Regeneration And Biphasic Renal Damage In Rats. *The International Journal of Medicine and Sciences* 3 (1) 2018 : 18-23
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. And Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, 6039-6042.
- Jaiswal AK, Gonzalez FJ, Nebert DW. Human P1- 450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res.* 13: 4503-4520, 1985.

- Jorgensen SW (2012) Ecotoxicology: a derivative of encyclopedia of ecology". Academic Press, London, p 390 pp
- Joseph, P.D., 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology, Hum. Genomics Proteomics 876940.
- Kacar, B ve Katkat, V., 2006. Bitki Besleme. Nobel Yayın No:849.
- Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2003. Metallerin Çevresel Etkileri -I, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- Kakkar, P., Jaffery, F.N., 2005. Biological Markers for Metal Toxicity. 137 Environmental Toxicology and Pharmacology, 19,335-349.
- Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, et al. 1997. Cloning and crystal structure of haematopoietic prostaglandin D synthase. Cell 90:1085–95
- Kanat N., Coşansu Akdemir S., 2014. Bakterilerde glutatyon ve önemi ,Sakarya Üniversitesi, Pamukova Meslek Yüksekokulu ,Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, SAÜ. Fen Bil. Der. 18. Cilt, 2. Sayı, s. 111-117, 2014 SAU J. Sci. Vol 18, No 2, p. 111-117
- Kankaya E., 2008. Metil paration'un İnci Kefali (*Chalcaburnustarichipallas*, 1811) Üzerindeki Akut Ve Kronik Toksik Etkilerinin Belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü ,Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van..
- Kaya, S., Akar, F. 2002. Metaller, Diğer Organik Maddeler ve Radyoetkin Maddeler, s: 207-250. S.Kaya, İ.Pirinççi, A.Bilgili [eds.], Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2.baskı, Ankara:Medisan.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012.Biyokimya, Aktif yayınları, Erzurum.
- Kehrer JP, (1993) : Free radical as mediator of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol., 23: 21-48.
- Khan, H.; Khan, M.F.; Jan, S.U.; Mukhtiar, M.; Ullah, N.; Anwar, N. Role of glutathione in protection against mercury induced poisoning. Pak. J. Pharm. Sci. 2012, 25, 395–400. [PubMed]
- Kitchin KT: An enzymatic approach to biotransformation. Meth Find Exptl Clin Pharmacol 6: 303-310,1984.

- Koç, S., Alptekin D. ,Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Balcalı,ADANA Cukurova Medical Journal 2014;39(2): 256-261.
- Kolobe, D. and Sayed, Y., “Characterization of bromosulphophthalein binding to human glutathione S-transferase A1-1: thermodynamics and inhibition kinetics”, *Biochemical Journal*, 382(2), 703-709, (2004).
- Konukçuoğlu, D., Akçay, T., Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi T Klin Tıp Bilimleri 1995. 15: 214-218
- Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2012).
- Kruger, T., 2002. Effects of zinc, copper and cadmium on *Oreochromis mossambicus* freeembryos and randomly selected mosquito larvae as biological indicators during acute toxicity testing (MSc thesis, not published) Rand Afrikaans University, Faculty of Science, Johannesburg S.A.
- Kuchel,W.P.,Ralston,B.G. 1988. Theory and Problems of Biochemistry. Schaum’s Outline Series, McGraw-Hill Book Company, New York
- Kurutaş B., Kiliç M., Arşiv 2003. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi
- Ladner J.E., Parsons J.F., Rife C.L., Gilliland G.L., Armstrong R.N. 2004. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* 43:352–61
- 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.,
- Lajmanovich, R.C., Andre’s, M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C., 2011. Arch Environ Contam Toxicol, Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors, 60, 681–689.
- Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.*, 349, 474-485.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants.*J.Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Loscalzo, J. and Freedman, J., 1986. Purification and characterization of human platelet glutathione-S transferase From bloodjournal.hematologylibrary.org by guest on, (67) 1595-1599.

- Lushchak, O.K., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76, 932–937.
- Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem*. 2008; 107: 690-700.
- Martinez-Lara, E., George, S.G., Lopez-Barea, J., Barcena, J.A., 1997. Purification and characterization of multiple glutathione S transferase isoenzymes from grey mullet liver. *CMLS, Cell. mol. life sci.*, 53, 759–768.
- Mc Kee, T., McKee, JR. 2003. *Biochemistry: The molecular basis of life* (Third edition). The McGraw–Hill Companies, Inc. New York.
- Mercan, U. Yüzüncü yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, VAN YYU Vet Fak Derg. 2004, 15 (1-2):91-96
- Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, et al. 2004. The human glutathione transferase Kappa: gene and protein characterization and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem*. 279(16):16246–53
- Morgan A.S, Sanderson PE, Borch RF, Tew KD, Niitsu Y, et al. 1998. Tumor efficacy and bone marrow-sparing properties of TER286, a cytotoxin activated by glutathione S-transferase. *Cancer Res*. 58:2568–75
- Neuefeind, T., Reinemer, and Bieseler, B. Plant glutathione-S-transferase and herbicide detoxification, *Biol. Chem.*, 378: 199205, 1997
- Novoa- Valinas, M.C., Melgar- Riola, M.J., Perez-Lopez, M., 2004. Hepatic glutathione S-transferases from lamprey (*Petromyzon marinus*): Purification and Characterization *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 169-178
- Oakley, A., “Glutathione transferases: a structural perspective”, *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151, (2011).
- Özaslan M.S., 2014. Glutathione S-Transferase Enziminin Van Gölü Balığı (*Chalcalburnus tarichi*) Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi , Yüksek Lisans Tezi , Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özaslan, M.S., Demir, Y., Küfrevioğlu O. I., Çiftçi M., 2017. Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fish gills *J Biochem Mol Toxicol*.

2017;00: e21967.

- Özdem S.S, Sadan G, (1994) : Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg., 11: 63-71.
- Pabst, M., Habig, W.H. and Jakoby, W.B., 1973. Mercapturic acid formation: theseveral glutathione transferases of rat liver, Biochem. Biophys. Res. Commun, 52, 1123-1128.
- Piancini, L.D.S., Guiloski, I.C., Silva de Assis, H.C. & Cestari, M.M. 2015. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. Toxicology Reports, 2: 1157-1163
- Pillay, T. V. R., Kutty, M. N. (2005). Heath and Diseases, p: 201-245, T.V.R. Pillay ve M.N. Kutty [eds.], Aquaculture Principles and Practises, 2 nd ed. U.K: Blackwell Publishing.
- Piner, P., 2005. Fenthion içeren 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.
- Relyea, R.A., 2006. The impact of insecticides and herbicide on the biodiversity and productivity of aquatic communities: response. Ecol. Appl., 16, 2027–2034.
- 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 isolated hepatocytes: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 128, (2) p, 227-235.
- Rout, G.R. and Das, P., 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. Agronomie 23:3-11.
- 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.
- Sandstead H H, Zinc: Growth, Development, and Function. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2000; 13:41-49.
- Santos A.A. Ferrer B., Gonçalves F.M., Tsatsakis A.M., Renieri E.A., Skalny A.V.,

2018. Review Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Cell Toxicity
- Sarı, M., Küçüköner, E., Arabacı, M., 2004. Van Gölü İnci Kefalı'nın Endüstriyel Hammadde Olarak Değerlendirilebilme Olanaklarının Araştırılması. KOSGEB Sonuç Raporu. Van. 51.
- Sarybayev, M., 2013. Türk toplumunda GSTT1,GSTM1,GSTP1 ve CYP1A1 Gen Polimorfizmi ile Multiple Myelom Arasındaki Olası ilişki (Glutasyon S-Transferaz T1,M1,P1 VE Sitokrom P1A1). Uzmanlık Tezi Dr. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul
- Schröder, P., 2001. The role of glutathione and glutathione s- transferses in plant reaction and adaption to xenobiotics, Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment Plant Ecophysiology, 2, 155-183.
- Seçer, S., Bozkurt, Y. 2001. The Effect of Heavy Metals Toxicity of mercury to fish, (in Turkish). EKİN Derg., 18: 83-87.
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Sehgal, R. and Saxena, A.B., 1986. Toxicity of zinc to a viviparous fish *Lebistes reticulatus* (Peters). Bull. Environm.Contam.Toxicol., 36, 888-894.
- Sheehan, J., Templer, M., Gregory, M., Hanumanthaiah, R., Troyer, D., Phan, T., Thankavel, B., and Jagadeeswaran, P., 2001. Demonstration of the extrinsic coagulation pathway in teleostei: Identification of zebrafish coagulation factor VII., Proc. Natl. Acad. Sci., 98, (15), 8768-8773.
- Singh, W. N. and Singh J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic poperties. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 32, 39–49.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Erzurum.
- Strange R.C., Spiter M.A.,Sudershan R.,Antony A Fryer.2001. Glutathione S-transferase family of enzymes. Mutation Research, Fundamental and Moleculer Mechanesis482(1-2),21-26.
- Stringari, J.; Nunes, A.K.; Franco, J.L.; Bohrer, D.; Garcia, S.C.; Dafre, A.L.; Milatovic, D.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.; Aschner, M.; et al. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis

- and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 227, 147–154. [CrossRef] [PubMed]
- Şekerci, A. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Androjenik Uzmanlık Tezi Sivas, 2015
- T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi Temmuz 2015
- Tatsuta, N., Murata, K., Iwai-Shimada, M., Yaginuma-Sakurai, K., Satoh, H., Nakai, K. Psychomotor ability in children prenatally exposed to methylmercury: The 18-month follow-up of Tohoku study of child development. *Tohoku J. Exp. Med.* 2017, 242, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
- Tekeli H. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı VBY-YL-2012-0001 Aydın, 2012
- TE-TA LTD. ŞTİ, Magnezyum, manyezit ve magnezyum bileşikleri. Türkiye sınai kalkınma Bankası yayınları, kimya sektörü araştırması, Yayın no: Kimya 2 1979, Ankara.
- Toribio, F., E. Martínez-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
- Toxicol.*, 21, (6):614-620.
- Toxicologie. Cheime und Gesundheit*, ISBNB. 3–527–26–455–8
- Trends in Pharmacological Sciences* December 2012, Vol. 33, No. 12
- Türkanoglu, A., 2007. Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University. Ankara.
- Türkoğlu M., 2008, Van Gölünden Alınan Su, Sediment Ve Inci Kefali (Chalcalburnus Tarichi, Pallas 1811) Örneklerinde Bazı Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması ,Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, 45 sayfa
- Van Vleet, T.R., Schnellmann, 2003. Toxic nephropathy: Environmental chemicals. *Seminars in Nephrology*, 23: 500-508.
- Vontas, J.G. Hemingway J. Glutathione S-Transferases As Antioxidant Defence

- Agents Confer Pyrethroid Resistance In *Nilaparvata lugens*, Biochemical Journal, 2001, 357(1) 65-72
- Wang, L.; Zhang, S.; Cheng, H.; Lv, H.; Cheng, G.; Ci, X. Nrf2-mediated liver protection by esculetin against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway. Free Radic. Biol. Med. 2016, 101, 401–412. [CrossRef] [PubMed]
- Whalen R, Boyer T.D. Human Glutathione S-Transferases. Sem Liver Dis 1998; Vol.18, No.4.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases, Biochim. Biophys. Acta. 1205: 1-18, 1994
- www.diyetce.com/beslenme/vitaminler/magnezyum1.html
- 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, E., 2000. Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve Kullanılan İlaçlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 219, Erzurum. 344.
- Yonar S.M., 2017. Farklı Su Sıcaklıklarında Tutulan Pullu Sazan (*Cyprinus carpio*)’da çörek otu (*Nigella arvensis*) yağının oksidatif stres ve bazı antioksidan parametrelere etkisi, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, (23119), Türk Tarım – Gıda Bilim ve teknoloji dergisi, 5(9): 1038-1043
- Yonar S.M., Yonar M.E., Yöntürk Y., 2014, Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)’nda Curcuminin Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisi, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye. serpilmise@gmail.com (Geliş/Received: 05.07.2013; Kabul/Accepted: 14.02.2014)
- 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.
- Zareba, G., Cernichiari, E., Hojo, R., Nitt, S.M.; Weiss, B., Mumtaz, M.M., Jones, D.E., Clarkson, T.W. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: Comparison with methyl mercury. J. Appl. Toxicol. 2007, 27, 511–518. [CrossRef] [PubMed]

- 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-2018
- Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C. & 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.
- Zhang, K. and Das, N. P.,“Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases”, *Biochemical pharmacology*, 47(11), 2063-2068, (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayşe YILMAZ
Doğum Yeri ve Tarihi	HAMUR/01.11/1991
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi-Fen Edebiyet Fakültesi
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller	
Bilimsel Faaliyetler	ICANAS Bilim Kongresi
İş Deneyimi	
Stajlar	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi-Araştırma Laboratuvarı
Projeler	
Çalıştığı Kurumlar	
İletişim	
E-posta Adresi	ayseylmz_04@hotmail.com
Mezuniyet Tarihi	