



**SİRAZ (*Capoeta Umbla*)'IN KARACİĞER DOKUSUNDAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI KİMYASALLARIN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Galip DURAN
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ
AĞRI-2019
(Her hakkı saklıdır.)

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

Galip DURAN

**SİRAZ (*Capoeta Umbla*)'IN KARACİĞER DOKUSUNDAN GLUTATYON S-
TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

AĞRI-2019



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



TEZ ONAY FORMU

**SİRAZ (*Capoeta Umbla*)'IN KARACİĞER DOKUSUNDAN GLUTATYON
S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ danışmanlığında, Galip DURAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan : Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

İmza :

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Aykut ÖZTEKİN

İmza :

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Emrah YERLİKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİRAZ (*Capoeta Umbla*)'IN KARACİĞER DOKUSUNDAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Galip DURAN

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Ramazan DEMİRDAĞ

Glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzimi metabolizmadaki detoksifikasyonda önemli bir yer tutar. GST enzim aktivitesinin herhangi bir nedenle azalması detoksifikasyon mekanizmasının düşmesine neden olur. Bu tez çalışmasında GST enzimi Siraz Balığı karaciğer dokusundan afinite kromatografisi ile 36,1 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve %73,6 verim ile 55,70 kat saflaştırılabilmektedir. Saflaştırılan enzimin saflık derecesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 28,6 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH'sı 7,5, stabil pH'sı 6,5, optimum iyonik şiddeti 100 mM K-fosfat ve son olarak optimum sıcaklığı 35 °C olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra GSH substratı için K_M sabiti 0,168 mM ve V_{max} değeri 0,166 EÜ/ml, CDNB substratı için K_M sabiti 1,179 mM ve V_{max} değeri 0,979 EÜ/ml olarak hesaplandı. Son olarak Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzime Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} ve Pb^{+2} gibi metal iyonları ile esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole ve atrazine gibi pestisitlerin inhibisyon etkisi incelendi ve bu pestisit ile metal iyonlarının IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplandı.

2019, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Siraz Balığı, Siraz Balığı karaciğer, glutaton s-transferaz, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF GLUTATHION S-TRANSFERASE ENZYME FROM LIVER TISSUE OF SIRAZ (*Capoeta Umbla*) AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME CHEMICALS ON ENZYME ACTIVITY

Galip DURAN

Ibrahim Cecen University

Graduate School of Natural and Applied Science

Supervisor: Ramazan DEMİRDAĞ

Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) enzyme plays an important role in detoxification in metabolism. Decrease in GST enzyme activity for any reason causes detoxification mechanism to decrease. In this study, GST enzyme was purified by affinity chromatography from liver tissue of liver of Siraz fish by 55.16 times with 36.1 EU / mg protein specific activity and 73.6% yield. The purity of the purified enzyme was checked by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was calculated to be approximately 28,6 kDa. The optimum pH of the enzyme was 7.5, the stable pH was 6,5, the optimum ionic strength was 100 mM K-phosphate and finally the optimum temperature was 35 ° C. In addition, the K_M constant for the GSH substrate was 0.168 mM and the V_{max} constant was 0.166 EU / ml, the K_M constant for the CDNB substrate was 1.179 mM and the V_{max} constant was 0.979 EU / ml. Finally, the activity of inhibition of pesticides such as esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole, and atrazine was investigated with the metal ions such as Se^{2-} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , and Pb^{2+} on the GST enzyme purified from liver tissue from Siraz Fish and IC_{50} values and K_i constants were calculated.

2019, 87 pages

Keywords: Siraz Fish, Siraz Fish liver, glutaton s-transferase, inhibition

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı eşim ve kızım Asya'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

.../.../201...

Galip DURAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Glutasyon.....	8
1.3. Glutasyon S-Transferaz.....	9
1.4. Metal ve Pestisitlerin Çevresel Etkileri.....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	29
3.1.2. Kullanılan cihaz ve aletler.....	29
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanış şekilleri.....	30
3.1.3.1. Saflaştırılan enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.3.2. Dokulardan homojenat eldesinde kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.3.3. GST enzimi saflaştırılmasında afinite kolonuna uygulanan çözeltiler.....	30
3.1.3.4. Bradford metodu ile protein tayininde kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.3.5. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	31
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Protein Tayini.....	33

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini.....	33
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	33
3.2.2. Glutasyon s-transferaz enzim aktivite tayini.....	34
3.2.3. Siraz Balığı karaciğer dokusundan GST enziminin saflaştırılması....	35
3.2.3.a. Karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	35
3.2.3.b. Afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması.....	36
3.2.4. Enzim saflığının SDS-PAGE kullanılarak kontrolü.....	36
3.2.5. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin molekül kütesinin SDS-PAGE ile tayini.....	38
3.3. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi karakterizasyon uygulamaları.....	39
3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	39
3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	39
3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	39
3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	40
3.3.5. GST enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tespitine yönelik çalışmalar.....	40
3.3.6. Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} ve Pb^{+2} metal iyonları ile Esfenvalerate, Deltamethrin, Cypermethrin, Diniconazole ve Atrazine pestisitlerinin GST enziminin aktivitesüzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
4.1. Kalitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	41
4.2. Siraz Balığı Karaciğer Dokusu GST Enziminin Saflaştırılma İşlemleri İle İlgili Sonuçlar.....	41
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları.....	41

4.2.2. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflığının kontrolü.....	42
4.3. Siraz Balığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	43
4.3.1. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları.....	43
4.3.2. Optimum pH'nın bulunmasına yönelik yapılan çalışmaların sonuçları.....	44
4.3.3. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaların sonuçları.....	46
4.3.4. Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları.....	48
4.3.5. Stabil pH'nın belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları.....	50
4.3.6. Siraz Balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH substratları için V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları.....	52
4.4. Siraz Balığı Karaciğer Dokularından Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin ve Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	53
4.4.1. Siraz Balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	53
4.4.2. Siraz Balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuç.....	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65

KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	88



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisi basit gösterimi.....	6
Şekil 1.2. Anahtar kilit modeli.....	7
Şekil 1.3. Anopheles crones'den saflaştırılarak izole edilen GST'nin kristallografik yapısı.....	11
Şekil 1.4. Sitosolik GST enzimleri.....	12
Şekil 1.5. Esfenvalerate molekülünün yapısal formülü.....	17
Şekil 1.6. Deltamethrin molekülünün yapısal formülü.....	18
Şekil 1.7. Cypermethrin molekülünün yapısal formülü.....	19
Şekil 1.8. Diniconazole molekülünün yapısal formülü.....	19
Şekil 1.9. Atrazine molekülünün yapısal formülü.....	20
Şekil 3.1. GST enzim aktivite ölçümünde spektrofotometrik ölçüm yapılabilmesi için kullanılan ürünün oluşum basamakları.....	34
Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için Bradford yönteminde kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 4.2. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin afinite kolonuna ait elüsyon grafiği.....	42
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	43

Şekil 4.4. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enzimi için $\log M_A-R_f$ grafiği.....	44
Şekil 4.5. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin K-fosfat tamponu kullanılarak elde edilen optimum pH belirlenmesine yönelik pH-aktivite grafiği...	45
Şekil 4.6. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum iyonik şiddet değerinin belirlenebilmesi için hazırlanan [K-fosfat]-aktivite grafiği.....	48
Şekil 4.7. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum sıcaklığı için farklı sıcaklıklarda ölçülen sıcaklık-aktivite grafiği.....	50
Şekil 4.8. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin stabil olduğu pH'sını belirlemek için yapılan çalışma sonucu elde edilen zaman-aktivite grafiği.....	51
Şekil 4.9. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi ile sabit CDNB (0,5 mM) konsantrasyonunda GSH içi V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesine ait grafik.....	52
Şekil 4.10. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi ile sabit GSH (1 mM) konsantrasyonunda CDNB için K_M ve V_{mx} değerlerinin belirlenmesine ait grafik..	53
Şekil 4.11. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Se^{-2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	54
Şekil 4.12. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Ba^{+2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	55
Şekil 4.13. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Cu^{+2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	56
Şekil 4.14. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Ag^{+} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	57

Şekil 4.15. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Pb^{+2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	58
Şekil 4.16. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Esfenvaleratenin inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	60
Şekil 4.17. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Deltamethrinin inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	61
Şekil 4.18. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Cypermethrinin inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	62
Şekil 4.19. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Diniconazolenin inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	63
Şekil 4.20. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Atrazinenin inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. GST enziminin aminoasit analizi (mol başına).....	12
Çizelge 3.1. GST enzim aktivite ölçümündeki kuvvet içeriği.....	35
Çizelge 3.2. Elektroforezde kullanılan jellerin hazırlanışı... ..	38
Çizelge 4.1. Glutasyon s-transferaz enzimi afinite kromatografisi sonucunda oluşturulan saflaştırma sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi ile yapılan aktivite ölçümleri....	45
Çizelge 4.3. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	47
Çizelge 4.4. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları.....	49
Çizelge 4.5. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	51
Çizelge 4.6. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin GSH ve CDNB için K_M ve $V_{\max}$ değerleri.....	53
Çizelge 4.7. Se^{-2} iyonunun Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	54
Çizelge 4.8. Ba^{+2} iyonunun Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	55

Çizelge 4.9. Cu ⁺² iyonunun Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	56
Çizelge 4.10. Ag ⁺ iyonunun Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Çizelge 4.11. Pb ⁺² iyonunun Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.12. Esfenvalerate pestisitinin Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Çizelge 4.13. Deltamethrin pestisitinin Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	60
Çizelge 4.14. Cypermethrin pestisitinin Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.15. Diniconazole pestisitinin Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	62
Çizelge 4.16. Atrazine pestisitinin Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Çizelge 5.1. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi izin karakterizasyon sonuçları.....	74
Çizelge 5.2. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi için bazı metal iyonlarının IC ₅₀ ve K _i değerleri.....	75
Çizelge 5.3. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi için bazı pestisitlere ait IC ₅₀ ve K _i değerleri.....	75

1.GİRİŞ

1.1.Enzimler

Enzimler metabolizmadaki biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen hepsinde işlevsel olan katalizörlerdir. Enzim terimini ilk olarak 1878 yılında Kühne kullanmıştır. 1897 yılında Eduard Buchner bazı hücre yapılarından fonksiyonel enzimleri ekstrakte etmiştir (Paulo ve Gübitz, 2003).

Biyokimya geçmişinde oldukça eskiye dayanan çalışmalar enzimlerle ilgilidir. Bu çalışmaların ilkleri 1700’lü yılların sonlarına doğru, mide salgılarında et ürünlerinin sindirilmesi temel alınarak yapılan araştırmalar sonucunda bulunmuş ve tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalara, özellikle 1800’lü yıllara gelindiğinde tükürük ve bazı bitki özütleri ile nişastadan şeker eldesi araştırmalarıyla devam etmiştir. 1850’li yıllarda Pasteur, şekerin maya ile alkole fermentleşmesi olayında, şekerin fermentler ile katalizlendiği sonucuna ulaşmıştır. Pasteur, canlı olan maya hücreleri yapılarından mevcut fermentlerin ayırlamayacağını öne sürdü. Daha sonra 1897 yılında Eduard Buchner, şekerin alkole maya özütleri ile fermentlendiğini, bu olayında fermentasyonun hücreden uzaklaştırıldığında, işlevine devam eden moleküller tarafından gerçekleştiğini bulmuştur. Frederic W. Kühne ise tespit edilen bu molekülleri, enzim olarak adlandırmıştır. 1926 yılında James Sumner üreaz enzimini saf kristal halde elde etmesiyle genel enzim çalışmaları hızlandı (Keha ve Küfrevioğlu 2015; Lehninger 2005; Gürdöl ve Ademoğlu 2010).

Enzimler kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinde hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyon hızını arttırabilen maddelerdir. Enzimlerin olmadığı çoğu reaksiyon biyolojik yapılarda olması gerekenden daha yüksek sıcaklık ve daha yüksek enerji düzeylerine ihtiyaç duyarlar. Enzimler diğer moleküller için bazı özel bağlanma bölgeleri bulunan proteinlerdir. Günümüzde enzimoloji biyokimyanın ve biyokimyasal çalışmaların merkezini oluşturmaktadır. Enzimler gen klonlama,

besin üretimi ve ileri tedavi teknikleri gibi birçok alanda (özellikle mikrobiyal endüstri ve genetik) sıklıkla uygulama alanı bulmuşlardır (Lerner ve Lerner, 2003).

Enzimlerin yapısı protein yapısında olduğundan proteinlerin özelliklerinin tamamına sahiptirler. Ayrıca enzimlerin molekül büyüklüğü fazla olduğundan kolodyum zarından geçemezler, ısı altında kolaylıkla denatüre olurlar, ancak her enzim için denatüre olma sıcaklıkları farklılıklar gösterebilir ve ortamın asitlik ve alkalilik oranlarına karşı çok duyarlıdırlar. Genel olarak 0 °C ila 40 °C arasında sıcaklık artışları, enzimin etkisini hızlandırır. Ancak bu sıcaklık değerlerinin üzerinde genellikle denatürasyon görülür (Keha ve Küfrevioğlu 2015; Gözükar 1997).

Enzimlerin genel özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin neredeyse tamamı protein yapısına sahiptir.
2. Enzimler reaksiyonları tekrar tekrar gerçekleştirebilir.
3. Bir enzim genel olarak bir çeşit yada benzer tipte olan reaksiyonlara etki eder.
4. Reaksiyonları aktivasyon enerjisini düşürerek katalizlerler.
5. Enzimler oluşacak reaksiyonun hızla dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler canlı ya da cansız ortamda görev yapabilirler.

Biyomoleküller oldukça kararlı yapılardır ve kendi başlarına reaksiyon vermeleri zordur. İşte bu sebeple hücrede oluşma ihtimali olan tüm kimyasal tepkimeler enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Yani canlı organizmada hiçbir kimyasal tepkime kendiliğinden gerçekleşmez. Enzimler protein yapısı gereği DNA tarafından şifrelenir ve bir hücrede gerçekleşen olayların tamamı DNA tarafından kontrol edilip düzenlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Bazı enzimler basit protein yapısındadır ve bu yapıların aktivite gösteren kısmı polipeptid zincirileridir. Tripsin, pepsin, ve üreaz enzimleri bunlara örnektir. Diğer bazı enzimler ise bileşik protein yapısındadırlar. Enzimlerin yapısında protein kısmı

yanı sıra protein olmayan ve kofaktör olarak adlandırılan küçük molekülü bir grup daha bulunur. Kofaktör, protein yapısına kuvvetli bir şekilde bağlı olup disosiyasyon olmuyorsa prostetik grup olarak, gevşek bir şekilde bağlı olup disosiyasyon olabiliyorsa koenzim olarak adlandırılır (Özeriş 1993).

Kofaktör olarak adlandırılan yapının bulunmaması durumunda enzimlerin neredeyse tamamının katalitik aktiviteleri kaybolur. Enzimin kofaktör olmadan aktif olamayan yapısını apoenzim, kofaktörü bulunan aktif enzime ise haloenzim denir (Trevor 1994). Kofaktör organik yapıysa koenzim olarak, metal iyonuysa aktivatör ya da anorganik kofaktör olarak adlandırılır. Aktivatör etki gösteren metal iyonları, bakır, kobalt, krom, iyot, mangan, çinko ve molibdendir (Özeriş 1993). Bazı durumlarda metal iyonu aktif enzim ile sıkıca bağlanmaz ve kolayca uzaklaştırılabilir. Diğer bazı durumlarda ise metal iyonları enzim yapısına bütünleşmiş parçalar oluşturup saflaştırma işlemlerinin tamamında yapıda kalırlar. Özellikle metal iyonları insan enzimleri için büyük öneme sahip olup aynı zamanda sağlık için son derece gereklidirler (Brown 1987).

Substrat enzimin etki ettiği maddedir. Enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu koenzim veya prostetik grup belirlerken apoenzimde enzimin etki edeceği substratı tayin eder. Dehidrojenleme reaksiyonları buna örnek olarak verilebilir. Çünkü dehidrojenleme reaksiyonları koenzimi niasinamid-adenin di nükleotid olan enzimler tarafından katalizlenmektedir. Burada hidrojenin ayrılacağı substratı da yine apoenzim belirler (Özeriş 1993).

Günümüzde bilinen 2000’i aşkın sayıda enzim çeşidi bulunmaktadır. Enzimlerin reaksiyon spesifikliğı ve substrat spesifikliğı dikkate alınarak bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmada enzimler kataloğa, EC numarası ile tabi olurlar. Bu numara dört basamaklı bir sayıdan ibarettir. Birinci basamak 6 adet olan temel sınıflardan hangisine girdiğini belirtir. Daha sonra gelen iki basamak ise tabi olunan alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. En son basamakta enzimin tabi olduğu yerdeki sırası gösterilir. Bu 6 adet sınıftan her biri, reaksiyon açısından aynı

spesifikliğe sahip olan enzimleri kapsar (Keha ve Küfrevioğlu 2015; Koolman *et al.* 2003).

Enzimlerin sınıflandırılması 6 ana gruptan oluşur .

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını yani indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizlerler. Bu grup enzimler önceki çalışmalarda oksidazlar, redüktazlar, peroksidazlar gibi çeşitli isimler almış enzimlerdir.

2. Transferazlar: Hidrojen dışındaki grupların transferini iki substrat arasında sağlayan enzimlerdir. Kinaz enzimleri fosforil grubu transferini gerçekleştirerek bu grup enzimlere örnek gösterilebilir.

3. Hidrolazlar: Glikozit, ester, C-halojenür, peptid, eter, anhidrit veya P-N bağlarına bir su molekülü katılması ile bağların parçalanması sonucu oluşan hidrolizi katalizeleyen enzimlerdir. Proteolitik enzimlerin tamamı bu grupta yer alır.

4. Liyazlar: Hidroliz ya da oksidasyondan farklı bir çalışma mekanizması ile çift bağların oluştuğu ve substratlardan grupların uzaklaştırıldığı tepkimeleri katalizlerler. Bu gruba örnek olarak dehidrotasyon ve hidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler verilebilir.

5. İzomerazlar: İzomerlerin birbirine olan dönüşümlerinin katalizini yapan enzimlerdir. Molekül içinde çift bağların oluşum ve oksidasyon-redüksiyonun meydana gelmesini sağlarlar. Mutaz ve epimeraz enzimleri bu grupta yer alır.

6. Ligazlar: ATP'nin hidrolizi ile ortaya çıkan enerjiden faydalanarak sentez yapan enzimlerdir (Yıldırım vd 2010).

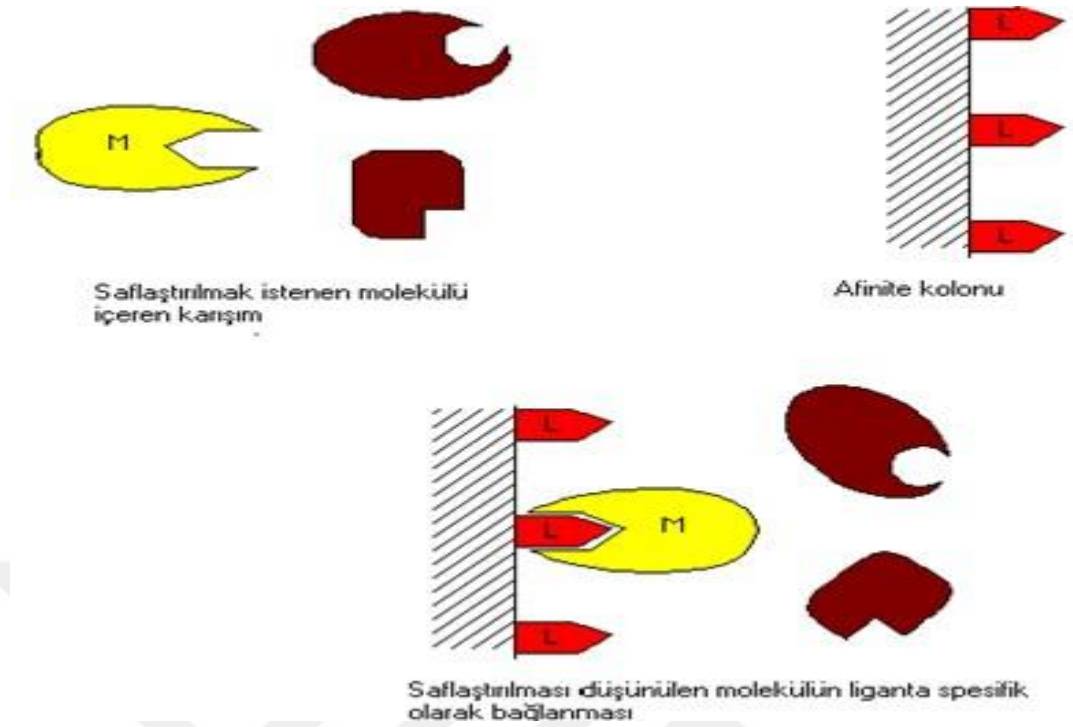
Çeşitli organizmalar kendilerine özgü proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein bulundurur. Bunun yanı sıra proteinler, biyolojik fonksiyonlarını uygun pH ve sıcaklık aralığında gerçekleştirebilirler. Bu sebeplerden dolayı herhangi bir hücre veya dokudan bir proteini izole etmek oldukça zor bir iştir. Bu zorluklara rağmen günümüze kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzimin kısmen saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve iki yüzden fazla enzimde saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzim aktivitesi göstermeyen birçok protein bazı kaynaklardan yüksek saflıkta izole edilmiştir. Proteinlerin sahip olduğu üç boyutlu yapıları, pH,

sıcaklık ve yüzey gerilimi gibi bazı faktörlerden aşırı şekilde etkilenecek kısa süre içerisinde enzim aktivitelerini kaybetmelerine neden olmaktadır. Bu sebeple enzim saflaştırma ve izolasyon çalışmaları oldukça dikkat gerektiren ve özen gösterilmesi gereken çalışmalardır (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Saflaştırma ve izolasyon işlemleri genel olarak enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
 2. Çözünürlükleri farklılıkları,
 3. Elektriksel yük,
 4. Adsorbsiyon davranışları farklılıklarına dayanılarak gerçekleştirilmektedir
- (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Bu tez çalışmasında, saflaştırma işlemi için spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisi kullanılmıştır. Afinite kromatografisi kullanıldığı durumlarda çoğu kez tek bir seferde aşırı kompleks olan karışımlardan bile izole edilebilirler. Afinite kromatografisi temelde adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılmaya çalışılan molekülün, matriks adı verilen ve her enzim için farklı olan özel bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir yöntemdir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı türden jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak olan enzim için tersinir ve aynı zamanda spesifik bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (inhibitörler gibi) direkt olarak matrikse bağlamak suretiyle hazırlanmış adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı sağlayabilmek için matriks ile ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

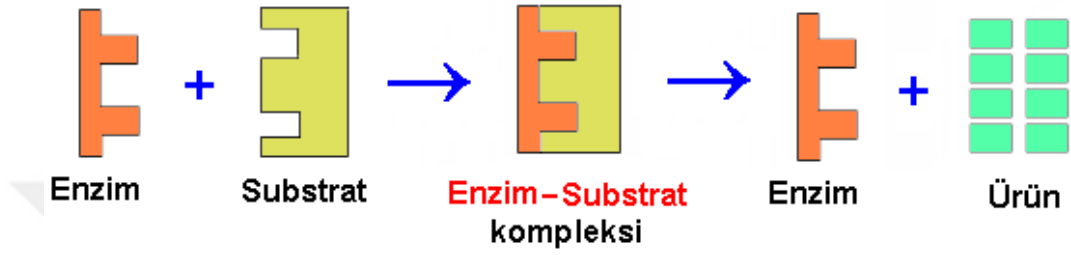


şekil 1.1. Afinite Kromatografisi Basit Gösterimi

Enzimatik kataliz olmadan canlı organizmalardaki reaksiyonların gerçekleşmesi mümkün değildir. Katalizlenme olmadan biyolojik reaksiyonlar çok yavaş ilerler. Biyolojik moleküllerin kararlı oldukları ortamlar genellikle hücre içi sıvı ortamında, pH'nın nötral olduğu ortamlarda ve orta derecede sıcaklık ortamlarındadır. Ayrıca biyokimyasal tepkimelerin birçoğu moleküllerin çarpışarak etkileşmesi ya da kararsız yüklü durumdaki aracı faktörlerin geçici oluşumu gibi reaksiyon için gerekli olan ve aynı zamanda hücre içerisinde imkansız veya istenmeyen kimyasal reaksiyonlara ihtiyaç duyarlar (Lehninger 2005).

Enzim üzerinde sınırlanmış özel bir cep ya da bir bölge içinde katalizlenmiş bir tepkimenin oluşması bu tür tepkimelerin ayırıcı özelliklerindendir. Enzimin etki ettiği molekül substrat olarak adlandırılır ve enzim bu moleküle aktif bölgesi ile bağlanır. Aktif bölge, amino asit kalıntılarının yan gruplarından substrata bağlandığı ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen kalıntılardan oluşmaktadır (Lehninger 2005).

Enzim aktivitesinde önemli bir rol oynayan enzim- substrat kompleksi ilk olarak 1880’de Adolphe Wurtz tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu E-S kompleksi, aynı zamanda enzimlerin çalışma prensiplerini teorik olarak tanımlayan ve enzimli tepkimelerin kinetik davranışlarını açıklayabilen matematiksel işlevler için başlangıç noktası niteliğindedir (Lehninger 2005).



Şekil 1.2. Anahtar Kilit Modeli

Enzimlerin çoğu ortak bazı kinetik özelliklere sahiptir ve bu kinetik özellikler sayesinde enzim mekanizmasının çalışmasının aydınlatılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Enzimlerde substrat değişiminin artışı ile değişimi sabit olan ES oluşturan enzimlerin tamamında enzimin katalitik aktivitesi, V_{max} 'a erişebilmek adına hiperbolik şekilde artar. Bütün substrata etki eden enzimler için karakteristik olan Michaelis Menten sabiti K_M 'dir. Michaelis Menten eşitliği K_M ve V_{max} arasında bir ilişki olduğunu anlatır. K_M ve V_{max} değerleri ölçülebilir değerlerdir ve farklı tür enzimler için farklı anlamlara sahiptirler (Lehninger 2005).

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızı pek çok faktörden etkilenebilmektedir. Bunlar pH, iyonik şiddet, enzim ile substrat konsantrasyonları, inhibitörlerin varlığı, aktivatörlerin varlığı ve sıcaklık gibi pek çok farklı faktörlerdir. (Yıldırım vd 2010). Enzimlerin etkisini azaltan veya denatüre olmalarına sebep olan maddelere inhibitör denir. Bu maddeler enzimin katalitik görevini yerine getirmesini engelleyen ve enzime bağlanan ancak substrat gibi işlev görmeyen maddelerdir. Enzim aktivitesinde meydana gelen bu değişim inhibisyon olarak adlandırılır. Aslında inhibisyon olayı biyolojik sistemlerde çok önem arz

eden bir kontrol mekanizmasının kendisidir. Zehirli maddelerin tamamına yakını fonksiyonlarını inhibisyon yoluyla gerçekleştirir (Gürdöl ve Ademoğlu 2010).

İnhibisyonun sınıflandırılması dönüşümlü inhibisyon ve dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere iki şekildedir. İnhibitörün enzime kovalent olarak bağlandığı veya zor ayrılabilen bir kompleks oluşturduğu durumlar dönüşümsüz inhibisyon olarak adlandırılırken, bu tür inhibisyonda V_{max} (enzimatik tepkimelerde ulaşılabilecek en üst hız oranı) azalır, K_M (substrata olan ilgiyi gösteren sabit değer) değişmez (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzim ile inhibitörün kolay ayrılabilirdiği bir denge halinin söz konusu olduğu inhibisyon türü ise dönüşümlü inhibisyon olarak adlandırılır. Dönüşümlü inhibisyon kendi içinde farklılaşmakta ve dört kısma ayrılmaktadır. Bunlar yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon ve lineer karışık tip (mixed) inhibisyondur (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

1.2. Glutasyon

Glutasyonun yapısında glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitleri bulunur (Karam 1996; Herschbach and Rennenberg 1994). Glutasyonun yapısında iki karboksil grubu, iki peptid bağı, bir tiyol grubu ve bir amino grubu bulunur. İndirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olmak üzere iki farklı formda bulunan glutatyonda GSH yapısında bulunan sisteinin tiyol sayesinde antioksidan özelliği kazanmıştır. Glutasyonun sudaki çözünürlüğü, molekül kütlelerinin küçüklüğü ve yapısında hidrofilik grupların fazla olması sebebiyle fazladır. GSH'ın bu yapısı molekülün kararlılığını ve molekülün savunmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır (Kidd 1999; Kosower 1976).

Hücre sitozolünde bol miktarda bulunan glutasyon hücreden toksik bileşenleri uzaklaştırmada ve indirgenmiş formu ile sülfhidril grubunun devamlılığını sağlamada önemli işlevlere sahiptir (Liebman and Greenberg 1988).

GSH özellikle alyuvarlarda sülfhidril tumpunu görevi üstlenmiştir. Kırmızı kan hücreleri yapısında GSH/GSSG oranı yaklaşık olarak 500'dür. (Keha ve Küfrelioğlu 2012). GSH, nukleus, mitokondri, ve sitoplazmada bolca bulunan ve hücre içi kompartmanlarında çözünebilen önemli bir antioksidandır (Alcher 1989).

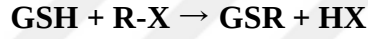
Her ne kadar sakin bir yaşam sürüyormuşuz gibi gözüksek de yaşamımız süresince potansiyel toksik bileşiklere ya direk ya da besin zinciri yoluyla dolaylı olarak maruz kalmaktayız. Endüstriyel yaşam, doğal yaşamla birlikte birçok zehirli molekül oluşturmaktadır. Örnek olarak reaktif oksijenin vücut yapısı içerisinde normal oksijen metabolizması ile birlikte üretiliyor olması verilebilir. Bu tarz yaşamsal faaliyetlerin zor olduğu toksik çevresel şartlarda yaşamın devamı için vücudumuzda detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Toksik moleküller DNA ve proteinleri yok ederek sonuçta hücrenin ve metabolizmanın ölümüne sebep olur. Bu detoksifikasyon reaksiyonları faz I ve faz II olmak üzere ikiye ayrılmışlardır. Faz I olarak adlandırılan reaksiyonlar yükseltgenme, indirgenme, hidroliz gibi reaksiyonlar ile substrata aktif gruplar ekleyerek, faz II olarak adlandırılan reaksiyonlar konjugasyon reaksiyonlarına substrat hazırlar (Lee 2003). Faz II konjugasyon sisteminde yer alan en önemli enzimlerden biri glutatyon S-transferazlardır.

1.3. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferaz, kısaca GST harfleriyle sembollenen ve E.C.2.5.1.18 numarasıyla gösterilen bir enzimdir. GST enzimi detoksifikasyon mekanizmasında, su içerisinde çözünen son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk kategoriyi katalizler ve homeostasisi sağlar. Çok işlevsel bir enzimdir. Katalizlenen bu ilk basamakta, Glutatyon (GSH) ile eksojen ve endojen hidrofobik elektrofillerin bağlanması gerçekleşir. GSH olmadan GST enziminin çalışması mümkün değildir. GSH olmadan GST çalışmadığı için GSH'a kosubstratta denmektedir (Sheehan et al. 2001; Autrup 2000).

GST enzimi; birçok canlı türünde özellikle canlı türlerinin dokularında oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. GST'nin sıklıkla rastlandığı dokular başta karaciğerdir. Bunun yanı sıra akciğer, böbrek, ,ince ve kalın bağırsak ile meme gibi organlarda da rastlanmaktadır. GST, sayılan organlarda bulunan sitozollerinin toplam protein içeriklerinin %5'ini kapsamaktadır. Adı geçen bu organlarda GST enzimi yüksek oranlardadır çünkü bahse konu organlar dış etkilerle alınmış ksenobiyotikler ile direkt temas halindedir.

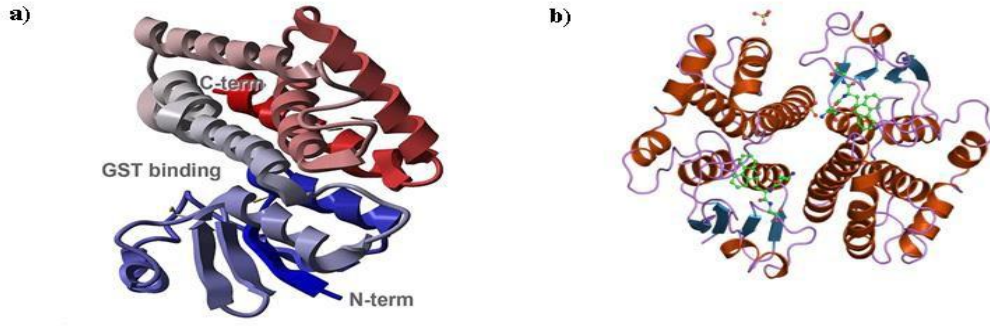
GST'm katalizlediği temel reaksiyon:



şeklindedir.

Enzimin ana fonksiyonu, glutatyon (GSH) ve substratı aktif bölgesine bağlayarak birbirlerine yakınlaştırmak (Eaton and Bammler 1999) ve GSH üzerindeki sülfidril grubunu aktive ederek GSH'un elektrofilik substratla reaksiyona girmesini sağlamaktır (Armstrong 1997). Epoksit halka açılmaları, nükleofilik aromatik geçiş reaksiyonları α , β -doymamış aldehit ve ketonlara geri dönüşlü miçel eklenmeleri ve bazı peroksidaz reaksiyonları GST enzimlerince katalizlenen reaksiyonlardır (Eaton and Bammler 1999).

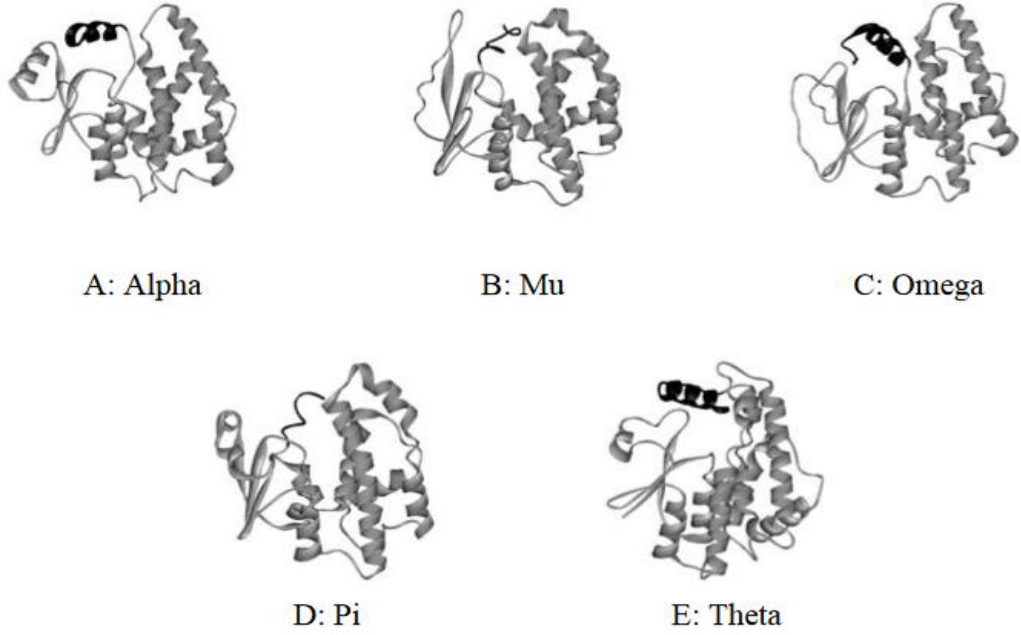
GST'lerin indirgeme özelliği, membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korumakla birlikte lipit peroksidasyonunun aldehit yapıda ürünleri olan 4-hidroksi alkenallerin GSH ile konjugasyonunu sağlarlar. Ayrıca mikrozomal GST'ler de peroksidaz aktivitesi ile lipit peroksitlere karşı koruma sağlar. GST'ler pestisitler ve ilaçlar gibi kanserojenler ile çevresel kirliliklere karşı önemli koruyucu mekanizmalardan biri olarak kabul edilirler. Çünkü elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da önemli bir role sahiptirler (Gyamfi *et al.* 2004).



Şekil 1.3. *Anopheles cracens*'den saflaştırılarak izole edilen GST'nin kristallografik yapısı (a) GSH'ın bağlandığı bölge (b) substratın bağlandığı bölge (Udomsinprasert et al. 2005; Ji et al. 1994)

Karaciğerde yüksek miktarda mikrozomal GST mevcuttur. Sıçan karaciğerinde endoplazmik retikulumda ve dış mitokondri membranındaki toplam protein seviyesinin %3-5'ini oluşturmaktadır (Morgenstern et al. 1987).

Sitozolik GST'ler, glutatyon ile endojen ve eksojen elektrofilik bileşenin konjugasyonunu katalizler. Ayrıca çok fonksiyona sahip dimerik proteinleri de içine alan bir ailedir. GST'ler aynı zamanda hidrofobik moleküllerin, safra asitlerinin, demirin, polisiklik hidrokarbonların ve bilirubinin transportu ile hücre içine bağlanmasında alırlar. Prostaglandin ve leukotriene biyosentezine katılırlar ve toksik hidroperoksitlerin eliminasyonunda anahtar rol oynarlar. GST bunlara ek olarak hücrenin ilaç ve diğer zehirli bileşenler gibi etkilere karşı direncini sağlar ve koruma görevi üstlenir. GST ökaryot hücrelerin tamamında bulunduğu gibi prokaryot hücrelerin çoğunda da bulunmaktadır. Çok fazla sitozolik forma sahip olan GST'nin günümüze kadar alfa (α), mü (μ), pi (π), teta (θ), sigma (σ), beta (β) şeklinde 6 sınıfı karakterize edilmiştir. (Bucciarelli et al. 1999).



Şekil 1.4. Sitozolik GST enzimleri (Nilsson 2001)

Enzimlerin yapısında temel teşkil eden aminoasitler içeriği açısından son derece önemlidir. Sıçan ve insan GST'lerinde, miktar olarak en çok bulunan amino asitler lösin, glutamik asit ve aspartik asittir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise insanda hiç bulunmamasına karşın sıçanda çok düşük miktarlarda bulunurlar (Baş 2006; Fleischner *et al.* 1976).

Çizelge 1.1. GST Enziminin Aminoasit Analizi (mol başına) (Fleischner *et al.* 1976)

Aminoasit	Sıçan	İnsan	Aminoasit	Sıçan	İnsan
Alanin	25	27	Lösin	48	58
Arginin	22	23	Metionin	9	13
Aspartat	41	34	Prolin	21	21
Fenilalanin	19	18	Serin	19	20
Glisin	20	20	Sistein	5	-
Glutamat	44	52	Tirozin	18	18
Histidin	6	6	Treonin	12	6
İzolosin	20	28	Triptofan	8	-
Lizin	35	44	Valin	18	14

Enzimlerin yapılarında kendine has olan ve substratının bağlanabildiği bazı katalitik bölgeler mevcuttur. GST enzimi farklı substratları tanıyabildiğinden, yarı

özgüllük gösterebilen enzimlerdendir. GST enziminin iki ayrı substrat bağlanma bölgesi mevcuttur.

1.G Bölgesi: GST enzimi üzerinde GSH'ın bağlanabildiği bölgedir. Bu bölge enzim üzerindeki bir ceptir. Cebin açık olan kısmına dönük olarak GSH'ın tiyol grubu (SH), yerleşmiştir. Bu tiyol grubunun özelliği diğer substratlara bağlanan grup olmasıdır. Bu grubun enzim üzerindeki pozisyonu GSH ile konjugasyonun sağlanabilmesi için son derece önemlidir. Buna bağlı olarak D-sistein'in, L-sistein'in, L-homosistein'in ve L-penisilamin ile substitusyonu sonucu oluşan GSH analogları, GST için kosubstrat olarak GSH ile yer değiştirmezler. GST tarafından bahse konu analoglar kullanılmaktadır. Çünkü tiyol grubu GST'nin bağlayacağı substratta önemli role sahiptir. GSH'ın aktivite kaybolmasına neden olan tek grubu tiyol grubudur (Anton et al. 1990).

2.H Bölgesi: GST'nin katalitik merkezinde bağladığı bölge hidrofobik elektrofilik substratların, hidrofobik bölgesidir. (Nishihira et al. 1995). GSH ve CDNB substratına karşı olan katalitik aktiviteyi kompetatif şekilde inhibe eden bir GSH analogu olan S-[2-(2-floro-4-nitrofenoksi)etil] glutasyonu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, sıçan karaciğer GST π enziminin elektrofilik substrat bağlanma bölgesini ortaya konmuştur. Yapılan deneyler G ve H bölgelerini içinde barındıran aktif alana GSH analogunun spesifik olarak bağlandığını göstermiştir. Karboksipeptidaz aktivitesi ile mevcut yedi aminoasit çıkarıldığında, katalitik aktivite %5 oranında azalmıştır. 9 aminoasitin bu bölgeden çıkarılmasıyla da enzimin aktivitesi tamamen ortadan kaybolmuştur. Ortaya konan veriler aktif bölge konformasyonunun stabilitesinde C terminalinin aktif rol oynadığını göstermektedir. Başka bir çalışmada Phe ile TRY108'in yer değiştirmesi ile kcat değerinin 14 kat azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Buna rağmen H bölgesinin substrat afinitesinde değişiklik olmamıştır. Tyr108'in OH grubunun rolü, GSH'un elektrofilik substrat ile konjugasyonu gibi kimyasal bir basamak için transisyon durumunu korumak olabilir (Lo Bello 1997).

Üzerinde pek çok araştırma yapılan Glutatyon S-transferazlar laktonlar, alkoller, aril halidler, kinonlar, epoksitler, esterler gibi yapısal farklılıkları olan substratların çok büyük bir kısmının reaksiyonlarını katalizleyebilme özelliğine sahiptir. GST'ler her ne kadar fazla sayısı substrat tanıyor olsa da bu substratların genel ortak özellikleri çoğunun elektrofilik bir merkez taşımaları ve hidrofilik oluşlarıdır (Coşkun 2007).

GST aktivitesinin ölçümünde iki farklı yöntem mevcuttur. Bunlardan birincisi spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntem üzerinde Habig ve arkadaşları ile Howie ve arkadaşları çalışmışlar ve bu yöntemi geliştirerek GST'ye özgül substratın, GSH konjugasyonu ile ortaya çıkan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine dayandırmışlardır. Diğer yöntem ise immünoradiyometrik yöntemdir ve serum doku örneklerinde ki GST aktivitesini radyoimmünassan ile tayin etmek mümkündür (Howie *et al.* 1988).

1.4. Metal ve Pestisitlerin Çevresel Etkileri

Bu tez kapsamında GST enzimi, siraz balığının karaciğer dokusundan saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve enziminin aktivitesi üzerine Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} ve Pb^{+2} metal iyonları ile esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole ve atrazine pestisitlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Metallerin işlenmesi ve kullanılması tarihsel gelişimde çok eskilere dayanmaktadır. Metaller üzerinde yapılan bu işlemler ve kullanımlar sonucunda ortaya metallerin doğal çevrimleri dışında farklı formlar çıkmıştır. Özellikle sanayileşmiş bölgelerde ve çok büyük oranda sanayi devrimi ile birlikte ortaya çıkan enerji ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla ağır metal içeren kömürler yakılmaya başlanmış ve bunun sonucu olarak bu bölgelerde ağır metal kirliliği artmıştır. Japonya'da meydana gelen ağır metal kirliliği zehirlenmesi bu açıdan ilk olarak tanımlanan zehirlenme olmuştur. (Kahvecioğlu vd 2003).

Yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller için ağır metal tanımı kullanılmaktadır. Ağır metallerin başlıcaları kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, cıva ve çinko olmakla birlikte 60'tan fazla ağır metal bulunmaktadır (Kahvecioğlu vd 2003).

Bazı metallerin organizmada belirli oranlarda bulunması gerekir. Bunlar yaşamsal ağır metaller olarak tanımlanmıştır. Yaşamsal ağır metaller özellikle biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı besinlerle düzenli olarak alınmalıdırlar. Kırmızı kan hücrelerinde birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinde bakırın üstlendiği rol buna örnek verilebilir. Ancak çok düşük konsantrasyonlarında bile çok önemli sağlık sorunlarına sebep olabilen yaşamsal olmayan ağır metaller ise fizyolojiyi tehdit eden önemli etmenler arasındadır. Kükürtlü enzimlere bağlanan cıva örnek olarak gösterilebilir (Bjergström *et al.* 1988).

Metaller doğada jeolojik ve biyolojik yollarla hareket eden ve doğal yollarla bozulmaya direnli elementlerdir. Özellikle yağmur suları ile çözülerek toprağa, nehirlerle, yeraltı kaynak sularına ve denizlere bir şekilde ulaşırlar. Bitki ve hayvanların bünyesinde biriken ağır metaller böylelikle biyolojik döngülerini oluştururlar. Biyolojik döngü ölü canlıların çürüyerek tekrar çevreye katılmasıyla tamamlanır (Goyer and Clarkson 2001; Donkin *et al.* 2000).

Metaller canlılar için her ne kadar önemli birer element olsalar da yüksek düzeyleri de bir o kadar tehlikelidir. İnsan hayatı için gerekli olmayan metaller su ve hava gibi etmenlerle vücuda girip burada "metal yükü" oluşturmaktadır. Bu birikme hayat boyu devam edip ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. (Denizli 2008).

Toksik özellikler üzerine yapılan araştırmalar özellikler metaller konusunda hızlı bir şekilde devam etmektedir. Neredeyse metallerin tamamı belirli bir miktarın üzerinde alınırsa toksik etkiye sebep olurlar. Bazı özel metaller ise çok düşük oranlarda alınsa bile toksik etkiye sebebiyet verebilmektedir. Bu metaller As, Pb, Hg, Fe, Cd, Cr, Co, Ni, Be, Cu ve Mn gibi ağır toksik etkiye sebep olan metallerdir. Ağır metaller şelatlaştırıcılar kullanılarak zararsız hale getirilebilmektedir.

Şelatlaştırıcıların iyi işlevsellik göstermesi; uygun metal bağı oluşmasındaki ligand sayısıyla belirlenir (Denizli 2008).

Ağır metallerin toksisitesi; birçok etkene bağı olarak değişiklik gösterebilir. Bunlardan bazıları sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen, balığın büyüklüğüne oranla çözelti hacmi, çözelti içerisindeki tanecik ve sinerjik etki gibi parametrelerdir. Özellikle suyun sahip olduğu pH değeri en önemli faktördür. Bu açıdan tatlı sular daha büyük risk taşımaktadırlar. (Mutluay ve Demirak 1996).

Pestisitler; çeşitli yollarla özellikle su kaynaklarına geçerek büyük tehlike oluşturmaktadır. Yağmur sularına, drenaj sularına, yüzey akışları ve sulama sularına karışarak bu sulara kontamine olurlar. Ayrıca doğrudan suya yapılan uygulamalar sonucunda (örn; sivrisinek mücadelesinde) pestisitler su bitkileri veya dip çamurları tarafından tutulurlar (Tuncer, 1987).

Pestisitlerin sudaki eriyebilirlikleri ve formasyonları su içerisindeki hareketliliğini etkiler. Bu şekilde suda eriyebilen ya da su içerisinde eriyebilecek formasyonuna dönüşebilen pestisitler su içerisinde kısa sürede dağılarak yayılım gösterirler. Ancak toz veya granül formda bulunanlar su içerisinde askıda kalarak uzun süreler boyunca aktif maddelerinin yayılmasına neden olurlar. Balıkların pestisitle buluşması genel olarak solungaçları vasıtasıyla su ortamından bunları absorbe etmesi ya da bulaşık materyalleri besin olarak tüketip bünyelerine alması ile olmaktadır (Toros ve Maden, 1991).

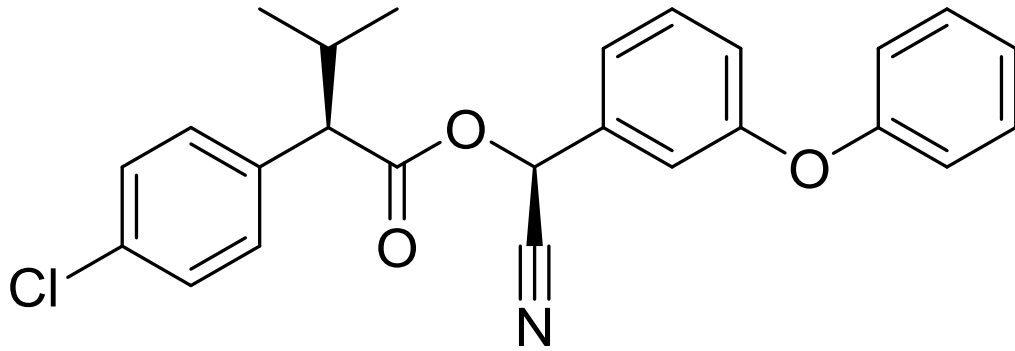
Pestisitler temelde canlı organizmaları öldürmek üzere özel olarak üretilmiş kimyasallardır. Bunun doğal bir sonucu olarak özellikle sucul canlılar açısından tehlike büyüktür (Lloyd, 1992).

Pestisitler balıklara farklı şekillerde etki edebilir. Direkt olarak öldürme olabileceği gibi özellikle yumurtlamaları ya da yumurtalarını etkileyerek üremelerine de etki edebilmektedir. Bunu sonucu olarak balık popülasyonunda azalma olabilmektedir. Ayrıca dokularda meydana getirdikleri hasarlar ile balıklarda duyarlılığa yol açarak

küçük değişimlerde bile balıkların direncini azaltarak yok olmalarına sebep verebilir. Yavru balıklar ise hassas oldukları için bu durumdan daha fazla zarar görürler (Toros ve Maden, 1991).

Esfenvalerate: $C_{25}H_{22}ClNO_3$ kimyasal formüle ve 419,19 gr/mol molekül ağırlığına sahip olan, insektisitler grubunda yer alan bir pestisit etken maddesidir. Parlama noktası $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, kaynama noktası $538\text{ }^{\circ}\text{C}$, yoğunluğu $1,21\text{ gr/cm}^3$ ve suda çözünmeyen ancak organik çözücülerde farklı miktarlarda çözünen bir kimyasaldır. Kristal yapıda, beyaz renkli, kokusuz katı bir hammaddedir. Tarım ilaçlarında, insektisitlere karşı üretilen bazı ilaçların ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Bu etken madde ile geliştirilen formüllerle, mısırdaki mısır koçan kurdu, mısır kurdu, pamukta pamuk piresi ve yeşil kurt gibi zararlılarla mücadelede kullanılır. Ayrıca bağlarda salkım güvesi, elmada ise elma iç kurdu ile mücadelede de kullanım alanı bulur

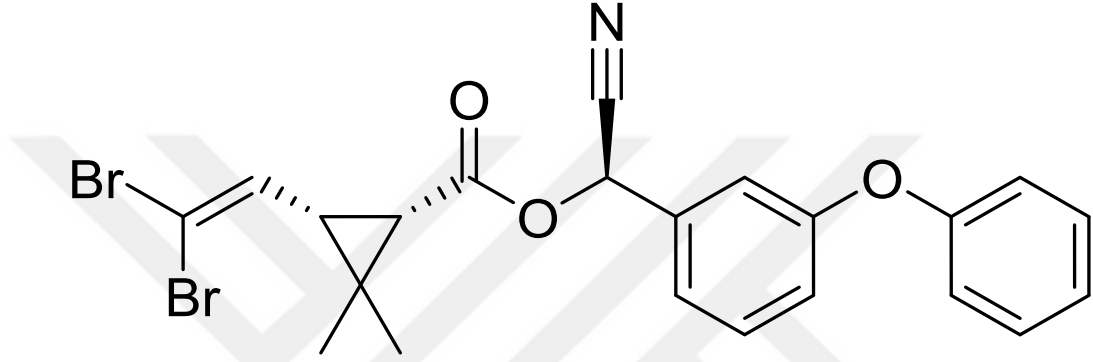
(<http://www.solverkimya.com/site/makaleler/tarim-hammadde-makaleleri.html/esfenvalerate-nedir-kimyasal-formulu-kullanim-alanlari.html> (20.03.2019)).



Şekil 1.5. Esfenvalerate molekülünün yapısal formülü

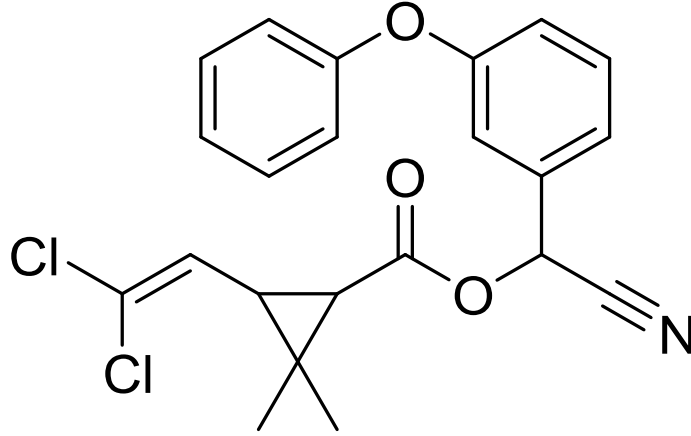
Deltamethrin: $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ kimyasal formüle ve 505,2 gr/mol molekül ağırlığına sahip olan, insektisitler grubunda yer alan bir pestisit etken maddesidir. Erime noktası $98\text{ }^{\circ}\text{C}$, kaynama noktası $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, yoğunluğu $1,5\text{ gr/cm}^3$ ve suda çok

az çözünen ancak organik çözücülerde kolaylıkla çözünen bir kimyasaldır. Kristal yapıda, renksiz veya beyaz renkli formlara sahip, kokusuz katı bir hammaddedir. Deltamethrin tarım ilaçlarında insektisitlere karşı üretilen bazı tarım ilaçlarının ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Tütün kurdu, tütün güvesi ve kuru incirde testereli böcekler için kullanım alanı bulur (<http://www.properkimya.com/makaleler/detaylar/deltamethrin-ozellikleri-hangi-alanlarda-kullanilir-teknik-ozellikleri.html> (20.03.2019)).



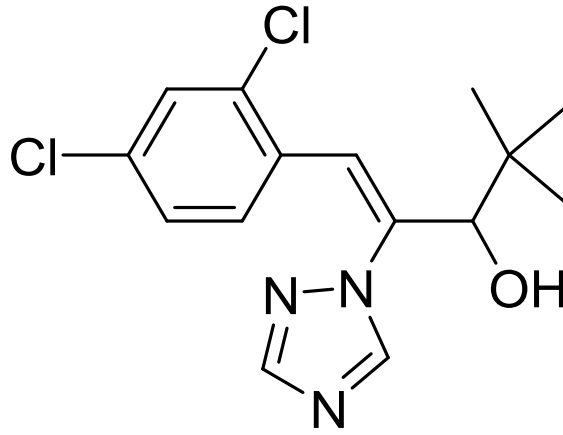
Şekil 1.6. Deltamethrin molekülünün yapısal formülü

Cypermethrin: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ kimyasal formüle ve $416,30 \text{ gr/cm}^3$ molekül ağırlığına sahip olan, insektisitler grubunda yer alan bir pestisit etken maddesidir. Parlama noktası 100 C° , yoğunluğu $1,20 \text{ gr/cm}^3$ ve suda çözünmeyen ancak aseton, kloroform, metil alkol ve organik çözücülerde çözünebilen bir kimyasaldır. Jel kıvamında, açık sarı renkli, karakteristik bir kokusu bulunan bir hammaddedir. Cypermethrin tarım ilaçlarında, insektisitlere karşı üretilen bazı tarım ilaçlarının ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Kullanıldığı alan ve insektisitlere bağlı olarak değişik etki mekanizmaları gösterir (<http://www.solverkimya.com/site/makaleler/tarim-hammadde-makaleleri.html/cypermethrin-nedir-nasil-cozunur-hangi-konsantrasyonlarda-kullanilir.html> (20.03.2019)).



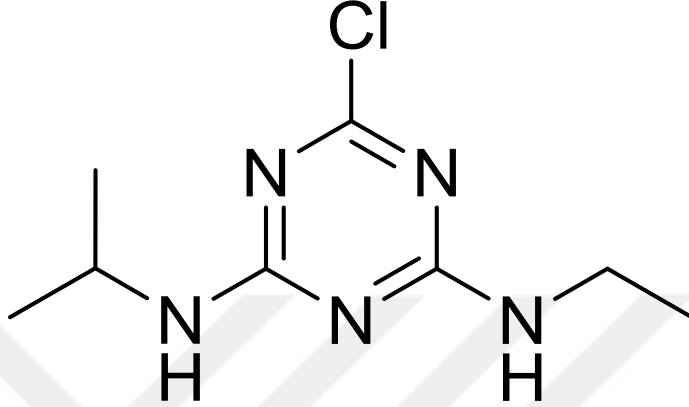
Şekil 1.7. Cypermethrin molekülünün yapısal formülü

Dinicanazole: $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O$ kimyasal formüle ve 326,22 gr/mol molekül ağırlığına sahip olan, fungusitler grubunda yer alan bir pestisit etken maddesidir. Külleme, pas, rastık, yaprak lekesi gibi hastalıklara tedavi olarak ya da uzun süreli koruma için kullanılırlar. Yeşil aksam, tohum ve toprak ilaçlaması gibi uygulama yöntemleri mevcuttur (<http://tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari> (20.03.2019)).



Şekil 1.8. Diniconazole molekülünün yapısal formülü

Atrazine: $C_8H_{14}ClN_5$ kimyasal formüle ve 215,68 gr/mol molekül ağırlığına sahip olan, herbisitler grubunda yer alan bir pestisit etken maddesidir. Tarımda istenmeyen otları yok etmek için sıkça kullanılmaktadır (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari> (20.03.2019)).



Şekil 1.9. Atrazine molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin tümünde bulunan glutatyon, yapısı itibariyle tripeptid (glisin - sisteinil - γ -glutamil) olan önemli bir tiyoldür ve ayrıca hücre içindeki serbest sülfhidril grupları içerisinde önemli bir orana sahiptir. İlk kez 1888 yılında maya hücresinde tespit edildikten sonra 1921 yılında Hopkins saflaştırarak karakterize etmiştir (Açan, 1990). Yapısında bulundurduğu -SH grupları sayesinde glutatyon, zararlı etkileri bulunan okside moleküllere karşı hücreyi korumaktadır. Başlıca glutatyon görevleri şu şekilde sıralanabilir: reaktif oksijen ve serbest radikal ürünlerinin hücre zararlarının bertaraf edilmesi, spektrin ve hemoglobin gibi membran proteinlerinin ve bazı enzimlerin tiyol gruplarının korunması, protein sentezlenmesi ve DNA sentezlenmesi, bazı detoksifikasyonlar (ksenobiyotik detoksifikasyonu, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin detoksifikasyonu), aminoasit taşınımı, proteinlerin konformasyonunun değişebilmesi için insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır. Bu görevler sebebiyle hücre içerisinde düşük seviyede bulunan glutatyon metabolik sıkıntıları meydana getirebilmektedir (Knapen et al., 1999).

Canlıların birçok metabolik aşamalarında değişimlere sebep olan ksenobiyotikler büyük oranda biyolojik olarak aktiftirler. Bahse konu ksenobiyotiklerin bazıları lipid membranından kolaylıkla geçebilen lipofilik yapıdaki bileşiklerdir. Canlılar elektrofilik metabolitlerine dönüştürerek bu yapıların daha kolay atılmasını sağlamaya çalışırlar. Bu dönüşüm işlemleri iki ayrı fazda gerçekleşmektedir. Bunlardan faz I reaksiyonları taneciklerin yükseltgenme-indirgenme (-COOH ve -OH gibi) işlemleriyle fonksiyonel gruplar oluşturulmasına dayanmaktadır. Faz II'de ise glutatyon s-transferaz enzimi vasıtasıyla yüksek hidrofilik yapıda olan metabolitler GSH benzeri endojen bir substrat ile konjuge olarak atılmaları kolaylaştırılır (Ioannides 2002).

Temel görevlerinden olan detoksifikasyon işlemini ksenobiyotikler ve endojen bileşik içeren elektrofilleri, GSH'la kovalent bağlanma sağlayan GST enzimi

böylelikle bahse konu bileşenlerin atılmalarını sağlar. Bunun yanı sıra besinler aracılığıyla alınabilen toksit etkili madderi, alınan besinlerin besin değerlerini kaybettirmeden bertaraf edilmesinde önemli rol oynar. Görev önemi bakımından en üst sırada yer alan diğer bir işlevi ise ksenobiyotiklerde bulunan reaktif merkezlerin, GSH tiyol gruplarına bağlanarak detoksifikasyonunun sağlandığı reaksiyonları katalizlemesidir (Habig et al. 1974).

Nonsubstrat olan ligandların GSH ile bağlanarak transportunu sağlamakta GST'nin diğer önemli görevlerinden birisidir. Hidrofobik ve nonspesifik bir bağlanma bölgesi olan H bölgesine sahip GST bu sayede nonpolar moleküllerin intrasellüler bağlanmasında bağlanma proteini olarak görev yapmaktadır. GST'deki aktivite kaybının nedenlerinden biride farklı formlarına nonsubstrat liganların bağlanmasıdır (Boyer 1989).

Toksik bileşenlere karşı doku ve organların korunulmasında GST'nin etki etme seviyesi büyük önem taşımaktadır. Günümüz şartlarında çok sayıda ilaçta bulunan bazı bileşikler ve yine sanayileşme ve diğer etkilerle meydana gelen pek çok sayıda bileşik GST aktivitesi için tehdit oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin sebep olduğu etki, hücreleri büyük oranda oksidatif stres şeklinde etkileyebilir. GST ise oksidatif strese maruz kalmış hücreleri bu etkilere karşı koruyan etkisiyle canlı yaşamında son derece önemlidir (Cho and Kim 2000).

GST'nin sahip olduğu G ve H bölgeleri sayesinde çevresel kirleticiler, karsinojenik bileşikler, ilaçlar ve diğer toksik birçok bileşiği substrat olarak kullanabilmektedir. GST'nin bu işlevi yapısındaki bağlanma bölgeleri olan iki protein altı biriminden oluşması ile mümkün olmaktadır (Cnubben *et al.* 2001).

Mitokondrial ve sitozolik GST süperaillesinin sınıflandırılması olayında mevcut protein yapısı ve protein dizisi büyük öneme sahip bir kriterdir. Homoloji gösterme açısından sitozolik GST %40'larda iken diğerleri %20 seviyelerindedir. Sitozolik GST'ler yapılarına göre sınıflandırılmış ve beta, alfa, epsilon, delta, theta, zeta, nu, mu, sigma, pi, omega, phi ve tau gibi farklı sınıflara ayrılmışlardır.

GST'ler mitokondrial açıdan sınıflandırıldığında ise kappa sınıfındadırlar (Josephy 2010; Oekley 2011; Eaton and Bammler 1999).

GST, enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda bitki, hayvan, bakteri, balık ve memelilere kadar birçok farklı canlı türünden saflaştırılarak karakterize edilmiş ve özellikle aktivite üzerine etki gösteren pestisit, ilaç, metaller ve toksik etkiye sahip bileşikler gibi pek çok farklı maddeyle etkileşimi incelenmiştir. Bakterilerden yararlanılarak sonuçlanan bir çalışmada GST enzimi, 800 kat ve %11 verimle DEAE sephacel ve glutatyon agaroz afinite kolonunda saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığının 24 kDa olduğu ve homodimer olduğu tespit edilmiştir. CDNB ve GSH için K_M değerleri sırasıyla 1,5 mM ve 0,25 olarak tespit edilmiştir. Optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,5 ve 35 °C olarak bulunmuştur. Bunlara ek olarak EDTA'nın aktivitede %30 oranında pozitif etki ettiği görülmüştür (Arca *et al.* 1990).

Literatür araştırmaları sonucunda GST enzimi ile ilgili pek çok araştırmaya rastlamak mümkündür. Örnek olarak afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan kedi balığı bağırsak mukozası GST enzimi verilebilir. %87 verimle 100 kat saflaştırılma yapılan bu çalışmada enzim kolondan 107 μ mol/ mg spesifik aktivite ile elde edilmiştir. Ayrıca yapılan elektroforez işlemi sonucunda molekül kütlesi 26,7 kDa olarak tespit edilmiş ve iki alt birimden yani homodimer olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan kinetik çalışmalarda ise CDNB ve GSH için K_M değerleri sırasıyla 0,43 mM ve 0,19 mM olarak rapor edilmişlerdir (Gadagbui *et al.* 2000).

E.coli ekstratı ile yapılan saflaştırma sonunda GST'nin 2300 kat ve %7,5 verim ile saflaştırıldığı ve bahse konu enzimin 45 kDa molekül kütlesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca iki eş alt birimden oluştuğu görülmüştür. Substratlar için yapılan çalışmalarda GSH ile CDNB K_M değerleri 0,33 mM ve 1,43 mM olarak tespit edilmiştir. optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 50 °C ve 7,0 olarak bulunmuştur. Stabil pH için 5'ten 11'e kadar olan geniş bir pH aralığında çalışma yapılmıştır (Iizuka *et al.* 1989).

Diğer bir çalışmada enzim izoformları HPLC ve SDS-PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Afinite kromatografisinde saflaştırılan gökkuşağı alabalık karaciğeri GST enzimi, saflaştırma ve karakterizasyon yapılmak üzere uygun şartlarda korunmuştur. 25,5 kDa ve 23,0 kDa olarak tespit edilen izoformların molekül kütleleri HPLC çalışması sonucu bulunmuştur (Riol *et al.* 2001).

Anyon değişim kromatografisi kullanılarak yapılan saflaştırma işleminde kefal balığı karaciğeri kullanılmış ve GST'nin 14 izoformu saflaştırılmıştır. Dimerik yapıda bulunan her bir GST izoformunun alt birimlerinin molekül kütleleri 23 ile 28 kDa olarak belirlenmiştir (Barcena *et al.* 1997).

İsimleri sırasıyla a, b, c, d olarak sembollenen 4 tip GST ile yapılan çalışmada afinite kromatografisi, sephadeks G-75 jel filtrasyon kromatografisi, CM selüloz katyon değişim kromatografisi ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda a izomeri 45 kDa molekül kütlelerinde b, c ve d izomerleri ise 50 kDa molekül kütlelerinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer izomerlere göre a izomeri 100 kat daha fazla peroksidaz aktivitesine sahiptir. Aminoasitlerin bileşimlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda ise GSTb'nin 424 aminoasitten, GSTa'nın ise 408 aminoasitten meydana geldiği bulunmuştur. Substrat ilgisine yönelik olarak yapılan çalışmalarda da GSTa'nın sahip olduğu düşük K_M değeri ile ilgisinin fazla olduğu görülmüştür (Oshino *et al.* 1989)

İnsan böbrek dokusundan saflaştırılan GST enziminde ise α , μ , π sınıfları çalışılmıştır. Çalışma sonucunda aynı sınıfta yer alan izoenzimlerin özellikleri benzerlikler taşıırken farklı sınıflardaki izoenzimlerin fonksiyonel ve yapısal özellikleri bakımından son derece büyük farklılıklar taşıdığı tespit edilmiştir. Söz konusu enzimin katyonik izoenzimlerinin biri hariç olmak üzere tamamının heterodimer olduğu gözlemlenmiştir. Heterodimer olmayan izoenzimin GST 9,1 olduğu tespit edilmiştir. GST 9,1 24,5 kDa molekül kütleli ve homodimerdir. Diğer alt birimlerin molekül kütleleri 26,5 kDa- 24,5 kDa'dur. Saflaştırmada epoksi ile

aktifleştirilmiş Sepheroz-6B'ye bağılı GSH afinite kolonu kullanılmıştır (Singh *et al.* 1987).

İnsan karaciğer dokusundan GST'nin anyonik ve katyonik izoenzimleri saflaştırılarak alt birimlerin moleköl kütleleri 22,5 kDa ve 24,5 kDa olarak tespit edilmiştir. Katyonik GST'de %80 amonyum sülfat doygunluğa, anyonik GST'de ise %65 amonyum sülfat doygunluğa ulaşarak sülfatla fraksiyonlama uygulanmıştır. Saflaştırmada DEAE- selüloz anyon değışim kromatografisi, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ve izoelektrik fokuslamayla teknikleri kullanılarak birbirinden ayrılmaları sağlanmıştır (Awasthi *et al.* 1980).

Optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerlerinin sırasıyla 5,5, 65 °C ve 2 mM K-fosfat tampon olarak tespit edildiği insan kanı serumundan GST enziminin saflaştırılması işleminde GSH ve CDNB substratları için V_{max} ve K_M değerleri de bulunmuştur (Türkanoğlu 2007).

Sığırdan alınan karaciğerle yapılan başka bir çalışmada ise orange A agaroz afinite kromatografisi kullanılmıştır. DEAE-sephacel ile iki temel izoenzim ayrışmış ve bu iki formun izoelektrik pH'ları sırasıyla 6,7 ve 6,1'olarak bulunmuştur. Ayrıca bu izoenzimlerin aktivitelerinin Cd^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} ve Cu^{+2} iyonları tarafından inhibe edildiği görölmüştür. SDS-PAGE elektroforezi ile 27 kDa, jel filtrasyon ile tabii moleköl kütlesi 49 kDa olarak tespit edilmiştir (Asaoka 1984).

Spesifik aktivitesi 16,00 EÜ/mg protein olan %80 verimle ve 1143 kat seyreltmenin sağlandığı insan eritrositlerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılmıştır. Paclitaxel, cyclophosphamide ve gemciabine ilaçları için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,23 mM, 5,75 mM ve 6,35 mM olarak rapor edilmiştir. Ayrıca K_i sabitleri sırasıyla paclitaxel için $0,182 \pm 0,028$ mM, cyclophosphamide için $6,97 \pm 0,49$ mM, gemciabine için 6,71 mM olarak bulunmuştur (Erat and Şakiroğlu 2012).

Diğer bir çalışmada doğal hali molekül ağırlığı 53 kDa olarak tespit edilen ve hindi karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi için inhibisyon çalışmaları da yapılmıştır. Doğal halinin molekül ağırlığı tespit edilirken sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Ayrıca molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 26 kDa, olarak rapor edilmiştir (Akkemik et al. 2012).

İlaçların GST enzimi üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada ise antiinflamatuvar grubunda yer alan indometazinin kullanılmıştır. Bu çalışmada insan eritrosit glutatyon s-transferaz ve sıçan karaciğer glutatyon s-transferaz enzimlerine bu ilacın in-vitro etkileri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda sıçan karaciğerinden saflaştırılan enzim üzerine bu ilacın inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir (Nicholls and Ahokas 1984; Wu and Mathews 1983), ancak insan eritrosit izoenzimlerinin aktivitesinde ise pozitif etki edip artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Orhan 1994).

Uygun zamanda doğum gerçekleşmiş bir hastanın plesentasından alınan örnek üzerinde yapılan bir çalışmada ise plasental GST'nin (GST- π) saflaştırılması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Ayrıca saflaştırılan bu enzim üzerinde inhibisyon çalışmaları da yapılmıştır. Enzim 2,628 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle %0,5 verimle 16 kat saflaştırılabilmektedir. Substrat ilgileriyle alakalı yapılan incelemelerde CDNB ve GSH için K_M 'ler sırasıyla 0,55 mM ve 2 mM olarak tespit edilmiştir. Ampisilinin adlı ilaç ile yapılan inhibisyon çalışmasında ise ilacın enzim üzerinde inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür (Çelik et al. 2003).

Bir tür sinek olan bactroceraxın gelişim evreleri üzerinde yapılan saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda ksenobiyotiklerden bazılarının inhibisyon etkilerinin ne durumda olduğu incelenmiş ve elde edilen sonuçlar rapor edilmiştir (Chen Er-Hu et al. 2012).

Pirinçten elde edilen GST enzimi üzerine bir ağır metal olan Cd^{+2} 'un etkileri incelenmiş ve inhibisyon tespit edilmiştir. GST enzimi pirinç kökünden jel filtrasyon ve afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmış

kadmiyumlu ve kadmiyumsuz olmak üzere çalışmalar yapılmıştır (Chun-hua Zhang et al. 2013).

Cd^{+2} ve Mn^{+2} gibi doğada birikebilen ve canlı organizmalarda ağır metal zehirlenmelerine yol açabilen metaller kullanılarak yapılan bir çalışmada ise bahse konu metal iyonlarının sıçan karaciğer dokusu GST enzimi aktivitesini nasıl etkilediği incelenmiştir. MnCl_2 (2,0 mgkg-1) ya da CdCl_2 (2,5 mgkg-1) miktarları tek doz olarak verildiğinde, enzim aktivitesinin 24 saat sonra pozitif yönde etkilenecek %36 oranında arttığı rapor edilmiştir (Casalino et al. 2004).

Cr^{+6} metal iyonunun in-vitro şatlarda insan eritrositlerine etkilerini incelemek için yapılan bir çalışmada, bahse konu iyonun glutatyon-redüktaz aktivitesini negatif yönde etkilediği, glutatyon-peroksidaz enzim aktivitesini ise pozitif yönde etkileyerek arttırdığı tespit edilmiştir. Katalaz ve GST enzimlerinin aktivitelerini ise değiştirmedeği rapor edilmiştir (Al-Mustafa 2006).

GST aktivitesini azaltabilen ya da artırabilen bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri mevcuttur. Bu konuyla ilgili bir çalışmada karbontetraklorür ve brombenzen ratlara uygulanmış ve aktivite açısından değişiklikler incelenmiştir. Bu işlemler sonucunda serum GST enzim aktivitesinin pozitif etkilendiği, karaciğer GST enzim aktivitesinin ise negatif etkilenecek azaldığı görülmüştür (Çetinkaya vd 1993).

Yine farklı bir çalışmada, şifalı olmasıyla bilinen bir bitki türü olan *Thonningia sanguinea*'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olduğu bilinen thonningianin A (ThA), in-vitro olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir (Gyamfi et al. 2004).

Atlantik somonu ve kahverengi alabalık karaciğer ve böbrekleri dokuları kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada sitozolik GST saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada adı geçen dokulardan sitozolik GST'nin saflaştırılması için glutatyon-agaroz aginite kromatografisi ve HCPLC teknikleri

kullanılmıştır. Atlantik somonu karaciğer dokusu ile yapılan çalışmalar sonucunda enzim $0,26 \pm 0,081$ EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %70,58 verimle ve 57,2 kat, Atlantik somonu böbrek dokusu ile yapılan çalışmalar sonucunda ise $37,50 \pm 5,39$ EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %86,9 verimle ve 187 kat saflaştırılmış ve sonuçlar rapor edilmiştir. Kahverengi alabalık karaciğer dokusundan enzim $27,69 \pm 3,34$ EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %74,54 verimle ve 42,66 kat, böbrek dokusundan ise $21,96 \pm 4,531$ EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %67,48 verimle ve 56,30 kat saflaştırmıştır (Novoa-Valinas 2002).

GST enzimi aktivitesi üzerine pestisitlerin de etkileri incelenmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada iribaşlara konsantrasyonu 1,85-240 mg/L arasında değişen glifosat uygulanmıştır. Çalışmada glifosatın asetilkolin esteraz, butirilkolin esteraz, karboksil esteraz 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). Relyea (2006) ve Costa *et al.* (2008)'e göre iribaşlar değişen glifosat miktarına karşı oksidatif strese girmişlerdir ve GST konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla önemli derece düşmüştür. Luschchok *et al.* (2009)'un çalışmasına göre bu şekilde zehirlenen ve oksidatif strese maruz kalan balıklarda GST aktivitesi %29-34 oranında azalmaktadır (Lajmanovich *et al.* 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Laboratuvar çalışmaları süresince kullanılan TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin), Sephadex G-150, indirgenmiş glutatyon (GSH), coomassie brilliantblue G-250, N,N'-metil bisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), akrilamid, amonyum persüfat, brom timol mavisi, glutatyon agaroz ve beta merkapt etanol Sigma Chemical Company.'den; trihidroksimetilaminometan, NaOH, NaCl, sodyum asetat, glisin, HCl, gliserin, H₃PO₄, potasyum bisfosfat, KH₂PO₄, potasyum klorür, potasyum asetat, etanol, metanol, sodyum asetat, izopropanol ve asetik asit Merck AG'den temin edilerek kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihaz ve aletler

Aşağıda listelenen cihaz ve aletler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Karıştırıcı (Vorteks)	:WiseMix
Spektrofotometre	: Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible SHIMADZU UV-1800
Manyetik Karıştırıcı	: CHILTERN HOTPLATE HS31
pH Metre	: OHAUS STARTER 3100
Peristaltik Pompa	: GILSON MINIPLUS 3
Su Banyosu	: JENOTECH BS11
Soğutmalı Santrifüj	: THERMOSL 16R
MeterCG840 Elektroforez Tankı	: CONSORT EV265
Karıştırıcı (Shaker)	: COMBI-Shaker
Hassas Terazı	: OHAUS pioneer
Otomatik Pipet	: Eppendorf

Çalkalayıcı	: İsoLab
Saf Su Cihazı	: UltraPure (Typ1) Water
Güç Kaynağı	: Bio Rad Power Pac 3000
Corporation EC Buzdolapları	: Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	: Arçelik

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanış şekilleri

Çözeltilerin tamamında hazırlama aşamasında saf su kullanılmıştır.

3.1.3.1. Saflaştırılan enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M KH_2PO_4 : 2,612 gr KH_2PO_4 tartılarak 90 ml saf su kullanılarak çözüldü ve pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra hacim toplamı 150 ml olacak şekilde saf su eklendi.
2. 20 mM'lık GSH: 0,244 gr GSH tartılarak yaklaşık 20 ml saf su ile çözüldü ve sonrasında saf su kullanılarak toplam hacim 40 ml'ye getirildi.
3. 25 mM'lık CDNB: 0,202 gr CDNB tartılarak 16 ml %95'lik etanolde çözüldü ve daha sonra toplam hacim yine etanol ile 40 ml'ye getirildi.

3.1.3.2. Dokulardan homojenat eldesinde kullanılan çözelti

1. 50 mM Tris-HCl Tamponu: 0,15 gr Tris 20 ml saf su içerisinde çözüldü, pH 7,4 olacak şekilde ayarlanmış ve toplam hacim 25 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3.1.3.3. GST enzimi saflaştırmasında afinite kolonuna uygulanan çözeltiler

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl (Kolonun yıkanması, paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan çözelti): 0,17 gr KH_2PO_4 ve 1,075 gr NaCl tartılarak 100 ml saf suda çözülüp pH 7,4'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 125 ml'ye tamamlanmıştır.

2. 0,1 M H_3BO_3 ve 0,5 M NaCl (Afinite kolonunun yenilenmesi yani rejenerasyonu için kullanılan tampon) (Borat Tamponu): 1,86 gr H_3BO_3 ve 8,76 gr NaCl tartılarak 240 ml saf suda çözülmüş ve pH 8,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 300 ml'ye tamamlanmıştır.
3. 0,1 M $NaCH_3COO$ ve 0,5 M NaCl (Afinite kolonunun yenilenmesi yani rejenerasyonu için kullanılan diğer tampon) (Asetat Tamponu): 0,615 gr $NaCH_3COO$ ve 2,9 gr NaCl tartılarak 60 ml saf suda çözülmüş ve pH 4,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 75 ml'ye tamamlanmıştır.
4. %0,02 NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon malzemelerini bakteri etkilerine karşı korumada kullanılan çözelti): 2 mg NaN_3 alınarak bir miktar saf su içerisinde çözülmüş ve toplam hacmi yine saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
5. 2,5, 5 ve 10 mM'lık GSH çözeltisi içeren pH'sı 9,5 olan 50 mM Tris-HCl tamponu (kolonda tutunan GST enzimi elüsyonu için yararlanılan tampon): 50 mM'lık Tris- HCl çözeltisinde katı halde bulunan indirgenmiş glutatyonun uygun miktarlarda çözülerek 3 tüpten meydana gelen gradientle en düşük derişimli olandan başlanarak sırayla kolona uygulandı.

3.1.3.4. Bradford metodu ile protein tayininde kullanılanlar

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: 50 mg reaktifin, 25 ml ve %95'lik etanol içerisinde çözüldükten sonra mevcut çözelti içerisine 25 ml ve %95'lik fosforik asit (H_3PO_4) eklenmesiyle elde edilen çözelti. Çözeltinin toplam hacmi saf su eklenerek 500 ml yapıldı. Hazırlanmış olan çözeltinin ışık almayacak şekilde muhafazası sağlandı.

3.1.3.5. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 1 M Tris-HCl: 6,055 gr Tris tartılarak 40 ml saf suda çözüldükten sonra pH'ı 8,8 olarak ayarlandı ve toplam hacmi saf su ilave edilerek 50 ml yapıldı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 6,055 gr Tris tartılarak 40 ml saf suda çözüldükten sonra pH'ı 6,8 olarak ayarlandı ve toplam hacmi saf su ilave edilerek 50 ml yapıldı.

3. %0,8 Bisakrilamid-%30 Akrilamid çözeltisi: 7,5 gr akrilamid ve 0,2 gr bisakrilamid tartılıp, 17,3 ml saf su kullanılarak çözüldü ve toplam hacim saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.
4. %10'luk sodyum dodesil sülfat çözeltisi: 1 gr SDS reaktifi tartılarak 9 ml saf su içerisinde çözülüp toplam hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 gr amonyum persülfat tartılarak 9 ml saf su içerisinde çözülüp toplam hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 0,755 gr Tris ve 3,755 gr glisin tartılarak 225 ml saf su içerisinde çözülüp önceden hazırlanmış olan %10'luk SDS çözeltisinden 2,5 ml eklenerek çözeltinin pH'ı 8,8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: %100'lük gliserinden 1 ml, pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl'den 0,65 ml, %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml ve %10'luk SDS'den 1 ml ve alındı, saf su kullanılarak ile hacim 10 ml yapıldı. Hazırlanan bu çözelti kullanılmaya başlamadan önce 50 µl β-merkaptotanol eklenmiştir. Bu oran 950 µl numuneye karşılık gelen orandır.
8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel içerisinde proteinlerin yürütülürken sabitlenmesi amacıyla %10 TCA, %40 su ve %50 izopropanol içeriğe sahip karışım hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 10 ml asetik asit, 40 ml su ve 50 ml metanol karışımı içerisinde 0,1 gr Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözdürülmesiyle elde edildi.
10. Jelin yıkandığı çözelti: 10 ml asetik asit, 40 ml su ve 50 ml metanolün karıştırılmasıyla hazırlanan çözelti.
11. % 0,1'lik bromtimol mavisi: 0,01 M ve 16 ml sodyum hidroksit içerisinde 0.1 gr indikatörün çözünmesi ve toplam hacmin saf su ilave edilerek 100 ml yapılmasıyla hazırlanan çözelti.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Tirozin, triptofan ve fenil alanin aminoasitleri 280 nm'de yapısında bulundukları proteinlerin maksimum absorbens göstermesini sağlar. İşte bu esasa dayanılarak kalitatif protein tayini, 280 nm'de absorbens değerlerinin ölçülmesi ile yapılır (Segel 1968). Sözü edilen bu metot ile kromatografi sonrası gradientli elüsyon yapıldı ve fraksiyon toplayıcısıyla eşit hacimler alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini gerçekleştirildi. Bu işlem esnasında kuvars küvetlere alınan fraksiyonların, spektrofotometre cihazıyla köre karşı absorbens değerleri okunarak kaydedildi.

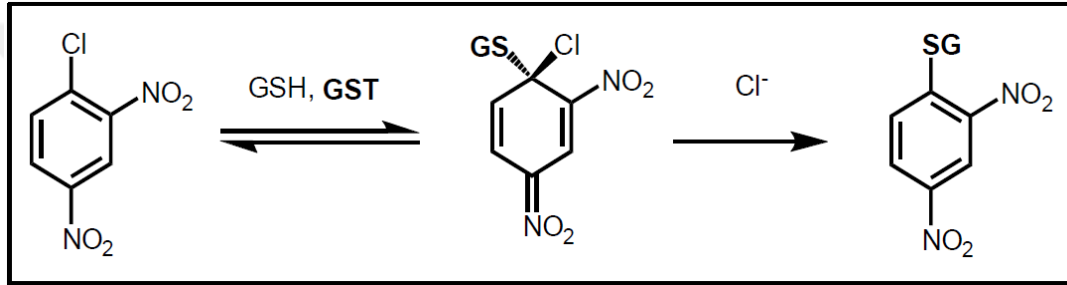
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

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

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

3.2.2. Glutasyon S-transferaz enzimi aktivite tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir aromatik elektrofile bir glutasyon molekülünü katalizler. Sıklıkla tercih edilen aromatik elektrofil CDNB'dir. CDNB'nin kullanılmasıyla oluşan DNB-SG (dinitrobenzen S-glutasyon) ürün 340 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Şekil 3.1). Böylelikle bahse konu dalga boyundaki absorbans artışı kullanılarak aktivite ölçülebilir. Bu metoda göre yapılan çalışmalarda aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.1. GST enzim aktivite ölçümünde spektrofotometrik ölçüm yapılabilmesi için kullanılan ürünün oluşum basamakları (Habdous et al. 2002)

Ortamda GSH bulunmadığında CDNB substratı GST'yi seri bir şekilde inaktive eder. İşte bu sebeptir ki sebepten reaksiyonun CDNB ile başlatılmaması gerekir. Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen enzim numunelerinin aktivite ölçümleri için toplam hacim 1000 µl olacak şekilde Çizelge 3.1'de verilen çözelti ortamı içeren küvetler hazırlandı. Spektrofotometreye yerleştirilen küvetler ile gerekli okumalar yapıldı. Başlangıçta ve her dakikada 1 olmak üzere her bir küvet için 3 dk'lık okumalar yapıldı ve elde edilen değerler kaydedildi (Habig et al. 1974).

Çizelge 3.1. GST enzimi aktivite ölçümündeki küvet içeriği

Küvet İçeriği	Kör	Numune
0,1 M aktivite tamponu	200µl	200µl
25 mM CDNB	20µl	20µl
20 mM GSH	50µl	50µl
Saf su	730µl	700µl
Enzim numunesi	-	30µl

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

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

EÜ: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: 1 dk'lık absorbans değişim farkı

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

VT: Ölçüm yapılan küvet toplam hacmi

VE: Ölçümün yapıldığı küvete eklenen enzim numunesi hacmi

SF: Seyreltilen örneklerde kullanılan seyreltme faktörü

3.2.3. Siraz Balığı karaciğer dokusundan GST enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Murat Nehri'nden elde edilen balıklar (Siraz) soğuk zincir kurallarına uyularak Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirildi ve -80 °C'de çalışmaların başlayacağı ana kadar muhafaza edildi. Balıkların dokuları ayrıldıktan sonra 6 gr doku tartıldı ve küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot ile muamele edildi ve havan yardımıyla bulamaç kıvamına getirildi. Herbir gram

için 3 ml Tris-HCl tamponuyla süspanse edildi. Oluşan karışım tülbent yardımıyla süzildükten sonra 12.000 rpm'de yarım saat santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan çökelti atıldı ve böylelikle homojenat elde edilmiş oldu. Yapılan işlemlerin tamamı +4 °C'de gerçekleştirildi.

3.2.3.b. Afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması

Glutasyon-Agaroz jeli 1 gram tartıldı ve 200 ml saf su ve dengeleme tamponu ile safsızlıkları uzaklaştırmak için birkaç defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu esnada jelin şişirilmesi tamamlanmış oldu. Sutrompu ile vakum yapılarak şişirilen jelde bulunan hava alındı. Elde edilen ve hazırlanmış olan jel, 1x10 cm ebatlarındaki kolona paketlenildi. Sistem kapalı sistem olarak hazır hale getirildi. Hazırlanan dengeleme tamponu peristaltik pompa yardımıyla kolona uygulandı. Tampon ve elüatın 280 nm'deki absorbanlarına ve pH'larına bakılarak kolonun dengelendiği anlaşıldı. Böylelikle afinite kolonu hazır hale getirildi (Güvercin *et al.* 2008; Toribio *et al.* 1996).

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

3.2.4. Enzim saflığının SDS-PAGE kullanılarak kontrolü

Enzimin saflaştırılma işleminin ardından %3-15 kesikli SDS-PAGE kullanıldı. Bu işlemde Laemmli metodu uygulanarak enzimin saflık derecesinin kontrolü yapıldı (Laemmli 1970).

Bu işlem için elektroforez cihazının plakaları ilk olarak alkol ve sonrada saf su kullanılarak iyice yıkandı. Düz bir plaka ve her kenarında aralık oluşturu bir

plaka tam olarak üst üste getirildi ve kısıkaçlar kullanılarak birbirine sabitlendi. Birbirine tutturulan plakalar, içinde sızmayı önleyen sünger bulunan özel jel hazırlama bölümüne kondu. Mevcut plakaların üst kısmından 1-2 cm kalıncaya kadar hazırlanan ayırma jeli enjektör yardımıyla dolduruldu. Bu ayırma jelinin tamamen donması beklendi, ayırma jelinin tamamen donarak katılaştığı tespit edildikten sonra yığma jeli ayırma jelinin üst kısmında kalan boşluğu dolduruldu. Numunelerin yükleneceği kuyucukların oluşması için tarak olarak adlandırılan parça dikkatlice yerleştirildi. Hazırlanan yapının kurumasını önlemek amacıyla ıslatılan süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı. Bu esnada yığma jelinin de katılışp setleşmesi beklendi. Yığma jelinin katılışmasıyla birlikte tarak adı verilen parça dikkatli ve yavaş bir şekilde çıkarılarak numunelerin yüklemesinin yapılacağı kuyucuklar oluşturulmuş oldu. Enzim örnekleri yaklaşık olarak 10 µg protein bulunduracak şekilde hazırlandı. 50 µl toplam hacim oluşturularak 1'e 1 oranda numune tamponu eklendi. Yaklaşık olarak 3 dk kadar kaynar su banyosunda inkübe edildi.

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

Bu işlem esnasında numunelerin mesafelerinin takibi numune tamponuna eklenen brom timol mavisi sayesinde gerçekleşti. Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından akım kesildi ve plakalar arasında bulunan jel özenle çıkarıldı. Çıkarılan jel sabitleştirme çözeltisi içerisine kondu. Yaklaşık 20 dk kadar sabitleştirme çözeltisinde bekletilen jel, çıkarıldı ve boyama çözeltisi içerisine konuldu. Çalkalayıcı kullanılarak boyama çözeltisi içerisinde 2 saat kadar bekletilen jel boyama işleminden sonra çıkarıldı ve yıkama çözeltisine kondu. Renginin açılıp

protein bantlarının belirginleşmesi için çalkalayıcıda yıkanan jel, daha sonra çözeltiden çıkarıldı ve fotoğraflandı.

Çizelge 3.2. Elektroforezde kullanılan jellerin hazırlanışı

Yığılma jeli	Ayırma jeli
5 ml 1 M Tris-HCl pH:8,8	0,41 ml 1 M Tris-HCl pH:6,8
6,53 ml %30'luk akrilamid- %0,8 bisakrilamid	0,8 ml %30'luk Akrilamid- %0,8 bisakrilamid
0,2 ml %0,1'lik SDS	0,03 ml %0,1'lik SDS
0,13 ml %5'lik TEMED	0,03 ml %10'lik TEMED
1 ml saf su	2,45 ml saf su
0,2 ml %10'luk PER	0,07 ml %5'lik PER

3.2.5. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile tayini

Molekül kütlesi tayininde standart proteinler olarak, 97 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa ve 14,3 kDa'lık standart olan proteinler kullanıldı. Siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılmış GST için yapılan elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin ve örneğin R_f değerleri hesaplanmış sonrasında $\log M_A - R_f$ standart grafikleri çizilmiştir. Siraz balığı karaciğer dokusundan elde edilen GST enziminin yani örneğin R_f değeri standart grafikte yerine konularak hesaplamalar yapılmış ve enziminin $\log M_A$ 'sı belirlemiştir. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi tespit edildi (Laemmli 1970).

Proteinlerin R_f değeri;

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

formülüyle yapılan hesaplamalar sonucunda belirlendi.

X_e = Proteinin jelde yürüdüğü uzunluk

X_{boya} = Boyanın jelde yürüdüğü uzunluk

3.3. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi karakterizasyon uygulamaları

3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi optimum pH'sını belirleyebilmek için pH'sı 5,0 - 8,0 aralığında değişen (5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0) fosfat tamponları hazırlandı. Herbir tampon ile enzimin aktivite ölçümleri yapılarak kaydedildi.

3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum aktivite verdiği iyonik şiddeti belirleyebilmek için 0,001M, 0,005M, 0,01M, 0,03M, 0,05M, 0,07M, 0,1M, 0,13M, 0,15M, 0,17M ve 0,2M fosfat tamponları hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri daha önceki çalışmalarda bulunan optimum pH değerine ayarlanarak herbir çözelti için aktivite ölçümleri yapılarak kaydedildi.

3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum sıcaklığını bulabilmek için elektronik olarak kullanabilen ısıtm-soğutma özellikli su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklığı belirleyebilmek için optimum iyonik şiddet ve pH'da çözeltiler hazırlandı. 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C ve 70 °C'deki sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapılarak kaydedildi.

3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin stabil olduğu pH'yı tespit edebilmek için fosfat tamponunun pH değerleri 6,5, 7,0, 7,5, ve 8,0 olan çözeltiler hazırlandı. Hazırlanmış olan çözeltilerden 500 µl alındı ve üzerine 500 µl enzim çözeltisi ilave edildi sonrasında ependorf tüplerine kondu. Tüplerdeki çözeltilerde ilk okuma yapıldı ve +4 °C'de saklandı. 8 gün süresince 24 saatte bir aktivite ölçümü yapılarak enzimin satabil olduğu pH değeri tespit edildi.

3.3.5. GSTenziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tespitine yönelik çalışmalar

Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin CDNB ve GSH substratlarının sahip olduğu K_M ve V_{max} değerlerini belirleyebilmek amacıyla sabit GSH (1 mM) konsantrasyonunda CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonuyla (0,03 mM, 0,06 mM, 0,09 mM, 0,12 mM ve 0,15 mM) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler ışığında $1/V-1/[CDNB]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik yardımıyla CDNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiş oldu. Yine aynı şekilde sabit CDNB (0,5 mM) konsantrasyonunda GSH'ın 5 farklı konsantrasyonu (0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM ve 0,125 mM) ile aktivite ölçümleri yapıldı ve $1/V-1/[GSH]$ grafiği çizildi. Bu grafikte GSH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

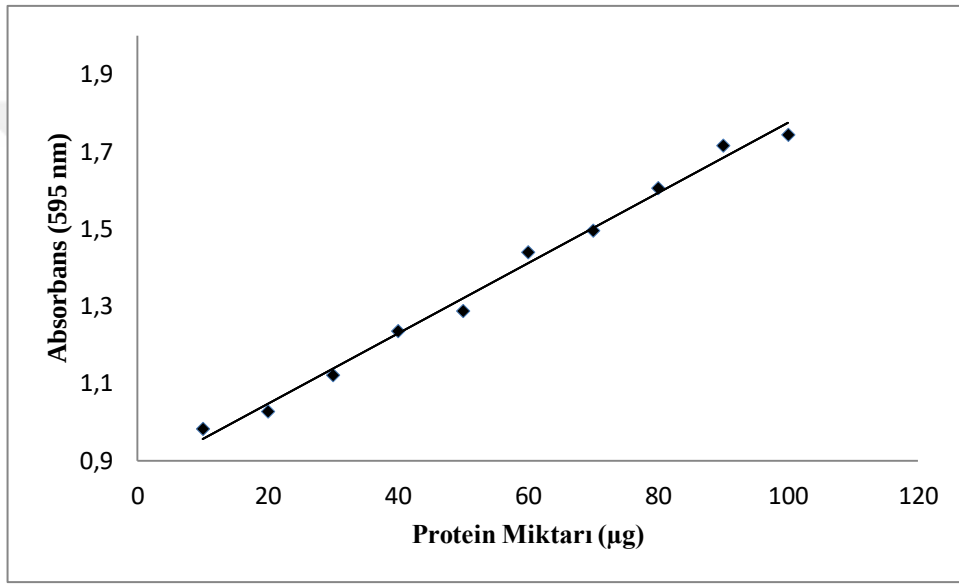
3.3.6. Se^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^+ ve Pb^{+2} metal iyonları ile Esfenvalerate, Deltamethrin, Cypermethrin, Diniconazole ve Atrazine pestisitlerinin GST enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Metal iyonları ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini değerlendirmek için farklı derişimleri kullanılarak GST enzimi ile aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibitör olmayan koşullardaki aktivite değeri %100 olarak kabul edildi ve inhibitör bulunan ortamlarda aktiviteler bağıl yüzde olarak hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonuna karşılık gelen aktivite yüzdelere grafikleri çizilerek enzim aktivitesinin yarıya indiği inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplandı. Ayrıca Cheng Prosof denklemi yardımıyla K_i sabitleri hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

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

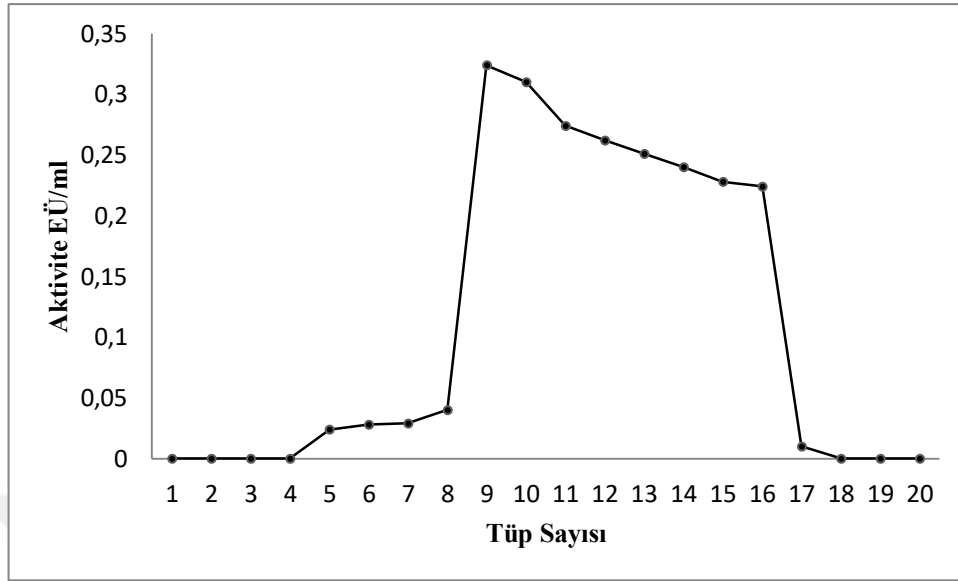


Şekil 4.1. Proteinlerin kaantitatif tayini için Bradford yönteminde kullanılan standart grafik

4.2. Siraz Balığı Karaciğer Dokusu GST Enziminin Saflaştırma İşlemi İle İlgili Sonuçlar

4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları

Hazırlanan homojenat dengelenen afinite kolonuna yüklendi. Kolon uygun tampon çözeltisi ile yıkandı ve yıkama işlemi sonucunda enzim gradientli elüsyon marifetiyle 36,1 EÜ/mg spesifik aktivite ile, %73,6 verim ve 55,70 kat saflaştırılmış olarak elde edildi. saflaştırma işlemine ait basamaklar Çizelge 4.1'de gösterildi. Elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri ölçülerek Şekil 4.2'de gösterilen elüsyon grafiği çizildi.



Şekil 4.2. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin afinite kolonuna ait elüsyon grafiği

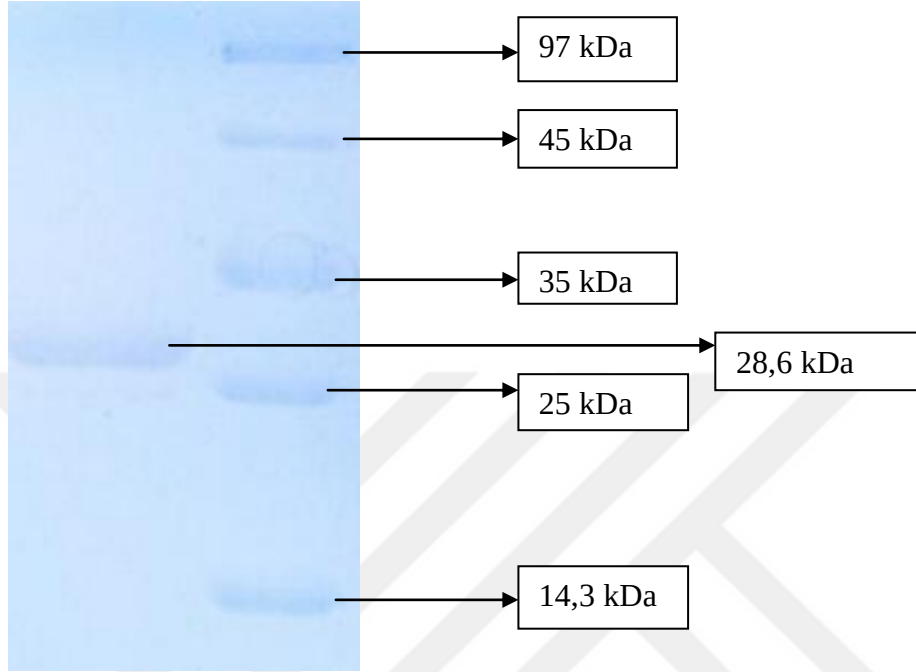
Çizelge 4.1. Glutasyon S-Transferaz enzimi afinite kromatografisi sonucunda oluşturulan saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Top. Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Top. protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spes. Akt. (EÜ/ml)	%Ver.	Saflaş. Katsayısı
Homojenat	30	1,125	1,735	52,05	33,75	0,648	100	1
Afinite Kromatografisi	8	3,105	0,0861	0,688	24,84	36,1	73,6	55,70

4.2.2. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflığının kontrolü

Siraz Balığı karaciğer dokusundan afinite kromatografisi ile alınan elüatlar içeğirindeki GST enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemi ile yapıldı. Saflık kontrolünün yapılabilmesi için bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi elektroforez sistemi kuruldu ve enzim numuneleri ile diğer proteinler sırasıyla kuyulara uygulandı.

Uygulama sonucu proteinlerin jel içerisindeki yürüme mesafeleri ölçülerek kaydedildi. Sonuçta oluşan bantları gösterir fotoğraf Şekil 4.3'te gösterildi.

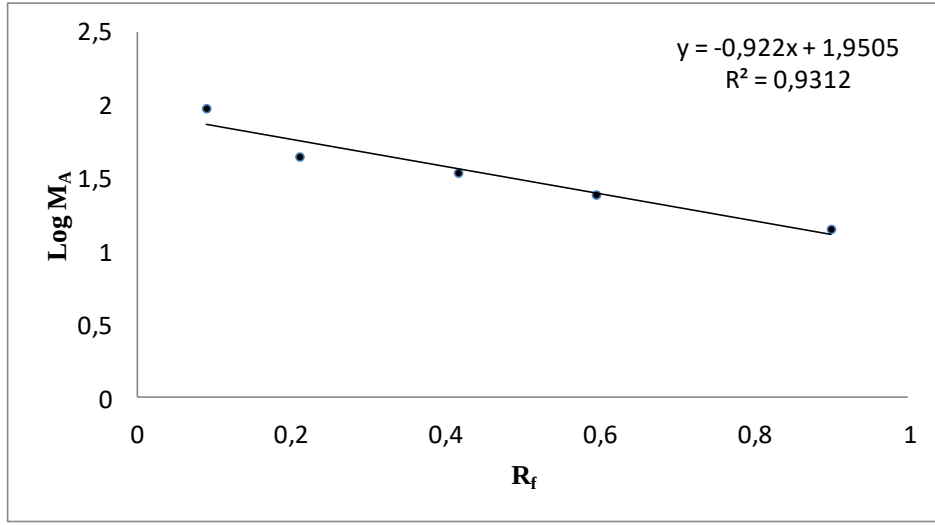


Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

4.3. Siraz Balığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

4.3.1. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları

Afinite kromatografisi sonucu alınan numuneler SDS-PAGE'de yürütüldü ve sonra fotoğraflandı (Şekil 4.3). Numunenin ve standart proteinlerin jel içerisinde yürüyebildikleri mesafeler ölçülerek R_f değerleriyle ilgili hesaplamalar yapıldı. Sonuç olarak R_f -log M_A grafiği çizildi ve çizilen grafikten saflaştırılmış GST enzimini molekül ağırlığı 28,6 kDa olarak belirlendi.



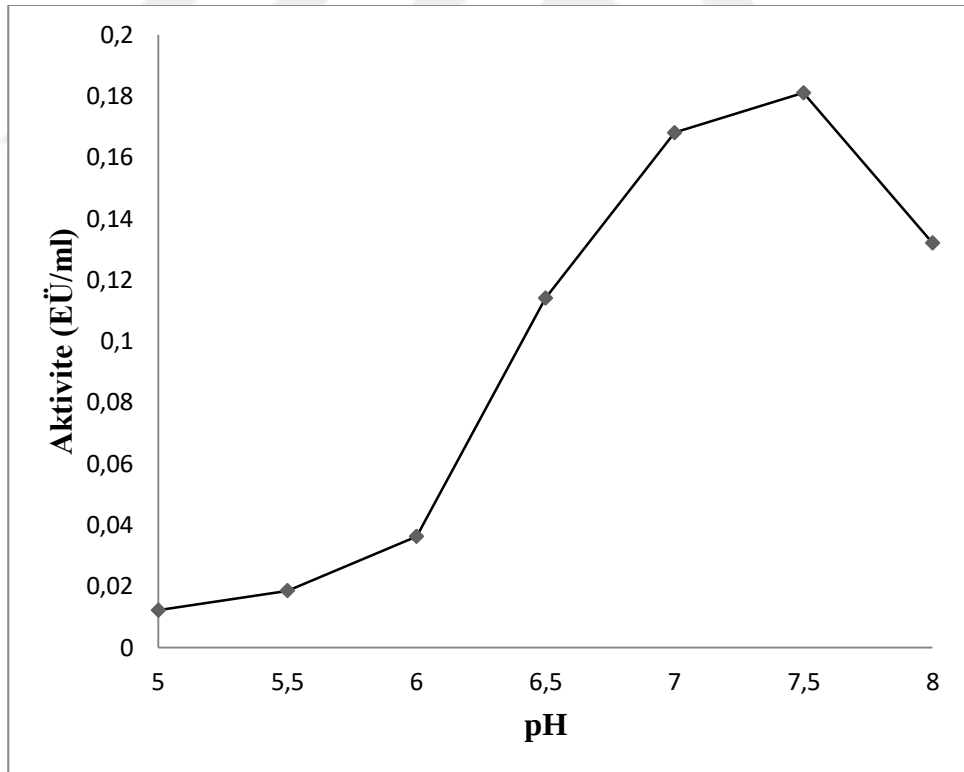
Şekil 4.4. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enzimi için logM_A-R_f grafiği

4.3.2. Optimum pH'nın bulunmasına yönelik yapılan çalışmaların sonuçları

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi optimum pH'sı tespit edebilmek için, pH değeri 5,0-8,0 aralığında değişen (5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0), tamponlardan ibaret olan oluşan 7 adet çözelti farklı çözelti kullanıldı. Enzimin herbir tamponda gösterdiği absorbans verileri spektrofotometre cihazıyla ölçüldü ve enzim aktivite değerleri hesaplanarak kaydedildi. Yapılan çalışmalar sonucu siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılarak elde edilen GST enziminin optimum pH değeri aşağıdaki Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5'te de gösterildiği gibi 7,5 olarak tespit edildi.

Çizelge 4.2. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi ile yapılan aktivite ölçümleri

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0121
5,5	0,0185
6,0	0,0362
6,5	0,114
7,0	0,168
7,5	0,181
8,0	0,132



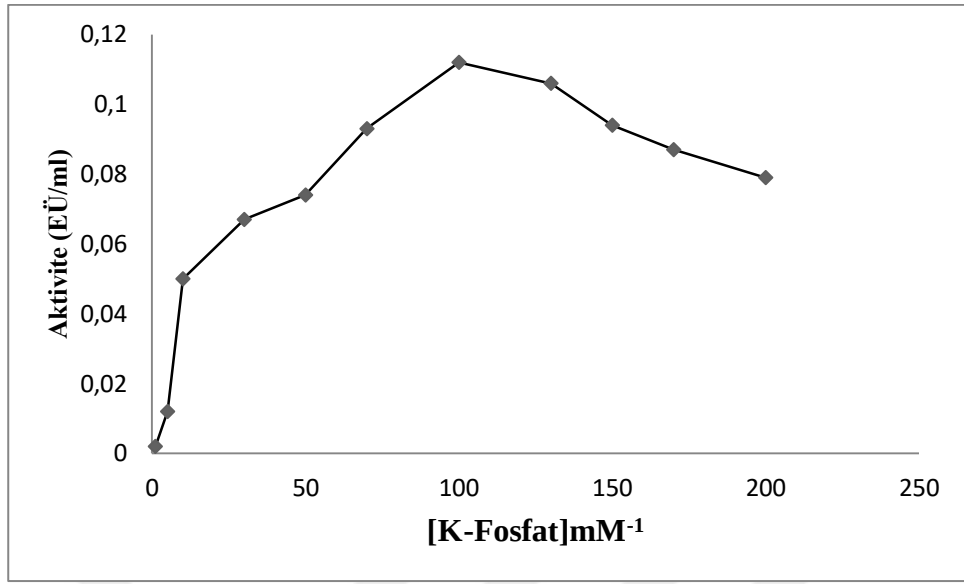
Şekil 4.5. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin K-fosfat tamponu kullanılarak elde edilen optimum pH belirlenmesine yönelik pH-aktivite grafiği

4.3.3. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaların sonuçları

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin en iyi aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiş olan optimum pH'daki fosfat tamponunun farklı konsantrasyon içeriklerine sahip çözeltileri hazırlandı ve bu bahse konu farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları aracılığıyla enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü. Daha sonra her bir tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. Cihazdan alınan veriler ışığında her bir tampon için aktivite değerleri bulundu. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddet değeri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'ta da gösterildiği gibi 100 mM olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçümü sonuçları

İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,001	0,002
0,005	0,012
0,01	0,050
0,03	0,067
0,05	0,074
0,07	0,093
0,1	0,112
0,13	0,106
0,15	0,094
0,17	0,087
0,2	0,079



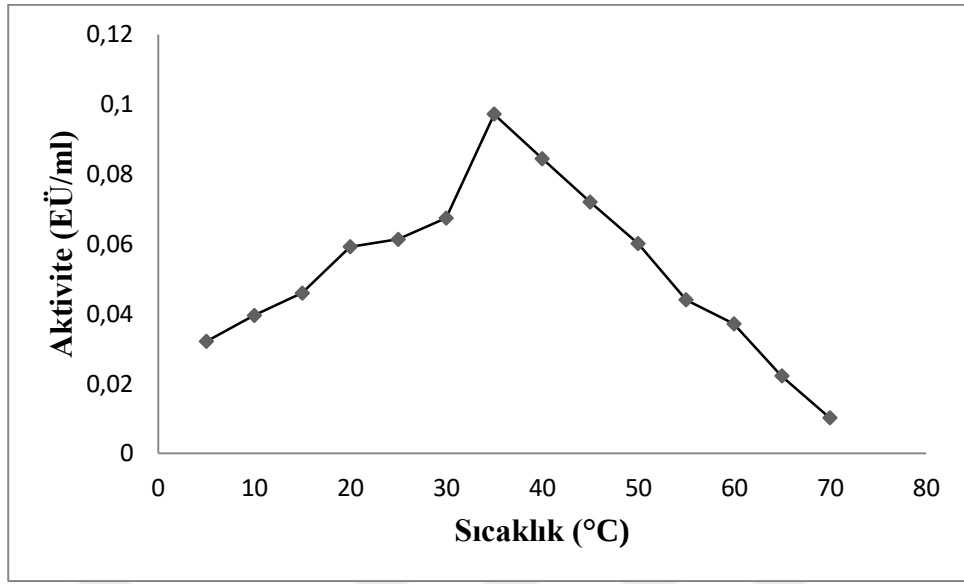
Şekil 4.6. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum iyonik şiddet değeri belirlenebilmesi için hazırlanan [K-fosfat]-aktivite grafiği

4.3.4. Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi için optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum iyonik şiddet ve pH'da tampon kullanıldı. 5°C ile 70 °C arasında her 5 °C'de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler ışığında siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi için optimum sıcaklık Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi 35°C olarak bulundu.

Çizelge 4.4. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
5	0,0321
10	0,0395
15	0,0459
20	0,0592
25	0,0613
30	0,0674
35	0,0972
40	0,0844
45	0,0720
50	0,0601
55	0,0440
60	0,0371
65	0,0222
70	0,0102



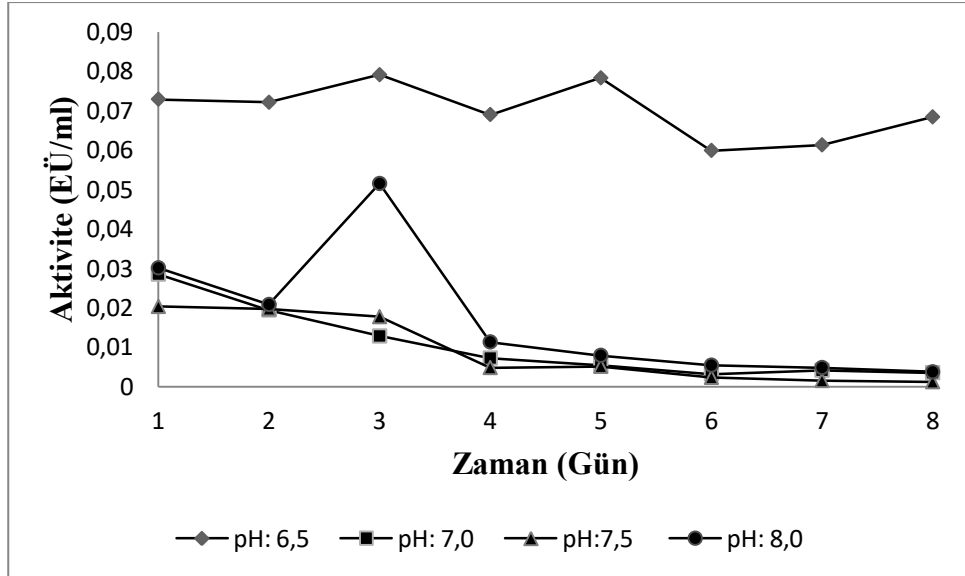
Şekil 4.7. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin optimum sıcaklığı için farklı sıcaklıklarda ölçülen sıcaklık-aktivite grafiği

4.3.5. Stabil pH'nın belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Siraz Balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enziminin stabil olduğu pH'yı bulabilmek amacıyla uygun iyonik şiddete değerine sahip farklı pH (6,5-7,0-7,5-8,0) değerlerinde tamponlar hazırlandı. 1/1 oranı kullanılarak saf enzim ile tampon çözelti karıştırıldı ve her gün olmak üzere aktivite değerleri saptandı. Sepektrofotometre cihazıyla 24 saatte bir ölçülen değerler kaydedildi. Siraz balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enziminin stabil pH değeri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8'de de gösterildiği üzere pH: 6,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

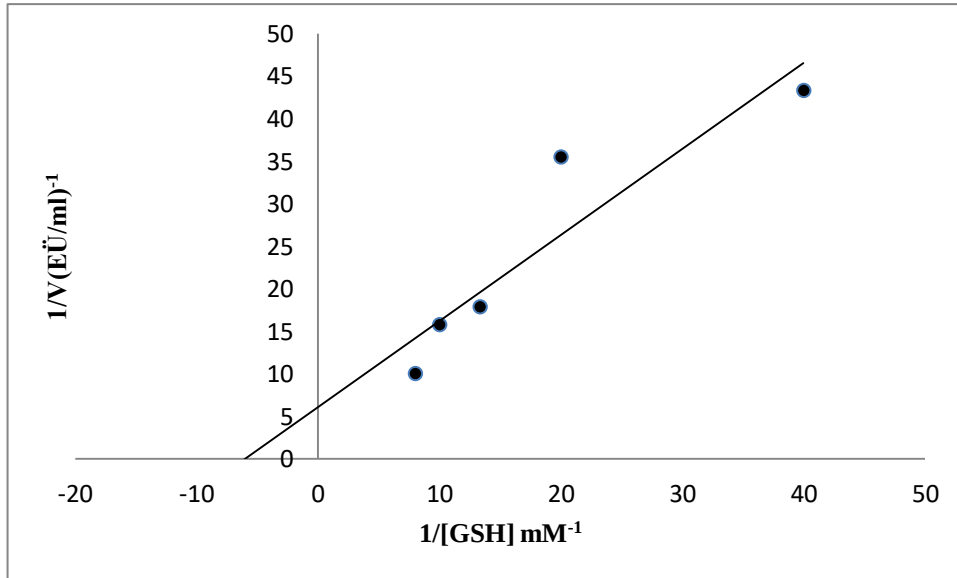
Zaman (Gün)	pH: 6,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH: 7,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH: 8,0 Aktivite (EÜ/ml)
1	0,0729	0,0285	0,0203	0,0301
2	0,0721	0,0194	0,0197	0,0208
3	0,0791	0,0128	0,0177	0,0515
4	0,0690	0,0072	0,0048	0,0113
5	0,0783	0,0054	0,0051	0,0079
6	0,0599	0,0032	0,0023	0,0054
7	0,0613	0,0041	0,0015	0,0048
8	0,0684	0,0035	0,0012	0,0037



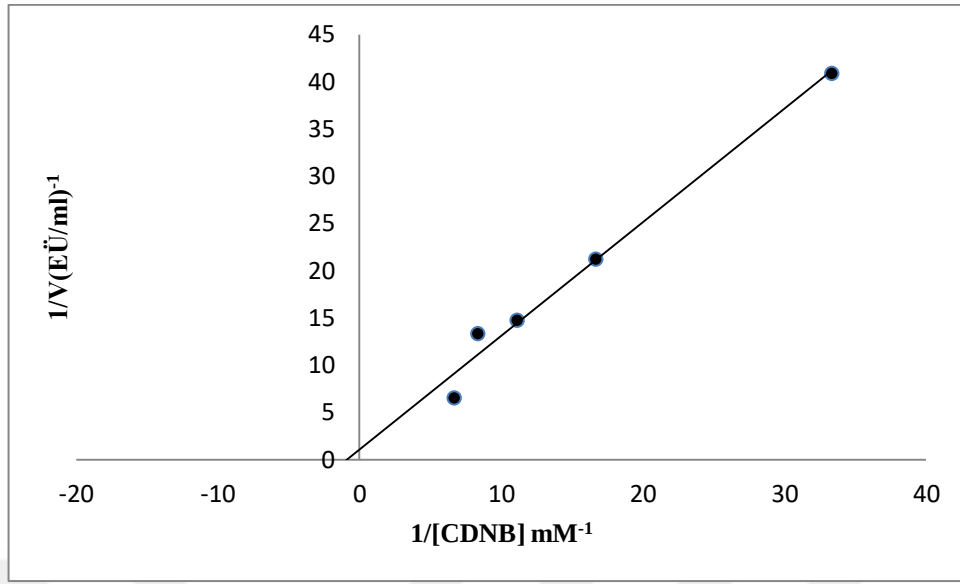
Şekil 4.8. Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enziminin stabil olduğu pH'sını belirlemek için yapılan çalışma sonucu elde edilen zaman-aktivite grafiği

4.3.6. Siraz balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH substratları için V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Siraz balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH substratlarına ait V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenebilmesi için 1 mM'lık sabit GSH konsantrasyonuna karşın CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonuyla (0,03 mM, 0,06 mM, 0,09 mM, 0,12 mM, 0,15 mM) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerle $1/V-1/[CDNB]$ grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak CDNB için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi. Aynı şekilde CDNB için de sabit 0,5 mM'lık konsantrasyonuna karşın GSH'ın 5 farklı konsantrasyonuyla (0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,125 mM) aktivite ölçümleri yapıldı ve $1/V-1/[GSH]$ grafiği çizildi ve GSH için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda CDNB için K_M değeri 1,179 mM ve V_{max} değeri 0,979 EÜ/ml olarak; GSH için ise K_M değeri 0,168 mM ve V_{max} değeri 0,166 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri yapılırken optimal şartlarda yapıldı. Elde edilen grafikler Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterildi. Ayrıca grafikler kullanılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterildi.



Şekil 4.9. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi ile sabit CDNB (0,5 mM) konsantrasyonunda GSH için V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesine ait grafiği



Şekil 4.10. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi ile sabit GSH (1 mM) konsantrasyonunda CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine ait grafik

Çizelge 4.6. Siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
GSH	0,168	0,166
CDNB	1,179	0,979

4.4. Siraz Balığı Karaciğer Dokularından Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin ve Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

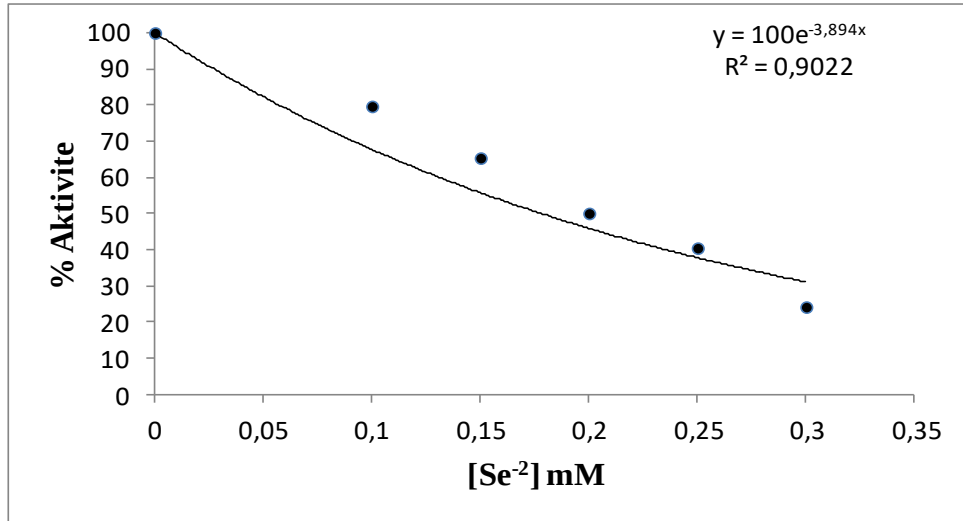
4.4.1. Siraz balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Çalışma yapılan ağır metallerden, siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenlerin en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteleri bulunarak % Aktivite-[I] değerleri hesaplanmış, grafikler çizilmiş ve söz

konusu metal iyonları için IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamaların ardından Se⁻², Ba⁺², Cu⁺², Ag⁺ ve Pb⁺² metal iyonları için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,177, 0,104, 0,195, 0,30 ve 0,128 mM olarak K_i değerleri ise sırasıyla 0,0015, 0,00086, 0,0016, 0,0025 ve 0,001 mM olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Se⁻² iyonunun Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

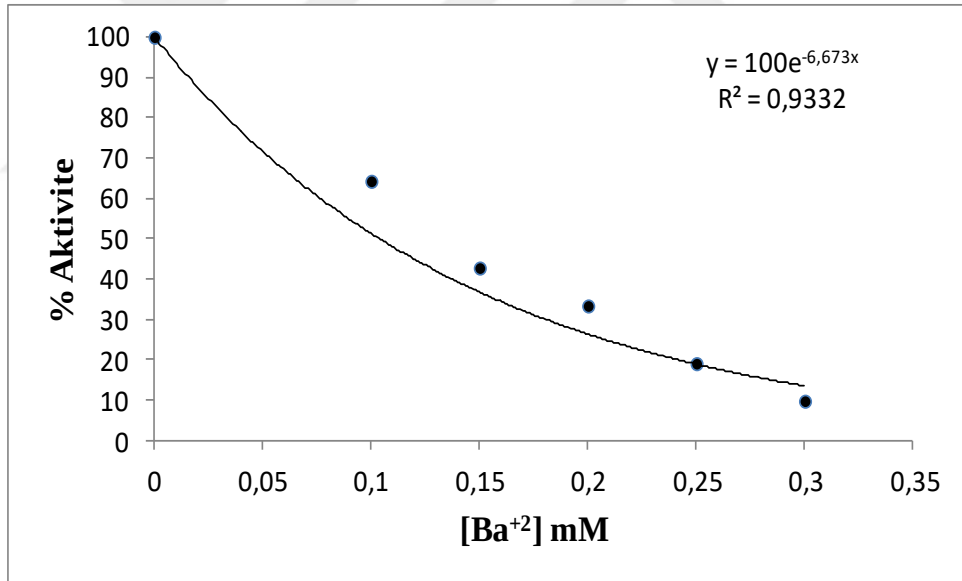
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,1	79,7
0,15	65,4
0,20	50,1
0,25	40,5
0,30	24,2



Şekil 4.11. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Se⁻² iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.8. Ba⁺² iyonunun Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

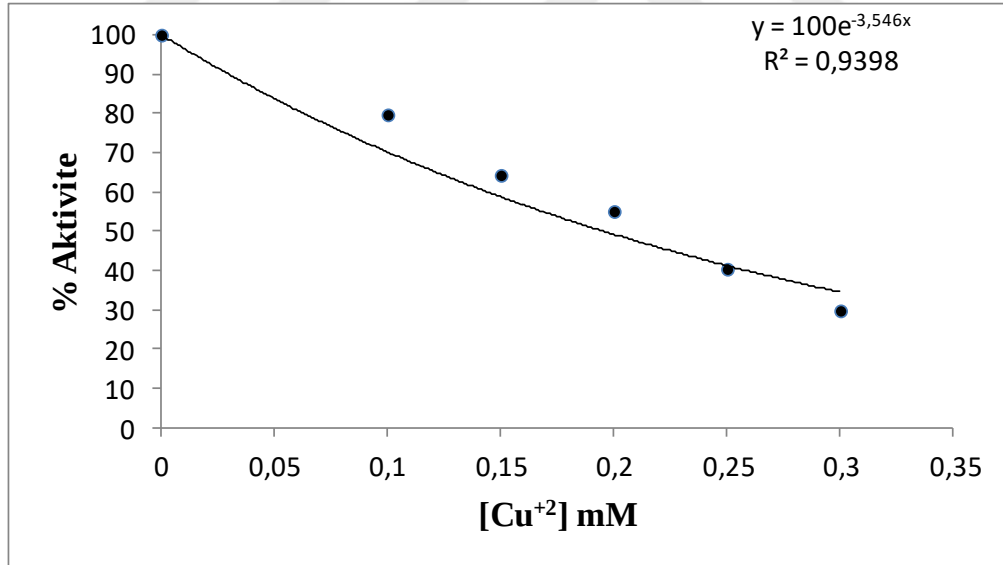
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,1	64,3
0,15	42,8
0,20	33,4
0,25	19,1
0,30	9,8



Şekil 4.12. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Ba⁺² iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.9. Cu^{+2} iyonunun Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

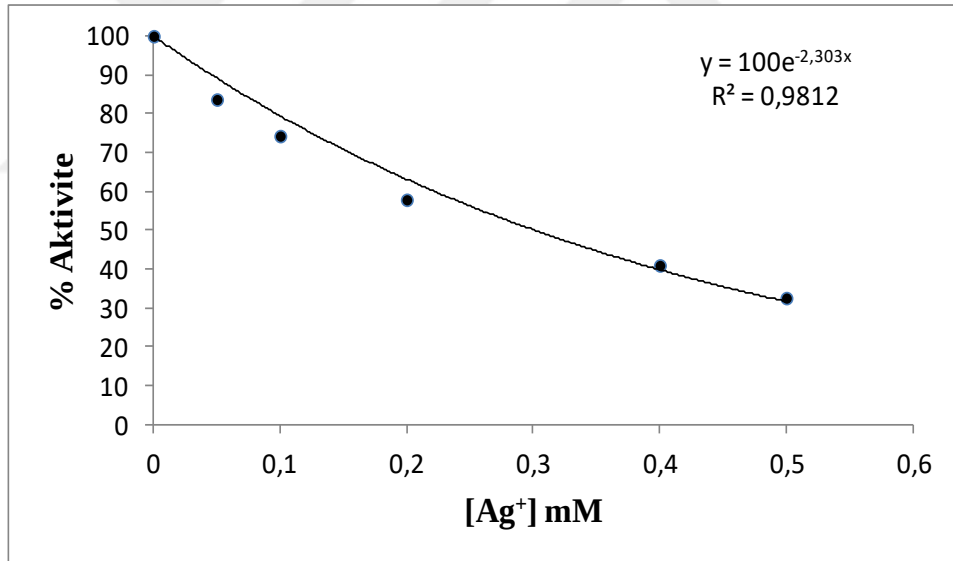
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,1	79,7
0,15	64,3
0,20	55,1
0,25	40,4
0,30	29,8



Şekil 4.13. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Cu^{+2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.10. Ag^+ iyonunun Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

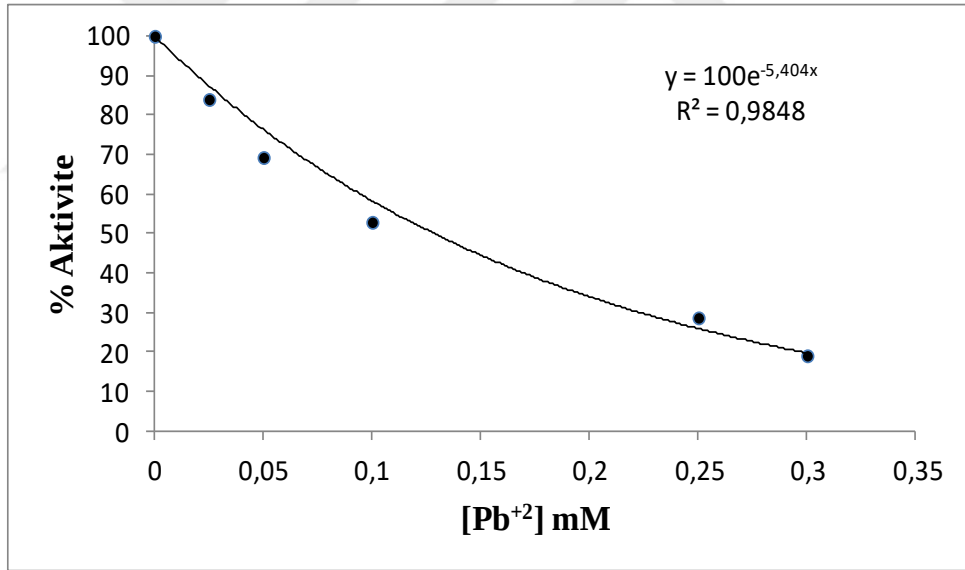
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,05	83,7
0,10	74,3
0,20	57,9
0,40	41
0,50	32,6



Şekil 4.14. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Ag^+ iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.11. Pb^{+2} iyonunun Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,025	84
0,05	69,3
0,10	52,9
0,25	28,7
0,30	19,1



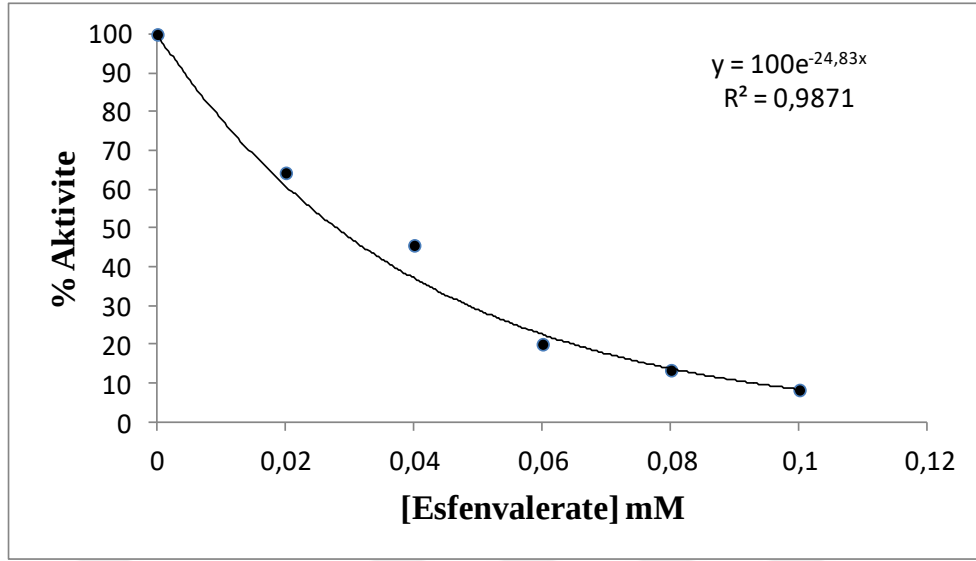
Şekil 4.15. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Pb^{+2} iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.2. Siraz balığı karaciğer dokularından saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Çizilen grafikler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda, esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole ve atrazine pestisitleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,028, 0,645, 0,019, 0,694 ve 0,512 mM olarak K_i değerleri ise sırasıyla 0,00023, 0,0054, 0,00016, 0,0058 ve 0,0043 mM olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Esfenvalerate pestisitinin Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

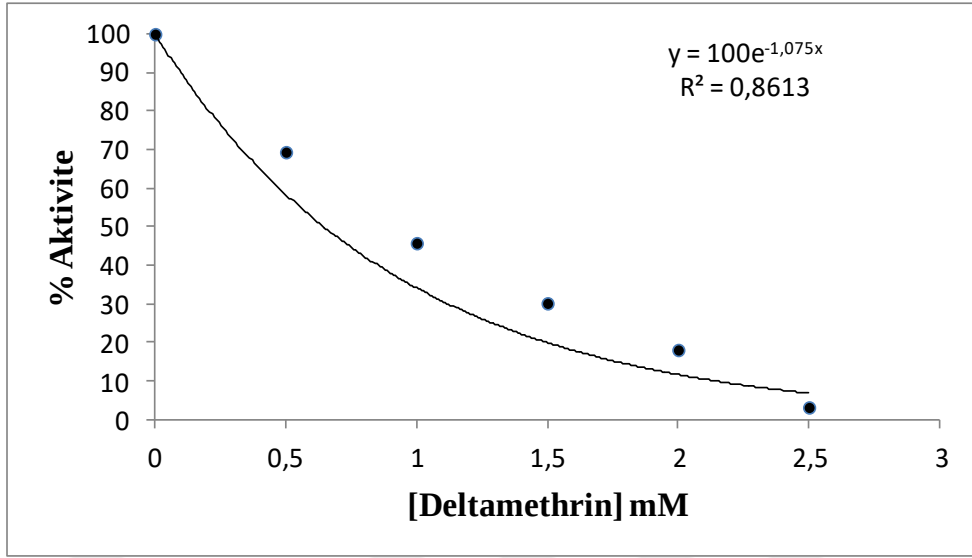
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,02	64,3
0,04	45,6
0,06	20,1
0,08	13,4
0,10	8,3



Şekil 4.16. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Esfenvaleratenin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.13. Deltamethrin pestisitinin Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

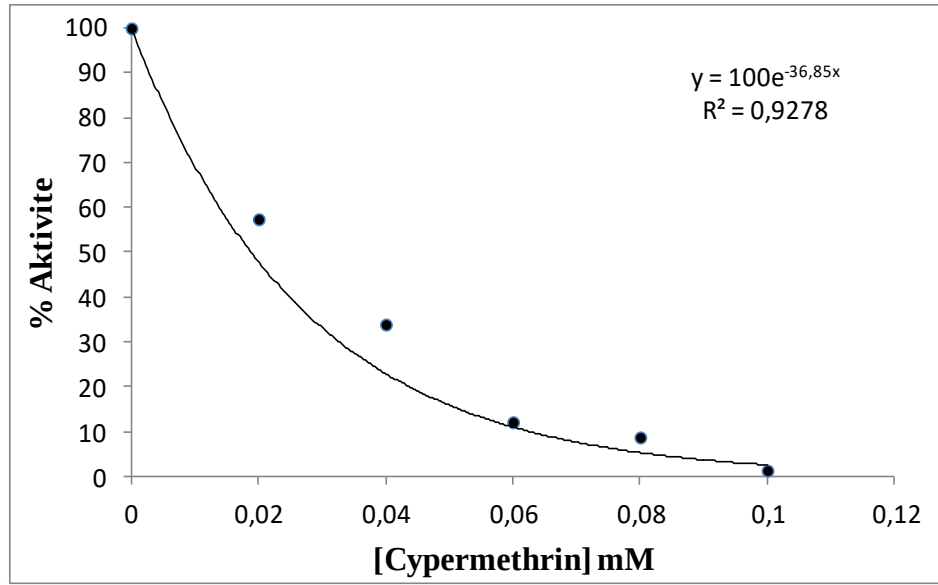
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,5	69,4
1,0	45,8
1,5	30,2
2,0	18,1
2,5	3,2



Şekil 4.17. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Deltamethrinin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.14. Cypermethrin pestisitinin Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

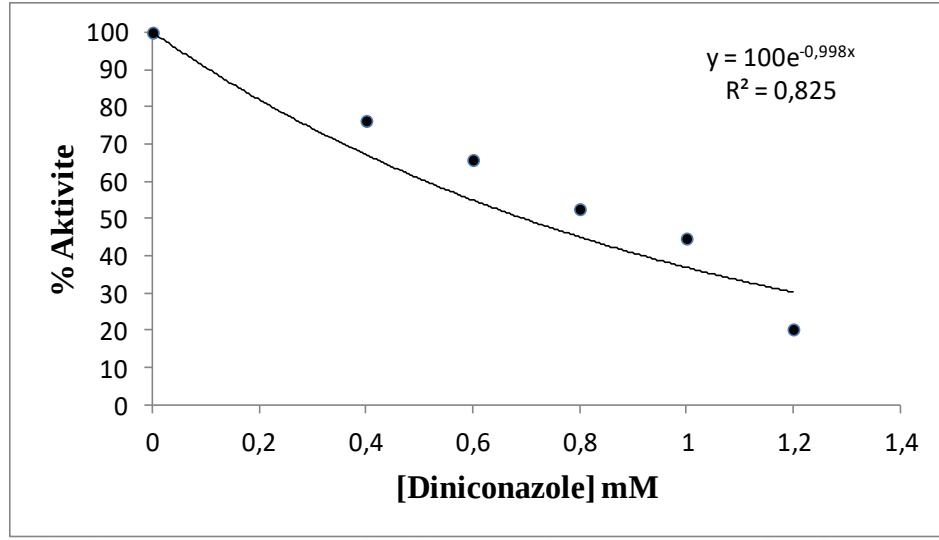
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,02	57,4
0,04	33,9
0,06	12,1
0,08	8,7
0,10	1,3



Şekil 4.18. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Cypermethrinin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.15. Diniconazole pestisitinin Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

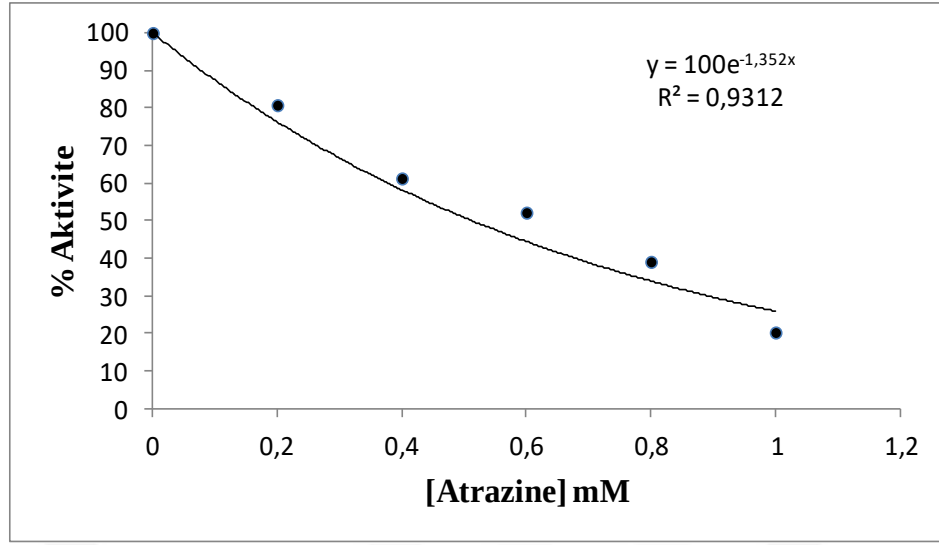
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,4	76,3
0,6	65,8
0,8	52,6
1,0	44,7
1,2	20,3



Şekil 4.19. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Diniconazolenin inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.16. Atrazine pestisitinin Siraz Balığı karaciğer dokuları GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,2	80,8
0,4	61,3
0,6	52,2
0,8	39,1
1,0	20,3



Şekil 4.20. Siraz balığı karaciğer dokuları GST enzimi üzerine Atrazinenin inhibisyon etkisini gösteren grafik

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz şartlarında canlıların hayatlarını devam ettirebilmesi, nüfus artışı, aşırı kentleşme, sanayileşme, teknolojik gelişmeler ve tarımsal faaliyetlere rağmen her geçen gün daha da zorlaşsa da sayılan bu kriterlerin canlı yaşamında değişmez unsurlar olduğuda görülmektedir. Örneğin artan nüfusa karşılık endüstriyel tarım bir gereklilik haline gelmiştir. Bununla birlikte teknolojik gelişmeler, sanayileşme ve kentleşmede aynı şekilde vazgeçilmez unsurlar arasındaki yerini almıştır. Önemli olan nokta ise mevcut bu unsurları kullanırken doğaya ve canlı yaşamına verilen zararı minimuma indirebilmektir. Aksi halde doğadaki tüm canlıların sağlığını tehdit eden ve her geçen gün artan bir tehlikeyle karşı karşıya kalınması kaçınılmazdır. Bütün bu tehditlere karşı vucüt direncini artırmanın önemi kaçınılmaz bir gerçektir. Tüm bunların yanı sıra enzimlerin canlıların metabolizmasındaki işleyişleri hayatın devamlılığı ve sürdürülebilirliği açısından yaşam için son derece elzemdir. Canlı yaşamındaki en önemli enzimlerden biride ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon s-transferaz enzimidir.

Özellikle ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonları söz konusu olduğunda GST enzimi iyi bilinen ve sıkça adı geçen bir enzimdir. GST'ler ksenobiyotik bileşenlere konjugasyonu sağlayan GSH barındıran dimerik yapıda olan enzim ailesinin geniş katılımlı üyelerindendir. GSH özellikle azot, sülfür veya elektrofilik karbon atomları barındıran nonpolar bileşenlere bağlanır. Bahsedildiği şekilde GST'ler oksidatif stresin sonucu olarak oluşan ksenobiyotiklerin ve ikincil endojen bileşiklerin faz II ile taşınmalarını sağlayarak, ksenobiyotiklerden yapısı değişmiş olanları hücre dışı ve içi sıvıda daha çözünür hale getirir. Bu işlemlerin sonucu olarak ta bahse konu bileşenlerin vücudun dışına atılımlarını kolaylaştırır. GST'ler, vücudun savunma mekanizmaları arasında interaktif yanıyla rol alır. Canlıların oksidatif stres ve sitotoksik elektrofilik kimyasallara karşı koruyucu mekanizmadır ve aynı zamanda dinamik bir yapıdır (Wagner *et al.* 2002).

GST'ler, toksik bileşikleri bertaraf etme yeteneklerinden dolayı çok detaylı bir şekilde üzerinde çalışılmış enzimlerdir. Öyleki bitkileri, böcekleri ve hatta bakterileri de içine alan farklı birçok kaynaktan incelenmiş ve bu kaynakların neredeyse tamamından saflaştırılmıştır. GST'lerin canlı savunma sisteminde sahip olduğu önemden dolayı araştırılması ve üzerinde çalışmaların yapılması günümüzde dahi devam etmektedir.

GST için yapılan çalışmalar sıçan karaciğer dokusuyla başlamıştır (Boyland and Chasseaud 1969). Sonraki çalışmalarda görülen durum ise fare, insan sıçan ve sığır gibi çok farklı türlerin farklı dokuları üzerinde çalışmaların özellikle saflaştırılmalarının yapıldığı ve metabolik kaabiliyetlerinin detaylı şekilde incelendiği görülmüştür (Hee-Joong *et al.* 2005).

Yapılan bir çalışmada, *monopterus albus* isimli bir balık türünün karaciğer dokusundan GST enzimi glutatyon-sepharose 6B afinite kolonu ile saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Takip edilen prosedürün ardından enzim %14 verimle, 300 kat ve 13,07 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır. Benzer bir çalışmada da kedi balığı bağırsak mukozası kullanılmıştır. Bağırsak mukozasından enzimin glutatyon agaroz afinite kromatografisi ile %87 verim, 100 kat ve 107 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktivite şeklinde saflaştırıldığı literatürdeki yerini almıştır (Huang *et al.* 2008)

Bu çalışmada siraz balığı karaciğer dokusundan glutatyon S-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması yapılmış, karakterizasyonu incelenmiş, bazı metal iyonları ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Murat Nehri'nden elde edilen balıklar hemen alınıp soğuk zincir kurallarına uygun olarak laboratuvarımıza getirildi ve balıkların karaciğerleri ayrıldıktan sonra küçük parçalara ayrılarak homojenizasyon yöntemlerinin en etkililerinden olan sıvı azot ile muamele yöntemiyle hücre zarları parçalanmıştır. Hazırlanan homojenat uygun tampon içerisine alındıktan sonra 12 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj ile çöktürülen hücre atıkları atılarak homojenat elde edilmiştir.

Saflaştırma işlemi, Chun-hua Z. *et al.* (2013), Güvercin *et al.* (2008) ile Çomaklı (2011) uyguladığı aşamalara göre yapıldı. İlk olarak homojenat hazırlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından glutatyon-agaroz jeli hazırlanarak kolona yüklendi ve dengeleme işleminden sonra homojenatın yüklenmesiyle saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. İşlemler sonrası saflaştırma tablosu hazırlandı. Glutatyon-agaroz ile afinite kolonu kullanılarak GST'lerin saflaştırılması, saflaştırma süresinin kısa olması ve aktivite kaybını düşük seviyede tutması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu saflaştırma basamaklarının gerçekleştirilmesiyle, GST enzimi afinite kromatografisi ile %73,6 verimle, 36,1 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve 55,70 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1).

Akkemik ve arkadaşları (2012) hindi karaciğer dokusu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, saflaştırdıkları GST'nin aktivitesinin maksimum olduğu pH 7,3 olarak belirlenmiştir. Sığır eritrositleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada bu değer 7,0 olarak tespit edilmiştir (Güvercin *et al.* 2008). Benzer şekilde monopterus albus isimli bir balıktan elde edilen GST enzimi için bahse konu değer 7,0-7,5 şeklindedir (Huang *et al.* 2008). Tilapia isimli bir balığın karaciğer dokusu kullanıldığında ise değer 8,0 olarak bulunmuştur (Hamed *et al.* 2004). Son olarak gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi için maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,3 olarak rapor edilmiştir (Çomaklı 2011). Bahse konu bu değerlerden de anlaşılabileceği gibi farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sı 7,0-8,0 aralığında olduğu görünmektedir.

Yapılan işlemler sonucunda saflaştırılması istenen enzimin 0,1M K-fosfat tamponundaki optimum pH'sı 7,5 olarak belirlendi (Şekil 4.5). Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalarda artan pH değerinin (5,0-8,0) literatür taraması sonuçlarından da görüldüğü kadarıyla, CDNB ve GSH'ın enzimatik olmaya konjugasyonlarını artıracak düşüldüğünden yüksek pH'daki ölçümlerin fayda sağlamayacağı kanaatine varıldı.

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine optimum iyonik şiddetin etkisi, enzim aktivitesinin optimum olduğu potasyum fosfat tamponunda 100 mM olarak belirlendi (Şekil 4.6).

Potasyum fosfat tamponunda yapılan stabil pH çalışmalarında, saflaştırılan GST enzimi için elde edilen değer 6,5 olarak bulundu. Bu değer tespit edilirken aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak 24 saatte bir olmak üzere 8 gün boyunca tekrarlanarak ölçümler alındı ve sonuca ulaşıldı (Şekil 4.8).

Enzim aktivitelerinin maksimum olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklık aralığı dışında enzim aktivitesi azalır ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Yapılan çalışmada siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin 5 °C ile 70 °C aralığında her 5 °C’de bir olmak üzere aktivite değerleri kaydedilmiş ve sonuç olarak enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değeri 35 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Böylelikle optimum sıcaklık değerinin 35 °C olduğu bulunmuştur. İncelenen bazı çalışmalarda bu değer, monopterus albus balık karaciğer dokusundan elde edilen enzim için 45 °C (Huang *et al.* 2008) ve insan kan serumundan elde edilen enzim için 65 °C (Türkanoglu 2007) olarak bulunduğu görülmüştür.

GST enzimiyle ilgili daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde insan trombosit GST’nin 25 kDa’luk eş alt birimlerden oluştuğu ve molekül ağırlığının 48 kDa olduğu, sıçan karaciğeri GST’nin 45 kDa ve homodimer olduğu ve insan cenin karaciğeri GST 23 kDa ve homodimer olduğu bulunmuştur. İnsan böbreğinden saflaştırılan GST izoenzimlerinin 24,5 kDa-25 kDa aralığında değişen alt birimlerden oluşan homodimer enzimler olduğu bulunmuştur. Sığır beyini GST’nin 22 kDa ve 25 kDa’luk alt birimlerden oluştuğu ve heterodimer olduğu ve kefal balığı karaciğeri GST’nin 23 kDa ile 28 kDa kütleli alt birimlerden oluştuğu ve heterodimer olduğu bulunmuştur. (Pabst *et al.* 1974; Loscalzo and Freedman 1986; Singh *et al.* 1987; Young and Briedis 1989; Kashiwada *et al.* 1991).

Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerini belirlemek için denatüre edici faktörlerin ortamda bulunduğu SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Hem enzim numunesinin hem de standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak R_f -logMA grafiği çizilmiştir. Daha sonra standart grafikten faydalanarak siraz balığı karaciğer dokusu GST enziminin molekül ağırlığı 28,6 kDa olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırma işleminin ardından yapılan SDS-PAGE ile tek bant elde edilmiştir (Şekil 4.3). Böylelikle saflaştırılan enzimin saflık kontrolü de gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi ve tek bant elde edilmesiyle işlem boyunca uygulanan basamakların araştırmacılar açısından uygun basamaklar dolayısıyla uygun bir prosedür olduğu sonucunu doğurmuştur.

Enzimin aktif bölgesinin yarısının dolduğu andaki substrat konsantrasyonu olan K_M değeri aynı zamanda ES kompleksinin ayrışma sabitidir ve enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir. K_M sabitinin yüksek olması enzimin substrata ilgisinin az oluşu, K_M sabitinin düşük olması ise enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Yapılan çalışmada Siraz Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH substratları için V_{max} ve K_M değerleri tespit edilmiştir. Bu değerlerin tespiti için sabit CDNB konsantrasyonuna karşılık, 5 farklı GSH konsantrasyonu kullanılmış ve enzimin spektrofotometre cihazıyla aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak Lineveawer-Burk grafiği çizilmiş ve bu grafikten GSH substratı için K_M sabiti 0,168 mM, V_{max} değeri ise 0,166 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır. Enzimin diğer substratı olan CDNB için ise sabit GSH konsantrasyonuna karşılık, 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılmış ve enzimin aktiviteleri ölçülerek elde edilen değerlerle Lineveawer-Burk grafiği çizilmiş ve bu grafikten CDNB substratı için K_M sabiti 1,179 mM, V_{max} değeri ise 0,979 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enziminin K_M değeri düşük olan GSH substratına ilgisinin fazla olduğu görülmüştür.

Bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin yapılan kinetik çalışmada enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 EÜ/mg, 15,68 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir (Huang *et al.* 2008). Hamed *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada Tilapia (*Oreochromis niloticus*) balığı karaciğeri GST enziminin GSH ve CDNB için K_M sabitlerini yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM olarak belirtmişlerdir. Benzer şekilde insan kan serumdan saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 EÜ/mg; 4,11 mM ve 0,23 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir (Türkanoğlu 2007). Bir başka çalışmada sıçan karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin CDNB için K_M sabiti 0,006 mM, GSH için ise 0,02 mM olarak bulunmuştur. (Pabst *et al.* 1974). GST enzimi siğir karaciğerinden orange A agaroz afinite kromotografisiyle saflaştırılmıştır. GSH ve CDNB için 1. izoenzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,55 mM, 0,10 mM ve 320 EÜ/mg, 6,9 EÜ/mg, 2. izoenzimin K_M ve V_{max} değerleri 0,83 mM, 0,165 mM ve 380 EÜ/mg, 0,86 EÜ/mg olarak bulunmuştur (Asaoka 1983). Gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin GSH için K_M sabiti 0,0395 mM, V_{max} değeri ise 0,0328 EÜ/ml olarak hesaplanmış, CDNB için K_M sabiti 0,2590 mM, V_{max} değeri ise 0,0655 EÜ/ml olarak belirlenmiştir (Çomaklı 2011). Literatürler incelendiğinde çoğunlukla GST enziminin GSH substratı için K_M sabitinin düşük olduğu yani kosubstratı olan GSH'a ilgisinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmanın sonucu literatürlerle uyumludur.

Proteinleri oluşturan aminoasitler, yapılarındaki R gruplarında bulunan fonksiyonel gruplarla tepkimelerini gerçekleştirir. Örnek olarak sistein aminoasiti -SH ve tirozin aminoasiti -OH grupları üzerinden tepkime verirler. Çok az miktarda bile metal iyonlarına maruz kalması sisteinin merkaptanlar teşekkül etmesine sebep olur. Birçok enzimin katalitik ve aktif bölgelerinin bileşeni olması bakımından sisteinin metal iyonlarına maruz kalması önemli sonuçlar doğurabilir. Sistein gibi enzimlerin ağır metal iyonlarıyla etkileşmesi -SH grupları üzerinden merkaptanlar meydana gelmesine sebep olur. Bunun sonucu olarak da enzim

katalitik fonksiyonunu önemli ölçüde kaybedebileceği gibi tamamen işlevselliğini yitirmesine de neden olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Sucul ortama bir şekilde bulaşmış kirleticiler doğrudan olabildiği gibi doğal besin zinciri yoluyla da organizmaları olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Özellikle enzim işlevselliği olan proteinlerin sülfhidril gruplarına metallerin bağlanması inhibisyona neden olabilmektedir (Kakkar and Jaffery 2005). Organizmalara çok az miktarlarıyla bile çok büyük hasar verebilen bileşenlerin başında ağır metallerin geldiği bilinmektedir. Bu durum çevresel riskler açısından önemli yer tutar. Bazı metallerde ise durum tam aksi yöndedir. Örneğin demir ve kurşun gibi metaller ise birçok organizma için hayati öneme sahiptir. Özellikle bazı enzimlerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi bu metallerle mümkündür (Tekman *et al.* 2008).

Çok az miktarları bile zararlı olan maddeler sayıldığında belki ilk sıraları alacak olan ağır metallerdir. Krom (Cr), kadmiyum (Cd) gibi ağır metaller besin zinciriyle dahil oldukları canlıların vücutlarından atılamadıklarından, canlı bünyelerinde fizyolojik olarak birikime sebep olurlar. Bu birikme sonucu belli sınırlar aşılsa da toksik etki yaparak ağır hasarlara hatta canlının ölümüne bile sebep olabilirler. Özellikle balıkların kan parametreleri etkilenecek çeşitli bozukluklar meydana gelebilir (Sehgal and Saxena 1986). Balıkların oksidatif stres ile oksidatif toksisite çalışmalarında model oluşturmasının nedeni ise bu etkilere karşı vermiş oldukları yanıtların memelilerdekilere benzer olmasıdır (Almeida 2002).

Yapılan çalışmada Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} , ve Pb^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesinin yarıya düşmesine sebep olan inhibitör konsantrasyonu değeri metal iyonlarına göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu değerlerin belirlenmesi için [I]-%Aktivite grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla Se^{-2} iyonu için 0,177 mM, Ba^{+2} iyonu için 0,104 mM, Cu^{+2} iyonu için 0,195 mM, Ag^{+} iyonu için 0,30 mM ve Pb^{+2} iyonu için 0,128 mM olarak hesaplanmıştır.

Görüldüğü gibi en yüksek toksik etkiye sahip metal iyonu IC₅₀ değeri en küçük olan (0,104 mM) Ba⁺² iyonudur.

Araştırmacılar, geçmiş yıllarda farklı enzimler üzerine ağır metal iyonlarının istenmeyen etkilerini sıklıkla rapor etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada kobalt kurşun ve bakır gibi ağır metallerin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II enzimine olan inhibisyon etkilerinden bahsedilmiştir (Ekinci *et al.* 2007). Farklı bir çalışmada ise insan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi, Al⁺³, Pb⁺², , Cu⁺², Fe⁺³, Cd⁺², ve Hg⁺² gibi metal iyonlarının inhibisyon etkilerine maruz bırakılarak bu iyonların IC₅₀ değerleri belirlenmeye çalışılmıştır (Çoban *et al.* 2007). Yine benzer bir çalışmada ise Al⁺³, Hg⁺², Pb⁺², Fe⁺³, Cu⁺² ve Cd⁺², metal iyonlarının gökkuşağı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Tekman *et al.* 2008).

Günümüzde kullanılan pestisitler kalite ve miktarın artırılmasını hedeflemiş olsalar da canlılar için büyük bir tehdit oluşturmaktadırlar. Bahse konu bileşiklerin kullanımındaki artış ekosistemde bulunan bütün canlıları doğrudan ya da dolaylı olarak bir şekilde etkilenmektedir. Son yıllarda giderek yaygınlaşan bilinçsiz pestisit kullanımı insan ve hayvanlarda ölüme kadar varabilen ciddi sonuçlar doğurmaktadır.

Mevcut pestisitlerin etkileri, özellikle dokular ve bu dokularda bulunan enzimi etkileyiş biçimlerine bakılarak anlaşılabilir boyuttadır. Dokulardaki tahribat, enzim aktivitelerindeki değişiklik gibi incelemeler sonucunda bazı yorumlar yapılabilir. Bu tez çalışmasında, esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole ve atrazine pestisitlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda pestisitlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla esfenvalerate için 0,028 mM, deltamethrin için 0,645 mM, cypermethrin için 0,0410 mM, diniconazole için 0,694 mM ve atrazine için 0,512 mM olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle detoksifikasyon işleminde görev alan GST enziminin çok az miktarda metal iyonu ya da pestisite maruz kalması sonucu

aktivitesini önemli ölçüde kaybettiği, bunun sonucu olarak ta canlı savunma mekanizmasının ciddi derecede zarar göreceği gayet açıktır. Yapılan kinetik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular canlı savunma sistemi açısından dikkate değer olmakla birlikte bu bahse konu bulgulara dikkat edilmesi gerekliliği kendini göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Siraz balığı karaciğer dokusundan GST enziminin saflaştırılması için glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.
2. Glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemiyle enzim saf olarak elde edilmiş ve saflaştırma sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu yapılan literatür araştırmalarında görülmüştür.
3. Çalışma sonucunda siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi 36,1 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip %73,6 verimle 55,70 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforezde bulunan tek bant ile tespit edilmiştir.
4. Saflaştırılan siraz balığı karaciğer dokusu GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH 7,5 ve stabil pH 6,5; optimum iyonik şiddet 100 mM K-fosfat; optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiştir.
5. Siraz balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine bazı pestisit ve metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla esfenvalerate, deltamethrin, cypermethrin, diniconazole ve atrazine pestisitleri ile Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} ve Pb^{+2} metal iyonları ile çalışılmıştır.
6. Bu pestisit ve metal iyonları için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu pestisit ve metal iyonlarının düşük dozlarda GST enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

7. Se^{-2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} , Pb^{+2} metal iyonları ve esfenvalerate, deltametherin, cypermetherin, diniconazole, atrazine pestisitleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,177, 0,104, 0,195, 0,30, 0,128, 0,028, 0,645, 0,019, 0,694, 0,512 mM olarak, ayrıca Cheng Prusoff denklemi kullanılarak K_i değerleri sırasıyla 0,0015, 0,00086, 0,0016, 0,0025, 0,001, 0,00023, 0,0054, 0,00016, 0,0058 ve 0,0043 mM olarak hesaplanmıştır.

Özellikle çevre kirliliğinde çok büyük bir pay sahibi olan ağır metallerin ve daha yüksek verim elde etmek, zirai zararlı canlıları yok etme amacıyla kullanılan pestisitlerin düşük dozlarda bile enzimi inhibe etmelerine dair elde edilen bulgulara bakıldığında bu çalışmanın literatüre önemli katkılarda bulunacağı ve GST enzimi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Çizelge 5.1. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi için karakterizasyon sonuçları

Çalışma Tipi	Sonuç
Optimum pH	7,5
Optimum iyonik şiddet	100 mM
Optimum sıcaklık	35 °C
Stabil pH	6,5
SDS-PAGE Sonucu M_A	28,6 kDa
GSH K_M	0,168 mM
GSH $V_{\max}$	0,166 EÜ/ml
CDNB K_M	1,179 mM
CDNB $V_{\max}$	0,979 EÜ/ml

Çizelge 5.2. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi için bazı metal iyonlarının IC₅₀ ve K_i değerleri

Metal	IC₅₀ (mM)	K_i (μM)
Se ⁻²	0,177	1,5
Ba ⁺²	0,104	0,86
Cu ⁺²	0,195	1,6
Ag ⁺	0,30	2,5
Pb ⁺²	0,128	1,0

Çizelge 5.3. Siraz Balığı karaciğer dokusu GST enzimi için bazı pestisitlere ait IC₅₀ ve K_i değerleri

Pestisit	IC₅₀ (mM)	K_i (μM)
Esfenvalerate	0,028	0,23
Deltametherin	0,645	5,4
Cypermethrin	0,019	0,16
Diniconazole	0,694	5,8
Atrazine	0,512	4,3

KAYNAKLAR

- Açan L. 1990. Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 100s
- 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.
- Alcher, R.G., 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants, *Physiol, Plant.*, 77, 457-464.
- Almeida, J.A., Dmız, Y.S., Marques, S. F. G., Faine, L. A., Rıbas, B. O., Burneiko, R.C., Novelli, E. L. B., 2002. The Use of Oxidative Stress Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to *In Vivo* Cadmium Contamination. *Environment International*, 27, 673-679.
- 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.
- Anton, E.P., Johannes, B., Arne Vander G., Gerard J.M., 1990. The Glutathione-binding Site in Glutathione S-transferases. *Biochem*, 265, 47-54.
- Arca, P., Garcida, P., Hardisson, C. and Suarez, J.E., 1990. Purification and study of a bacteril glutathione S- transferase Area de Microbiologia, Faeultad de Medicina 1, 77-79.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*. Jan, 10, 2-18.

- Asaoka, K., 1984. Affinity Purification and Characterization of Glutathione S-Transferases from Bovine Liver. *J. Biochem.*, 95, 685-696.
- Autrup, H., 2000. Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Matebolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research*, 464,65-76.
- Awasthi, Y.C, Doa, D.D. and Saneto, R.P., 1980. İnterrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver *Biochem J.* 191, 1- 10. Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Barcena, J. A. E., Martinez-Lara, S. G., George, J. Lopez-Barea. 1997. Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver. *CMLS, Cell. mol. life sci.*, 53, 759–768.
- Baş, O., 2006. Dinitrocresol'ün (*Rat Rattus Norvegicus*) Sıçan Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi Yüksek Lisans Tezi.
- Bigersson,B., Sterner, O., Zimerson, E., 1988. Eineverstdliche Einführung inde Toxilologie. Cheime und Gesundheit,ISBN. 3–527–26–455–8
- Boyer, T.D., 1989. The Glutathione S-transferases: An Update *Hepatology*, 9(3),486-96.
- 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, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.
- Brown, H., W., 1987. Introduction to Organic and Biochemistry, 4th Ed., Brooks/Cole Publishing Company, Belmont, California.

- 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.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200, 29-38.
- Chen, E.-H., Dou, W., Hu, F., Tang, S., Zhao, .-M., Wang, J. -J., 2012. Purification and Biochemical Characterization of Glutathione S-Transferases in *Bactrocera minax* (Diptera:Tephritidae). *Florida Entomologist*, 95(3), 593-601.
- Cho, M. K., Kim S.G., 2000. Induction of Class Alfa GST by 4-methylthiozale in rat Liver: Role of Oxidative Stres. *Toxicol Lett.* 115, 107–115.
- Chun-hua Z., W. Ze-ying, J., Ting, G., 2013. Purification and Identification of Glutathione S-transferase in Rice Root under Cadmium Stress. *Ying, Rice Science*, 20(3), 173-178.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Costa, M.J., Monteiro, D.A., Oliveira-Neto, B.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology*, 17, 153–163.
- Coşkun, G., 2007. Glutathione-S-transferase enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Çelik, V.K., Armutcu, F., Aker, A., 2003. Human Placental Glutathione-S-Transferase: Isolation, Kinetic Properties and *in vitro* Interactions with Several Drugs. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 25, (4) 187-192.

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).

Çoban, T. A., Senturk, M., Ciftci, M., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an *in vitro* study. Protein Pept Lett, 14, 1027-1030.

Çomaklı, V., 2011. Glutatyon S-transferaz Enziminin Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. (Doktora Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.

Denizli, A., Ağır metal toksikolojisi; su ürünleride uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri 2008

Donkın, S. G., Ohlson, D. L., Teaf, C. M., 2000. Principle of Toxicology, Environmental and Industrial Applications. Second Edition. (P. L. Williams, Ph.D. R. C. James, S. M. Roberts, Edts.). John Wiley & Sons, Inc, New York, 325 s.

Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicol Sci. Jun; 49 (Suppl 2),156-64.

Ekinci, D., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu Ö. İ., 2007. *In vitro* inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. J Enzyme Inhib MedChem, 22, 745-750

- Erat, M. and Şakiroğlu, H., 2013. The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, (4) 711-6.
- Fleischner, G., K. Kamisaka, I.M. Arias., 1976. Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function*. 229
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione Stransferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49,27–37.
- Goyer, R. A., Clarkson, T.W., 2001. Toxic Effects of Metals. (Klaassen, C. D., Edts.) Casarette & Doull's Toxicology-the Basic Science of Poisons; 6th Edition. New York: McGraw-Hill. s. 827-844.
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul. 1225. Gürdöl, F., ve Ademoğlu, E., 2010. *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- Güvercin, S., 2008. Glutatyon S-transferaz Enziminin Sığır Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin İncelenmesi. (Yükseklisans Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination of Some Kinetic and Characteristic Properties of Glutathione S-transferase from Bovine Erythrocytes. *Protein & Peptide Letters*, 15, (1) 6-12.
- Gürdöl, F., Ademoğlu ,E., 2010. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri 2.Baskı*, İstanbul.
- Gyamfi MA, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y. Inhibition of glutathione s-transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro. *Food Chemical Toxicology* 2004; 42: 1401-1408.

- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G., 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326, 131-142
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S- transferases. The first enzymmatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 246, 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*, Vol.30, No.3-4, 189-199.
- 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*, Vol. 38, No. 2, 232-237.
- Herschbach, C. and Rennenberg, H., 1994. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants, 1069-1076.
- Howie, A.F., Hoyes, J.D., Beckett, G.J., 1988. Purification of acidic glutathione S-transferase from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their mesaurment. *Clinica Chimica Acta*, 177, 65-76.
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q.Y., 2008. Purification and partial

characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 147, 96-100.

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*, Nov., 6039-6042

Ioannides, C., 2002. *Xenobiotic metabolism: An overview* (C. Ioannides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 1-32.

Ji X., Johnson W.W., Sesay M.A., Dickert L., Prasad S.M., Ammon H.L., Armstrong R.N., Gilliland G.L., 1994, Structure and function of the xenobiotic substrate binding site of a glutathione S-transferase as revealed by X-ray crystallographic analysis of product complexes with the diastereomers of 9-(S-glutathionyl)-10-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene, *Biochemistry*, 33 (5): 1043–52.

Josephy, P.D., 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology, *Hum. Genomics Proteomics* 876- 940.

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.

Karam, D., 1996. Glutathione S-transferase: an enzyme for chemical defense in Plants.

Kashiwada, M., Kitada, M., Shimada, T., Itahashi, K., Sato K. and Kamataki, T., 1991. Purification and Characterization of Acidic Form of Glutathione S-Transferase in Human Fetal Livers. High Similarity to Placental Form J. Biochem., 110, 743- 747.

Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2015. Biyokimya, Aktif yayınları, Erzurum.

Kidd, P.M., 1999. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. Ph.D. Alternative Medicine Review.

Knapen M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 82: 171-184.

Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.

Kosower, E.M., 1976. Chemical properties of glutathione. In Glutathione metabolism and function, ed.

Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680.

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.

Lehninger, Principles of Biochemistry, 2005. Worth Publishers Inc., New York, 1152 p.

Liebman, J.F. and Greenberg, A., 1988. Mechanistic principles of enzyme activity. VCH Publishers, New York.

Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med., 349, 474-485.

LERNER, K. L., and LERNER B. W., 2002. World of microbiology and immunology. America, 1-359.

Lloyd, R. 1992. Pollution and Freshwater Fish. A Buckland Foundation Book, Fishing News Books, Cornwall, p. 176.

Lo Bello, M., Oakley, A. J., Battistoni A., Mazzetti A.P., Nuccetelli M., Mazzaresse G., Rossjohn J., Parker M. W., Ricci G., 1997. Multifunctional Role of Tyr 108 in the Catalytic Mechanism of Human Glutathione Transferase P1-1. Crystallographic and Kinetic Studies on the Y108F Mutant Enzyme. Biochem. (U.S.), 36 (20), 6207-17.

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.

Morgenstren, R., Lundqvist, G., Hancock, V., De Pierre, J.W., 1988. Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. J Biol Chem, 263, 6671-75.

- Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım AŞ, s: 83-84, İstanbul.
- Nicholls, F.A. and Ahokas, J.T. Inhibition of purified glutathione S-transferases by indomethacin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119 (1984) 1034-1038.
- Nilsson, O. L., 2001. Redesign of Alpha Class Glutathione Transferases to Study Their Catalytic Properties. Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Sci. and Techn. 672. 30.
- Nishihira, J., Sakai, S. M., Nishi, Hatanaka, Y., 1995. Identification of the Electrophilic Substrate -Binding Site of Glutathione S-Transferase P by Photoaffinity Labelling. Eur. J. Biochem. 232(1), 106-10.
- Novoa-Valinas, M.C., Perez-Lopez, M., Melgar, M.J., 2002. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic Glutathione S-transferase from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo solar*) and Brown trout (*Salmo Trutta*) Comparative Biochemistry and physiology, part C 131, 207-213.
- Oakley, A., 2011. "Glutathione transferases: a structural perspective". Drug Metab. Rev. 43, (2) 138–51.
- Orhan, H., 1994. Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin *in vitro* incelenmesi. Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- Oshino R, Kamei K., Nishioka Z.M. and Shin M. 1989. Purification and Characterization of Glutathione S-Transferases from Guinea Pig Liver. J. Biochem. 107, 105-110
- Özeriş, S., 1993. Temel Organik Kimya, İstanbul.

- Pabst, M.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B., 1974 Glutathione S-Transferase A. The Journal of Biological Chemistry, 7140-7150.
- PAULO, A. C., and GUBITZ, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.
- 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.
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations, Inc, New York, p: 403
- 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, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J., 360, 1-6
- Singh, S.V., Leal, T., Ansari G.A.S. and Awasthi Y.C., 1987. Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. Biochem. J., 246, 179-186
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. Comp Biochem Physiol C, 148, 117-121.

- Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroksidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97.
- Toros, S. ve Maden, S. 1991. Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 1222, Ders Kitabı No: 352, s..332.
- Trevor, P., 1994. Enzim Bilgisi, Bilim ve Teknoloji Yayınları Çeviri Vakfı
- Tuncer, E. 1987. Tarımsal ilaçların çevre kirliliği üzerine etkileri ve alınması gereken önlemler. T.C. Tarım Bakanlığı Ziraat Mücadele ve Karantina Genel Müd. Basılmamış seminer notları, Sivas, 5s.
- Türkanoğlu, Aysun., 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.
- Udomsinprasert R., Pongjaroenkit S., Wongsantichon J., Oakley A.J., Prapanthadara L.A., Wilce M.C., Ketterman A.J., 2005, Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme, *Biochem. J.* 388: 763–71.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.,2010. Moleküler Biyoloji.Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.
- Young, P.R. and Briedis A.V., 1989. Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. *Biochem. J.*, 257, 541-548.
- Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., Lee, S-J.,2002.Loss of Myostatin Attenuate 836.
- Wu, C., Mathews, K.P., 1983. Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 980-985.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kayseri ili Kocasinan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri'de tamamladıktan sonra 2003 yılında İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde başladığı lisans eğitimini 2007 yılında başarıyla tamamladı. 2016 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve iki çocuk babasıdır.

