

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN İSKORPİT BALIĞI
(SCORPAENA PORCUS) KARACİĞER DOKUSUNDAN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İNHİBİSYON
KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Adı SOYADI
Kübra IŞIK**

Danışman
Doç. Dr. Ercan SOYDAN

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra IŞIK tarafından, **Doç. Dr. Ercan SOYDAN** danışmanlığında hazırlanan **“GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN İSKORPİT BALIĞI (*SCORPAENA PORCUS*) KARACİĞER DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ ”** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10.5.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Deniz EKİNCİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç.Dr. Ercan SOYDAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ercüment Aksakal Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

06 / 01 / 2023

Kübra IŞIK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN İSKORPİT BALIĞI (*SCORPAENA PORCUS*) KARACİĞER DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06.01.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

06 / 01 / 2023

Doç. Dr. Ercan SOYDAN

ÖZET

GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN İSKORPİT BALIĞI (*SCORPAENA PORCUS*) KARACİĞER DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ

Kübra IŞIK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2023

Danışman: Doç. Dr. Ercan SOYDAN

Çalışmamızda iskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz saflaştırıldı ve ağır metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlendi. Saflaştırma süreci üç aşamadan oluşuyordu; homojenatin hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi saflaştırması. Bu aşamaların sonunda 10. 479 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip enzim %28.3 verimle 25.9 kat saflaştırıldı. Optimizasyon sonuçları, optimum pH: 6.5, optimum substrat konsantrasyonu 0.3 mM NADPH ve optimum tampon 300 mM KH₂PO₄ olarak bulundu. Saflaştırma işleminin sonrasında Mn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ ve Cr³⁺ ağır metallerin inhibisyon etkileri araştırıldı. Ağır metallerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 2.4 µM, 30 µM, 135 µM ve 206 µM olarak hesaplandı.

Anahtar Sözcükler: Glutatyon redüktaz, İskorpit balığı, enzim saflaştırılması, metal iyonları

ABSTRACT

PURIFICATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM SCORPION FISH (*SCORPAENA PORCUS*) LIVER TISSUE AND INVESTIGATION OF SOME HEAVY METAL INHIBITION KINETICS

Kübra IŞIK

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Agricultural Biotechnology Programme
Master, January/2023
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Prof. Dr. Ercan SOYDAN

In the current study, glutathione reductase was purified from Scorpion fish (*Scorpaena porcus*) liver tissue and the effects of heavy metal ions on the enzyme activity were determined. The purification process consisted of three stages; preparation of the homogenate, ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography purification. At the end of these steps, the enzyme was purified 25.9-fold with a specific activity of 10,479 EU/mg and a yield of 28.3 %. The optimum pH was found to be 6.5, optimum substrate concentration was 0.3 mM NADPH and optimum buffer was 300 mM KH₂PO₄. After purification, inhibition effects of Mn⁺², Cd⁺², Ni⁺², and Cr⁺³, as heavy metal ions were investigated. IC₅₀ values of the heavy metals were calculated as 2.4 µM, 30 µM, 135 µM and 206 µM, respectively.

Keywords: Glutathione reductase, scorpion fish, enzyme purification, metal ion

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimden itibaren bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Deniz EKİNCİ başta olmak üzere, danışman hocam Doç. Dr. Ercan SOYDAN 'a ve öğrenim hayatım boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz teşekkürler ve saygılarımı sunarım.

Bu zamana kadar bana en büyük desteklerini gösteren maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen her daim arkamda olan bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan annem Handan IŞIK, babam Mehmet Duran IŞIK ve ablam Güllü IŞIK 'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmaları esnasındaki büyük yardımlarından dolayı Araş. Gör. Gürkan BİLİR ve Araş. Gör. Ömer TAŞ hocalarıma ve ekip arkadaşlarım Mutlu YALÇIN ve Seyit Batuhan DUDAK 'a teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sekiz yıldır dostluğumuzu sürdürmekte ve her daim sürdüreceğimiz, maddi, manevi ve akademik hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen Büşra ÇEVİK 'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Mehmet Han BAŞTÜRK, Abdullah AYDIN ve Sinan ERGÜN arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimi, Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK 'ün aziz ruhuna ithaf ediyorum. Sonsuz saygı, minnet ve özlemle...

Kübra IŞIK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	6
1.3. Glutatyon	9
1.4. GR (Glutatyon Redüktaz)	13
1.5. Ağır Metaller	15
1.6. İskorpit Balığı (Scorpaena porcus L.)	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Materyal	18
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2. Kullanılan Malzemeler	19
2.1.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	19
2.2. Yöntem	22
2.2.1. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enziminin Aktivite Ölçümü	22
2.2.2. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz (GR) Enziminin Saflaştırılmasına Yönelik Yöntemler	23
2.2.3. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enziminin Karakterizasyon Çalışması	28
2.2.4. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enzimiyle İlgili Kinetik Çalışmalar	30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
3.1. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları	32
3.1.1. Amonyum Sülfat Sonuçları	32
3.1.2. Afitinite Kromatografisi Sonuçları	33
3.2. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Belirlenmesi	33
3.3. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarda Belirlenmesi	34
3.3.1. GR Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi	34
3.3.2. GR Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	35
3.3.3. GR Enziminin Optimum Substrat Miktarının Belirlenmesi	35

3.3.4. GR Enzimi Aktivitesinde Kullanılan Ağır Metal İnhibitör Etkilerinin Sonuçları	36
4. SONUÇ	41
KAYNAKÇA	43
ÖZ GEÇMİŞ	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

μmol	: Mikromol
dk	: Dakika
EC	: Enzim kodu
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Glutasyon Disülfid
I ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyon
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NADP ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PMSF	: Fenilmetil Sülfonil Florür
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Santrifüjde dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Enzim ve substrat gösterimi.....	2
Şekil 1. 2. Enzim-Substrat kombinasyonu	5
Şekil 1. 3. Glutasyonun yapısı	10
Şekil 1. 4. GSH yapısı.....	11
Şekil 1. 5. GSSG yapısı.....	11
Şekil 1. 6. GR enzimin 3 boyutlu yapısı	13
Şekil 1. 7. GR enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon	14
Şekil 1. 8. İskorpit Balığı (Scorpaena porcus L.).....	17
Şekil 2. 1. İskorpit balığı ve karaciğer dokusu.....	18
Şekil 2. 2. Amonyum sülfat çöktürme işlemi.....	25
Şekil 2. 3. Diyaliz işlemi.....	26
Şekil 3. 1. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Saflaştırılan glutasyon redüktaz enziminin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığının belirlenmesi	34
Şekil 3. 2. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Nikel'in Gr enzim aktivisine etkisi	37
Şekil 3. 3.İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivisine etkisi	38
Şekil 3. 4. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivisine etkisi	39
Şekil 3. 5. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivisine etkisi	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. GR aktivite ölçüm içerikleri	23
Tablo 2. 2. %12'lik ayırma jelinin hazırlanması.....	28
Tablo 2. 3. Yığma jelinin hazırlanması.....	28
Tablo 2. 4. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu ölçüm içerikleri.....	29
Tablo 2. 5. Potasyum fosfat pH optimizasyonu içerikleri.....	29
Tablo 2. 6. Potasyum fosfat substrat optimizasyonu içerikleri	30
Tablo 2. 7. Ağır metal inhibisyon etkileri içerikleri.....	31
Tablo 2. 8. Glutasyon redüktaz enzimi üzerine $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 'ın IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu.....	31
Tablo 2. 9. Glutasyon redüktaz enzimi üzerine $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 'ın IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu.....	32
Tablo 2. 10. Glutasyon redüktaz enzimi üzerine $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 'ün IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu.....	32
Tablo 2. 11. Glutasyon redüktaz enzimi üzerine $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 'ün IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu.....	32
Tablo 3. 1. Amonyum sülfat ve çöktürme aralığı ve aktivite sonuçları	33
Tablo 3. 2. Potasyum fosfat optimum iyonik şiddetin aktivite ölçüm sonuçları.....	34
Tablo 3. 3. Potasyum fosfat optimum pH şiddetinin sonuçları.....	35
Tablo 3. 4. Potasyum fosfat optimum substrat miktarının sonuçları	35
Tablo 3. 5. Nikel'in iskorpit balığı karaciğer dokusu glutasyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi	37
Tablo 3. 6. Mangan'ın iskorpit balığı karaciğer dokusu glutasyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi	38
Tablo 3. 7. Krom'un iskorpit balığı karaciğer dokusu glutasyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi	39
Tablo 3. 8. Kadmiyum'un iskorpit balığı karaciğer dokusu glutasyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi	40
Tablo 3. 9. İskorpit balığı karaciğer dokusu için GR enziminin IC_{50} değerleri	41

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Yaşamı oluşturan çok çeşitli biyokimyasal tepkimelerin neredeyse tümü, enzimler olarak bilinen bir dizi dikkate değer biyolojik katalizör aracılığıyla gerçekleşir.

Enzimlerin en önemli özellikleri arasında katalizleme güçlükleri ve özgünlükleri yer almaktadır. Bu yüzden enerji açısından uygun yolları katalize ederek metabolizmadaki tüm olayları sağlarlar (Gözükara, 1997).

Biyolojik kataliz, yapılan araştırmalar sonucunda ilk kez 1700'li yılların sonlarına doğru mide salgılarının etin sindirilmesi üzerine etkisi sonucunda keşfedilmiştir. Bir sonra ki yıllardaki çalışmalarda tükürük ve bitki eksrakteleriyle çalışılarak nişastanın şekere dönüşümü elde edilerek çalışmalar sürdürülmüştür. Louis Pasteur, şekerin mayayla alkole fermentleşmesinin ardından 1850 yılında şekerin fermantasyon sonucu katalize edildiğini bildirmiştir. Çalışmanın ardından Louis Pasteur, fermantasyonun yaşayan maya hücrelerin bünyesinden ayıramayacağını öne sürmüştür. Eduard Buchner 1897'de maya özlerinin şekeri alkole fermentlendiğini ve ardından fermantasyonun hücre yapısından çıkarıldığında işlevini sürdüren moleküller sayesinde devam ettiğini keşfetmiştir. Daha sonra Frederick W. Kühne bu molekülü enzimler olarak belirtmiştir. Çalışmaların hız kazanması ise James Sumner'ın 1926 yılında üreaz enzimini saf kristal formdan ayırmasıyla devam etmiştir (Lehninger, 2005).

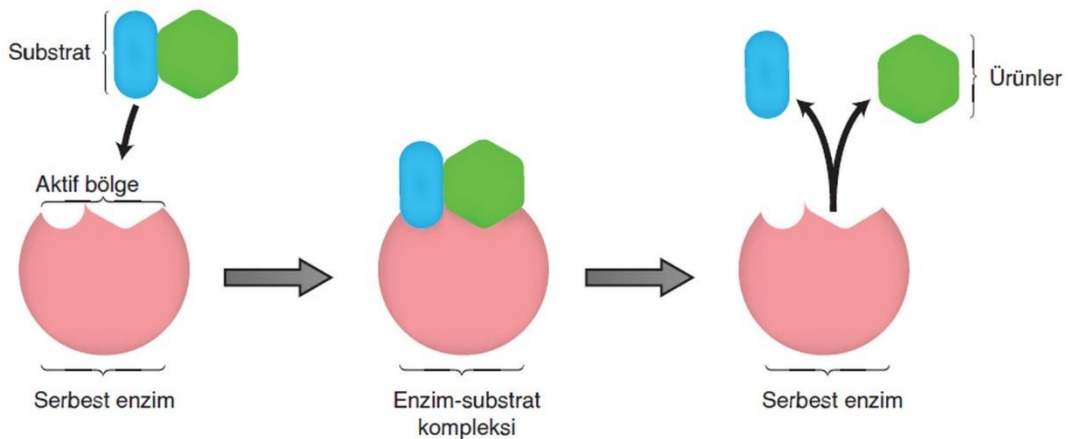
Belirli bir katalitik RNA molekülü grubu dışında, tüm enzimler protein yapısında özellik göstermektedir. Bu yüzden protein yapısında olan enzimler proteinlerin tüm özelliklerini göstermektedir. Büyük moleküllu yapıya sahip olan enzimler kolodyum zarından geçemezler. Sıcaklık ile kolayca denatüre edilerek ortamdaki asit-alkali varlığına karşı hassaslık gösterirler. Enzimin 0°C ile yaklaşık 40°C arasında ısı yükselmesine bağlı olarak tesir hızları artmaktadır. Bunun sonucunda sıcaklık üzerine çıkılması durumunda protein yapısından bozukluk meydana gelmektedir (Gözükara, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimlerin çoğunun protein formda olması, benzer tip reaksiyonlarla gerçekleşmesi, aynı veya benzer çeşit reaksiyonları katalizlemesi, aktivasyon

enerjisini düşürerek hızlarını arttırması, reaksiyonların hız bir şekilde dengeye ulaşması ve canlı yada cansız ortamlarda da bu özellikleri göstermesi enzimlerin genel özellikleri arasında bulunmaktadır.

Hücrede sağlanan tüm kimyasal tepkimeler enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Canlıların yapısı oluşturan biyomoleküllerin kinetik yöndeki kararlılıkları ve kolayca tepkime vermemeleri bunun nedenini açıklamaktadır. Hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenmektedir. Kontrol edilmeleri için de enzimlerin protein yapılarında olmaları ve DNA tarafından şifrelenmesi gerekmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimle katalizli bir reaksiyonun diğer reaksiyonlardan ayıran özelliklerinden biri, aktif bölge adı verilen sınır içerisinde gerçekleşmesidir. Aktif bölgeye bağlanarak enzim üzerinde aktivite gösteren bu moleküller substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge, substratı bağlama yeteneğine sahip enzim üzerindeki özel bölgedir. Bu bölge yüzeyi kimyasal transformasyonu katalizleyen amino asit tortularıyla meydana gelmiştir. Enzim substrat kompleksinin meydana gelmesi aktif bölge merkezinin substratı tutmasıyla oluşmaktadır. Substratın ürüne dönüşümüyle meydana gelen enzim-ürün kompleksinden enzimin ayrılması sonucu ürün serbestleşmektedir (Lehninger,2005).



Şekil 1. 1. Enzim ve substrat gösterimi

Enzimler genel olarak etki ettikleri bileşikten veya katalize ettikleri reaksiyondan türetilirler. Örneğin, glutatyon redüktaz, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) tarafından oksitlenen glutatyonun indirgenmesini hızlandırır. Fosfat ester bağlarının hidrolizi asidik koşullar altında asit fosfataz tarafından katalize edilir. Bahsedilen örneklerden de anlaşılacağı gibi enzimler genellikle substratın veya katalizledikleri reaksiyonların sonuna ‘-az’ eki eklenerek adlandırılmaktadır (Rehm and Reed 1995). Bunun sonucunda enzimler reaksiyon çeşitlerine göre transferazlar, oksidoredüktazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak 6 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplandırma sistemi Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) kurum tarafından enzimlerin yaptıkları reaksiyon türlerine göre sınıflandırmıştır.

1: Oksidoredüktazlar: Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksigeneazlar ve peroksidazlar olarak da adlandırılan oksidoredüktazlar, indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlemektedir.

2: Transferazlar: Bir molekülde bulunan işlevsel grubun diğer moleküle aktarılmasını sağlamaktadır. Transketolaz, transaldolaz, aspartat transaminaz, alanin transaminaz ve kreatin kinazlar, transferaz grubu içerisindeki enzimlerdir.

3: Hidrolazlar: Karbon-karbon, karbon-kükürt, karbon-fosfor, karbon-azot gibi bağlara H₂O ekleyerek yıkımı katalizlemektedir. Proteazlar ve ester hidrolazlar bu grup içerisinde yer almaktadır.

4: Liyazlar: Dekarboksilazlar, dehidratazlar ve sentazlar bu grup içerisinde yer alan enzimlerdir. karbon-karbon, karbon-kükürt, karbon-oksijen ve belirli karbon-azot bağlarını yıkıma uğratmaktadır.

5: İzomerazlar: Optik ve geometrik izomerlerin dönüştürülmesini katalizlemektedir. Rasemazlar, mutazlar, epiremazlar, izomerazlar bu grup içerisindeki enzimlerdir.

6: Ligazlar: İki molekülü birleştiren reaksiyonları katalize ederler. Örnek olarak peptid sentaz, aminoasit-trna sentetaz, DNA ligaz ve RNA ligaz verilebilir.

Enzimler substrat türlerine göre ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre oldukça özgün yapıdadırlar. Özellikle tek bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu katalizlediği gibi aynı zamanda da aynı tür reaksiyonları da katalizlemektedir. (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2012). Bunun yanı sıra, aynı reaksiyonu

katalizleyen fakat moleküler yapısında olan enzimler bulunmaktadır. Bunlar izoenzim olarak adlandırılmaktadır. İzoenzim olarak adlandırılan bu enzimler kofaktörlerine, substratlarına ve inhibitörlerine göre farklı afiniteleri vardır. Başlıca özellikleri arasında aynı reaksiyonu katalizlemeleri, iki ya da daha fazla polipeptit zinciri içermeleri, farklı genlerin ürünleri olmaları ve dokuya özgü olmalarının yanı sıra farklı amino asit dizilimlerine sahiptirler (Devlin, 2002).

Tripsin ve pepsin gibi bazı enzimler sadece polipeptit zincirlerinden oluşmaktadır. Bu nedenle başka bir gruba ihtiyaç duymazlar. Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için yapılarında protein olmayan bir kimyasal gruplara ihtiyaç duyarlar. Bunlar demir, çinko, mangan, magnezyum veya gibi kofaktör adı verilen inorganik iyonlardır. Koenzim adı verilen bu iyonlar, organik veya metalorganik bileşikler olabilir ve bunların çoğu vitaminlerden elde edilmektedir (Nelson at al., 2008).

Enzimler, genel olarak protein yapıda olmalarının yanı sıra bazı tür enzimlerin protein yapılarına, protein olmayan daha küçük organik ya da anorganik yapıların bağlanması sonucu oluşan farklı bir protein yapısı bulunmaktadır. Bu tür enzimlerin yalnızca proteinden oluşan ve içeriğinde kofaktör olmayan inaktif olan kısmına 'Apoenzim', kofaktör ve koenzimlerin tümünü barındıran katalitik aktif durumuna 'Holoenzim' adı verilmektedir. Enzimin aktivitesini gösteren inorganik yapıdaki yan gruplara ise 'Kofaktör', organik yapıdaki yan gruplara ise de 'koenzim' adı verilmektedir (Önal, 2010).

Enzim saflaştırma işlemi çok zor bir süreçtir. Çünkü enzimlerin çoğu protein yapısında olduklarından dolayı ortam şartlarının değişmesine karşı hassasiyet göstermektedirler. Bu nedenle çözeltilerdeki enzim miktarı, enzimin etkilediği substrat molekülünün yanı sıra reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ürün veya enzimatik reaksiyonların yol açtığı farklı parametreler tarafından da belirlenmektedir (Söyüt, 2006). Enzim katalizli reaksiyon hızını etkileyen en önemli faktörler ligand konsantrasyonu (substratlar, inhibitörler, aktivatörler), enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve iyonik şiddettir (Segel, 1991).

Substrat konsantrasyonu: Enzim miktarı sabit tutularak substrat miktarı artırılarak reaksiyon hızı maksimum seviyeye (V_{max}) vardığında bir artma

gösterecektir. Bu seviyeden sonra substrat konsantrasyonundaki artış hızı artmamaktadır.

Enzim konsantrasyonu: Çok fazla substrat konsantrasyonunun varlığında, enzim konsantrasyonu arttıkça enzim katalizli reaksiyonun hızı artmaktadır. Bir süre sonra reaksiyonu gerçekleştiren enzim denatürasyona uğramaktadır. Bunun sonunca ortamdaki substrat konsantrasyonu arttırıldığında enzim aktivitesini kaybettiğinden dolayı dönüşüm sağlanamamaktadır (Wilson and Walker, 2010).

Sıcaklık: Kimyasal reaksiyonlarda olmak üzere enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızları sıcaklık artışına bağlı olarak artış göstermektedir. Sıcaklığın 10°C arttırılması, enzimlerin aktivitesini %50 ile %100 oranında bir artış sergilenmektedir. Reaksiyon sıcaklığındaki 1 ya da 2 derecelik artışlar ise %10 ila %20 arasında aktivasyon hızına etki etmektedir.

pH Etkisi: Enzimler pH değişikliğinden kolayca etkilenmelerinden dolayı her enzimin optimum şartlarda çalıştığı bir pH değeri bulunmaktadır (Kurland and Pilgis, 1995).

İnhibitör Etkisi: Enzimin katalitik etkisini yavaşlatan ve bazı durumlarda katalizi sonlandıran bileşenlere enzim inhibitörleri denir. Enzim inhibitörleri yarışmalı, yarışmasız ve yarı-yarışmalı olmak üzere etki göstermektedir. İnhibisyon mekanizması hakkındaki çoğu teori, enzim substrat kompleksi ES'nin varlığına dayanmaktadır (Kurland and Pilgis, 1995).

Aktivatör Etkisi: Enzimlerle birleşerek enzim katalizli reaksiyonların hızını arttıran maddelere aktivatör denir. Metabolizma kontrolündeki enzimlerin regülasyonunda rol oynamaktadır.

1913'te Leonor Michael ve Maud Menten, enzim ve substrat kombinasyonunu ilk kez öne sürmüşlerdir. Bu yaklaşımda enzim [E], substrat [S], enzim-substrat [ES] kompleksinin hızlı bir şekilde dengeye ulaşması ve ES'nin geri kazanımının çok daha yavaş olduğu varsayılmaktadır.



Şekil 1. 2. Enzim-Substrat kombinasyonu

K_1 , substrat [S] ve enzim [E]'den enzim-substrat kompleksi ES'nin oluşumu için sabit bir oran olmaktadır. K_2 ise ES kompleksinin substrata ve serbest enzime ayrışmasının ters reaksiyonu için sabit bir oranıdır ve K_3 ürünü [P] ve serbest enzim oluşumunun hız sabitini açıklamaktadır (Suzuki, 2015).

1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

İnsanlar için esansiyel bir element olan oksijenin hücreler tarafından enerji üretilmesi için kullanılması sonucunda ortaya çıkan ATP ile kararsız elementler de ortaya çıkmaktadır. Bu kararsız elementlere örnek olarak Reaktif oksijen türleri veya reaktif nitrojen türleri verilebilir. Ortaya çıkan bu elementler duruma göre toksik veya faydalı etkiler yapabilmektedir. ROS ve RNS arasında oluşan hassas denge hayatın önemli bir yönü olmaktadır. Bağışıklık ve hücre fonksiyonları üzerinde düşük ve normal seviyelerde ki ROS ve RNS'ler faydalı etkiler göstermektedir. Artan konsantrasyon sonucunda hücre yapısına zarar veren bir süreç olan oksidatif stres oluşumu görülmektedir. (Halliwell, 2007; Valko et al., 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Genestra, 2007; Pacher et al., 2007; Bahorun et al., 2006; Valko et al., 2004; Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Young and Woodside, 2001). Kanser, artrit, otoimmün bozukluklar, yaşlanma, oksidatif stres, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi dejeneratif ve kronik rahatsızlıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İnsan vücudu, doğal, dışarıdan veya takviyeler yoluyla sağlanan antioksidanlar üreterek oksidatif strese karşı savunma mekanizmasına sahip olmaktadır (Pham et al., 2008).

Hücre içi ve Hücre dışı kaynaklı antioksidan moleküller bu radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran temizleyiciler olarak rol almaktadırlar. Bundan dolayı bağışıklık sistemi ve çeşitli hastalıklara karşı riski ortadan kaldırabilmektedirler (Valko et al., 2006; Valko et al., 2005; Parthasarathy et al., 1999; Frei, 1997; Chatterjee et al., 2007).

Serbest radikaller, moleküllerden, her parça bir elektron tutacak şekilde kimyasal bir bağın kırılması, bir radikalın başka bir radikal vermek üzere parçalanması ve ayrıca redoks reaksiyonları yoluyla da oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge, 2007; Bahorun et al., 2006). Serbest radikaller peroksil ($ROO\cdot$), hidroksil ($OH\cdot$), lipid peroksil ($LOO\cdot$), süperoksit ($O_2\cdot^-$) ve alkoksil ($RO\cdot$) grupları içermektedir. Ayrıca hipokloröz asit ($HOCl$), singlet oksijen (O_2), hidrojen ozon (O_3), peroksit (H_2O_2),

nitrik asit (HNO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3), peroksinitrit (ONOO^-) ve lipid peroksit (LOOH), serbest radikaller değillerdir ve genellikle oksidanlar olarak adlandırılırlar. Bu oksidanlar kararsız yapıları nedeniyle serbest radikallerin artmasına bunun sonucunda oksidatif stres oluşumuna sebebiyet vermektedir (Genestra, 2007; Pham et al., 2008). Buradan anlaşılması gereken, serbest radikal oluşumu çeşitli moleküller ve çevresel koşullar tarafından tetiklenebilmektedir.

ROS ve RNS üretimi enzimsel ve enzimsel olmayan reaksiyonlar sonucu meydana gelmektedir. Fagositoz ve prostaglandin sentezi bu kararsız radikallerin enzimatik reaksiyon sonucu oluşumunu örnek olarak verilebilir. (Halliwell and gutteridge, 2007; Bahorun et al., 2006; Valko et al., 2004; Valko et al., 2007; Valko et al., 2007; Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007). Örneğin NADPH oksidaz, süperoksit anyon radikali (O_2^-), peroksidazlar, ksantin oksidaz gibi birkaç hücrel oksidaz sistemi aracılığıyla üretilmektedir. Oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon radikali (O_2^-), peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil (OH^-), HOCl vb. gibi çeşitli ROS ve RNS'ler veren birçok reaksiyonlara katılmaktadır. Hidrojen peroksit, amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz dahil olmak üzere çeşitli oksidaz enzimlerinin etkisiyle üretilmektedir. Son olarak da hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside oksidasyonunu da katalize etmektedir. İn vivo ortamda en reaktif serbest radikal olan OH^- , demir veya bakır (katalizör) varlığında süperoksit anyon radikali'nin hidrojen peroksit ile reaksiyonu ile oluşmaktadır. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir (Valko et al., 2004; Valko et al., 2007; Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007). Hipokloröz asit (HOCl), hidrojen peroksit varlığında miyeloperoksidaz enzimi tarafından üretilmektedir. NO biyolojik dokularda L-arginin'in oksit sentaz tarafından sitriline oksidasyonundan oluşmaktadır (Valko et al., 2004; Valko et al., 2007; Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007).

ROS ve RNS, eksojen veya endojen kaynaklardan üretilmektedir. Endojen serbest radikaller, zihinsel stres, iltihaplanma, aşırı egzersiz, enfeksiyon, bağışıklık hücresi aktivasyonu, kanser vb. rahatsızlarda ortaya çıkmaktadır. İnsan sağlığını etkileyen çevresel faktörler ve bazı ilaçlar organizmada ROS ve RNS birikimine neden olabilmektedir (Valko et al., 2007; Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Young and Woodside, 2001; Valko et al., 2006; Valko et al., 2005; Parthasarathy et al., 1999; Frei, 1997).

Vücuda farklı yollardan girmesinin sonucunda bu eksojen bileşikler parçalanır veya serbest radikallere metabolize edilirler. Hücresel yapıların olgunlaşma süreci için düşük veya orta konsantrasyonlarda, ROS ve RNS gereklidir. Fagositler (makrofajlar, nötrofiller, monositler), istilacı patojenik mikropları yok etmek için hastalığa karşı vücudun savunma mekanizmasının bir parçası olarak serbest radikalleri salgırlar (Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Young and Woodside, 2001). Granüloamatöz hastalığı olan hastalarda, bağışıklık sistemi tarafından ROS üretiminin önemi açıkça örneklenmiştir. Bu hastalarda, zara bağlı eksik NADPH oksidaz sistemi vardır. Bunun sonucunda süperoksit anyon radikali (O_2^-) üretemez hale getirir ve böylece kalıcı enfeksiyona neden olur (Valko et al., 2007; Dröge, 2002). Serbest radikallerin bir diğer faydalı etkisi ise hücre içi sinyal sistemindeki rolleridir (Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007). Fagositik olmayan NADPH oksidaz izoformları tarafından üretilmeleri, kardiyak miyositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri ve tiroid dokusu dahil olmak üzere çeşitli fagositik olmayan hücrelerde hücre içi sinyalinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Pacher et al., 2007). Serbest radikallerin diğer bir faydalı aktivitesi, mitojenik bir tepkinin uyarılmasıdır (Pacher et al., 2007; Genestra, 2007).

Serbest radikal ve oksidanların üretiminin artmasıyla hücre zarlarını, proteinleri, lipitleri, lipoproteinleri ve DNA gibi moleküllerin yapılarına zarar vererek oksidatif stresi meydana getirirler. (Dröge, 2002; Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Young and Woodside, 2001). Hücrelerde oluşan fazla serbest radikaller yeterince yok edilemediğinde ortaya oksidatif stres çıkabilir. Diğer bir ifadeyle, oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ve nütrolizasyonu arasındaki dengesizlikten dolayı ortaya çıkmaktadır. Örnek olarak, yüksek miktarda hidroksil radikali ve peroksinitril, lipid peroksidasyonu ile hücre zarı yapısına ve lipoproteine zarar vermektedir. Gerçekleşen bu reaksiyon, hücre içi toksik ve mutasyon kaynağı olan malondialdehit bileşiklerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Radikal bir zincir reaksiyonu lipid peroksidasyonunu oluşturmaktadır. Yani bir kez başladıktan sonra hızla yayılarak çok sayıda lipid moleküllerini etkilemektedir (Frei, 1997). Proteinler ayrıca ROS / RNS tarafından hasar görerek yapısal değişikliklere ve enzim aktivitesi üzerinde aktivite kaybına yol açar. (Halliwell, 2007; Young and Woodside, 2001; Valko et al., 2006; Valko et al., 2005; Parthasarathy et al., 1999; Frei, 1997). Mutasyonlarda ortaya çıkan farklı oksidatif DNA lezyonları, DNA'daki

oksidatif hasar sonucu olmaktadır. Vücut, DNA onarım enzimlerini veya antioksidanları kullanarak bu saldırılara karşı çeşitli savunma mekanizması geliştirmektedir (Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007). Oksidatif stres, uygun şekilde düzenlenmediği takdirde, çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların yanı sıra yaşlanma sürecini ve bazı akut patolojileri tetikleyebilmektedir (Pham et al., 2008).

Vücut, endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar üreterek oksidatif strese karşı koymak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Antioksidanlar, hücreleri toksik etkilerine karşı korumak, serbest radikallerin fazlalığını nötralize etmek ve hastalıkların önlenmesine katkıda bulunmaktadır (Pham et al., 2008).

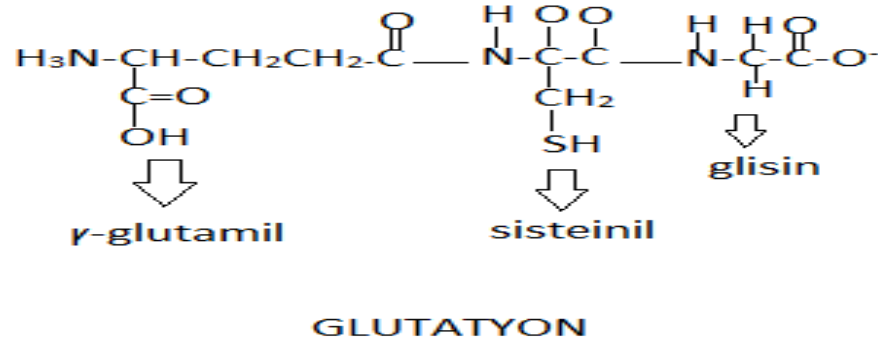
Hücre tarafından üreten bileşikler, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Serbest radikallerin nötralizasyonunda yer alan önemli antioksidan enzimler; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gösterilmektedir (Willcox et al., 2004; Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Young and Woodside, 2001; Valko et al., 2006; Valko et al., 2005).

Enzimatik olmayan antioksidanlar ayrıca metabolik antioksidanlar ve besleyici antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlara ait metabolik antioksidanları lipoid asit, glutatyon, L- ariginin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin ve transferrin vb. gibi vücutta metabolizma tarafından üretilmektedir (Dröge, 2002; Willcox et al., 2004) Eksojen antioksidanlara ait besleyici antioksidanlar, vücutta üretilemeyen ve besinlerle veya takviyelerle alınması gereken C vitamini, E vitamini, karotenoidler, eser metaller ve yağ asitleri olarak örnek verilmektedir (Pham et al., 2008).

1.3. Glutatyon

Tiyol grubu güçlü bir indirgeyici ajan olan glutatyon (GSH), glutamin, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan suda çözünür bir tripeptiddir. GSH bazı dokularda milimolar konsantrasyonlara ulaşan en bol hücre içi küçük moleküllu tiyol haline getirir. Glutatyonun önemi, bitkilerde, memelilerde, mantarlarda ve bazı prokaryotik organizmalarda yaygın olarak kullanılmasından anlaşılmaktadır (Anderson, 1988). GSH, detoksifikasyona ek olarak, glioksalaz sistemi, ribonükleotitlerin indirgenmesi,

tiyol:disülfid reaksiyonlarının düzenlenmesi dahil olmak üzere diğer hücresel reaksiyonlarda da rol oynamaktadır (Mullineaux, 1997).

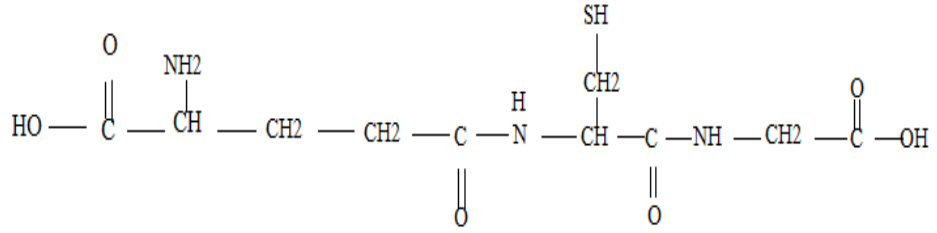


Şekil 1. 3. Glutatyonun yapısı

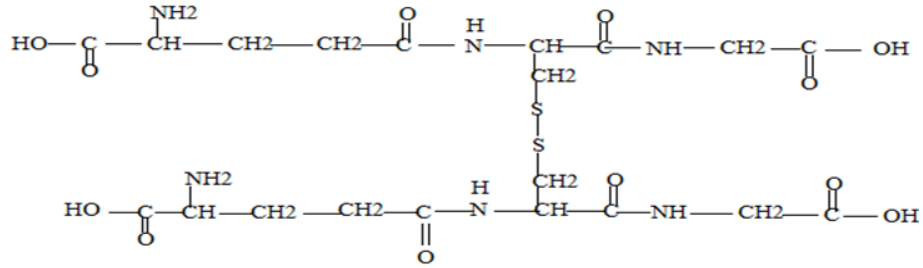
GSH, tiyolü azaltılmış ve disülfid oksitlenmiş (GSSG) formlarda bulunmaktadır (Kaplowitz et al., 1985). GSH baskın formdur ve toplam GSH'nın %98'ini oluşturur (Akerboom et al., 1987; Ballatori et al., 2009; Forman et al., 2009). Ökaryotik hücreler üç ana GSH rezervuarına sahiptir. Hücresel GSH'ın %80-85'i sitozolde, %10-15'i mitokondride ve küçük bir yüzdesi endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. GSH'ın yapısı, glutamat ve GSH sisteinini bağlayan peptid bağının, α -karboksil grubu yerine glutamatın γ -karboksil grubu aracılığıyla olması bakımından benzersiz olmasıdır. Bu bağı hidrolize edebilen tek enzim, yalnızca γ -glutamyltranspeptidazdır (GGT). Sonuç olarak GSH hücre içi bozunmaya karşı dirençlidir ve yalnızca hücre dışı olarak GGT ifade eden hücreler tarafından metabolize edilmektedir. Bu durum GSH'nın parçalanmasına ve onu oluşturan amino asitlerin hücreler tarafından alınmasına ve GSH'a yeniden katılmasına izin vermektedir. Plazma GSH'nun büyük bir kısmı, sentezlediği GSH'nın neredeyse tamamını plazma ve safraya taşıyarak GSH'ın organlar arası homeostazında merkezi bir rol oynayan karaciğerden kaynaklanmaktadır (Ookhtens and Kaplowitz, 1998; Lauterburg et al., 1984; Lu, 1999).

GSH, antioksidan savunma, ksenobiyotiklerin veya metabolitlerinin detoksifikasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesinin ve apoptozun düzenlenmesi, sisteinin depolanması, redoks potansiyelinin sürdürülmesi, bağışıklık fonksiyonunun modülasyonu ve fibrojenez dahil olmak üzere birçok hayati fonksiyonda rol oynamaktadır (Ballatori et al., 2009; Forman et al., 2009; Meister and Anderson, 1983; Pallorda et al., 2009; Lu, 2009).

Glutatyon, dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki farklı formda bulunarak bir denge sağlamaktadır. Hücre içi sıvılarda GSH, glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ile GSSG'a dönüştürülmektedir (Arrick ve Nathan, 1984). GSSG daha sonra NADPH'ı hidrojen kaynağı olarak kullanarak tekrar GSH'a indirgemektedir (Demirkol ve Ercal, 2012).



Şekil 1. 4. GSH yapısı



Şekil 1. 5. GSSG yapısı

GSH'nın antioksidan işlevi, büyük ölçüde glutatyon peroksidaz (GPx) ile katalize edilen reaksiyonlar tarafından sağlanmaktadır. Bu durumda GSH, GSSG'ye oksitlenirken hidrojen peroksit ve lipid peroksidi azaltmaktadır. GSSG, NADPH'ı glutatyon redüktaz tarafından tekrar GSH'ye indirgenerek bir redoks döngüsü oluşturmaktadır (Lu, 2009). GSSG miktarındaki artış oksidanların sebep olduğu doku hasarları ile sonuçlanmaktadır. Buna bağlı olarak GSH/GSSG oranı da değişmektedir (Meister and Anderson, 1983). Hücrenin oksidatif durumu hakkında hücresel döngü anahtarı olarak görev yapan GSH/GSSG fikir vermektedir. GSH/GSSG oranının çok düşük olması oksidatif stresin o oranda ilerlemiş olduğu sonucuna varılır (Schafer and Buettner, 2001). Oksidatif stres, hücrenin GSSG'yi GSH'ye indirgeme potansiyelini aştığında redoks dengesinde önemli bir hatadan kaçınmak için, GSSG aktif olarak

hücre dışına taşınır veya bir protein sülfidril grubu ile reaksiyona girerek karışık bir disülfid oluşumuna yol açabilir. Böylece şiddetli oksidatif stres, hücrel GSH'yi tüketmektedir (Lu, 2009).

Oksidatif strese maruz kalma, serbest radikallerin nötralizasyonu ve ksenebiyotiklerin detoksifikasyonları da dahil olmak üzere GSH proteinlerdeki disülfid bağlarını indirgemektedir (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). Hücre içi peptidazlar tarafından γ -glutamil bağının varlığı sayesinde tripeptidin bozulması engellenmektedir. Sisteinin -SH grubu bir elektron verici davranışı göstererek GSH indirgeyici özellikler vermektedir. Ayrıca serbest radikallerin uzaklaştırılmasını da sağlamaktadır (Meister and Anderson, 1983).

GSH tüm hücrelerin sitozolünde 2 adımda sentezlenmektedir. İlk adımda γ -glutamilsistein sentetaz tarafından katalize edilen L-glutamat ve L-sisteinden γ -L-glutamat-L-sistein oluşturulur. İkinci adımda ise GSH sentetazın katalizlenmesi sonucu γ -L-glutamin-L-sistein molekülüne L-glisin ilave edilerek GSH oluşturulur. (Demirkol ve Ercal, 2012). Hücrede farklı formlarda bulunan GSH'nin en önemlileri GSH, GSSG, GSS-protein kompleksi, karışık disülfitler sistein, α -pantetein ve koenzimA gibi SH grubu içeren düşük molekül bileşiklerdir (Smirnova and Oktyabrsky, 2005).

GSH içerdiği gamma (γ) bağının etkisi ile zor parçalanabilen bir molekül olmaktadır ve GSH'u parçalamada görev alan tek enzim γ -glutamil transpeptidaz enzimidir. γ -glutamil ve L-sisteinil- glisin şeklinde GSH'u γ -glutamil transpeptidaz enzimi ayırmaktadır. Daha sonra L-sisteinil-glisin, dipeptidaz enzimi yardımıyla hücre tarafından tutulan sistein ve glisine parçalanır (Smirnova and Oktyabrsky, 2005.)

Kısaca glutatyon bir antioksidan molekül olarak hücre, doku ve organ sistemlerinin yapısal ve fonksiyonel formlarının korunmasında önemli bir etkiye sahiptir. Çok fazla oksidatif stres sonucu veya düşük antioksidan potansiyalinde antioksidan hasar gözlenmektedir. Bu nedenle glutatyon seviyesi düşer ve serbest radikal hasarları sonucunda patolojik hastalıklar görülür. GSH; yaşlanma, kanser, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın temelinde yer alması açısından önem taşımaktadır (Aksoy, 2002).

1.4. GR (Glutatyon Redüktaz)

GR (Glutatyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.8.1.7: GR) flavoenzimin piridin nükleotit disülfid oksidoredüktaz ailesine ait enzimdir (Veine et al., 1998). Tiorredoksin redüktaz ve lipoamid dehidrojenaz içeren GR enzimi GSSG'ye eşlik eden NADPH oksidasyonunun indirgenmesini katalize eder (Bohme et al., 2000).



Şekil 1. 6. GR enzimin 3 boyutlu yapısı

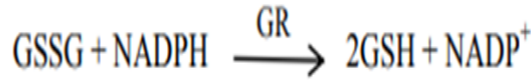
Bu reaksiyon, kırmızı kan hücresinde yüksek GSH/GSSG oranını korumak için önemlidir (Wong et al., 1989). GR ayrıca redoks homeostazında da önemli bir rol oynamaktadır (Bauer et al., 2006). İnsan hücrelerinde protein oksidasyonunun korunmasının yanı sıra glutatyona bağımlı antioksidan sisteminin de anahtar enzimidir (Yawata and Tanaka 1974; Kanzok et al., 2001).

1931 yılında glutatyonun davranışını inceleyen Hopkin ve Illiott, termolabil sistemin glutatyondan disülfiti indirgeme kapasitesine sahip olduğunu bulmuş ve glutatyonun iyi beslenmiş hayvanların karaciğerlerinde, aç kalmış hayvanların karaciğerlerine göre daha hızlı azaldığını gözlemlemiştir. Kısa bir süre sonra Mann 1932 yılında, anaerobik koşullar altında glikoz dehidrojenazın varlığında glikoz aracılığıyla glutatyonun indirgendiğini göstermiştir. Daha sonra Meldrum tarafından bozulmamış eritrositlerde hemen hemen aynı anda hızlı azalma ve çok daha yavaş oksidasyon gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın ardından 1933 yılında Meldrum, heksoz monofosfatın aerobik ve anaerobik koşullar altında glutatyonu azaltma kabiliyetine sahip olduğunu kanıtladı.

Hidrojenin koenzim II-dehidrojenazlardan oksitlenmiş glutatyona aktarılmasını sağlayan buğday tohumundan gelen enzim ilk olarak Conn ve Vennesland tarafından

1951 yılında glutatyon redüktaz (GR) olarak adlandırıldı. Rall ve Lehninger tarafından bezelye tohumlarında ve sıçan böbrek, karaciğer, dalak, kalp kası, beyin ve iskelet kası içinde de GR enzimini tespit etmişlerdir. 1954 yılında Asnis GR'nin bir flavoprotein olduğunu ve FAD'ın yapısında bir grup olarak bulunduğunu kanıtladı. Langdon daha sonra sıçan karaciğerinden ekstrakte edilen GR'nin kofaktör getirmediğini ve flavin nükleotit içermediğini bildirmiştir. 1963 yılında Mapson ve Isherwood GR'nin flavoprotein olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir.

GR, oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize ederek GSH ve GSSG oranını belli bir seviyede tutan önemli bir enzimdir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamda NADPH gereklidir. Ortamda gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolu ile sağlanmaktadır. Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ile GR enzimi arasında bulunan bu bağlantı Pentoz fosfat yolu sonucunda meydana gelmektedir. G6PD enziminin çalışmaması sonucu olarak NADPH üretimi etkilenmektedir. NADPH üretiminin azalması sonucunda glutatyon redüktaz enziminin işlevini etkilemektedir. Diğer yandan GR'nin aktivite düşüklüğü ise glutatyon oluşumunu etkilemektedir. (Ciftci vd, 2000; Keha & Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 1. 7. GR enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon

GR enzimi tarafından katalize edilen reaksiyon, hücrel redoks durumunun bir göstergesi olarak kabul edilen ve bu nedenle büyük önem taşıyan GSH/GSSG oranının korunmasını sağlar (Meister, 1983; Wu et al., 2004).

GR katalize ettiği reaksiyonda NADPH koenzimi ihtiyacı, hayvan ve bitki dokularındaki bazı enzim sistemleri tarafından sağlanır. Pentoz fosfat metabolik yolu bu enzim sistemlerinden en iyi bilinenidir (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Pentoz fosfat metabolik yolunun iki adımı vardır. Bunlar oksidatif olan ve oksidatif olmayan metabolik yollardır (Cabezas vd, 1999). Oksidatif aşama, hücrelerde NADPH'nın kaynağı olmaktadır. Bir molekül glikoz-6-fosfat molekülü için bir molekül riboz-5-fosfat gerekir sonuç olarak bir molekül karbondioksit (CO₂) ve iki molekül NADPH oluşmaktadır (Champe et al., 2007).

Oksidatif aşamanın reaksiyonunu ilk katalize eden enzim glukoz-6-fosfat dehidrojenazdır (G6PD). Bu ilk reaksiyon, glikoz-6-fosfatın (G6P) 6-fosfo-D-glukonata (6GP) dönüşümünü katalize etmektedir. Oksidatif aşamanın ikinci reaksiyonu 6-fosfoglukonat dehidrojenaz (6PGD) tarafından katalize edilir (Champe et al., 2007).

Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimine NADPH^+ sağlanmasıyla pentoz fosfat metabolik yolun hızı kontrol edilir. Glutasyon redüktaz enziminin katalize ettiği reaksiyonda, eğer NADPH oksitlenir ve bununla beraber $[\text{NADPH}] / [\text{NADP}^+]$ oranı düşerse, metabolik yol NADPH 'yi yenilemek için hızlanır (Halliwell and Gutteridge, 2015). Pentoz fosfat metabolik yolağına ek olarak, sitosolik NADPH , malik enzim tarafından katalize edilen malat katalizli pirüvat oluşumunun reaksiyonu ile da üretilir (Aksoy, 2000).

GR, mitokondri, sitozol ve peroksisomlarda bulunmasının yanısıra çoğunlukla kloroplastlarda bulunmaktadır (Edwards et al., 1990).

Hücrede GR ve GSH eksikliği oksidatif hasara neden olmaktadır. Bunun sonucunda Parkinson, Alzheimer, orak hücreli anemi, karaciğer ve akciğer hastalıkları, kistik fibröz, inme, kanser ve şizofreni olmak üzere hastalıklara sebep olmaktadır (Townsend et al., 2003; Wu et al., 2004).

1.5. Ağır Metaller

Metallerin işlenmesi ve kullanılması çok eski tarihsel gelişime dayanmaktadır. Metaller üzerindeki prosesler ve kullanımlar sonucunda metallerin doğal döngülerinin dışında farklı formlar ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri sanayi devrimi ile birlikte ortaya çıkan enerji ihtiyacını çok büyük ölçüde karşılamak için birçok sanayileşmiş bölgelerde ağır metal içeren kömürler kullanılmaya başlanmıştır. Bunun sonucunda bu bölgelerde ağır metal kirliliğinde artış meydana gelmiştir (Kahvecioğlu vd 2003).

Ağır metaller terimi, atomik yoğunluğu 4 g / cm^3 'ten fazla veya sudan 5 kat veya daha fazla olan metaller ve metaloidler grubu için geçerli olan genel bir terim olmaktadır (Hawkins, 1997). Ağır metaller arasında çinko (Zn), kobalt (Co), nikel (Ni), kadmilyum (Cd), arsenik (As), gümüş (Ag), demir (Fe), krom (Cr), kurşun (Pb) ve platin grubu elementleri yer almaktadır (Nagajyoti et al., 2010).

Ağır metallerin vücutta birikmesinin insan sağlığını olumsuz etkilediği kanıtlanmıştır. Arsenik, kurşun, aliminyum, demir, cıva ve kadmilyum gibi ağır

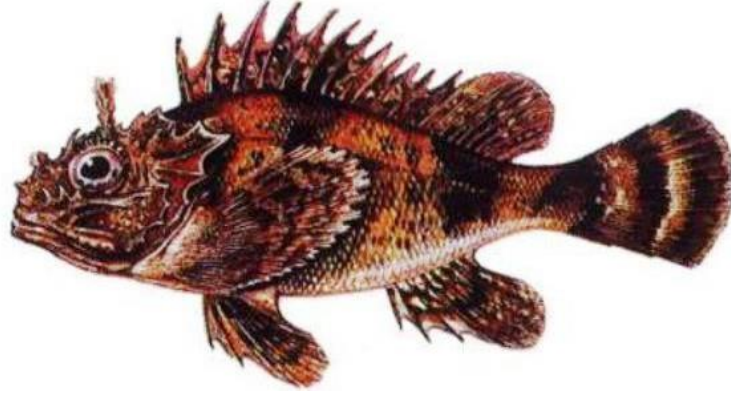
metaller insan sağlığını olumsuz etkilere neden olacak başlıca metallerdir. Bu metaller vücuda deri veya solunum yolları veya ağır metallerin kontamine içme suyu ve yiyecekler yoluyla alınması gibi çeşitli yollarla da maruz kalabilmektedir. Ayrıca ağır metaller vücutta oksijen ve klorür gibi bazı bileşiklerle reaksiyona girerek kendi toksik etkilerini gösterebilirler (Rusyniak et al., 2010).

Vücutta ağır metallerin birikmesi insan vücudunun ana metabolik sürecini yok eder ve aynı zamanda antioksidan dengesizliğine yol açar. Benzer şekilde esansiyel enzimlerin fonksiyonu ve çok sayıda hormonun aktivitesi de etkilenmektedir (Dhir et al., 2011). Ağır metaller, kalp, beyin, karaciğer ve böbrekler gibi insan vücudunun önemli organlarında birikerek metabolik işlevlerine çeşitli şekillerde müdahale eder ve bununla birlikte organlarda biyolojik fonksiyonlarını bozabilir (Al- Samman, 2015)

Birçok çalışmalar sonucunda, ağır metal birikiminden kaynaklanan çeşitli kanserojen yollar bulmuşlardır. Sonuç olarak ağır metallerin kanserojenliği ve mutajenitesinin oksidatif stresin indüklenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bazı araştırmacılar, biyolojik sistemlerdeki redoks reaksiyonlarının nikel, kobalt, krom ve arsenik gibi kanserojen metal iyonları tarafından ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Oluşan reaksiyonlar sonucu meydana gelen serbest radikaller, DNA ve proteinlerde oksidatif hasara sebep olmaktadır. Bu redoks reaksiyonlarının ürettiği türler, DNA'nın doğrudan zarar görmesine rağmen, insanlarda kansere neden olan iki önemli işleve daha sahip olmaktadır. Biri redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerin aktivasyonu, diğeri mitotik sinyal olarak rolünü içermektedir (Genestra, 2007).

Ağır metallerin depoalanmasıyla birlikte vücutta ana metabolik süreçlerin yok olmasına ve antioksidanlardaki dengesizliğe neden olarak benzer şekilde hormonların aktivite ve enzimlerin işlevlerindeki etkilemektedir (Jayawardena et al., 2017). Bunun sonucunda ağır metallerden etkilenen moleküler yollardan bağımsız olarak, sonunda nörolojik hastalıklara böbrek fonksiyonlarında bozulmaya, farklı kanser türlerine ve diğer endokrin hastalıklara yol açabilen oksidatif strese neden olabilen reaktif oksijen türleri üretirler (Qayyum et al., 2012).

1.6. İskorpit Balığı (*Scorpaena porcus* L.)



Şekil 1. 8. İskorpit Balığı (*Scorpaena porcus* L.)

Turan (2007), Akşiray (1987) ve Mater vd. (1989) İskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) sistematikteki yerini şöyle açıklamaktadır:

Alem: Hayvan

Üst sınıf: Gnathostomata

Sınıf: Osteichthyes

Alt sınıf: Actinopterygii

Takım: Scorpaenidae

Aile: Scorpaenidae

Cins: *Scorpaena*

Tür: *Scorpaena porcus* Linnaeus

İskorpit balıkları 16-18 yıl yaşayan, yavaş hareket eden ve akıntılı bölgelerde yaşayan Scorpaenidae ailesinin uzun ömürlü bir üyesidir (Akşiray, 1987). Morfolojik özellikleri dikkate alındığında baş yapısı büyük ve uzunluğu eninden fazla olmaktadır. Gövde rengi siyaha yakın düzensiz benekler ile kahverenginin açık ve koyu tonlarındadır (Ferri et al., 2010). Yüzgeç kısımlarında zehir maddesi salgılayan dikenler bulunmaktadır. Bu dikenlerin kısımlarında, çabuk iyileşmeyen yaralar ve acı veren zehir keseleri bulunmaktadır (Akşiray, 1987). İyi bir renk uyumu göstermelerinin yanı sıra stress altına girdiklerinde yüzgeç ışınlarnı dikleştirerek savunma haline geçmektedirler (Bat et al., 2008).

İskorpit balığı Akdeniz ve Karadeniz havzalarının tamamında görülmektedir. Ülkemiz sınırları içerisinde en fazla Ege, Karadeniz ve Akdeniz’de bulunur. 1000 m’ye kadar derinliklerde yaşayan İskorpit balığı sığ ve alglerle kaplı bölgeleri tercih etmektedir (Akşiray, 1987).

Denizlerdeki kirlilik esas olarak deniz canlılarında ve tortullarda birikmektedir. Bu nedenden dolayı insanlara besin zinciri yoluyla da insanlara geçmektedir (Tüzen, 2003). En önemli kirliletiçi faktörlerden biri olan ağır metaller, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir ve oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebilmektedir. Reaktif oksijen türleri lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar vermektedir (Siktar ve ark.,2011). Balıkların büyük miktarda elde edilmesinin kolay olması, metal biriktirme potansiyeline sahip olması, metal biriktrime potansiyeline sahip olması, uzun ömürlü olması, analiz için optimum boyutta olması nedeniyle iyi bir biyo gösterge olmaktadır (Batvari ve ark. 2007).

Bu tez çalışmasında iskorpit balığı karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enzimini saflaştırarak, saf enzim aktivitesi üzerinde bazı ağır metallerin inhibitörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmamızda materyal olarak İskorpit balığının (*Scorpaena porcus*) karaciğer dokusu kullanılmıştır.



Şekil 2. 1. İskorpit balığı ve karaciğer dokusu

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Coomassie brilliant blue G-250, Okside glutatyon, β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat, fenilmetil sülfonil florür, potasyum fosfat, ditiyotreitöl, amonyum sülfat, takrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timöl mavisi, amonyum persülfat, hidroklorik asit, glisin, gliserin, potasyum asetat, sodyum dodesil sülfat, etilendiamintetraasetikasit, asetik asit, potasyum klorür, sodyum asetat, metanol, etanol, 2',5' ADP-Sepharose 4B, sodyum klorür, , kadmiyum nitrat, markör, izopropanol, mangan nitrat, nikel ve krom nitrat kimyasal maddeler bu tez çalışmasında kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Malzemeler

Aşağıdaki malzemeler tez çalışmasında kullanılmıştır.

pH metre: Thermo Scientific Orion Star A211

Hassas terazi: Ohaus-Pioneer

Soğutmalı santrifüj: Hermle Z 326 K

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800

Buzdolabı (+4°C): Bosch GSV33vW30

Vorteks: Velp Scientific Orion StarA211

Saf su cihazı: Nüve Water Disteller ND12

Otomatik pipet: ISOLAB, Thermo

Manyetik karıştırıcı: Ika Topolino S1

Derin dondurucu (-20°C): Bosch KSU40623NE

Peristaltik pompa: Gılsön Mınıpuls 3

Elektroforez tankı: Bıo Rad Power Pac Basic

Güç kaynağı: Bıo Rad Power Pac Basic

Buz makinesi: Scotsman AF 80

2.1.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

2.1.3.1. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Tamponlar

1: 1 M KH_2PO_4 (pH=7.0) tampon çözeltisi: KH_2PO_4 'dan 34.025 g alındı ve 200 ml saf su içerisinde çözündürüldü ve pH: 7.0'a ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlanmıştır.

2: GSSG (2 mM) çözeltisi: 12.24 mg GSSG tartılıp 10 ml saf su içinde çözölmüştür.

3: NADPH çözeltisi (2 mM): 16.66 mg NADPH tartılarak 10 ml saf su içerisinde çözödüröldü

2.1.3.2. Diyaliz ve Amonyum Sülfat Çöktürme İşleminde Kullanılan Tampon Çözeltilerin hazırlanması

1: 100 ml'lik 300 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) tampon çözeltisi: Stok KH_2PO_4 (1 M) tampon çözeltisinden 30 ml alınarak 50 ml saf su içerisinde pH (6.5)'e ayarlanarak 300 mM seyreltildi. Tampon çözeltinin hacmi 100 ml olacak şekilde tamamlanmıştır.

2: 500 ml 30 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) diyaliz için kullanılan tampon çözeltisi: 1 M stok KH_2PO_4 çözeltisinden 15 ml eklenerek 200 ml distile su içerisinde pH' ı (6.5) ayarlanarak 30 mM seyreltildi. Tampon çözeltinin son hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.3. Afinite Kromatografisi Solösyonların Hazırlanması

1: Kolonun paketlenmesi ve dengelenmesi: 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT (pH: 7.3) : 6.845 g KH_2PO_4 , 0.292 g EDTA, 0.156 g DTT tartılarak 800 ml distile su içerisinde çözödüröldü ve pH: 7.3'e ayarlandı. Daha sonra 1 lt olacak şekilde tamamlandı.

2: Afinite kramatografisi kolunu için birinci yıkama tamponu: 0.1 M K-asetat, 0.1 M K-fosfat (pH: 7.85): 9.8 g K-asetat ve 13.609 g K-fosfat tartılarak 800 ml saf su içerisinde çözödüröldükten sonra pH: 7.85'e ayarlandı. Daha sonra 1 lt olarak tamamlandı.

3: Afinite kramatografisi kolonu için ikinci yıkama çözeltisi: 0.1 molar potasyum fosfat + 0.1 M KCI (pH: 7,85): 13.609 g K-fosfat + 7.45 KCI tartılarak 800 ml saf su içerisinde çözödüröldü. Tamamen çözöünen solösyon pH'sı 7.85 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1000 ml olarak ayarlandı.

4: Elüsyon tamponu: 1 milimolar (mM) EDTA + 50 milimolar K-fosfat + 0.5 milimolar NADPH + 1 mM GSH (pH: 7.3): 0.680 g Potasyum fosfat, 0.0292 g EDTA, 0.0306 g GSH ve 0.0416 g NADPH tartılarak 60 ml saf su içerisinde çözündürüldü ve pH: 7.3'e ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

5: Rejenerasyon tamponu : 0.1 M Na-asetat + 0.5 M NaCl (pH: 4.5): 2.05 g Na-asetat ve 7.305 g NaCl tartılıp 200 ml saf su içerisinde çözündürüldü ve pH: 4.5'e ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.4. Jel Elektroforez Çözeltilisinin Hazırlanması

1: 1.5 M Tris-HCl (pH: 8.8): 9.085 Tris tartıldı ve 30 ml saf su içerisinde çözündürüldü. Çözdürülen tamponun pH'ı ayarlandıktan sonra hacmi 50 ml olacak şekilde tamamlanmıştır.

2: 1 M Tris-HCl (pH: 6.8): 6.055 Tris tartıldı ve 30 ml saf su içerisinde çözündürüldü. Çözdürülen tamponun pH'ı ayarlandıktan sonra 50 ml'ye tamamlandı.

3: %30 Akrilamid-%0.8 Bisakrilamid çözeltisi: 7.5 g akrilamid ve 0.2 g bisakrilamid 17.3 g saf su ile çözündürüldü.

4: Numune tamponu : 1 M Tris-HCl (pH: 8) çözeltisinde 0.5 ml alındı. 1 ml %10'luk SDS + 1 ml %100'lük gliserin+ 1 ml %0.1'lik bromtimol mavisi kimyasalları alınarak son hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Stok olarak hazırlanan bu tampon çözeltiden kullanım sırasında 950 µl tampona 50 µl β-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

5: %10'luk amonyum persülfat: 0.1 g amonyum persülfat 1 ml saf su içerisinde çözüldü.

6: %10'luk SDS: 1 gram SDS, 9 gram saf su içerisinde çözülmüştür.

7: Yürütme tamponu için kullanılan çözelti: 1.51 g Tris + 7.51 g glisin 450 ml saf su içerisinde çözündürüldü.

8: Boyama çözeltisi: 50 ml metanol + 10 ml asetik asit + 40 ml saf su içinde 0.1 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

9: Sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol + %10 TCA, saf su ile son hacmi 1 lt olacak şekilde hazırlanmıştır.

10: Yıkama çözeltisi: 60 ml metanol +20 ml asetik asit + 50 ml saf su ile hazırlanmıştır.

2.1.3.5. Ağır Metallerin Stok Çözeltisi

- 1: 0.1 M $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$: 0.364 g tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 2: 0.1 M BaCl_2 : 0.416 g BaCl_2 tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü
- 3: 0.1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: 0.374 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 4: 0.1 M $\text{Ag}(\text{NO}_3)$: 0.338 g $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 5: 0.1 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$: 0.296 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 5: 0.1 M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$: 0.472 g $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 7: 0.1 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$: 0.378 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 8: 0.1 M $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$: 0.238 g $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 9: 0.1 M $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$: 0.392 g $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ tartıldı ve 20 ml saf su içerisinde çözündürüldü.

2.2. Yöntem

2.2.1. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enziminin Aktivite Ölçümü

GR enziminin aktivitesinin ölçümü iki temel prensibe dayanmaktadır. Birinci reaksiyonda tepkimeye katılan NADPH, 340 nm’de en yüksek absorbands değerini göstermektedir. Tepkimenin gerçekleştiği ortamda yer alan glutatyon redüktaz enzimi, NADPH’ın düşmesine neden olmaktadır (Carlberg & Mannervik, 1985).

İkinci reaksiyon sonucunda ürün olarak oluşan glutatyonun DTNB ile birlikte tepkime sonucunda oluşan bileşiğin absorbandsının spektrofotometrik olarak izlenmesi esasına dayanmaktadır. Bileşin verdiği absorbands spektrofotometrede 412 nm’de takip edilmesi gerekmektedir. Bunun sonucunda GR enzimi GSH’ın yükselmesine neden olmasının yanı sıra ortaya çıkan GSH, DTNB ile tepkimeye girmesi sonucunda absorbands yükselişine neden olmuştur (Goudsmit vd, 1988).

Aktivite ölçümü spektrofotometrede NADPH’ın oksitlenmesinden kaynaklanarak, 340 nm’de absorbands azalışı izlenerek belirlendi. Ölçümler Kinetics

rate’de 340 nm’de 3 dk süreyle yapılmıştır. Aktivite ölçüm sonucu küvet içeriğinin kontrol ve numune miktarları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2. 1. GR aktivite ölçüm içerikleri

Stok aktivitesi için ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim	Konsantrasyon (mM)	Hacim	Konsantrasyon (mM)
Saf su	300		200	
100 mM KH ₂ PO ₄ (pH: 7.0)	500	100	500	100
Homojenat			100	
GSSG	100	0.2	100	0.2
NADPH	100	0.2	100	0.2
Toplam miktar	1000 µl		1000 µl	

2.2.2. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin Saflaştırılmasına Yönelik Yöntemler

2.2.2.1. Homojenatın Hazırlanması

Çalışmada kullanılan iskorpit balığı materyali Ordu’nun Fatsa ilçesinden bir balıkçıdan temin edildi. İskorpit balıklarının karaciğer dokuları steril ortamda alındı. Yaklaşık 7.5 g karaciğer dokuları sıvı azot içerisinde mekanik parçalama işlemine tabi tutuldu. Numune 50 ml’lik falkon tüpe alınarak üzerine 50 mM KH₂PO₄ + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 1 mM PMSF tamponu eklenerek 40 ml’ye tamamlandı. Bu işlemin ardından numune 15000 rpm ve +4°C’de 60 dk süreyle santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminin ardından tek kullanımlık pipet yardımıyla filtre kağıdından süzülerek süpernatant kısmı ayrılarak başka tüpe aktarıldı. Elde ettiğimiz homojenat çalışmanın devamı için -20’de saklandı.

2.2.2.2. Amonyum Sülfat İşlemi

Protein saflaştırılması işleminde ilgilenilen proteinin konsantrasyonu artırılması için kullanılan yöntemlerden biri o proteinin ilgilenilmeyen proteinlerden ayrıştırılmasıdır. Proteinlerin çözünürlüğü, o proteinin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik

kısımların dağılımı ile ilişkilidir. Bu özellikler sayesinde amacımıza uygun olarak çöktürme işlemi yapılır. Bu çöktürme işlemlerinin fazla tercih edileni yüksek tuz derişikleri ile çöktürmedir.

Proteinler, su içerisinde neredeyse hiç çözölmezler. Ortamdaki nötral tuz konsantrasyonunun artması proteinlerde bulunan hidrofobik kısımların su ile etkileşimini arttırmaktadır. Bu etkileşimin artması protein çözölürlüğünde arttırmaktadır. Nötral tuz nedeniyle ortamda biriken tuz iyonları proteinin iç kısımlarında yer almaya meyilli olan hidrofobik bölgelerin etrafındaki suların uzaklaşmasına neden olarak hidrofobik bölgelerin birbirleriyle etkileşiminin artmasını sağlamakta, bu durum ise proteinin çökmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat ilave edilerek çökelek oluşturulur ve oluşturulan bu çökelek santrifüj vasıtasıyla geri kazanılıp uygun tampon kullanılarak tekrar çözölürölür. Bunun sonucunda, istenilen proteini içeren çökelek kısmı istenmeyen protein kısımlarından uzaklaştırılmış olur.

İskorpit balığı karaciğer dokusundan hazırlanan homojenat için amonyum sülfat işlemi boyunca farklı %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 aralıklarında çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için katı (NH₄)₂SO₄ parça parça eklenerek manyatik karıştırıcı yardımıyla buz içerisinde homojenata aktarıldı. Bütün çöktürme aralıklarında katılacak (NH₄)₂SO₄ aşağıdaki formülle bulunur;

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S2 - S1)}{3,54 - S1}$$

V: Enzim numunesinin hacmi

S1: Çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S2: İstenilen amonyum sülfat doygunluğu



Şekil 2. 2. Amonyum sülfat çöktürme işlemi

Bu süreç buz içerisinde gerçekleştirildi. Her aralık sonrası 15000 rpm’de 30 dk süreyle santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlemin ardından süpernatant ve çökelek kısmı ayrıldı. Çökelekler ise 300 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) tamponu ile çözülerek süpernatant ve çökelek kısımlarından enzim aktivitesine bakıldı. Enzim aktivite ölçümü her aralıkta tekrarlandı ve enzimin aktivite gösterdiği aralık belirlendi. Diğer aşamalarda ki çalışmalarda ise belirlenen aralıkla devam edildi.

2.2.2.3. Diyaliz

Protein çözeltilerindeki tuzların uzaklaştırılmasında diyaliz uygulanır. Bu işlem için üretilen, gözenekli ve küçük molekülleri geçiren, büyük moleküllerin geçmesini engelleyen genellikle selüloz asetatından yapılan yarı geçirgen bir zardan oluşan diyaliz torbası kullanılmaktadır. Hazırlanan çözelti diyaliz torbasına aktarılır ve uygun tampon içerisinde oldukça yavaş bir şekilde karışması sağlanır. Küçük moleküller, zardaki osmotik basınç dengelenene kadar zardan geçerler. Denge sağlandığında moleküllerin dış tampona geçişi durur. Bu uygulama boyunca diyaliz torbasının içerisinde bulunduğu tamponu birkaç kez değiştirmek gereklidir.

Amonyum sülfat işleminin ardından belirlenen aralıktaki karışım diyaliz torbasına aktarıldı. 30 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) tamponu içerisinde 2 saat boyunca diyaliz edildi. Buz küveti içerisinde magnetik karıştırıcı üzerinde sağlandı. Daha sonra aktivite tayini yapıldı.



Şekil 2. 3. Diyaliz işlemi

2.2.2.4. Afinite Kolonunun Hazırlanışı ve İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enziminin Saflaştırılması

10 ml'lik hacim için 2 gram 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartıldı. Katı maddeleri uzaklaştırmak için 400 ml saf ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama sırasında şişen jelin havası alındı. Şişen jelin havası alındıktan sonra jel 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM DTT + 1 mM EDTA (pH: 7.3) dengeleme tamponu ile süspanse edildi. Süspanse edilen jel 1x10 cm boyuntunda soğutulmuş kolona yüklendi. Kolon dengeleme işlemine yaklaşık 1.5 saat boyunca devam edildi. Kolonun dengelenmiş olduğu 280 nm'de absorbanslarının eşitlenmesinden anlaşıldı. Bu işlemde sonra kolon saflaştırma işlemine hazırlanmış oldu. Amonyum sülfat doygunluk aralığında yapılan diyaliz numunemiz 2 ml olarak uygulandı. Çözelti kolondan geçirildikten sonra birinci yıkıma 0.1 M Potasyum fosfat + 0.1 M Potasyum asetat (pH: 7.85) tamponu geçirilip ardından ikinci yıkama 0.1 M Potasyum fosfat + 0.1 M Potasyum klorür (pH: 7.85) tamponu eklendi . Yıkama için kullanılan tamponların kolondan geçmesi sonrasında enzim çözeltimizde aktivite geçişi olup olmadığı anlamak için 3 adet 15'lik falkonlara 6 ml kadar örnekler alınıp spektrofotometrede aktivite ölçümüne bakıldı. Kolon yıkandıktan sonra 50 mM KH_2PO_4 + 1mM GSSG + 1 mM EDTA + 0.5 mM NADPH (pH:7.3) elüsyon için kullanılan tampon eklendi. Ardından 4 adet 15'lik falkon içerisinde 9 ml eluat örnekleri alındı. Elüsyon tamponunun ardından 0.1 M Sodyum asetat + 0.5 M Sodyum klorür (pH: 4.5), 0.5 M Sodyum klorür + 0.1 M Tris (pH: 8.5)

rejenerasyon tamponları uygulandı. Rejenerasyon tamponlarından sonra dengeleme tamponu eklenerek jel koruma altına alındı ve kolon kapatıldı.

Toplanan elüatların 340 nm’ de aktivite değerlerine bakıldı. Elde edilen saflaştırma örneklerinin protein miktarlarına ve saf olup olmadıklarını anlamak için sırasıyla Bradfor yöntemi ile protein tayini ve SDS-PAGE yapılarak elektroforez batları görüntülendi.

2.2.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

LAEMMLİ (1970) tarafından önerilen enzim saflığının kontrolünde ve molekül ağırlığının saptanmasında SDS poliakrilamid jel elektroforezi prosedürü değiştirilerek uygulandı. Çalışmada kullanılan elektroforez plakaları su ve alkol ile sterilizasyonu sağlandı. Plakalar kışkaçlar yardımıyla düzeneğe tutturuldu. Ardından sabitleşen plakalar düzeneğe yerleştirildi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve otomatik pipet yardımıyla plakaların arasına üst tarafta 1-4 cm boşluk bırakılarak dolduruldu. 30 dk boyunca jelin donması beklendi ve sonrasında ise yığma jeli hazırlanmıştır ve alttaki jelin üzerine eklenmiştir. Daha sonra kuyucukları elde etmek için jel tarağı sisteme yerleştirildi. Belirlenen numune kuyularının ardından jel plakası elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve elektroforez tankına yürütme tamponu eklenmiştir. Saflaştırılan enzim eluatlarından toplam hacim 120 µl’ye ayarlanarak 5 dk boyunca denatüre edildi. Denatüre olan numuneler kuyucuklara 10-15 µl olacak şekilde farklı farklı kuyulara yüklendi. Molekül ağırlığını belirlemek için 10 kDa ile 250 kDa aralığında markör kullanıldı. Elektorforez tankı anot (+) ve katot (-) kısımlarına gelecek şekilde dikkatli bir şekilde kapatıldı. Elektroforez tankı 150 V’da 1.5 saat boyunca yürütüldü. Numunelerin yürütme takibi numune içerisine eklenen brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işleminin ardından jel dikkatlice çıkarıldı ve 1 saat boyunca sabitleştirme çözeltisinde bekletildi. Jel sabitleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra 45 dk boya çözeltisi içerisinde bekletildi. Boyanan jel yıkama çözeltisine alındı ve 1 gün boyunca protein bantlarından net bir görüntü alana kadar bekletildi. Yıkama solüsyonundan çıkarılan jel görüntülendi.

Tablo 2. 2. %12'lik ayırma jelinin hazırlanması

Çözeltiler	Hacim (mL)
1.5 M Tris-HCl (pH: 8.8)	2.5
%30 Akrilamid-%0.8 Bisakrilamid	4
%10 SDS	0.1
%10 Amonyum Persülfat	0.1
%100'lük TEMED	0.004
Saf su	3.3

Tablo 2. 3. Yığılma jelinin hazırlanması

Çözeltiler	Hacim (mL)
1 M Tris-HCl (pH: 6.8)	0.38
%30 Akrilamid-%0.8 Bisakrilamid	0.5
%10 SDS	0.03
%10 Amonyum Persülfat	0.03
%100'lük TEMED	0.003
Saf su	2.1

2.2.3. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enziminin Karakterizasyon Çalışması

2.2.3.1. Saflaştırılan GR Enzimi için Optimum İyonik Tamponun Belirlenmesi

Potasyum fosfat tamponundan 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ve 800 mM derişikleri kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. Optimizasyon için gerekli olan kontrol ve numune küvet miktarları Tablo 2.4'de belirtilmiştir.

Tablo 2. 4. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu ölçüm içerikleri

	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
Stok aktivitesi için ölçüm çözeltileri	Hacim	Konsantrasyon (mM)	Hacim	Konsantrasyon (mM)
Saf su	300		200	
KH ₂ PO ₄ Tamponu (pH: 7.0)	500	100	500	Değişken
Enzim örneği			100	
GSSG	100	0.2	100	0.2
NADPH	100	0.2	100	0.2
Toplam Miktar	1000 µl		1000 µl	

2.2.3.2. Saflaştırılan GR Enzimi İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Potasyum fosfat (KH₂PO₄) tamponunun optimizasyon sonucunda en yüksek aktivite gösteren konsantrasyonda pH optimizasyonu yapıldı. Fosfat tamponu (KH₂PO₄) 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, pH değerlerinde optimizasyon için hazırlandı ve aktivite ölçümlerine bakıldı. Tablo 2.5.'de pH optimizasyonu içerikleri belirtildi.

Tablo 2. 5. Potasyum fosfat pH optimizasyonu içerikleri

	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
Stok aktivitesi için ölçüm çözeltileri	Hacim	Konsantrasyon (mM)	Hacim	Konsantrasyon (mM)
Saf su	300		200	
KH ₂ PO ₄ (pH değişken)	500	300	500	300
Enzim örneği			100	
GSSG	100	0.2	100	0.2
NADPH	100	0.2	100	0.2
Toplam miktar	1000 µl		1000 µl	

2.2.3.3. Saflaştırılan GR Enzimi İçin Optimum Substrat Miktarının Belirlenmesi

Belirlenen optimum potasyum fosfat (KH_2PO_4) ve optimum pH'da 70, 80, 90, 100, 120 ve 150 μl , NADPH kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. Saf su ve NADPH substratının total hacmi 300 μl olarak ayarlanmıştır. Küvet içerikleri tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2. 6. Potasyum fosfat substrat optimizasyonu içerikleri

Stok aktivitesi için ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim	Konsantrasyon (mM)	Hacim	Konsantrasyon (mM)
Saf su	300		Değişken	
300 mM KH_2PO_4 (pH: 6,5)	500	300 mM	500	300
Enzim örneği			100	
GSSG	100	0.2	100	0.2
NADPH	100	0.2	Değişken	0.2
Toplam miktar	1000 μl		1000 μl	

2.2.4. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan GR Enzimiyle İlgili Kinetik Çalışmalar

2.2.4.1. Bazı Metal İyonlarının İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

İskorpit balığı karaciğer üzeri üzerinde bazı ağır metal inhibitör etkilerini görmek amacıyla $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, ve $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ stok şeklinde hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda belirlenen metal iyonları seyreltilerek kullanılmıştır. Toplam hacim (ağır metal çözeltisi ve su) 250 μl olacak şekilde ölçüm yapıldı. Ağır metal iyonların küvetteki miktarları değiştirilip farklı konsantrasyonlarda enzimin aktivitesi üzerine olan etkileri spektrofotometrede 340 nm'de 3 dk boyunca ölçüm yapılmıştır. İnhibitör bulunan ve bulunmayan ortamdaki küvet içerikleri Tablo 2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 7. Ağır metal inhibisyon etkileri içerikleri

Kontrol Küveti			Numune Küveti	
Stok aktivitesi için ölçüm çözeltileri	Hacim	Konsantrasyon (mM)	Hacim	Konsantrasyon (mM)
Saf su	250	-	Değişken	-
300 mM KH ₂ PO ₄ (pH: 6,5)	500	300	500	300
Enzim örneği	-	-	100	
Ağır metal çözeltisi	-	-	Değişken	Değişken
GSSG (2 mM)	100	0.2	100	0.2
NADPH (2 mM)	150	0.2	150	0.3
Toplam miktar	1000 µl		1000 µl	

2.2.4.2. I₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada iskorpit balığı karaciğer dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerinde etkisi incelenmiştir. Enzim inhibisyonuna neden olan Ni(NO₃)₂, Mn(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂ ve Cr(NO₃)₃ ağır metaller için belirli substrat konsantrasyonunda dört çeşit inhibisyon konsantrasyonu kullanıldı ve I₅₀ grafikleri çizilerek belirlenmiştir. Grafiklerin eğri denklemlerinden faydalanılarak enzimin aktivitesini yarıya indiren IC₅₀ değerleri belirlendi.

Tablo 2. 8. Glutatyon redüktaz enzimi üzerine Ni(NO₃)₂'ın IC₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu

Saf su (µl)	KH ₂ PO ₄ (300 mM) (µl)	Diyaliz sonrasında elde edilen enzim (µl)	Ni(NO ₃) ₂ (µl)	İnhibitör konsantrasyonu (mM)	GSSG (µl)	NADPH (µl)	Toplam hacim (ml)
125	500	100	25	0,025	100	150	1
50	500	100	100	0,1	100	150	1
-	500	100	150	0,15	100	150	1
-	450	100	200	0,2	100	150	1

Tablo 2. 9. Glutatyon redüktaz enzimi üzerine $Mn(NO_3)_2$ 'ın IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu

Saf su (μ l)	KH_2PO_4 (300 mM) (μ l)	Diyaliz sonrasında eldi edilen enzim (μ l)	$Mn(NO_3)_2$ (μ l)	İnhibitör konsantrasyonu (mM)	GSSG (μ l)	NADPH (μ l)	Toplam hacim (ml)
145	500	100	5	0,005	100	150	1
130	500	100	20	0,02	100	150	1
120	500	100	30	0,03	100	150	1
110	500	100	40	0,04	100	150	1

Tablo 2. 10. Glutatyon redüktaz enzimi üzerine $Cr(NO_3)_3$ 'ın IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu

Saf su (μ l)	KH_2PO_4 (300 mM) (μ l)	Diyaliz sonrasında elde edilen enzim (μ l)	$Cr(NO_3)_3$ (μ l)	İnhibitör konsantrasyonu (mM)	GSSG (μ l)	NADPH (μ l)	Toplam hacim (ml)
140	500	100	10	0,01	100	150	1
110	500	100	40	0,04	100	150	1
50	500	100	100	0,1	100	150	1
-	400	100	250	0,25	100	150	1

Tablo 2. 11. Glutatyon redüktaz enzimi üzerine $Cd(NO_3)_2$ 'ın IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarı, substrat ve inhibitör konsantrasyonu

Saf su (μ l)	KH_2PO_4 (300 mM) (μ l)	Diyaliz sonrasında elde edilen enzim (μ l)	$Cd(NO_3)_2$ (μ l)	İnhibitör konsantrasyonu (mM)	GSSG (μ l)	NADPH (μ l)	Toplam hacim (ml)
140	500	100	10	0,01	100	150	1
135	500	100	15	0,015	100	150	1
125	500	100	25	0,025	100	150	1
100	400	100	50	0,05	100	150	1

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları

3.1.1. Amonyum Sülfat Sonuçları

İskorpit balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimini materyal metot kısmında anlatıldığı gibi sırasıyla %0-100 aralıklarında amonyum sülfat işlemi yapıldı.

Uygulanan aralıklar sonrasında elde edilen çökelek optimum 300 mM KH_2PO_4 tamponunda çözülerek diyaliz işlemi için hazır hale getirildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda en yüksek aktivite %60-80 aralığında belirlendi. Elde edilen aralıktaki numuneye diyaliz işlemi uygulanarak aktivite ölçümü yapıldı.

Erat'ın 2002'de yaptığı bir çalışma sonucunda insan ve sığır eritrositlerinden GR enzimine ait amonyum sülfat aralığını %30-70 olarak belirlemiştir (Erat, 2002).

Acan ve Tezcan'ın 1989'da yaptığı çalışmada koyun beyini için GR enziminin amonyum sülfat aralığını %35-55 olarak belirlemişlerdir (Acan ve Tezcan, 1989).

Ulus ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise koyun karaciğerinden amonyum sülfat aralığını %0-60 olarak bulmuşlardır (Ulus vd., 2005).

Tablo 3. 1. Amonyum sülfat ve çöktürme aralığı ve aktivite sonuçları

Amonyum sülfat çöktürme aralığı %	0-20	20-40	40-60	60-80
Süpernatant	0,246	0,213	0,160	0,16
Çökelek	0,90	0,84	0,127	0,864

3.1.2. Afitinite Kromatografisi Sonuçları

Diyaliz sonrası işlemde numune afinite kromatografisi kolonuna yüklendi. Elüsyon tamponu sonucu falkon tüpleri içerisinde toplanan elüatların aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Belirlenmesi

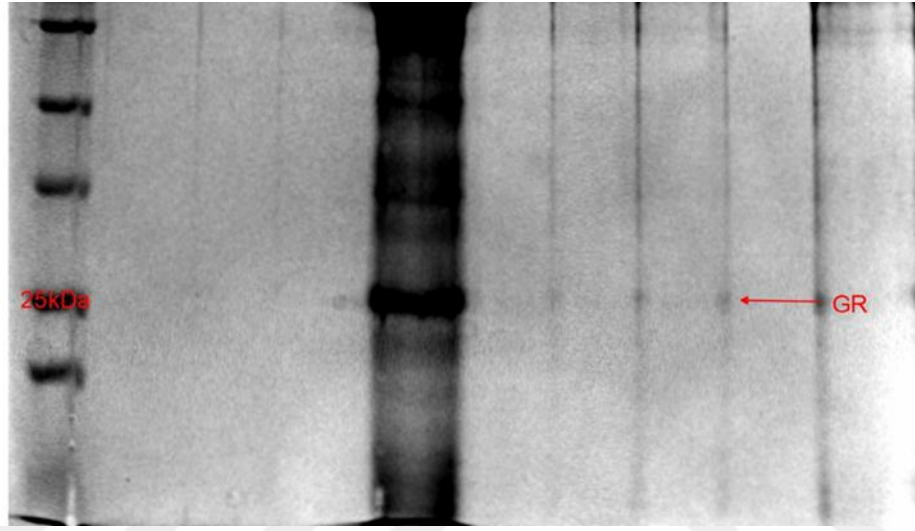
Kolon sonrası en yüksek aktivite gösteren elüatın enzim saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE işlemi yapıldı. Kolondan toplanan elüat örneği belirli konsantrasyonlarda kuyucuklara uygulandı ve yürütme işlemi yapıldı. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.1.'de gösterildi. Çalışma sonucunda karaciğer dokusu %28,277 verimle 25,96 kat saflaştırılmış ve moleküler ağırlığı 25 kDa olarak görüntülendi.

Erat ve Çiftçi 2006 yılında yaptıkları çalışmada glutatyon redüktaz enziminin %24'lük verimle insan eritrositlerinden 5.823 kat saflaştırmışlardır (Erat ve Çiftçi, 2006).

Akkemik ve ark. 2011’de bazı ilaçların insan eritrositlerinden glutatyon redüktaz üzerindeki etkileri çalışmalarında GR enziminin %44.44 verimle 31150 kat saflaştırmışlardır (Akkemik vd., 2011).

Ulus ve Tandoğan tarafından sığır karaciğerinden yaptıkları çalışmada GR enzimini %38.4 verimle 5456 kat saflaştırmışlardır (Ulus ve Tandoğan, 2007).

Bir başka çalışmada ise Taşer ve Çiftçi 2012’de hindi karaciğerinden glutatyon redüktaz enzimini %10.75 verimle 2476 kat saflaştırmışlardır (Taşer ve Çiftçi, 2012).



Şekil 3. 1. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Saflaştırılan glutatyon redüktaz enziminin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığının belirlenmesi

3.3. İskorpit Balığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarda Belirlenmesi

3.3.1. GR Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi

İskorpit balığı karaciğer dokusundan GR enziminin aktivite gösterebilmesi için en uygun optimum iyonik şiddetin belirlenmesi amaçlanarak KH_2PO_4 tamponlarının farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve aktivite ölçümleri yapıldı. KH_2PO_4 tamponu için elde edilen değerler Tablo 3.2.’de gösterildi. Yapılan ölçümler sonucunda optimum iyonik şiddetin 300 mM KH_2PO_4 tamponunda belirlendi.

Tablo 3. 2. Potasyum fosfat optimum iyonik şiddetin aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	50	100	150	200	300	400	500	600	700	800
% Aktivite	44,6	52,4	64	71,1	100	93,3	91,1	88,8	86,3	85,4

Literatürde Tekman ve ark., 2008’de yaptığı çalışmada Gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden GR enzimi için optimum iyonik şiddet 50 mM Tris-HCl tamponunda belirlemiştir (Tekman vd., 2008).

Bilir’in 2017 yılında yaptığı çalışmada soya tohumundan elde edilen glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini 300 mM Tris-HCl tamponunda belirlemiştir. (Bilir, 2017)

Taş 2017’de kalkan balığı solungaç dokusundan yaptığı çalışmada GR enziminin optimum iyonik şiddetini 300 mM Potasyum fosfat tamponu olarak belirlemiştir (Taş, 2017).

3.3.2. GR Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan GR enziminin optimum pH’sı 5.0-9.0 arasında tampon olarak 300 mM KH_2PO_4 kullanıldı ve spektrofotometrik olarak enzim aktivitesine bakıldı. Elde edilen değerler Tablo 3.3.’de gösterildi. Yapılan ölçümler sonucunda iskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzimi için optimum pH’ı 300 mM KH_2PO_4 tamponunda pH: 6.5 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. 3. Potasyum fosfat optimum pH şiddetinin sonuçları

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
% Aktivite	58,6	70,3	73,9	100	94,7	70,9	52,4	34,8	21,4

3.3.3. GR Enziminin Optimum Substrat Miktarının Belirlenmesi

İskorpit balığı karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enziminin optimum substrat konsantrasyonu 60 - 150 μl miktarlarında 300 mM KH_2PO_4 pH: 6.5 tampon çözeltisi kullanılarak enzim aktivitesine bakıldı. Elde edilen değerler Tablo 3.4’de gösterildi. Yapılan ölçümler sonucunda iskorpit balığı karaciğer dokusu GR enziminin optimum substratı 300 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) tamponu kullanılarak 150 μl olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. 4. Potasyum fosfat optimum substrat miktarının sonuçları

NADPH	70	80	90	100	120	150
% Aktivite	65,9	71,1	76,8	85,7	93,2	100

3.3.4. GR Enzimi Aktivitesinde Kullanılan Ağır Metal İnhibitör Etkilerinin Sonuçları

İskorpit balığı karaciğer dokusundan ekstrakte edilen ve diyaliz sonrası glutatyon redüktaz enzimi aktivitesine nikel $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, mangan $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, krom $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ ve kadminyum $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ağır metallerin etkilerini belirleyebilmek için ağır metallerin stok çözeltileri hazırlandı ve karaciğer dokusu glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırıldı. İnceleme sonunda bulunan inhibisyon etkileri Tablo 3.5-3.8.'de verilmiştir. Aynı zamanda ağır metallerin farklı konsantrasyonlarında elde edilen IC_{50} grafikleri Şekil 3.2-3.5'de ve hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

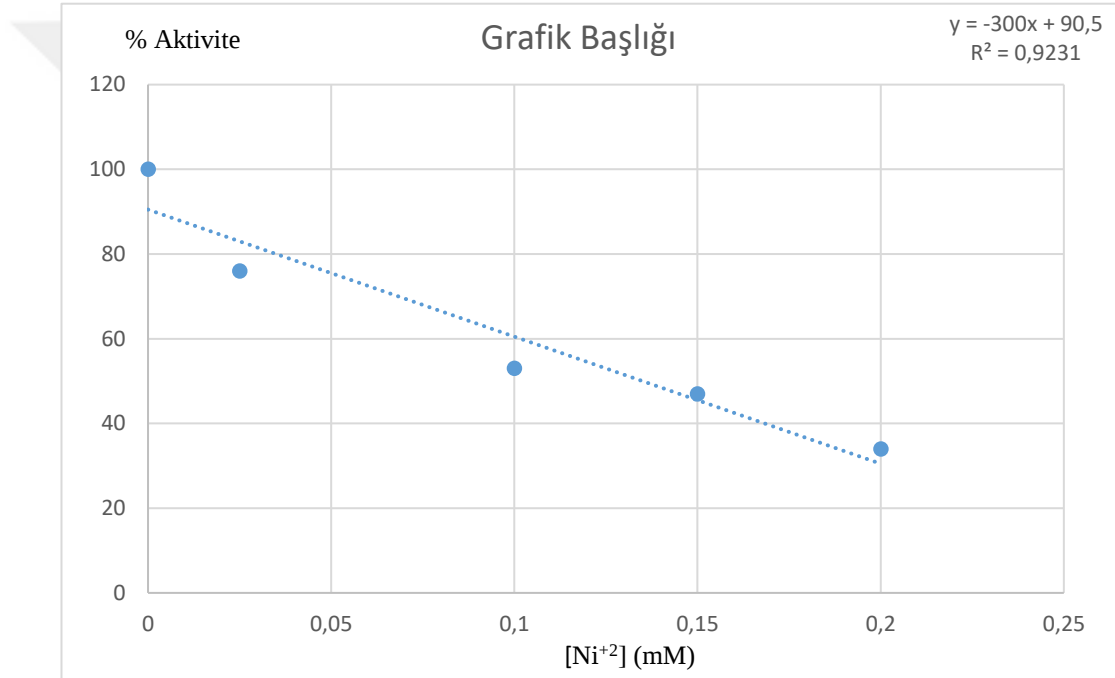
Ekinci ve Şentürk 2011'de yaptıkları çalışmada, gökkuşağı alabalığının karaciğerinden izole ettikleri GR enziminin Co^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cr^{+3} , Sn^{+2} ve Mg^{+2} ağır metalleri etkisi altında aktivitelerine bakmışlardır. Bulunan ağır metallerin IC_{50} değerleri sırasıyla 42,2 μM , 63,1 μM , 357 μM , 486 μM , 508 μM , 592 μM , 657 μM olarak bulunmuştur (Ekinci ve Şentürk, 2011).

Tekman ve ark., 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada ise Gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden saflaştırdıkları GR enzime uygulanan Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , ve Al^{+3} ağır metallerinin bu enzimin aktivitesi üzerine inhibisyon kinetiğini incelemişlerdir. IC_{50} değerleri sırasıyla 65,5 μM , 82 μM , 122 μM , 509 μM , 797 μM , 804 μM olarak bulunmuştur (Tekman vd., 2008).

Yusuf ve Çiftçi tarafından 2017 yılında tavuk böbreğinden saflaştırılan GR enziminin üzerinden yapılan ağır metal inhibisyon çalışmasında Ni^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} ve Al^{+3} ağır metallerin GR enzimi üzerinde inhibisyon etkilerini belirlemişlerdir. IC_{50} değerleri ise sırasıyla 337 μM , 191 μM , 168 μM , 187 μM , 289 μM olarak bulunmuştur (Yusuf ve Çiftçi, 2017).

Tablo 3. 5. Nikel'in iskorpit balığı karaciğer dokusu glutatyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi

Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0	100
25	76
100	53
150	47
200	34

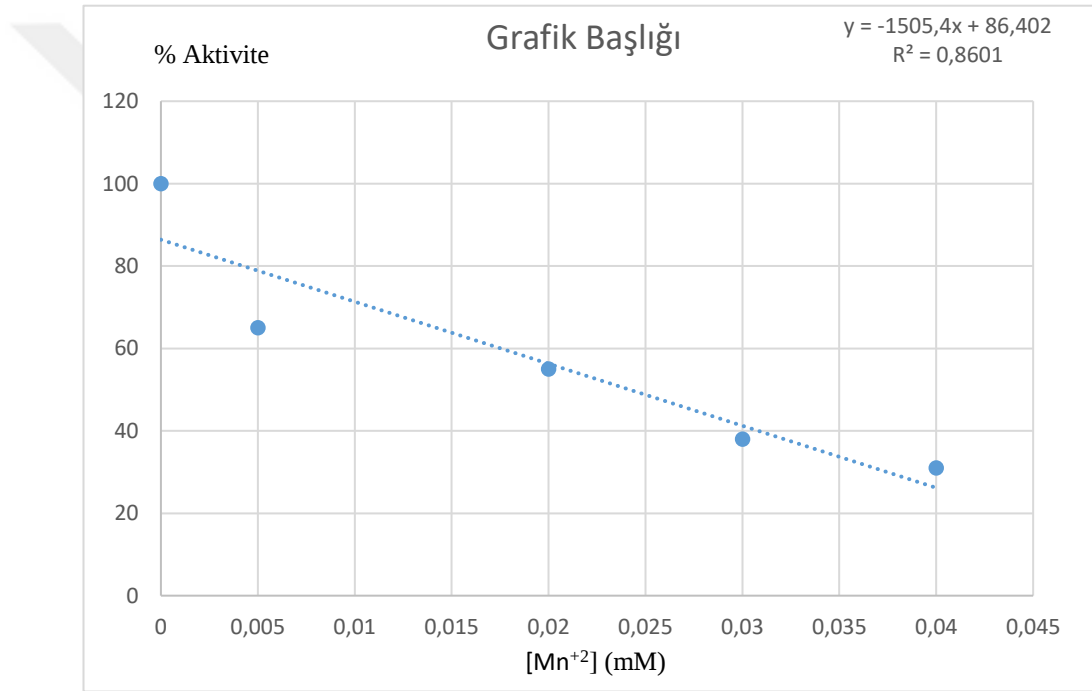


Şekil 3. 2. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Nikel'in Gr enzim aktivitesine etkisi

Tablo 3.5.'de verilen deney sonucuna göre 0.05 ile 0.25 mM aralıklardaki konsantrasyonlarda Ni²⁺ metal iyonunun 0.3 mM NaDPH substratında IC₅₀ grafiği Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. İskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzim aktivitesine uygulanan Ni²⁺ metalinin I₅₀ değeri 135 μM olarak bulunmuştur.

Tablo 3. 6. Mangan'ın iskorpit balığı karaciğer dokusu glutatyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi

Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0	100
5	65
20	55
30	38
40	31

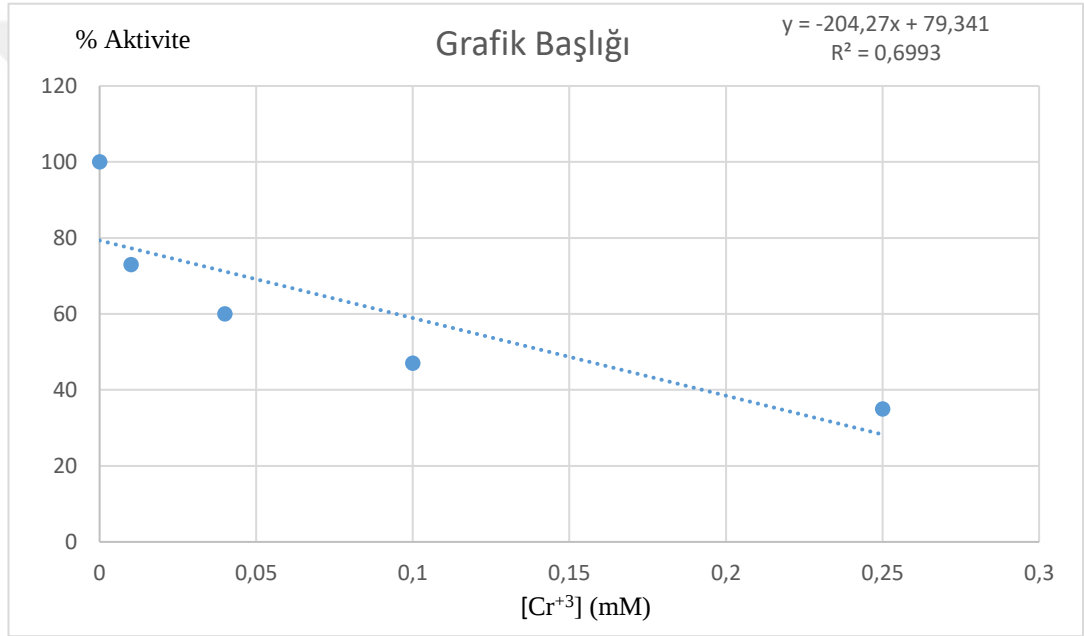


Şekil 3. 3.İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivisine etkisi

Tablo 3.6.'da verilen deney sonucuna göre 0.005 ile 0.045 mM aralıklardaki konsantrasyonlarda Mn^{+2} metal iyonunun 0.3 mM NaDPH substratında IC_{50} grafiği Şekil 3.3.'de gösterilmiştir. İskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzim aktivitesine uygulanan Mn^{+2} metalinin I_{50} değeri 2.4 μM olarak bulunmuştur.

Tablo 3. 7. Krom'un iskorpit balığı karaciğer dokusu glutatyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi

Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0	100
10	73
40	60
100	47
250	35

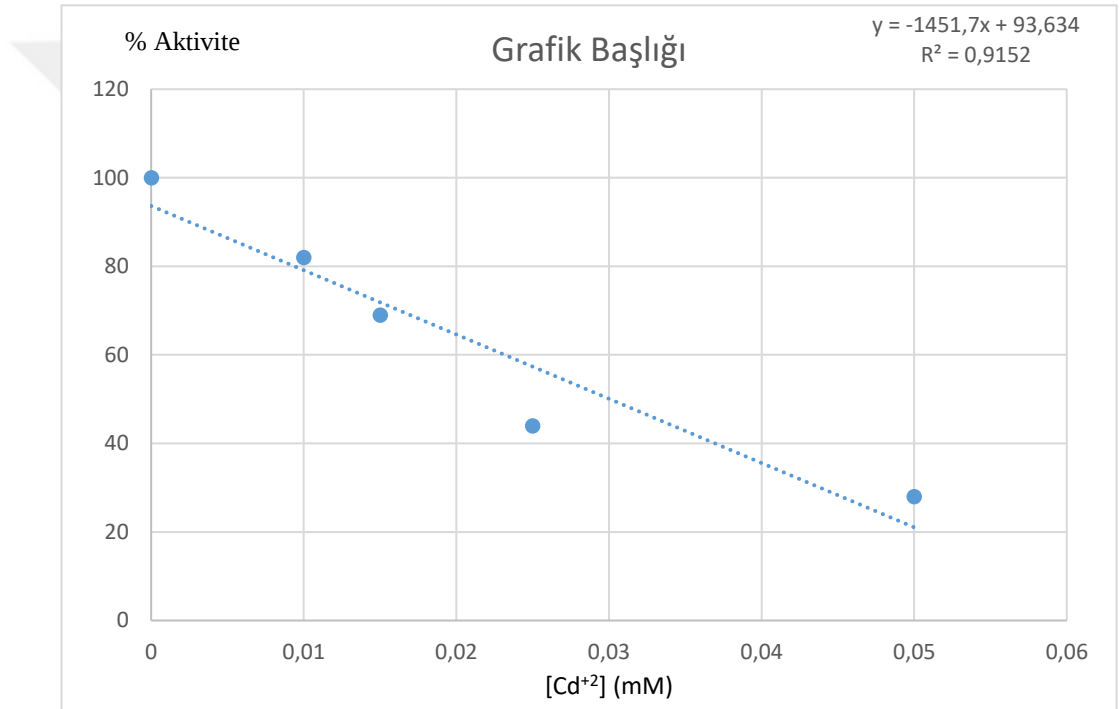


Şekil 3. 4. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivitesine etkisi

Tablo 3.7.'de verilen deney sonucuna göre 0.05 ile 0.3 mM aralıklardaki konsantrasyonlarda Cr^{+3} metal iyonunun 0.3 mM NaDPH substratında IC_{50} grafiği Şekil 3.4.'de gösterilmiştir. İskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzim aktivitesine uygulanan Cr^{+3} metalinin I_{50} değeri 206 μM olarak bulunmuştur.

Tablo 3. 8. Kadmiyum'un iskorpit balığı karaciğer dokusu glutatyon redüktaz enzimi aktivitesine etkisi

Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0	100
10	82
15	69
25	44
50	28



Şekil 3. 5. İskorpit balığı karaciğer dokusundan Mangan'ın Gr enzim aktivisine etkisi

Tablo 3.8.'de verilen deney sonucuna göre 0.01 ile 0.06 mM aralıklardaki konsantrasyonlarda Cd^{+2} metal iyonunun 0.3 mM NaDPH substratında IC_{50} grafiği Şekil 3.5.'de gösterilmiştir. İskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzim aktivitesine uygulanan Cd^{+2} metalinin I_{50} değeri 30 μM olarak bulunmuştur.

Tablo 3. 9. İskorpit balığı karaciğer dokusu için GR enziminin IC₅₀ değerleri

Metal ion	IC ₅₀ (μM)
Ni ⁺³	135 μM
Mn ⁺²	2.4 μM
Cr ⁺	206 μM
Cd ⁺²	30 μM

4. SONUÇ

Bu tez çalışmasında iskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enzimi kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı ve bazı karakteristik özellikleri incelendi. Saflaştırma yöntemleri sırasıyla, homojenat hazırlama, amonyum sülfat çöktürme, diyaliz, 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi, Bradford tayini ve SDS polyakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile gerçekleştirildi.

Saflaştırma işlemi ilk olarak homojenat hazırlama işlemiyle gerçekleştirildi. Hazırlanan karaciğer dokusu homojenatlarına %0-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Yapılan çöktürme işleminde GR enziminin %60-80 aralığında çöktüğü belirlendi. Kısmi bir saflaştırma yöntemi olan amonyum sülfat çöktürme işleminde birçok safsızlıklar giderilerek proteinler daha derişik hale getirildi. Çöktürme işleminden sonra afinite kromatografisinden önce ortamdaki iyonları uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz işleminin ardından 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunda saflaştırma işlemi yapılmış ve GR'nin molekül ağırlığını belirleye bilmek için SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda karaciğer dokusu %28,277 verimle 25,96 kat saflaştırılmış ve moleküler ağırlığı 25 kDa olarak belirlendi.

Saflaştırılan enzim üzerine Ni⁺³, Mn⁺², Cr⁺², ve Cd⁺² ağır metalleri uygulanmıştır. Uygulanan ağır metallerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 135 μM, 2.4 μM, 206 μM ve 30 μM olarak hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmada karakterizasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla iskorpit balığı karaciğerinden GR enziminin optimum pH, optimum substrat ve optimum tampon değerleri belirlendi. İskorpit balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH:6.5, optimum substrat 0,3 mM NADPH ve optimum tampon 300 mM KH₂PO₄ olarak bulunmuştur.

Elde edilen veriler literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında istenilen verim ve kat sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Verilen jel görüntüsünde GR enziminin SDS-PAGE’de tek bant elde edildiği görülmüştür. Standart banttıan faydalanılarak enzimin mol kütlesi 25 kDa olarak bulundu. Bulunan bu değır diğır çalışmalardan kıyasla GR enzimlerinden farklı olduğu görülmektedir.

Doğada bulunan ağır metallerin etki ettiğı zararlar çalışmanın önemini sağlamaktadır. Çünkü çevresel problemler sonucu ortaya çıkan ağır metaller toprak, su ve denizlere karışarak canlı ekosistemine zarar vermektedir. Özellikle denizlerde ve akarsularda biriken ağır metaller sucul canlıların maruz kalmasına neden olmaktadır. Sucul canlıların maruz kalması sonucunda bu ağır metaller besin alımı vasıtasıyla da insanlara geçmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada metal iyonlarının karaciğır dokusunda bulunan glutatyon redüktazın aktivitesinin inhibisyonuna sebebiyet verdiğı saptanmıştır. Canlı hücrelerde oluşan oksidatif strese yanıt mekanizmasının önemli bir enzimi olan glutatyon redüktaz, farklı ağır metaller ile inhibe olmaktadır ve bu durum organizma üzerine olumsuz etki oluşturmaktadır. Bu olumsuz etki patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. GSH ve GSSG oranının dengede tutulması hücresel fonksiyonlar için çok kritik olmaktadır ve GR enzimi bu oranı dengede tutmaktan sorumludur. Antioksidan enzim olan GR’nin üzerinde inhibe edici etkisi bulunan bu ağır metallerin çevreye verdiğı kirlilikten kaçınmak adına kullanımlarının kontrollü olması gerekmektedir. Bu çalışmanın içeriğı literatürde ilk olup, çıktıları ise iskorpit balığının karaciğırinden saflaştırılan GR enziminin fonksiyonlarının bulunmasına katkı yapacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Açan, L. (1990). Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara*.
- Akerboom, T., Bilzer, M., & Sies, H. (1982). The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 257(8), 4248-4252.
- Akkemik, E., Şentürk, M., Özgeriş, F. B., TAŞER, P., & Ciftci, M. (2011). In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(2), 235-241.
- Aksoy M (2000). Beslenme Biyokimyası. Hatipoğlu Yayınlar, 126: 161
- Akşiray F (1987). Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı, Cilt No. 2. Kardeşler Basımevi, İstanbul
- Al-Samman, T. (2015). Effect of heavy metal impurities in secondary Mg alloys on the microstructure and mechanical properties during deformation. *Materials & Design (1980-2015)*, 65, 983-988.
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*, 27(1), 84-93.
- Asnis, ER. (1955). A glutathione reductase from escherichia coli. *J. biol. chem.* 213: 77–86.
- Bahorun, T., Soobrattee, M., Luximon-Ramma, V., & Aruoma, O. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1(2), 25-41.
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases.
- Bat, L., Erdem, Y., Ustaoglu-Tırıl, S., & Yardım, Ö. (2008). Balık Sistematigi (Fish Systematic). Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Ankara, Nobel Yayın No: 1330. *I. Baskı, XVIII+ 270 p.(In Turkish)*.
- Bauer, H., Fritz-Wolf, K., Winzer, A., Kühner, S., Little, S., Yardley, V., . . . Davioud-Charvet, E. (2006). A Fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2 ‘-(3 ‘-Methyl)-1 ‘, 4 ‘-naphthoquinolyl] hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. crystal structure of the alkylated human enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 128(33), 10784-10794.
- Bauer, H., Fritz-Wolf, K., Winzer, A., Kühner, S., Little, S., Yardley, V., . . . Davioud-Charvet, E. (2006). A Fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2 ‘-(3 ‘-Methyl)-1 ‘, 4 ‘-naphthoquinolyl] hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. crystal structure of the alkylated human enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 128(33), 10784-10794.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. In *Methods in enzymology* (Vol. 113, pp. 484-490): Elsevier.
- Chatterjee, M., Saluja, R., Kanneganti, S., Chinta, S., & Dikshit, M. (2007). Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 84-93.
- CİFTCİ, M., KÜFREVİOĞLU, Ö. I., GÜNDOĞDU, M., & ÖZMEN, I. (2000). Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological research*, 41(1), 107-111.
- Conn, E. E., & Vennesland, B. (1951). Glutathione reductase of wheat germ. *Journal of Biological Chemistry*, 192(1), 17-28.

- Demirkol, O. and N. Ercal. (eds.). (2012). Glutathione, In: Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods.
- Devlin, T. M. (2002). Biochemistry with clinical correlations. *Canada: Wiley-Liss*, 407-488.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P., Sharma, S., Kumar, R., & Mehta, D. (2011). Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1678-1684.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., & Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2), 278-284.
- Ekinci, D., & Şentürk, M. (2013). Assesment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(1), 11-15.
- Erat, M. (2002). İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Erat, M., & Ciftci, M. (2006). Effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *European journal of pharmacology*, 537(1-3), 59-63.
- Ferri, J., Petrić, M., & Matić-Skoko, S. (2010). Biometry analysis of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) from the eastern Adriatic Sea. *Acta Adriatica: International Journal of Marine Sciences*, 51(1), 45-53.
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1-12.
- Frei, B. (1997). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins. *Linus Pauling Institute. Oregon State University*.
- Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
- Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
- Goudsmit, J., Debouck, C., Meloen, R. H., Smit, L., Bakker, M., Asher, D. M., . . . Gajdusek, D. C. (1988). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4478-4482.
- Göç, G. (2017). *Bacillus pumilus* Y7 katalaz (*katX2*) geninin klonlanması. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Gürdöl, F., & Ademoğlu, E. (2010). Biyokimya. *İkinci baskı. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.*
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & GUTTERIDGE, J. (2007). Free radicals in biology and medicine. v. 4. *New York: Oxford*, 689.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press, USA.

- Hopkins, F. G., & Elliott, K. A. C. (1931). The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 109(760), 58-88.
- Jayawardena, U. A., Angunawela, P., Wickramasinghe, D. D., Ratnasooriya, W. D., & Udagama, P. V. (2017). Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), 2855-2867.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., & Timur, S. (2003). Metallerin çevresel etkileri-I. *Metallurji dergisi*, 136, 47-53.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H.-M., Botella-Munoz, J., . . . Becker, K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504), 643-646.
- Kaplowitz, N., Aw, T. Y., & Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 25(1), 715-744.
- Karagözoğlu, Y., & Çiftci, M. (2017). Bazı metal iyonlarının tavuk böbreğinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine in vitro etkilerinin araştırılması. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 6(1), 24-30.
- Keha, E. E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). *Biyokimya: Aktif Yayın Dağıtım*.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (drl.). (2012). *Biyokimya*, Erzurum.
- Kurland, I. J., & Pilkis, S. J. (1995). Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Science*, 4(6), 1023-1037.
- Langdon, R. G. (1958). Properties and mechanism of action of purified glutathione reductase. *Biochimica et biophysica acta*, 30(2), 432-433.
- Langdon, R. G. (1958). Properties and mechanism of action of purified glutathione reductase. *Biochimica et biophysica acta*, 30(2), 432-433.
- Lauterburg, B. H., Adams, J. D., & Mitchell, J. R. (1984). Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, 4(4), 586-590.
- Lehninger, A. (1970). *Biochemistry*. New York: Worth Pub. Inc. 1970.
- Lu, S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB journal*, 13(10), 1169-1183.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 42-59.
- Mann, P. J. G. (1932). The reduction of glutathione by a liver system. *Biochemical Journal*, 26(3), 785.
- Mater S, Uçal O ve Kaya M. (drl.).1989. Türkiye Deniz Balıkları Atlası. İzmir.
- Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220(4596), 472-477.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Meldrum, N. U., & Tarr, H. L. A. (1935). The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. *Biochemical Journal*, 29(1), 108.
- Mullineaux, P. (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*, 667-713.

- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*, 8(3), 199-216.
- Nelson, D. (2008). Lehninger principles of biochemistry: Macmillan. *Lehninger principles of biochemistry: Macmillan*.
- Ookhtens, M., & Kaplowitz, N. (1998). *Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst (e) ine*. Paper presented at the Seminars in liver disease.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1), 315-424.
- Pallardó, F. V., Markovic, J., García, J. L., & Viña, J. (2009). Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 77-85.
- Parthasarathy, S., Santanam, N., Ramachandran, S., & Meilhac, O. (1999). Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *Journal of Lipid Research*, 40(12), 2143-2157.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Prabhu, B., Batvari, D., Kamala-kannan, S., Shanthi, K., Krishnamoorthy, R., Lee, K. J., & Jayaprakash, M. (2008). Heavy metals in two fish species (*Carangoides malabaricus* and *Belone strongylurus*) from Pulicat Lake, North of Chennai, Southeast Coast of India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 145(1-3), 167.
- Qayyum, S., Ara, A., & Usmani, J. A. (2012). Effect of nickel and chromium exposure on buccal cells of electroplaters. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 74-82.
- Rall, T. W., & Lehninger, A. L. (1952). Glutathione reductase of animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 194(1), 119-130.
- Rehm, HJ. and G. Reed (eds.). (1995). *Biotechnology*. vch, weinheim, Germany.
- Rusyniak, D. E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., & Furbie, B. (2010). Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 365-396.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Segel, I. H. (1991). *Biochemical calculations: how to solve mathematical problems in general biochemistry*: John Wiley & Sons.
- Smirnova, G., & Oktyabrsky, O. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 70(11), 1199-1211.
- Söyüt, H. (2006). *Gökkuşluğu alabalık (Oncorhynchus mykiss) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*. Doktora Tezi, Erzurum,
- Suzuki, H. (2015). Chapter 7: Active Site Structure. *How Enzymes Work: From Structure to Function*. Boca Raton, 117-140.
- Şıktar, E., Ekinci, D., Şıktar, E., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., & Günay, M. (2011). Protective role of L-carnitine supplementation against exhaustive exercise induced oxidative stress in rats. *European journal of pharmacology*, 668(3), 407-413.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(2), 117-121.

- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155.
- Turan, C. (2007). Türkiye kemikli deniz balıkları Atlası ve Sistematigi. *Nobel Kitabevi, Adana*, 549.
- Tüzen, M. (2003). Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food chemistry*, 80(1), 119-123.
- Ulus, G., Erat, M., ÇİFTÇİ, M., ŞAKİROĞLU, H., & Bakan, E. (2005). Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(5), 1109-1117.
- Ulus, N. N., & Tandoğan, B. (2007). Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Molecular and cellular biochemistry*, 303(1), 45-51.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Veine, D. M., Arscott, L. D., & Williams, C. H. (1998). Redox Potentials for Yeast, Escherichia coli and Human Glutathione Reductase Relative to the NAD⁺/NADH Redox Couple: Enzyme Forms Active in Catalysis. *Biochemistry*, 37(44), 15575-15582.
- Veine, D. M., Arscott, L. D., & Williams, C. H. (1998). Redox Potentials for Yeast, Escherichia coli and Human Glutathione Reductase Relative to the NAD⁺/NADH Redox Couple: Enzyme Forms Active in Catalysis. *Biochemistry*, 37(44), 15575-15582.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 275-295.
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*: Cambridge university press.
- Wong, K. K., Vanoni, M. A., & Blanchard, J. S. (1988). Glutathione reductase: solvent equilibrium and kinetic isotope effects. *Biochemistry*, 27(18), 7091-7096.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
- Yawata, Y., & Tanaka, K. R. (1974). Regulatory mechanism of glutathione reductase activity in human red cells. *Blood*, 43(1), 99-109.
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.

ÖZ GEÇMİŞ

Kübra IŞIK, Adana Ahmet Kurttepe (Anadolu) Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 13.01.2020 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. 2015 yılından bu yana öğrenci hayatına devam etmekte olan Kübra IŞIK, orta derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-7743-817X

Yayınlar:

1. Işık, K., Taş, Ö., & Ekinci, D. (2022). Partial purification of glutathione S-transferase enzyme from the seed of mallow (*Malva sylvestris* L.) and investigation of the inhibition kinetics of some heavy metals.
2. Işık, K. & Soydan, E. (2023). İskorpit Balığı Solungaç Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Metal İnhibisyonunun İncelenmesi . Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi , 38 (1) , 221-233 . DOI: 10.7161/omuanajas.1226399
- 3: Işık, K. & Soydan, E. (2023). Purification and Characterization of Glutathione Reductase from Scorpionfish (*Scorpaena Porcus*) and Investigation of Heavy Metal İons İnhibition. Journal of Enzyme İnhibition and Medicinal Chemistry, DOI: 10.1080/14756366.2023.2167078.