

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**BROYLER KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE BAZI
AĞIR METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA TAK

BALIKESİR, MAYIS- 2018

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**BROYLER KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE BAZI
AĞIR METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA TAK

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU

Doç. Dr. Semra IŞIK

Doç. Dr. Mustafa ZENGİN

Doç. Dr. Nahit GENCER

BALIKESİR, MAYIS – 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

TUĞBA TAK tarafından hazırlanan “BROYLER KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE BAZI AĞIR METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 14.05.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

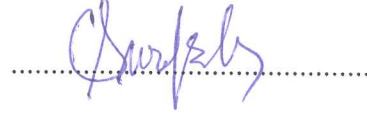
Danışman
Prof. Dr. Oktay Arslan



Üye
Prof. Dr. Mustafa Küçükislamoğlu



Üye
Doç. Dr. Semra Işık



Üye
Doç. Dr. Mustafa Zengin

.....

Üye
Doç. Dr. Nahit Gencer

.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma
Projeleri tarafından 2017/073 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

BROYLER KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE BAZI AĞIR METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA TAK

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, MAYIS – 2018

Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) ksenobiyotik metabolizmasında önemli role sahip multifonksiyonel bir enzimdir. Bu nedenle GST enzim aktivitesinin azalması karaciğerin detoksifikasyon kabiliyetinin düşmesine sebep olur. Bu çalışmada GST enzimi Broyler karaciğerinden hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ilk defa saflaştırılmıştır. Bu amaçla Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip olan hidrofobik jel sentezlenmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin saflığı kontrol edilmiştir. Enzimin kinetik sabitleri glutasyon (GSH) ve 1- kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratları için ayrı ayrı bulunmuştur. K_M ve V_{max} değerleri GSH ve CDNB için sırasıyla 0,97 mM, 1,36 EÜ/ml ve 8,77 mM, 1,36 EÜ/ml olarak belirlendi.

Araştırmamızda Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2} ağır metallerin Broyler karaciğeri GST (bGST) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Cd^{+2} metal iyonunun 0,64 mM IC_{50} değeri ile en güçlü inhibitör olduğu saptanmıştır. Ba^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonlarının enzim üzerinde önemli bir etki göstermediği bulunmuştur. Ca^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonları ise çalışılan konsantrasyonlarda (0,5- 4 mM) bGST enziminin aktivitesini farklı düzeyde artırdığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Glutasyon S-transferaz (GST), broyler karaciğeri (bGST), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK), metal iyonu, inhibisyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME HEAVY METALS ON GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ENZYME PURIFIED FROM BROILER LIVER

MSC THESIS

TUĞBA TAK

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

KİMYA ANABİLİM DALI

(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, MAY 2018

Glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) is a multifunctional enzyme with an important role in xenobiotic metabolism. Therefore, the decrease in GST enzyme activity causes the detoxification ability of the liver to decrease. In this study, the GST enzyme was purified for the first time by hydrophobic interaction chromatography from Broiler liver. For this purpose, a hydrophobic gel having the chemical structure Sepharose 4B-L-tyrosine-1-naphthylamine was synthesized. The enzyme purity was checked by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Enzyme kinetic constants were found separately for glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) substrates. K_M ve V_{max} values were determined as 0.97 mM, 1.36EU / ml and 8.77 mM and 1.36EU / ml for GSH and CDNB, respectively.

In our study, heavy metals such as Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} and Zn^{+2} the effects on broiler liver. GST (bGST) were investigated. Cd^{+2} metal ion was found to be the strongest inhibitor with an IC_{50} value of 0.64 mM. It has been found that Ba^{+2} and Ni^{+2} metal ions have no significant effect on the enzyme. Ca^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} and Mn^{+2} metal ions increased the activity of bGST enzyme at different concentrations (0.5-4 mM) at the working concentrations.

KEYWORDS: Glutathione S-transferase (GST), broiler liver (bGST), hydrophobic interaction chromatography (HEK), metal ion, inhibition

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|-------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ | v |
| TABLO LİSTESİ | vi |
| SEMBOL LİSTESİ | vii |
| ÖNSÖZ | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Glutasyon..... | 3 |
| 1.2 Glutasyon S-Transferaz Enzimi | 5 |
| 1.2.1 GST' nin Moleküler Yapısı | 7 |
| 1.2.2 Glutasyon S-Transferaz Substratları | 9 |
| 1.2.3 GST' nin Fizyolojik Özellikleri | 11 |
| 1.2.4 GST' nin Saflaştırılması | 14 |
| 1.3 Ağır Metallerin Toksikitesi..... | 15 |
| 1.3.1 Civa (Hg) | 16 |
| 1.3.2 Nikel (Ni)..... | 16 |
| 1.3.3 Kadmiyum (Cd) | 17 |
| 1.3.4 Magnezyum (Mg) | 17 |
| 1.3.5 Kurşun (Pb)..... | 18 |
| 1.3.6 Bakır (Cu) | 18 |
| 1.3.7 Baryum (Ba) | 19 |
| 1.3.8 Krom (Cr) | 19 |
| 1.3.9 Çinko (Zn)..... | 19 |
| 1.3.10 Demir (Fe)..... | 20 |
| 1.4 Ağır Metallerin GST Üzerindeki Etkisi..... | 21 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER | 22 |
| 2.1 Materyaller..... | 22 |
| 2.1.1 Araştırmada Kullanılan Bileşikler | 22 |
| 2.1.2 Araştırmada Kullanılan Cihazlar ve Aletler | 23 |
| 2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı..... | 23 |
| 2.2 Yöntemler | 27 |
| 2.2.1 bGST Enziminin Saflaştırılması | 27 |
| 2.2.1.1 Homojenizatın Hazırlanışı | 27 |
| 2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürülmesi | 27 |
| 2.2.1.3 Sentezlenen HEK Kolonu ile bGST Enziminin Saflaştırılması..... | 28 |
| 2.2.2 bGST Enziminin Saflaştırılması Kullanılan Hidrofobik Jelin Sentezi | 28 |
| 2.2.2.1 Sepharose 4B' nin Aktivasyonu..... | 28 |
| 2.2.2.2 Uzantı Kolu Olarak L-Tirozinin Bağlanması..... | 29 |
| 2.2.2.3 Ligand Olarak Kullanılan 1-Naftilamin Kenetlenmesi | 29 |
| 2.2.3 bGST Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Saflığının Kontrolü..... | 30 |
| 2.2.4 Protein Tayini | 31 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.5 | bGST Enziminin Aktivite Ölçümü | 32 |
| 2.2.6 | bGST Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar | 33 |
| 2.2.6.1 | K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması | 33 |
| 2.2.7 | Bazı Ağır Metal İyonlarının bGST Enzimi Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi | 34 |
| 3. | BULGULAR | 36 |
| 3.1 | Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik..... | 36 |
| 3.2 | Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile bGST Enziminin Saflaştırılması | 37 |
| 3.3 | bGST Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü | 39 |
| 3.4 | CDNB ve GSH Substratları için K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi | 40 |
| 3.1 | bGST Enzimi Üzerinde Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesi | 43 |
| 4. | TARTIŞMA VE SONUÇ | 56 |
| 5. | KAYNAKLAR..... | 61 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1: Glutasyonun kimyasal yapısı..... | 3 |
| Şekil 1.2 : Ksenobiyotiklerin glutasyon ile GST katalizli reaksiyonu | 6 |
| Şekil 1.3: GST alt birimlerinin şematik gösterimi..... | 7 |
| Şekil 1.4: GST P1-1' in kristalografik yapısı..... | 8 |
| Şekil 1.5: GST' nin katalizlediği bazı reaksiyonlar | 10 |
| Şekil 2.1 : Sepharose 4B' nin aktivasyonu..... | 28 |
| Şekil 2.2: L-tirozinin bağlanması..... | 29 |
| Şekil 2.3: 1-Naftilamin kenetlenmesi..... | 30 |
| Şekil 2.4: GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan mekanizması..... | 32 |
| Şekil 3.1: Bradford yönteminde kullanılan grafik..... | 36 |
| Şekil 3.2 : HEK kolonunda bGST enziminin elüsyon grafiği..... | 37 |
| Şekil 3.3: HEK ile saflaştırılan bGST enziminin SDS- poliakrilamid jel elektroforezi..... | 39 |
| Şekil 3.4: CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik..... | 41 |
| Şekil 3.5: GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik..... | 42 |
| Şekil 3.6: Hg^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 44 |
| Şekil 3.7: Cd^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 45 |
| Şekil 3.8: Cu^{+1} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 46 |
| Şekil 3.9: Cr^{+3} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 47 |
| Şekil 3.10: Zn^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 48 |
| Şekil 3.11: Cu^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 49 |
| Şekil 3.12: Ba^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 50 |
| Şekil 3.13: Ni^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 51 |
| Şekil 3.14: Mn^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 52 |
| Şekil 3.15: Pb^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 53 |
| Şekil 3.16: Fe^{+2} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği..... | 54 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan cihazlar ve aletler. | 23 |
| Tablo 2.2: SDS-PAGE' de kullanılan jel karışımlarının miktarları..... | 26 |
| Tablo 2.3: GST aktivite ölçüm prosedürü. | 32 |
| Tablo 2.4 : Değişken GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi. | 33 |
| Tablo 2.5 : Değişken CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi. | 34 |
| Tablo2.6 : bGST enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 35 |
| Tablo3.1: bGST enziminin saflaştırma değerleri. | 38 |
| Tablo 3.2: bGST enziminin CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan $1/V - 1/[S]$ değerleri..... | 41 |
| Tablo 3.3: bGST enziminin GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan $1/V - 1/[S]$ değerleri..... | 42 |
| Tablo 3.4: Hg^{+2} , nın bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 44 |
| Tablo 3.5: Cd^{+2} , un bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 45 |
| Tablo 3.6: Cu^{+1} , in bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 46 |
| Tablo 3.7: Cr^{+3} , un. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 47 |
| Tablo 3.8: Zn^{+2} , nun bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 48 |
| Tablo 3.9: Cu^{+2} , ın. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 49 |
| Tablo 3.10: Ba^{+} , un bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 50 |
| Tablo 3.11: Ni^{+2} , in bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 51 |
| Tablo 3.12: Mn^{+2} , nın bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 52 |
| Tablo 3.13: Pb^{+2} , nun. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 53 |
| Tablo 3.14: Fe^{+2} , nin bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları. | 54 |
| Tablo 3.15: bGST enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarına ait değerler..... | 55 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|------------------------|--|
| GST | : Glutasyon S-transferaz enzimi |
| bGST | : Broyler glutasyon S-transferaz enzimi |
| EC | : Enzim kod numarası |
| EÜ | : Enzim ünitesi |
| SDS | : Sodyum dodesil sülfat |
| PAGE | : Poliakrilamid jel elektroforezi |
| kDa | : Kilo Dalton |
| TEMED | : N, N, N', N' -tetrametil etilendiamin |
| CNBr | : Siyanojen Bromür |
| V_{max} | : En yüksek reaksiyon hızı |
| K_m | : V _{max} 'ın yarısındaki substrat konsantrasyonu |
| IC₅₀ | : Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu |
| HEK | : Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi |

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabır ve hoşgörü ile her konuda beni destekleyen çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca katkılarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Nahit GENCER' e, Doç. Dr. Semra IŞIK' a, Dr. Adem ERGÜN'e ve Biyokimya Anabilim dalındaki tüm hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım süresince enzim kaynağı olarak kullanılan materyallerimin temininde yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Mikail ARSLAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında her zaman yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Kübra ÇIKRIKCI ve Kübra SİLAY' a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen ve bana güvenmekten hiçbir zaman vazgeçmeyen benim için çok değerli olan başta babam İrfan TAK'a ve annem Nebaat TAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Başarılarımı destekleyen ve hep arkamda olan çok değerli ablam Serpil AYDIN' a, abim Ergin TAK'a ve kız kardeşim Seda TAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak benim için çok değerli olan biricik yeğenlerime bu tezi ithaf ederim.

1. GİRİŞ

Dünyadaki hayvansal protein açığının kapatılmasında en önemli sektör kümes hayvancılığıdır. Diğer hayvan yetiştiriciliğine göre üretiminin kolay ve hızlı olmasının yanında maliyetininde düşük olması başlıca üstünlüklerindedir. Aynı zamanda kırmızı ete göre yağ oranında düşük, proteinin kaliteli, sindiriminin kolay olması da diğer üstünlükleri arasında sayılabilir. Bu nedenlerle Broyler endüstri sektörü dev adımlarla ilerlemektedir. Yeterince kaliteli ve ucuz üretime yönelik olarak sürdürülen çalışmalar sonucu, eski üretim modelleri hemen hemen tümüyle terk edilmiştir [1-3].

Günümüzde söz konusu üretimde en ekonomik ve hayvan başına en yüksek verimin elde edilmesi temel ilke olarak benimsenmiştir. Bunun için üretiminde temel girdi olan daha kaliteli ve ucuz yemin hazırlanması konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla, yüzlerce çeşit ilaç ve kimyasal maddelerin yemlere katılması ve bu maddelerin hayvanların büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması yapılmaktadır. Son yıllardaki verilere göre, bütün dünyada hayvansal besin üretimi bu şekilde %70-80 oranında artırılmıştır [4,5].

Broyler yetiştiriciliğinde, artık katkısız yem hemen hemen düşünülemez hale gelmiştir. Kullanılan katkı maddelerinin birçoğunun etkileri araştırılmıştır. Dünyada birçok bölgede kullanılan hayvan yemlerinin belirli ölçüde ağır metal içerdikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [6,7]. Çevredeki ağır metal kirliliği, besin zinciri ile bitkiler ve insanlarında içinde olduğu tüm hayvansal organizmalar için büyük bir risk olduğu tartışılmaz bir gerçektir. Bu gerçek karşısında hayvan yemlerinde ağır metallerin bulunması şaşırtıcı bir konu olarak düşünülemez [8].

Ağır metaller, çok düşük konsantrasyonlarda bile enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkileri oldukça dramatiktir [9-14]. Çoğu enzim için IC₅₀ değerleri mM düzeydedir. Bölüm 1.2.3' de ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi, GST'ler farklı fizyolojik fonksiyonları ile canlı organizmalar için vazgeçilmezdir. Bu fonksiyonlarından, Faz-II' deki detoksifikasyon işlevi, hayvanın toksik maddelerin dışarı atılması için oldukça önemlidir. GST aktivitesinin inhibisyonu başta oksidatif

stres olmak üzere gerek bitki [15] ve gerekse hayvanlarda [16] birçok probleme sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ağır metallerde dâhil birçok çevre kirleticisinin bu enzim üzerindeki etkileri detaylıca araştırılmıştır. Örnek olarak; Aksoy ve ark. balık karaciğerinden saflaştırdıkları GST' nin sekiz farklı ağır metale karşı afinitesini araştırmışlardır. Hesaplanan IC₅₀ değerleri 0,011-0,253 mM arasında değiştiği saptanmıştır [13]. Bir diğer çalışmada ise hindi karaciğerinden elde edilen GST üzerinde ağır metallerin inhibisyon etkisi saptanmıştır [14]. Ağır metallerin GST üzerindeki etkisi konusunda bir diğer çalışma Crupkin ve ark. tarafından yapılmıştır [17].

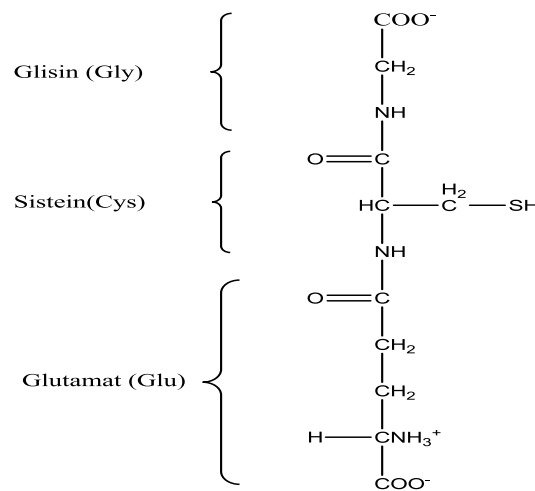
Bu çalışmada, Broyler karaciğerinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan GST enzimi üzerinde Ba⁺², Ca⁺², Cd⁺², Cr⁺³, Cu⁺¹, Cu⁺², Fe⁺², Hg⁺², Mn⁺², Ni⁺², Pb⁺² ve Zn⁺² ağır metal iyonlarının etkisinin araştırılması planlanmıştır. Söz konusu hayvanların ömürlerini çok kısa olması nedeniyle GST aktivitesinin değişmesinin hayvanın kendi sağlığı üzerinde önemli bir farkındalık oluşturmaya bilir. Ancak, bu enzimin aktivitesindeki azalma, hayvanın detoksifikasyon kabiliyetini düşüreceği için pestisitler dâhil birçok toksik madde birikecektir. Bu durum insan sağlığı açısından çok önemli bir sorun oluşturacağı açıktır. Bu nedenle araştırmamızdan elde edilecek sonuçların temel bilimler alanında olduğu gibi toksikoloji alanında da yaygın etki göstereceği düşüncesindeyiz.

1.1 Glutasyon

Canlı organizmalardaki yaşamın sürekliliği, son derece kompleks bir o kadar kontrollü biyokimyasal tepkimelerin devam etmesine bağlıdır. Bu sistemi bozacak yönde ortaya çıkan endojen veya ekzojen kaynaklı faktörler canlı organizmalara önemli hasarlar verirler. Bunlar içerisinde oksidatif stres, son yıllarda diğer faktörlere göre daha fazla öne çıkmaktadır. Oksidatif stresin hücre içerisinde kontrol altına alınmasına yönelik bir sistem dizayn edilmiştir. Bu amaçla katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon S-transferaz gibi enzimler hücre içerisindeki antioksidan sistemin önemli bir parçasıdır. Bunun dışında glutasyon, vitamin E, vitamin C, NADPH gibi bileşiklerde bu sistem içerisinde önemli rollere sahiptir [18,19].

Glutasyonun canlı organizmalarda birçok fonksiyonu olmasına rağmen, en temel işlevi antioksidan etkisidir. Oksidatif stresin aşırı arttığı organizmalarda, antioksidan potansiyelin düşmesi sonucu GSH düzeyinde önemli azalmaya yol açtığı bilinmektedir. Bunun sonucu kanser, yaşlanma, aterosikloroz gibi çok önemli patolojik sonuçlar ortaya çıkmaktadır [19,20].

γ – glutamilsisteinilglisin kimyasal yapısına sahip bir tripeptid olan glutasyon ilk defa 1921 yılında kas kasılması çalışmaları sırasında keşfedilmesine rağmen yapısı 15 yıl sonra aydınlatılabildiği [21].



Şekil 1.1: Glutasyonun kimyasal yapısı.

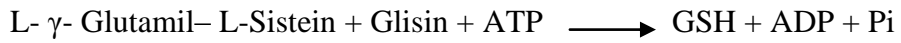
Şekil 1.1' de görüldüğü gibi söz konusu tripeptid, iki karboksil grubu, bir amino grubu, iki peptid bağı ve bir tiyol grubundan ibarettir. İndirgenmiş glutatyon ve yükseltgenmiş glutatyon olmak üzere iki formda bulunur. Glutatyon, farklı dokularda yüksek konsantrasyonlarda (0,1 - 10 mM) bulunmasına rağmen yaklaşık %99 indirgenmiş formdadır (GSH). Glutatyonun indirgenmiş formda tutulabilmesi için pentoz- fosfat yolunun aktivitesi son derece önemlidir. Hidrofilik grupların, molekül büyüklüğüne göre fazla olması glutatyonun sudaki çözünürlüğünün yüksek olmasına sebep olur. Bu durum, GSH' ın canlı organizmalardaki stabilitesini ve mobilizasyonunu artırır [22,23].

Hücrede ATP' nin kullandığı iki reaksiyon sonucunda glutatyon sentezi gerçekleşir. Glutatyon sentetaz ve γ -glutamil sistein sentetaz da bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir [24].

γ -glutamil sistein sentetaz



Glutatyon sentetaz



Bitki, hayvan ve mikroorganizmaların hücre sitozolünde birçok fizyolojik proseste önemli rolü vardır [25]. Önemli bir indirgen güç olan glutatyon (GSH) özellikle eritrositlerde hemoglobinin ve diğer proteinlerin sistein rezidülerinin yükseltgenmesini önleyerek söz konusu moleküllerin fonksiyonlarının devamını sağlar. Eritrosit hücrelerindeki GSH / GSSG oranının yaklaşık olarak 500 olması oldukça dikkat çekicidir [26]. Bunun dışında hücre içi proteinlerin dihidrolipoik asit ve koenzim A (CoA) gibi moleküllerin tiyol gruplarını indirgenmiş formda tutar. Ayrıca askorbik asit, α - tokoferol gibi antioksidan moleküllerinde korunmasında son derece önemli fonksiyona sahiptir. GSH, DNA sentezinin ön bileşeni olan ribonükleotitlerin indirgenmesinde de önemli işlevi vardır [27].

Glutatyon, hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere ve radyasyona karşı korunmasında son derece önemli fonksiyona sahiptir. Ayrıca bazı ilaçların

inaktivasyonunda ve östrojen, prostaglandin gibi bazı bileşiklerin metabolik etkilerinde de görev alır [18-27].

GSH, tiyol gruplarını indirgemiş halde ve demiri ferröz (Fe^{+2}) halde tutulmasını sağlayarak proteinin inaktivasyonunu engelleyebildiği gibi rejenere olmalarına da olanak sağlar [28,29]. GSH aminoasitlerin transportunu sağlar ve GST aracılığıyla da elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonun da kofaktör görevi görmektedir [30,31].

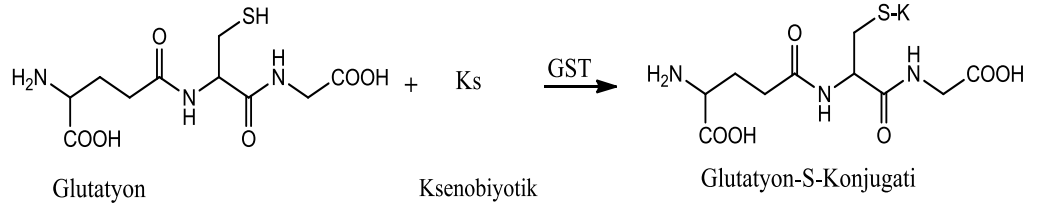
1.2 Glutasyon S-Transferaz Enzimi

GST' nin yapısı hakkındaki ilk bilgiler 1961 yılında fare karaciğerinde yapılan çalışma ile ortaya çıkarılmıştır [32]. Söz konusu enzimin saflaştırılması ise Habig ve ark. tarafından ilk olarak 1974 yılında gerçekleştirilmiştir [33].

GST izoenzimleri için farklı substrat spesifikliklerine göre, aril transferazlar, alkil transferazlar, epoksit transferaz gibi sınıflandırmalar yapılmıştır [34,35]. Enzimin sınıflandırılmasında ayrıca fiziksel ve yapısal özellikleride dikkate alınmıştır. GST enzimlerinin birçoğu hücre sitozolünde bulunurken, karaciğer hücrelerinin mikrozomal kısmında da GST aktivitesine rastlanılmıştır. Söz konusu enzim mikrozomal membrana oldukça sıkı bir şekilde bağlı ve bazı özellikleri ile sitozolik formlardan farklı olduğu tespit edilmiştir [36,37].

GST enziminin fizyolojik önemi nedeniyle bundan sonra birçok çalışma yapılmış, başta memeliler olmak üzere böceklerde, balıklarda, kuşlarda ve birçok mikroorganizmalarda GST aktivitesi saptanmıştır. Memelilerde ise en sık rastlanılan doku başta karaciğer olmak üzere akciğer, kas, ince bağırsak, testis, plasenta gibi organların hem sitozolünde hemde membranında tespit edildiğine dair çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür [38,39]. Bu izoenzimlerin birçok fizyolojik fonksiyonu saptanmıştır. Bunlardan en önemlisi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonun da Faz II aşamasında rol oynamasıdır [40,41]. Buna ilaveten GSH - bağımlı peroksidaz aktivitesi ile birçok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinde antioksidan olarak fonksiyonu vardır [42]. Ayrıca farklı doymamış hidrokarbonların izomerleşmesinde de görev alır [43,44] Bu enzimlerin non-katalitik aktiviteleri ile

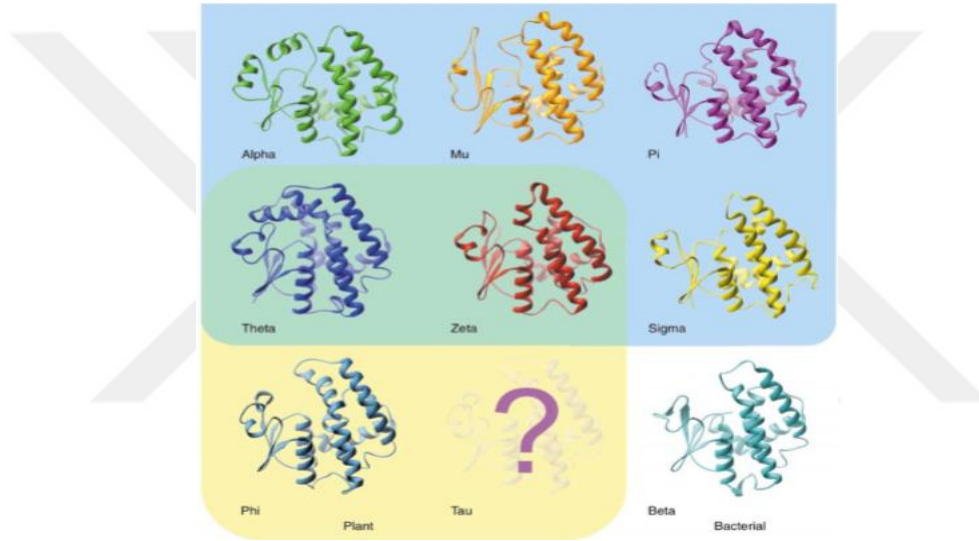
karsinojenik maddelerde dâhil birçok hidrofobik ligandı bağlayarak onların transportunda temel işlevleri vardır [45].



Şekil 1.2 : Ksenobiyotiklerin glutasyon ile GST katalizli reaksiyonu [46].

1.2.1 GST' nin Moleküler Yapısı

GST' ler, elektrofilik bileşikleri ile GSH' ın konjugasyon reaksiyonunu katalize eden dimerik yapıdaki büyük protein ailesidir [48-50]. Hemen hemen tüm türlerde bulunan bu proteinler yapısal benzerliklerine göre sınıflara ayrılmışlardır. Sitozolik GST' ler memelilerde Pi, Omega, Teta, Alpha, Mü ve Zeta olarak sınıflandırılırken [51], Teta ve Zeta sınıfında bulunan GST' ler bitkilerde ve diğer organizmalarda tanımlanmıştır. Diğer gruplarda Epsilon ve Delta yalnızca böceklerde [52], bitkilerde bulunan Lambda [53], Tau, Phi ve prokaryotlarda ise Beta olarak tespit edilmiştir [54].

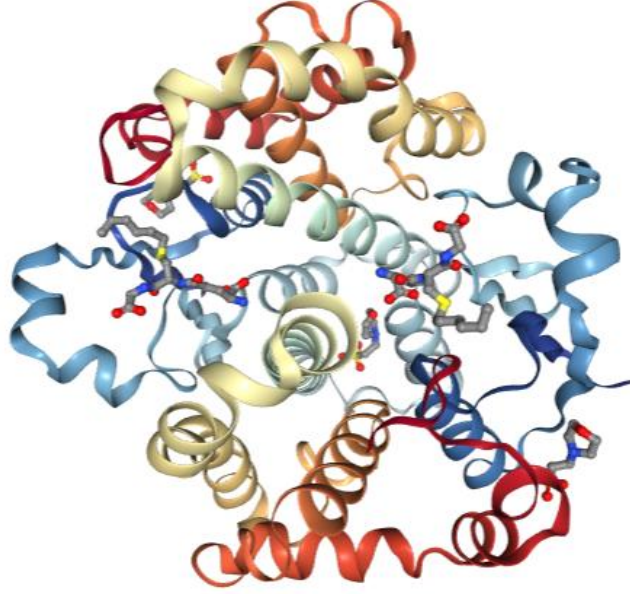


Şekil 1.3: GST alt birimlerinin şematik gösterimi. Memelilere özgü GST' ler (Alpha, Mu, Pi ve Sigma) mavi, Bitki ve bakteriyel GST' ler (Phi ve Beta) sarı ve beyaz, Hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan GST' ler (Theta ve Zeta) yeşil arka plana sahiptir [55].

Memeli Pi, Mü, Alpha sınıfı GST' lerin iki farklı birimden oluştuğu bilinmektedir. Her bir alt birimin bağımsız aktif bölgelere sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Her bir aktif bölgede glutatyona spesifik bir domain ve onun yanında elektrofilik substratları bağlayan daha hidrofilik olan bir bölgenin varlığı tespit edilmiştir [56].

GST' ler yaklaşık olarak 23-29 kDa molekül ağırlığına sahip globüler yapıda dimerik proteinlerdir. Her bir alt birim 200-240 rezidüden oluşur. Yaklaşık 80 aminoasit rezidüsünden meydana gelen üç α -heliks ve bir β -tabaka motifinden N-terminal bölge domaini G bölgesini oluşturur. Bu bölge GSH' a oldukça spesifiktir.

H domaini denilen diğer bølge ise hidrofobik elektrofil bileşiklerin bağlanması için dizayn edilmiştir. Bunun dışında 5 ve 6 α -heliks yapısında C terminal bөлger dikkat çekmektedir [57].



Şekil 1.4: GST P1-1' in kristalografik yapısı.

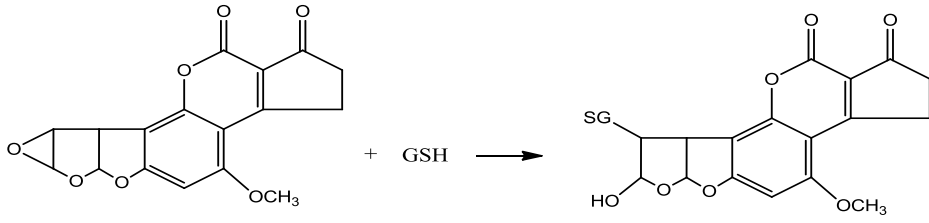
Bu bөлgerden G domaini tüm GST' lerde benzer iken H domaini türden türe farklı izoformlar arasında belirgin farklılıklar olduğu bilinmektedir. Enzimin hem substrat bağlama kapasitesi hem de çeşitliliği bu bөлgenin farklılığından kaynaklanmaktadır [58].

1.2.2 Glutasyon S-Transferaz Substratları

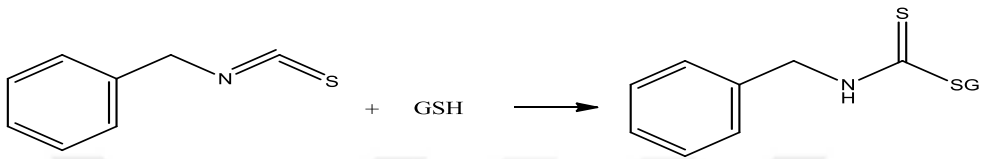
GST' ler tipik olarak ksenobiyotikler ve glutasyon arasındaki konjugasyon reaksiyonlarını katalizler. Söz konusu ksenobiyotikler, ya reaktif (elektrofilik merkez) ya da Faz I enzimleriyle reaktif hale gelmesi gerekir. GST çok sayıda elektrofilik substratlara sahiptir. Bu substratların en tipik özelliği lipofilik karaktere sahip olmasıdır. Toksinler, ilaçlar, karsinojenik maddeler GST substratlarının sadece bir kaçıdır [59,60].

GST' nin katalizlediği konjugasyon reaksiyonlarında, genel olarak epoksit içeren bileşikler, alkil ve aril halojenürler, izotiyosiyanatlar, $\alpha - \beta$ doymamış karboniller ve kinonlar substrat olarak yer alırlar [61]. Konjugasyon reaksiyonlarında elektrofilik substratların tamamının Faz I enzimleri ile aktif hale gelmesine gerek yoktur. Ancak bazıları siklooksigenazların etkisi ile aktif hale gelirler [62]. Ayrıca oksidatif stres sonucu meydana gelen serbest radikallerle de aktivasyonunun gerçekleşeceği bildirilmiştir [63].

1.



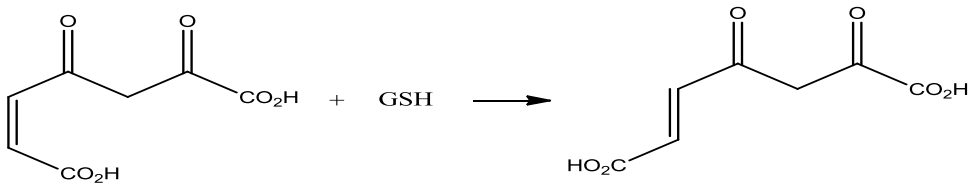
2.



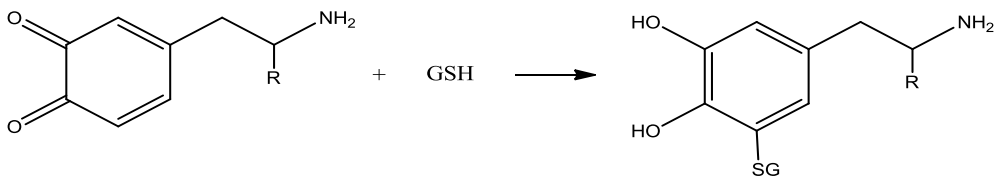
3.



4.



5.



Şekil1.5: GST' nin katalizlediği bazı reaksiyonlar: 1-Aflotoksin B1=8,9-epoksit, 2-Benzilizotiyosiyanat, 3-Dibrometan, 4-Melailasetoasetat ve 5-O- kinon.

GST substratları olan 4 hidroksil-2-noneal, dopaminokrom, aminokrom, kolesterol-5-6-oksit, adenin propenal, 9-hidroksiperoksinoleik asit gibi endojen moleküllerin, bütadien, strien oksit, akrolein, aflotoksin B1-8,9-epoksit, heksaklorobütadien, etilenoksit gibi çevresel karsinojenlerin; lindan, DDT, atrazin gibi pestisitlerin detoksifikasyonunu sağlarken, başta cis platin gibi, plastik bazlı kanser ilaçları da olmak üzere, siklosofamid, klorombusil, etakrinik asit, adriamisin gibi ilaçları inhibe ederek, bu ilaçların hücre içerisindeki direncine sebep olurlar [64].

1.2.3 GST' nin Fizyolojik Özellikleri

Heterodimerik ve homodimerik olan GST enzimlerinin tüm canlı türlerinde bulunması, hayati öneminin bir göstergesidir. Katalitik ve nonkatalitik olan bu enzimler, birçok fonksiyona sahiptirler. Detoksifikasyon işlevinin yanı sıra hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı görevleride vardır [65].

GST' lerin birçok önemli fizyolojik fonksiyonlarının olmasına rağmen, en temel işlevi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda anahtar role sahip olmasıdır. Gelişen teknoloji, hızlı kentleşme ve insanların güzel görünme kaygıları sonucu birçok ksenobiyotiğe maruz kalınmaktadır. İlaçlar ve kozmetikler, gıda katkı maddeleri, pestisitler, endüstriyel atıklar, bakteriyel ve bitkisel toksinler en temel ekzojen ksenobiyotik türleridir. Bu bileşikler Faz I ve Faz II ile belirli ölçüde detoksifiye edilerek vücuttan atılırlar [66].

Bazı ksenobiyotikler Faz I evresinde başta hidrosilasyon olmak üzere deaminasyon, epoksidasyon gibi çok çeşitli reaksiyonlar sonucu hidrofobitesi ve toksisitesi azaltılarak vücuttan atılırlar. Ancak birçok ksenobiyotik Faz I evresinde vücuttan atılabilir bir forma getirilemez. Bu amaçla Faz II diye adlandırılan evre ile birçok gruplar eklenerek toksisitesi azaltılır. Bu şekilde vücuttan atılabilir forma getirilir. Faz II' de birçok spesifik enzimler yardımıyla sülfat, asetat, glutatyon, glukronik asit ve metil grupları eklenir [67].

Faz I sonucu Faz II tepkimeleri arasında oluşan metabolitin glutatyon bileşiğiyle konjugasyonu oldukça önemlidir ve bu konjugasyon organizmayı son

derece reaktif olan elektrofilik maddelerin saldırısından korur. GSH konjugasyon tepkimelerinin çoğu GST enzimleri tarafından gerçekleşir [68].

GST' deki sülfhidril grubu güçlü bir nükleofilik grup gibi hareket ederek, epoksit ya da toksik bileşiklerin ya da metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları detoksifiye eder. Toksik etkisi sahip bu ksenobiyotikler direkt GSH ile konjugasyona uğramasalardı, DNA, RNA ya da hücre proteini ile kovalent olarak birleşerek, hücrede ciddi hasarlara neden olacaktı. Bu yüzden GSH, bazı karsinojenler ve ilaçlar gibi çoğu toksik bileşiklere karşı son derece önemli bir savunma mekanizması oluşturur [69].

GST tarafından katalizlenen detoksifikasyon reaksiyonları, hücreden toksik bileşiklerin atılmasına yol açar. Bu durum canlı için son derece önemlidir. Ancak özellikle kemoterapide tümör hücresi içindeki GST' nin aktivitesi tedavide önemli bir probleme yol açar. Bu nedenle söz konusu GST' ler için birçok bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir [61].

Vücuttan atılımları gerçekleşmeden önce, glutatyon konjugatları ileri bir metabolizasyona uğrarlar. Glutatyonda bulunan glutamil ve sistein aminoasitleri spesifik enzimlerce uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil rezidüsünün amino grubuna bir asetil grubu eklenir. Meydana gelen bu bileşikte vücuttan atılan merkaptürik asittir [65].

GST' lerin detoksifikasyon aktivitesi yanında, canlı organizmalarda metabolize edilemeyen lipofilik çoğu bileşiği bağlamaları ve bunların hücre içerisindeki mobilitelerini artırmaları kinetik öneme sahiptir[65]. Sıçan karaciğerinde karsinojenleri, bilirubini ve diğer azotlu bileşikleri bağlayan bir protein tanımlanmıştır [65]. Söz konusu proteinin GST-1 izoenzimi olduğu saptanmıştır [65]. Ayrıca bilirubin gibi çoğu pigment polisiklik aromatik hidrokarbonlar, kolik asitler ve proteinler tarafından bağlanarak taşındığı bilinmektedir [65]. Buna ilaveten GST' lerin sitoplâzma yüksek miktarda bulunması, tıpkı albüminin kan dolaşımında üstlendiği rolü hücre içerisinde söz konusu enzimin yerine getirdiği düşüncesi ortaya konulmuştur [70]. Yapılan bir çalışmada "hem" bileşiğinin sentezinin son aşamasında iç mitokondri zarından dışarıya hareketini GST' ler tarafından kolaylaştırdığı bulunmuştur. GST' lerin aynı zamanda bazı steroid hormonlarını da

bağladığı tespit edilmiştir. Ancak bu olayın fizyolojik sonuçları tam olarak anlaşılamamıştır [71].

GST' nin bu biyolojik fonksiyonlarının yanında, peroksidaz aktivitesi ile de dikkat çekmektedir. Özellikle araşidonik asit ve lineorik asit hidroperoksitleri başta olmak üzere birçok endojen peroksitleri parçalar. Bu aktivitesi glutatyon peroksidaz enzimine benzer olmasına rağmen, GST' nin selenyumdan bağımsız olması önemli bir farkındalık oluşturur [65].

GST' nin çok sayıda tanımlanmış, diğer fonksiyonları da vardır. Bunlar arasında lökotrien, prostaglandin sentezi ve bazı hormon ve büyüme uyarıcı faktörlerinin fonksiyonunda önemli işleve sahiptir [65].

GST enzimi aktivitesi, birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Örnek olarak; GST polimorfizm ile Parkinson hastalığı arasındaki ilişki incelenmiş bu enzim aktivitesinin söz konusu hastalık gelişiminde önemli olacağı kanısına varılmıştır [72]. Bir diğer çalışmada prostat kanseri ile GST arasındaki ilişki incelenmiş ancak anlamlı bir bulguya ulaşılamamıştır [73]. Benzer bir çalışmada da karaciğer GST' si ve yaşlılık arasında bir ilişki saptanmıştır [74].

1.2.4 GST' nin Saflaştırılması

Literatürde GST izoenzimlerinin saflaştırılması konusunda çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür [75-82]. Bu çalışmalardan birinde balık bağırsak mukozosundan GST enzimi afinite tekniğiyle saflaştırılarak özellikleri aydınlatılmıştır. Bu çalışmada, enzimin spesifik aktivitesi 107µmol/mg olarak saptanmıştır. Kullanılan afinite kolonunun kimyasal yapısının, glutatyon-agaroz olduğu görölmektedir [75].

Bir başka çalışmada Angelucci ve ark. Levrek karaciğerinden GST enzimini yine aynı kromatografik teknik kullanılarak saflaştırmışlardır [76]. GST enziminin saflaştırılması konusunda bir diğer çalışmada, Down sendromlu çocukların eritrositlerinde enzim afinite tekniğiyle saflaştırılarak sağlıklı çocukların enzimleriyle karşılaştırılmıştır. Söz konusu çalışmada jelin yapısı diğer çalışmalarda da olduğu gibi glutatyon-agaroz şeklinindedir [77].

Bir diğer çalışmada GST insan plasentasından afinite tekniğiyle %0,5 verimle 16 kat saflaştırılmıştır. Enzimin hem glutatyon (GSH) hem de CDNB' ye karşı biyolojik ilgileri saptanmıştır. CDNB' ye karşı enzimin biyolojik ilgisinin yüksek bulunması oldukça dikkat çekici olarak görölmektedir [78]. GST enzimi insan kan serumundan da saflaştırılarak özellikleri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada enzimin kinetik sabitleri farklı substratlar kullanılarak belirlenmiştir [79]. GST enzimi E.coli ekstratlarından da afinite tekniğiyle yüksek verimle saflaştırılmıştır. Saf enzimin kinetik özellikleri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir [80].

GST enziminin saflaştırılması için anyon değişim kromatografisi tekniğide kullanılmıştır. Bu çalışmalardan birinde Kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan enzimin alt birimlerinin molekül kütleleri 23-28 kDa olarak saptanmıştır [81].

GST saflaştırılması konusunda bir diğer çekici çalışma Van gölünde yaşayan “ *Chacalburnus tarichii Pallas*” balığından GST enziminin saflaştırılmasıdır. Söz konusu enzim afinite tekniğiyle (glutatyon-agaroz) 301 kat % 19 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin sağlığı elektroforez ile kontrol edilmiştir [13].

1.3 Ağır Metallerin Toksikitesi

Ağır metaller birçok sistemde oluşan elementleri ifade etmektedir. Bu elementlerin bir kısmı canlı organizmalara besin zinciri ile girmektedir. Bazı ağır metaller belirli konsantrasyonlarda canlı organizmalar için son derece gerekli iken, yüksek konsantrasyonlarda bir o kadar toksite gösterirler [82,83].

En önemli ağır metal kaynakları toprak ve metal sanayinin oluşturduğu kirliliktir. Genellikle madenlerin çıkartılmasından işletilmesine kadar olan tüm evrelere, Pb, Cu, Mn, Ni, Co, Zn atmosfere belirli oranlarda salınmaktadır. Diğer ağır metal kaynakları ise; ticari gübreler, kömür atıkları, tarımda kullanılan pestisitler, endüstriyel atık suları, hayvansal atıklar, trafik kökenli atıklar ve kanalizasyon atıklarıdır [84]. Bu ağır metallerin havada kalma sürelerinin yaklaşık 5 gün olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [85].

Ağır metaller, toksik etkilerine ve canlı organizmadaki işlevlerine göre sınıflandırılabilir. En zararlı olarak bilinen ağır metaller, kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), civa (Hg)'nin biyolojik işlevleri yoktur ve her derişimde zehirlidirler. Diğer önemli ağır metallerden arsenik (As), bizmut (Bi), antimon (In) ve talyum (Tl) eser miktarlarda organizma tarafından tolere edilebilen ikinci grup elementlerdir. Üçüncü grup elementlerinden nikel (Ni), çinko (Zn), kobalt (Co), vanadyum (V), selenyum (Se), krom (Cr), nikel (Ni) ve demir (Fe) belirli konsantrasyonlarda canlı organizmalar için son derece gerekli olmasına rağmen yüksek konsantrasyonları belirli düzeylerde toksiteye sahiptir. Bu elementlerde Ni, Cr, Cu ve Se nükleik asitlerle belirli düzeyde etkileştikleri için kanserojen özelliğine sahip oldukları saptanmıştır [85,86].

İnsan ve hayvan organizmasına giren ağır metallerin ilk etkilediği bölge üst solunum yollarıdır. Ayrıca akciğer, bronş, boğaz ve gırtlak gibi önemli kanser türlerinin oluşmasında direkt ya da indirekt sorumluluklarının olduğu ortaya konulmuştur. Ağır metallerin vücuttan atılma hızı oldukça önemlidir. Çünkü vücuda giriş hızı atılma hızından düşük ise ağır metal birikimi de kaçınılmazdır [84-87].

Araştırmamızda kullanılan ağır metallerin bazı özellikleri bölüm 1.3.1 ve 1.3.9' da özetlenmiştir.

1.3.1 Civa (Hg)

Oda sıcaklığında sıvı olan tek metal olup, gümüş beyaz rengi ile dikkat çekmektedir. Civa bazı özellikleri nedeniyle birçok endüstri alanında önemli kullanım alanı bulmuştur. Bu nedenle civa bileşikleri önemli çevre kirleticileri arasındadır.

Civa gerek ticari gerekse tıbbi olarak yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Tüm dünyada civa toksisitesi önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Civanın hemen tüm bileşiklerinin toksik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Söz konusu element Hg^{+2} ve Hg^{+} formunda farklı bileşiklere sahiptir. Bunlardan $HgCl_2$ bileşiklerinin daha toksik olduğu saptanmıştır. Genel olarak organik civa bileşikleride özellikle beyin ve karaciğerde önemli hasarlara sebep olur. En tehlikeli organik civa bileşiği dimetilcivadır. Birkaç μl ' sinin bile ölüme neden olduğu bilinmektedir [88].

1.3.2 Nikel (Ni)

Nikel, ferromanyetik bir özelliği sahip parlak ve gümüşümsü bir elementtir. Nitrik asitte çözülürken, seyreltik ve hidroklorik asitte az çözülür. Bu elementin korozyon ve ısı direncinin yüksek olması nedeniyle alaşım üretiminde sık sık kullanıldığı bilinmektedir [89,90]. Bu elementin özellikle organik bileşikleri daha toksiktir. Deriyi tahriş etmesinin yanında kalp ve damar sistemi içinde oldukça zararlı ve kanserojen bir metal olmasında rağmen, nikel ve tuzlarıyla zehirlenmeye nadir olarak rastlanılmaktadır [90].

Diyetle alınan nikel miktarı, hayvan yiyecekleri ve bitkilerin tükettikleri miktarlara bağlıdır. Nikel alınımının hemen hemen yarısı başta ekmek olmak üzere

diğer tahıl ürünlerinin tüketilmesi ile gerçekleşir. Günlük nikel alınımının 150µg' dan az olmasının gerektiği tespit edilmiştir [91].

1.3.3 Kadmiyum (Cd)

Gümüş beyazı renginde olan kadmiyum, havada hızla kadmiyum okside dönüşür ve kadmiyum klorür, kadmiyum nitrat, kadmiyum sülfat gibi inorganik tuzları suda belirli düzeyde çözülür.

Doğada çinko ile birlikte bulunan kadmiyum çinko rafinasyonunun yan ürünü olarak elde edilir. Kadmiyumunun endüstride kullanım alanlarından bazıları; metallerin kaplanması, bazı metal alaşımlarının eldesinde, plastiklerde stabilizatör olarak sayılabilir. Bu nedenle kadmiyum içeren materyallerin çevreye atılması büyük bir kadmiyum kirliliğine sebep olur [92,93].

Belirli düzeyde kadmiyum içeren havaya maruz kalan kişilerde akciğer ve böbrek hastalıkları ortaya çıkmaktadır. Bunun en önemli nedeni, bu elementin söz konusu organlarda daha fazla birikmesidir [93].

İnsan sağlığı açısından kadmiyum miktarının kumsal alanlarda 1-5 ng/m³, kentsel ve endüstriyel bölgelerde ise 10-20 ng/m³ düzeyini aşmaması gerektiği Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilmektedir [94].

1.3.4 Magnezyum (Mg)

Magnezyum vücudun tüm önemli organların işleyişi için gerekli elementtir. Eksikliğinde birçok metabolik sorunun ortaya çıktığı belirlenmiştir. Vücut için normal magnezyum değerleri 1,7-2,2 mg/dL olması gerektiği tavsiye edilmektedir. Yetişkinlerde alınması gereken günlük magnezyum miktarı 300-400 mg' dır.

Vücuttaki magnezyum %60' ı kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) ile birlikte kemiklerde bulunur, diğer %40' ı ise kan ve kas sistemindedir. Protein sentezi, hücrelerin büyümesi ve yenilenmesinde önemli rol oynar. Bu element binlerle ifade

edilen enzimlerin aktivitesi için gereklidir. Ancak belirli düzeyin üzerindeki magnezyum önemli toksik etkilere sahiptir [95].

1.3.5 Kurşun (Pb)

Mavimsi gri renkte olan kurşun, insan faaliyetlerine bağlı olarak önemli oranda biyosfere yayılır [92]. Antik uygarlıklar tarafından gümüş üretimi esnasında keşfedilen bu metal kullanımı uzun yıllardan beri endüstride artarak devam etmektedir. Bu nedenle çevredeki kurşun oranı her geçen gün insan sağlığını tehdit edecek boyutlara gelmektedir [93].

Solunum ve sindirim sistemiyle alınan kurşun miktarı, çevreye bağlı olarak yaklaşık 100-500 µg düzeyleri arasındadır. Havadaki tanecik büyüklüğü ve kimyasal bileşimine bağlı olarak %15-70' i solunum yoluyla %10'u ise sindirim yoluyla vücuda alınır [96].

Kurşun absorbe edildiği zaman farklı dokularda farklı düzeylerde birikir. Örnek olarak; %95' i mineral dokuda, %52 i ise kan ve yumuşa dokuda birikir. Kan dolaşımında bulunan kurşunun %99' u eritrositlere bağlanır ve yarılanma ömrü kanda 20-40 iken kemiklerde 10 yıl kadardır. Absorbe olmayan kurşun feçes ile atılırken absorbe olan kurşunun %50-60 kadarı böbrek ve safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılır [97].

1.3.6 Bakır (Cu)

Uzun yıllardan beri bilinen ve birçok alanda kullanılan spesifik bir renge sahip metaldir [98]. Bakır, yüksek elektrik v ısı iletkenliği aşınmaya ve korozyona direnci, çekilebilme ve dövülebilme gibi özelliklerinden dolayı endüstride önemli rol oynar [98].

Bitkiler ve hayvanlar üzerindeki bakırın etkisi canlının türüne bağlıdır. Küçük ve basit yapıda olan canlılar için toksik etki gösterirken büyük canlıların ise temel bileşinini oluşturur. Genellikle bakır ve bileşikleri olan fungusit, anti bakteriyel

madde, biosit ve böcek zehiri olarak yumuşakçalara ve tarım zararlılarına karşı yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir [90].

1.3.7 Baryum (Ba)

Baryum doğada serbest olarak bulunmaz. Başta sülfür (S), karbon (C) ve oksijen (O) olmak üzere birçok elementler ile bileşikler halinde yer alır. Birçok toprak türleri ve deniz suyundan yüksek miktarda baryum tespit edilmiştir. En çok rastlanılan baryum bileşiği $BaSO_4$ ve $BaCO_3$ olduğu bilinmektedir. Söz konusu bileşikler endüstride birçok alanda kullanım alanı bulmuştur. Bu nedenle çevre için önemli bir sorun olduğu düşünülmektedir. $BaSO_4$ birçok radyolojik incelemelerde kullanılan bir maddedir [99].

1.3.8 Krom (Cr)

Krom, gümüş beyazlığında parlak ve oldukça sert bir maddedir. Bu elementin gerek havada gerekse suyun altında oksitlenmemesi endüstride çok geniş kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca krom bileşiklerinde Cr^{+3} ya da Cr^{+4} bileşikleri boya pigment üretiminde ve tekstil sanayinde yaygın bir şekilde kullanılır. Krom belirli konsantrasyonlarda, karbohidrat, su ve protein metabolizması üzerinde önemli etkilere sahiptir. Kromun canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine bağlıdır. Ayrıca söz konusu oksidasyon basamağındaki bileşimlerinde biyolojik aktivitesine önemli katkılar sağlar. Vücudun günlük krom ihtiyacı 30-200 μg arasında değişir. Diğer metaller nazaran daha az zararlı olmakla birlikte bazı patolojik sonuçlara sebep olduğu bilinmektedir [100].

1.3.9 Çinko (Zn)

Beyazımsı ve kırılğan olan çinko, yer kabuğunda 130 mg/kg civarında bulunur. Doğada oldukça yaygın bir şekilde bulunan çinko volkanik kayaların tümünde bulunur [93].

Çinko, başta motorlu taşıtlar olmak üzere diğer yanma faaliyetleri sonucu çevreye yayılırlar. Ayrıca birçok yol inşaat aktiviteleri ile de önemli çinko oluşturmaktadır. Buna ilaveten; kömür kazanlarında oluşan emisyonlar uçucu külde belirli boyutta partikül şeklinde bulunur [101].

Çinko insan vücudunda yaklaşık 2-3 gr arasında değişir ve sağlık için oldukça önemli bir eser elementtir. Vücutta değişik bölgelere yayılmış durumdadır. Bunlardan kemik, kas, prostat, böbrek ve karaciğer yer alır [102].

Çinko karbohidrat, protein, yağ ve nükleik asit metabolizmasında önemli işlevlere sahiptir. Başta karbonik anhidraz (CA) ve bazı proteazlar olmak üzere birçok enzimin kofaktörüdür. Bu elementin en önemli özelliği başta Cd, Hg olmak üzere birçok ağır metalin toksifitesini düşürdüğü saptanmıştır. Bu nedenle bu element eksikliği birçok fizyolojik soruna sebep olduğu bilinmektedir [93].

1.3.10 Demir (Fe)

Toprakta bol miktarda bulunan demir, sıklıkla taşıt emisyonlarında bulunur. Demir birçok endüstri dalında sıklıkla kullanıldığı için çevre kirliliğini tehdit eden önemli elementlerden birisidir [102].

Demir canlı organizmalarda başta hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar olmak üzere birçok molekülün fonksiyonu için gerekli bir elementtir. Bu elementin emilimi ince bağırsakların üst kısmında spesifik bir taşıma sistemiyle gerçekleşir. Trans ferritin aracılığı ile ilgili dokulara taşınır. Reseptör aracılı endositoz işlemi ile hücrelere alınan demir ilgili yerlerde kullanılır. Demirin fazlası ferritin proteini ile başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda depolanır [103].

Gereğinden fazla demir alınımı tüm dokularda önemli hasarlara sebep olur. Demirin sağlık açısından toksifite sınır değerlerinin 4-6 mg/m³ olduğu tespit edilmiştir [102]. Demirin atılması ise başlıca bağırsaklarda ve az miktarda da böbrek yoluyla gerçekleşir [103].

1.4 Ağır Metallerin GST Üzerindeki Etkisi

Ağır metallerin GST üzerindeki etkisi konusunda birçok çalışma vardır. Örnek olarak; Mn, Cd iyonlarının GST üzerinde etkileri incelenmiş ve söz konusu iyonların aktiviteyi belirli ölçüde arttırdığı saptanmıştır [9].

Bir başka çalışmada ise, bazı metal iyonlarının insan eritrosit GST' ler üzerindeki etkileri saptanmıştır. Söz konusu çalışmada GST üzerinde önemli bir etki oluşturmadıkları saptanmıştır [10]. Bu konuda dikkat çeken bir diğer çalışma ise Pb, Cd ve Al metal iyonlarının eritrosit GST üzerinde belirli ölçüde inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır [11]. Aynı konuda Cd, Hg ve Ni' in insan GST enzimini inhibe ettiğini gösteren bir başka çalışmada mevcuttur[12]. Son yıllarda ağır metallerin GST üzerindeki etkisinin incelendiği bir başka çalışma ise Aksoy ve ark. yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada saflaştırılan enzim üzerinde Ag, Cu, Cd, Fe, Pb, Cr, Co ve Zn metal iyonlarının etkileri saptanmıştır. Cd, Co ve Fe hariç tüm metal iyonlarının belirli ölçüde inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir [13].

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Araştırmada Kullanılan Bileşikler

Bu alışma için kullanılan, indirgenmiş glutatyon (GSH), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum sülfat, hidroklorik asit, tris HCl, sülfürik asit, siyanojen bromür, amonyum sülfat, sodyum karbonat, etilalkol, sodyum bi karbonat, sodyum dodesil sülfat, β -merkaptotanol, gliserol, glisin, Bromofenol mavisi, akrilamid, N,N'- metilenbisakrilamid ve Coomassie brilliant blue G-250 gibi kimyasallar Merck veya Sigma Chemical'dan temin edilmiştir.

Araştırmada GST enziminin saflaştırılması ve bazı metal iyonlarının etkilerinin incelenmesi için kullanılan Broyler karaciğeri yerel bir besi iftliğinden temin edilmiştir.

2.1.2 Araştırmada Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan cihazlar ve aletler.

| | |
|------------------------|--|
| Hassas Terazı | Libror, AEG- 220 (Shimadzu) |
| Manyetik Karıştırıcı | ARE Magnetic, Heating Stirrer IKA Combimag RCO |
| U.V Spektrofotometresi | Biotek Power Wave XS |
| pH Metre | Orion- Model 920A |
| Otomatik Pipetler | Eppendorf, Medisis |
| Derin Dondurucu | Beko Buzdolabı |
| Soğutmalı Santrifüj | Sigma Laborzentrifügen 3K 15/ 10706/ 10707 |
| Elektroforez Sistemi | BIORAD |
| Kromatografi Kolunu | Sigma (1,5x10 cm) |
| Vorteks | Fisions Whirli Mixer |
| Gradient Mikser | Atta Magnetik karıştırıcı ve Gradient Tüp |
| Homojenize Edici | Feliks Blender |

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

0,1 M NaHCO₃ Tamponu (pH 10.0): 4,2005 g (0.05 mol) NaHCO₃ 450 mL distile su içerisinde çözülerek, 1M NaOH ile pH 10.00' a getirildi ve son hacim 500 mL' ye tamamlandı

0.2 M NaHCO₃ Tamponu (pH 8.8): 16,802 g (0.2 mol) NaHCO₃ 950 mL distile su içerisinde çözülerek, 1 M NaOH ile pH 8.8' e getirdi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı.

0.01 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH 6.0): 0,8899 g(0.005 mol) Na₂HPO₄.2H₂O 450 mL distile suda çözülerek, 1 M HCl ile pH 6.0' a getirildi ve son hacim 500 mL' ye tamamlandı.

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0.1 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 8.0); 14,2 g (0.1 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 950 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH 8.0' e getirildi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı.

Hidrofobik jele bağlanmış bGST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon: 0,1 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 8.0); 28,4 g (0.2 mol) Na_2HPO_4 1950 mL distile su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile pH 8' e getirildi ve son hacim 2 L ' ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürülmesi sonucu oluşan çökeleğin alındığı tampon: 0,1 Fosfat tamponu (pH 6,5); 8,709 g (0.05 mol) K_2HPO_4 450 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH 6.5' e getirildi ve son hacim 500 mL' ye tamamlandı.

Kantitatif protein tayini için kullanılan çözelti: Coomassie brilliant blue çözeltisi; 10 mg Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi 25 mL %95' lik etanol içerisinde çözüldü. Çözeltiye 50 mL %95' lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

bGST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

0,1 M Fosfat tamponu (pH 6.5); 17,418 g (0.1 mol) K_2HPO_4 950 mL distile su içerisinde çözülerek pH 6.5' e getirildi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı.

0,2 M L-Glutatyon Hazırlanışı; 0,6146 g (0.002 mol) L-glutatyon 9 mL distile suda iyice çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 10 mL' ye tamamlandı.

0,1 M CDNB' nin Hazırlanışı; 1,01 g (0,005 mol) 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB) alınarak bir miktar etanol içerisinde hafif ısıyla beraber çözünür. Toplam hacim etanol ile 50 mL' ye tamamlanır.

Aktivite ölçümünde saf etanol kullanıldı.

Karaciğer dokusundan homojenat hazırlamak için kullanılan çözelti: 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH 7,5); 0,6057 g Tris 950 mL distile suda çözülerek pH 7,5' e getirildi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı.

İnhibitör çözeltileri: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan ağır metaller 0.1 M olacak şekilde hazırlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

| | |
|-------------------------|---------|
| Gliserol | 2,0 mL |
| %10' luk SDS | 4,0 mL |
| Bromofenol mavisi | 0,01 mL |
| β -merkaptoetanol | 1,0 mL |
| Distile su | 0,5 g |
| 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) | 2,5 mL |

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

| | |
|----------|--------|
| Tris-Baz | 3,0 g |
| Glisin | 14,4 g |
| SDS | 10g |

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığılma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanım miktarları tablo 1.1' de verilmiştir.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0,33 g Coomassie brilliant blue G-250, 60 mL metanol de çözüldü. Bu çözeltiye 12 mL saf asetik asit ve 60 mL saf su ilave edildi.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 saf su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Tablo 2.2: SDS-PAGE' de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

| | Ayırma jeli | Yığıma jeli |
|--|--------------------|--------------------|
| | % 10 | % 3 |
| <u>Akril amid/Bis(% 30)</u> Akril amid 15g Bis 0,4 g Son hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlanır. | 3,33 mL | 0,52 mL |
| <u>Distile su</u> | 4 mL | 2,44 mL |
| <u>1,5M Tris-HCl (pH 8.8)</u> 11,82 g Tris-HCl alınarak 45 mL saf suda çözülür ve çözeltinin pH 8.8 'e NaOH ile getirildi ve hacmi 50 mL tamamlandı. | 2,5 mL | - |
| <u>0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u> 3,94 g Tris-HCl alınarak 45 mL distile suda çözülür ve çözeltinin pH 6.8'e getirilerek hacmi 50 mL tamamlandı. | - | 1 Ml |
| <u>%10'luk SDS</u> 1 g SDS az miktarda saf sui le çözülerek son hacim 10 mL getirildi. | 0,1 mL | 40µL |
| <u>TEMED</u> | 5 µL | 4 µL |
| <u>%10'luk amonyum persülfat</u> 1 g Amonyum persülfat alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde distile suda çözüldü. | 150 µL | 80 µL |

2.2 Yöntemler

2.2.1 bGST Enziminin Saflaştırılması

2.2.1.1 Homojenizatın Hazırlanışı

Enzim kaynağı olarak yerel besi çiftliğinden alınan Broyler karaciğeri kullanıldı. GST, saflaştırılmadan önce homojenize edildi. Bu amaçla karaciğer küçük parçalara ayrıldı ve daha sonra sıvı azot ile hücre zarları parçalandı. 50 mM Tris-HCl tamponu eklenerek blender yardımıyla homojenize edildi. Homojenat tülbent ile süzüldükten sonra, süzüntü 12.158 xg + 4° C’ de 1 saat santrifüj edildi ve çökelti atıldı. Böylece homojenat elde edilmiş oldu.

2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürülmesi

Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisinden (HEK) önce enzim içeren homojenizat tuz ile çöktürme işlemine maruz bırakılmıştır. Bu amaçla %20-80 arası amonyum sülfat kullanılmıştır. İlgili tuz konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Homojenizat hacmi

S₁: Amonyum sülfat doygunluğu (1’in kesri)

S₂: Amonyum sülfat doygunluğu (2’in kesri)

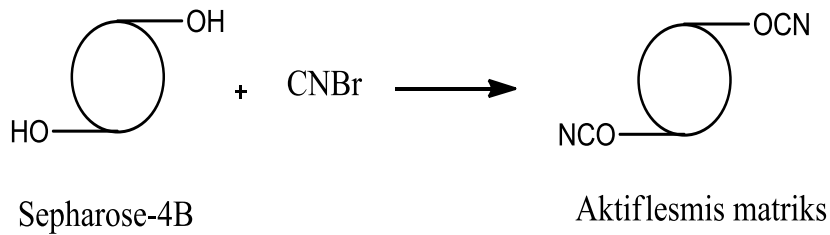
2.2.1.3 Sentezlenen HEK Kolonu ile bGST Enziminin Saflaştırılması

Bu çalışmada araştırma grubumuz tarafından daha önce sentezlenen HEK jeli, aynı metoda göre tarafımızdan sentezlenmiştir [104]. Söz konusu jel 1,5-10 cm boyutundaki kolona uygun bir şekilde paketlenildi. 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) tamponu ile dengelendi. %80 amonyum sülfat ile çöktürülmüş enzim çözeltisi herhangi bir işlem yapılmadan direkt kolona tatbik edilmiştir. Dengeleme tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Elüsyon işlemi, gradient mikser cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elüsyon tamponu, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) içeren çözelti ve tuz içermeyen 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) gradienti şeklinde kullanıldı. Eluatlar 2 mL' lik fraksiyonlar halinde toplandı. Elüsyon işlemi tamamlandıktan sonra her bir fraksiyonda kalitatif protein tayini (280 nm) ve aktivite tayini (Bölüm 2.2.5' de gösterildiği gibi) yapıldı. Son olarak belirli düzeyde aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi.

2.2.2 bGST Enziminin Saflaştırılması Kullanılan Hidrofobik Jelin Sentezi

2.2.2.1 Sepharose 4B' nin Aktivasyonu

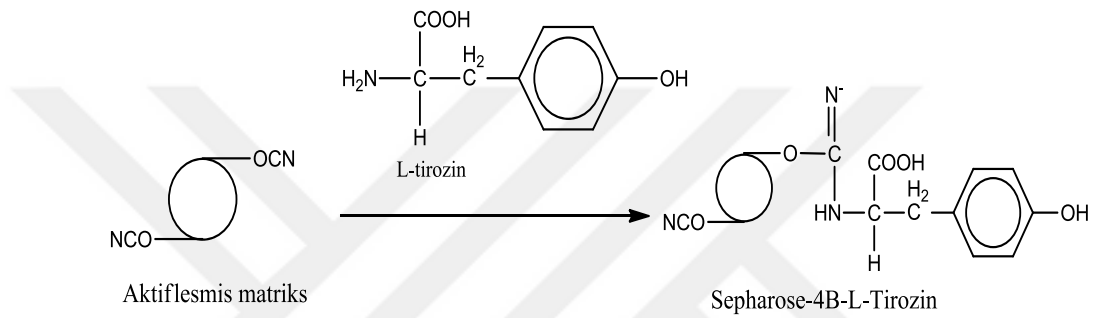
20 mL Sepharose 4B, saf su ile yıkanarak dekantasyon işlemi gerçekleştirildi. 20 mL destile su katılarak 8 g CNBr ilave edildi. Karışımın pH' ı 11 olacak şekilde konsantre NaOH kullanılarak ayarlandı. Aktivasyon işlemi pH sabit oluncaya kadar devam edilirdi. Daha sonra süzülen jel süspansiyonu önce saf su daha sonra 1M NaCO_3 (pH 10.00) ile yıkama işlemi gerçekleşti.



Şekil 2.1 : Sepharose 4B' nin aktivasyonu.

2.2.2.2 Uzantı Kolu Olarak L-Tirozinin Bağlanması

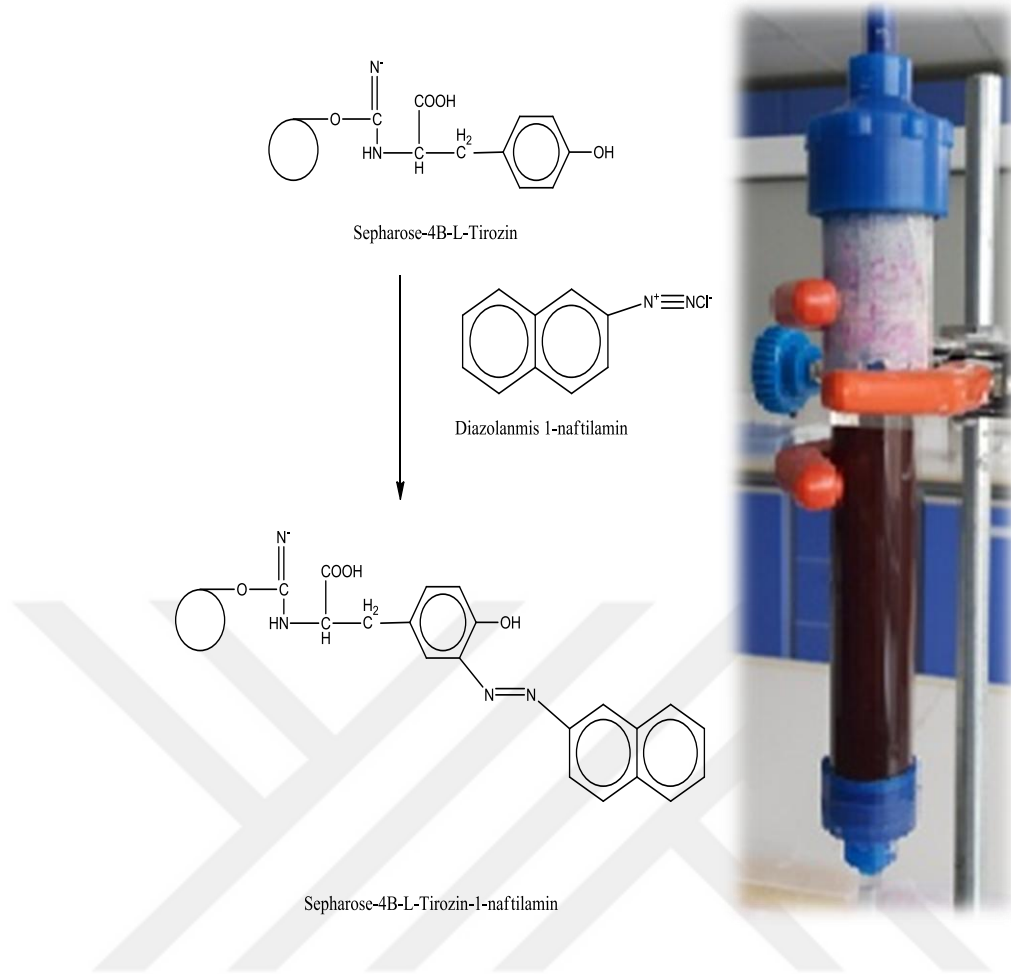
Aktifleştirilmiş matriks ile 40 mL 0,030 g tirozin (0,1 M NaCO₃ tamponu içinde çözülmüş, pH 10.00) 90 dakika karıştırıldı. Daha sonra 1 gece bekletildi. Bekletme sürecinden sonra süspansiyon bol su ile yıkandı. Yıkama suyu 280 nm’ de absorbans vermeyinceye kadar yıkama işlemine devam edildi. Bu süreçte matrikse bağlanmayan L-tirozin uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile tekrarlandı. Uzantı kolu bağlanmış matriks 0,2 M NaHCO₃ pH 8.0 olan tampon içerisine alındı.



Şekil 2.2: L-tirozinin bağlanması.

2.2.2.3 Ligand Olarak Kullanılan 1-Naftilamin Kenetlenmesi

5 mg 1- Naftilamin yaklaşık 0°C civarında 20 mL 1 mL HCl içerisinde çözüldü. Kısa sürede (10 dakika) diazolanmış ligand jel süspansiyonuna katıldı. Bu sırada pH 9.52’ de sabit tutularak 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra önce saf su ile ardından 0,01 M Na₂HPO₄ (pH 6.0) tamponu ile yıkanarak jel sentezi tamamlandı.



Şekil 2.3: 1-Naftilamin kenetlenmesi.

2.2.3 bGST Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Saflığının Kontrolü

Araştırmamızda %3 ve %10 akrilamid konsantrasyonlarında kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez işlemi, sabitlenen elektrofrezin dökme aparatına Tablo 1’ de belirtilen çözeltiler sırasıyla pipetlendi. Bu işlem esnasında Elektrofrez için son derece önemli olan hava kabarcıklarının bulunmamasına azami dikkat edildi. Hazırlanan ayırma jelinin polimerizasyonu için 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra yağma jeli dökülerek tarak dikkatlice yerleştirildi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra çıkarılan tarak sonucu oluşan bölümler numune tatbik edildi.

Elektrofrez işleminde numunelerin hazırlanması için araştırma grubumuz tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi [106].

2.2.4 Protein Tayini

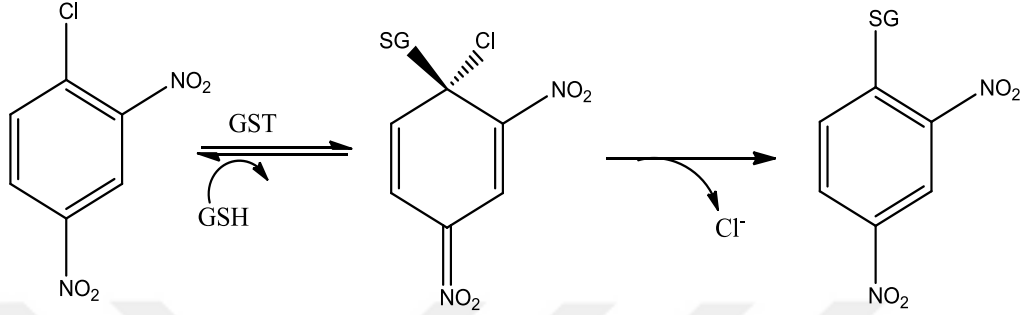
Araştırmamızda numunelerdeki protein tayini iki farklı metot kullanılarak yapılmıştır. Bu metotlardan 280 nm' de gerçekleştirilen kalitatif protein tayini saflaştırma sırasında her bir fraksiyon için yapılmıştır. Bu tekniğin esası protein yapısında bulunan aromatik rezidülerinin (tirozin – triptofan ve fenilalenin) 280 nm' deki absorpsiyonuna dayanır.

Saflaştırma verimi ve derecesi hesaplamakta kullanılan protein miktarı Bradford yöntemine göre hesaplanmıştır. Bu yöntemin esası Coomassie brilliant blue G- 250' nin proteinle yaptėı kompleksin 595 nm' deki absorpsiyonuna dayanır.

Bu amaçla, standart serum albümin zelteleri farklı miktarlarda (0– 100 μ L) 10 mL' lik tüplere alındı. Tüplerin hacimleri saf su ile 100 μ L' ye tamamlandı. Tüplere 5 mL renk reaktifi eklenerek 10 dakika vorteks ile karıştırıldı. Her bir tp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm' de absorbans ölümleri gerçekleştirildi. Protein konsantrasyonu OD595 değerleri kullanılarak standart grafik hazırlandı. Aynı işlem homojenizat ve saf enzim kullanılarak OD595 değerleri saptandı. Hazırlanan standart grafiğin denkleminde protein tayini belirlenmiştir.

2.2.5 bGST Enziminin Aktivite Ölçümü

bGST enzim aktivitesi Habig ve ark. yöntemine göre gerçekleştirilmiştir [107]. Bu yöntem CDNB ve GSH konjugasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutatyonunun 340 nm’deki absorpsiyon ölçümüne dayanır.



Şekil 2.4: GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan mekanizması.

bGST aktivitesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları Tablo 2.3’de verilmiştir. Ölçüm prosedürü genel olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponu (pH 6.5), GSH 20 mM ve CDNB 25 mM ve 5 µL saf alkol eklenerek hazırlanan reaksiyon karışımına 50 µL saflaştırılmış bGST’ nin katılmasıyla 340 nm’deki absorbans değişikliği kaydedilmiştir.

Tablo 2.3: GST aktivite ölçüm prosedürü.

| Küvet içeriği | Numune |
|----------------------|--------|
| 0,1 M Fosfat Tamponu | 900 µL |
| 25mM CDNB | 15 µL |
| Saf etil alkol | 5 µL |
| 20mM L-Glutatyon | 30 µL |
| Enzim Numunesi | 50 µL |

2.2.6 bGST Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar

L-glutasyon (GSH) ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratları kullanılarak K_M ve V_{max} değerleri saptandı. Ayrıca bazı metal iyonları için, IC_{50} değerleri de hesaplandı.

2.2.6.1 K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

bGST enziminin CDNB ve GSH substratlarının K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla sabit GSH konsantrasyonunda CDNB' nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümü yapıldı (Tablo2.4). Elde edilen değerlerle Linewear – Burk grafiği çizilerek CDNB için K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Benzer şekilde sabit CDNB konsantrasyonunda GSH' in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümü yapılarak (Tablo.2.5) Linewear – Burk grafik çizildi ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri bulundu.

Tablo 2.4 : Değişken GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi.

| 0,1 M Fosfat Tamponu (μ L) | 0,1 M CDNB (μ L) | Etanol (μ L) | 0,2 M GSH (μ L) | Enzim (μ L) |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| 865 | | | 15 | |
| 867 | | | 13 | |
| 870 | 15 | 5 | 10 | 100 |
| 873 | | | 7 | |
| 875 | | | 5 | |

Tablo 2.5 : Değişken CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi.

| 0,1 M Fosfat Tamponu (μL) | 0,1 M CDNB (μL) | Etanol (μL) | 0,2 M GSH (μL) | Enzim (μL) |
|---|---|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| 840 | 15 | | | |
| 842 | 13 | | | |
| 845 | 10 | 5 | 40 | 100 |
| 848 | 7 | | | |
| 850 | 5 | | | |

2.2.7 Bazı Ağır Metal İyonlarının bGST Enzimi Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2} ağır metal iyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla en az 5 farklı konsantrasyonda her bir metal ilave edildi. Enzim aktiviteleri Tablo 2.6' da belirtildiği şekilde ölçüldü. Metal iyonu katılmadan ölçülen enzim aktivitesi kontrol olarak kullanıldı. IC_{50} değerleri %aktivite metal iyonu konsantrasyonları grafiklerinden hesaplandı.

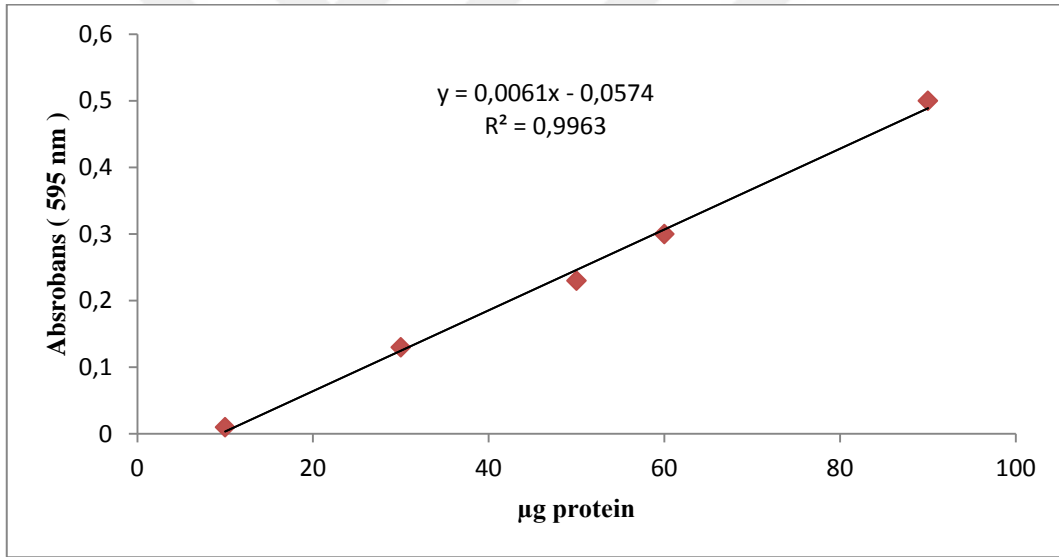
Tablo2.6 : bGST enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

| 0,1 M Fosfat Tamponu (μL) | 0,1M CDNB (μL) | Etanol (μL) | 0,2 M GSH (μL) | Metal İyonunun Hacmi (μL) | Enzim (μL) |
|---|--|---------------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| 850 | | | | - | |
| 845 | | | | 5 | |
| 840 | | | | 10 | |
| 835 | | | | 15 | |
| 830 | 15 | 5 | 30 | 20 | 100 |
| 825 | | | | 25 | |
| 820 | | | | 30 | |
| 815 | | | | 35 | |
| 810 | | | | 40 | |

3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

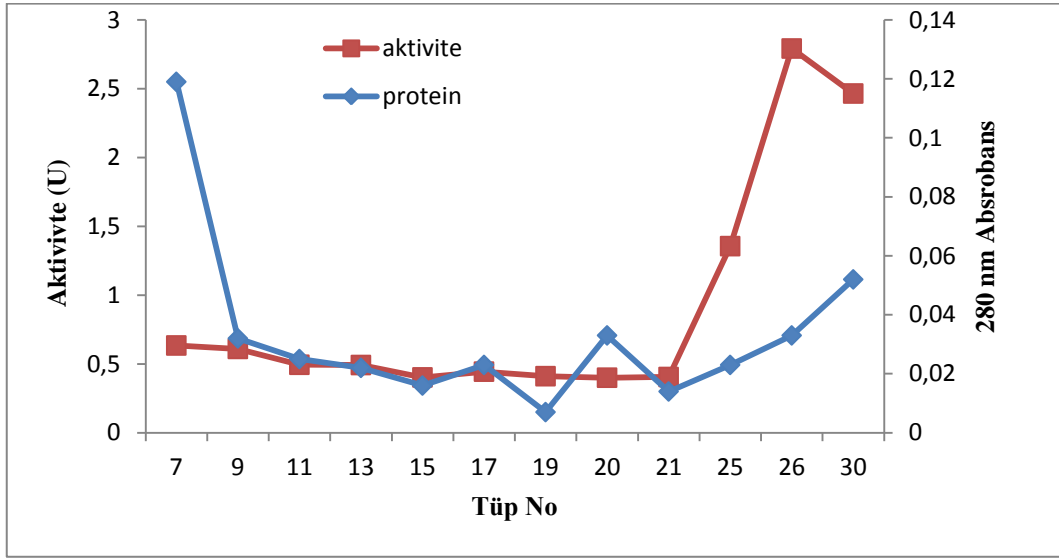
HEK kolonuna tatbik edilen ham ekstrakt ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Standart grafik bölüm 2.2.4' de belirtildiği gibi hazırlandı. Amonyum sülfat çöktürülmesi ve HEK sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten saptandı. Söz konusu standart grafik şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1: Bradford yönteminde kullanılan grafik.

3.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile bGST Enziminin Saflaştırılması

Dengelenen HEK kolonuna homojenat yüklendi. Kolon bölüm 2.2.1.3' de açıklandığı gibi uygun tamponla yıkandı ve bGST enzimi gradientli elüsyon yapılarak, eluatlar 2 ml' lik tüpler halinde toplandı. Elüe edilen her bir eluatın 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 340 nm' de aktivitelerine bakıldı. İlgili saflaştırma grafiği şekil 3.2'de verilmiştir.



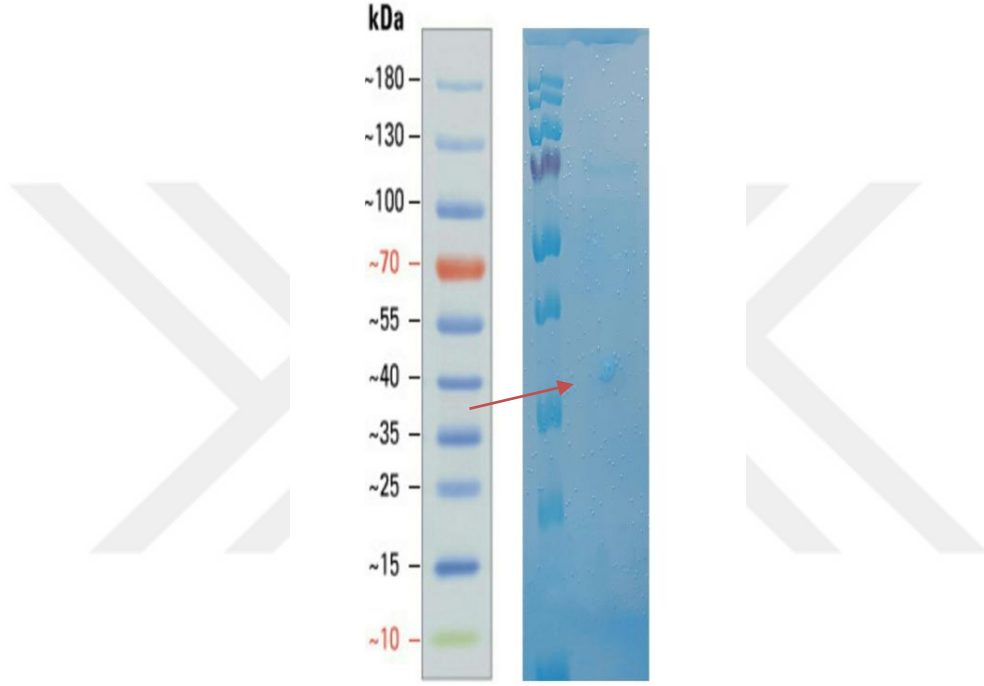
Şekil 3.2 : HEK kolonunda bGST enziminin elüsyon grafiği.

Tablo3.1: bGST enziminin saflaştırma değerleri.

| Saflaştırma Basamağı | Hacim (mL) | Aktivite ($\mu\text{mol/mLdk}$) | Toplam Aktivite | Protein Miktarı (mg/mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite(U/mgprotein) | Saflaştırma Derecesi |
|-------------------------------------|-------------------|---|------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Amonyum sülfat Çöktürmesi | 3 | 5,28 | 15,84 | 926,3 | 27 789 | $5,70 \times 10^{-3}$ | - |
| Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi | 2 | 1,24 | 2,48 | 75,5 | 151 | 0,016 | 2,8 |

3.3 bGST Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

bGST enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 2.2.3 de belirtildiği gibi elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırasıyla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 3.3' de gösterilmiştir.



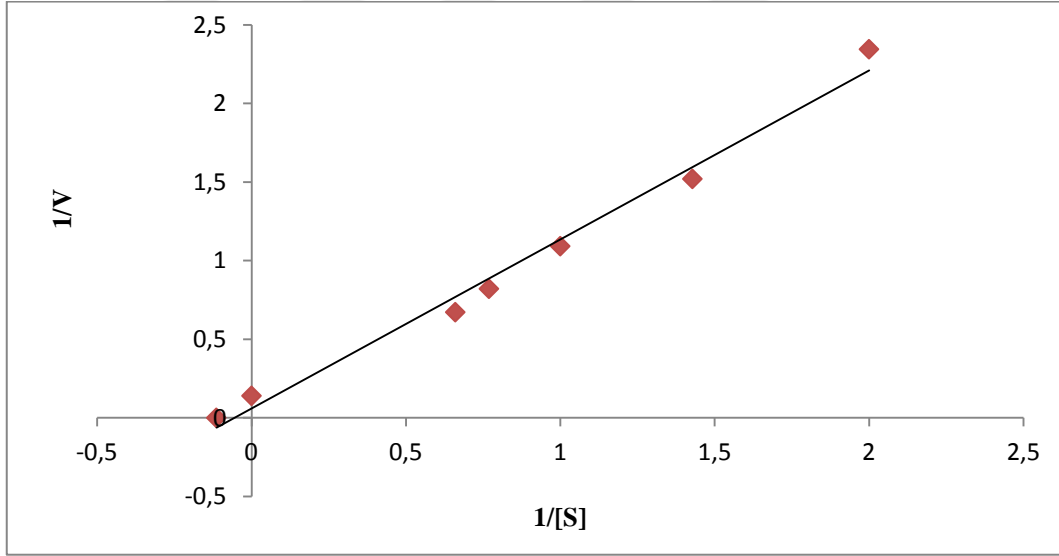
Şekil 3.3: HEK ile saflaştırılan bGST enziminin SDS- poliakrilamid jel elektroforezi.

3.4 CDNB ve GSH Substratları için K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

bGST enziminin GSH ve CDNB substratlarının K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 2.2.6.1' de belirtildiği gibi sabit GSH konsantrasyonunda CDNB' nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerle (Şekil 3.4) $1/V$ ve $1/[S]$ ' e karşı Lineweaver grafiği çizilerek CDNB için K_M ve V_{max} değerleri saptandı. Enzimin bir diğer substratı olan GSH için benzer şekilde (Şekil 3.5) K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda CDNB için K_M değeri 8,77 mM ve V_{max} değeri 7,14 EÜ/ mL; GSH için ise K_M değeri 0,97 mM ve V_{max} 1,36 EÜ/mL olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar tablo 3.2 ve 3.3' de gösterildi.

Tablo 3.2: bGST enziminin CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan $1/V - 1/[S]$ değerleri.

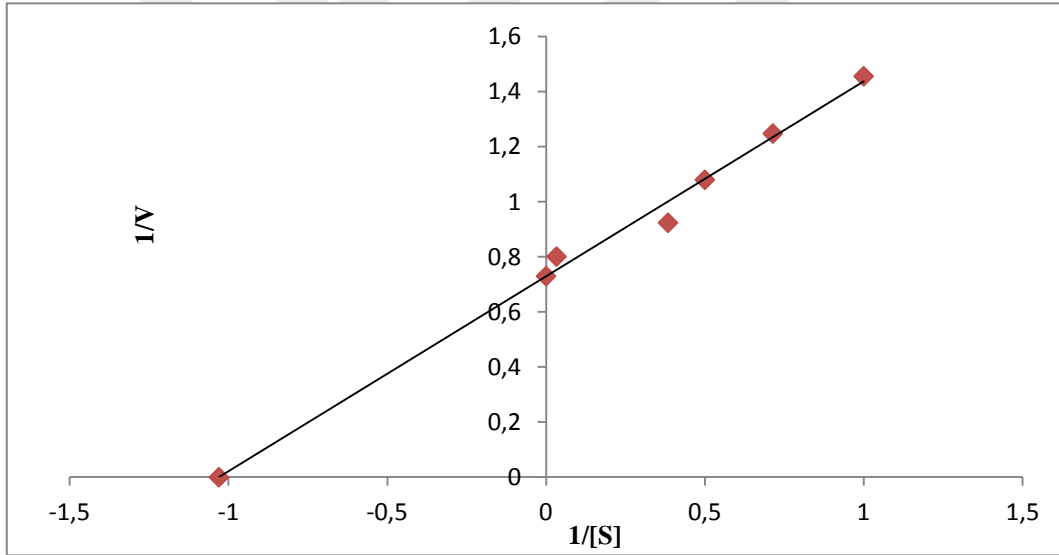
| Değişken CDNB Konsantrasyonu (mM) | $1/[S]$ | ΔA (340nm) | Aktivite ($\mu\text{mol/ml/min}$) | $1/V$ |
|-----------------------------------|---------|--------------------|-------------------------------------|-------|
| 1,5 | 0,6 | 0,143 | 1,487 | 0,672 |
| 1,3 | 0,7 | 0,117 | 1,216 | 0,822 |
| 1 | 1 | 0,088 | 0,915 | 1,092 |
| 0,7 | 1,4 | 0,063 | 0,655 | 1,526 |
| 0,5 | 2 | 0,041 | 0,426 | 2,347 |



Şekil 3.4: CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.

Tablo 3.3: bGST enziminin GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan $1/V - 1/[S]$ değerleri.

| Değişken GSH Konsantrasyonu (mM) | $1/[S]$ | ΔA (340nm) | Aktivite ($\mu\text{mol/ml/min}$) | $1/V$ |
|----------------------------------|---------|--------------------|-------------------------------------|-------|
| 3 | 0,33 | 0,120 | 1,248 | 0,801 |
| 2,6 | 0,38 | 0,104 | 1,082 | 0,924 |
| 2 | 0,5 | 0,089 | 0,925 | 1,081 |
| 1,4 | 0,7 | 0,077 | 0,801 | 1,248 |
| 1 | 1 | 0,066 | 0,686 | 1,457 |



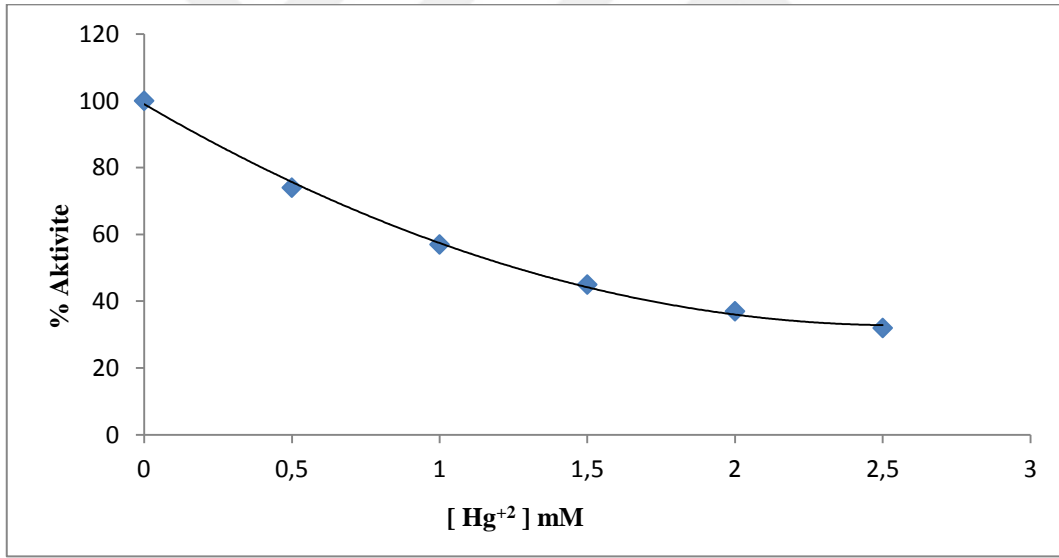
Şekil 3.5: GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.

3.1 bGST Enzimi Üzerinde Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesi

bGST üzerinde çalışılan ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi için bölüm 2.2.7' de anlatıldığı gibi en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteleri ölçüldü. % Aktivite- [I] değerleri (Tablo 3.4– Tablo 3.14) ile grafikler çizildi. (Şekil 3.6 – 3.16) . Bu grafiklerden IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 3.15).

Tablo 3.4: Hg⁺² nın bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

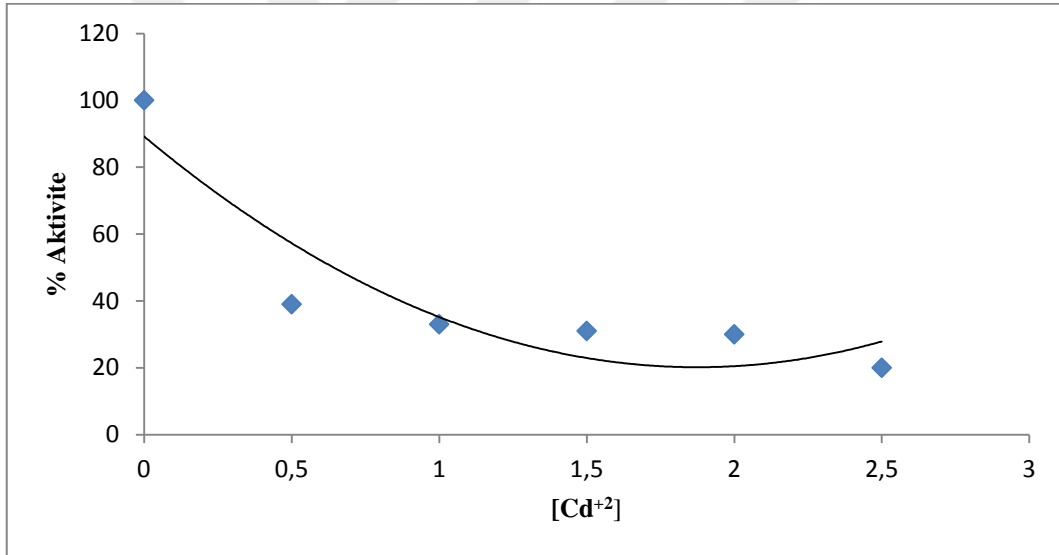
| Metal Çözeltisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|-------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,132 | 1,37 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,098 | 1,01 | 74 |
| 10 | 1 | 0,075 | 0,78 | 57 |
| 15 | 1,5 | 0,059 | 0,61 | 45 |
| 20 | 2 | 0,049 | 0,50 | 37 |
| 25 | 2,5 | 0,042 | 0,43 | 32 |



Şekil 3.6: Hg⁺² iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.5: Cd⁺² un bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

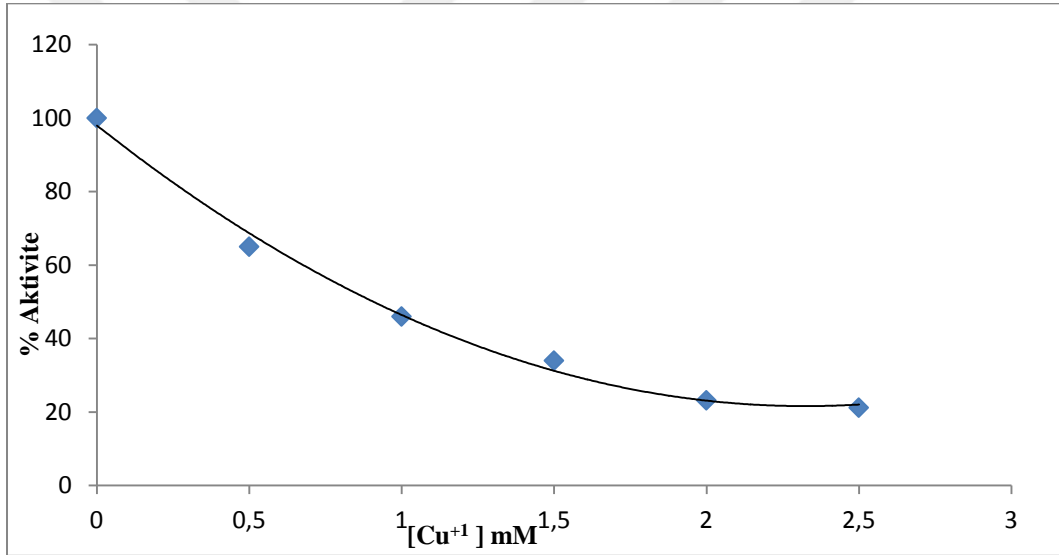
| Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|---------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,061 | 0,634 | 39 |
| 10 | 1 | 0,051 | 0,530 | 33 |
| 15 | 1,5 | 0,048 | 0,499 | 31 |
| 20 | 2 | 0,046 | 0,478 | 30 |
| 25 | 2,5 | 0,031 | 0,322 | 20 |



Şekil 3.7: Cd⁺² iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.6: Cu^{+1} in bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

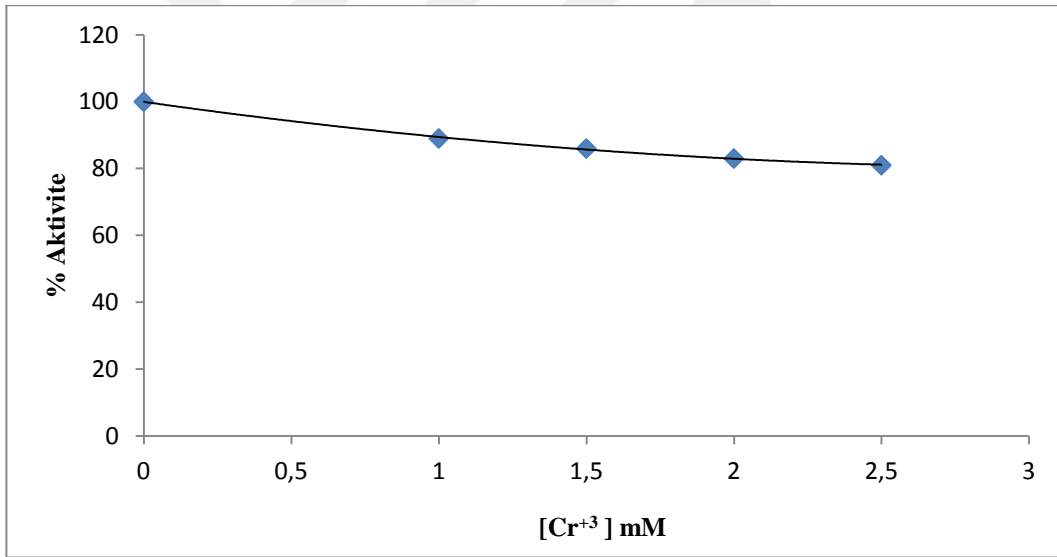
| Metal Çözeltisinin Hacmi (μl) | Küvetteki Metal Konsantrasyon [I](mM) | ΔA (340nm) | Aktivite ($\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$) | % Aktivite |
|--|---------------------------------------|--------------------------|---|------------|
| - | - | 0,155 | 1,61 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,1 | 1,04 | 65 |
| 10 | 1 | 0,071 | 0,73 | 45 |
| 15 | 1,5 | 0,052 | 0,54 | 34 |
| 20 | 2 | 0,036 | 0,37 | 23 |
| 25 | 2,5 | 0,033 | 0,34 | 21 |



Şekil 3.8: Cu^{+1} iyonunun % Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.7: Cr⁺³ un. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

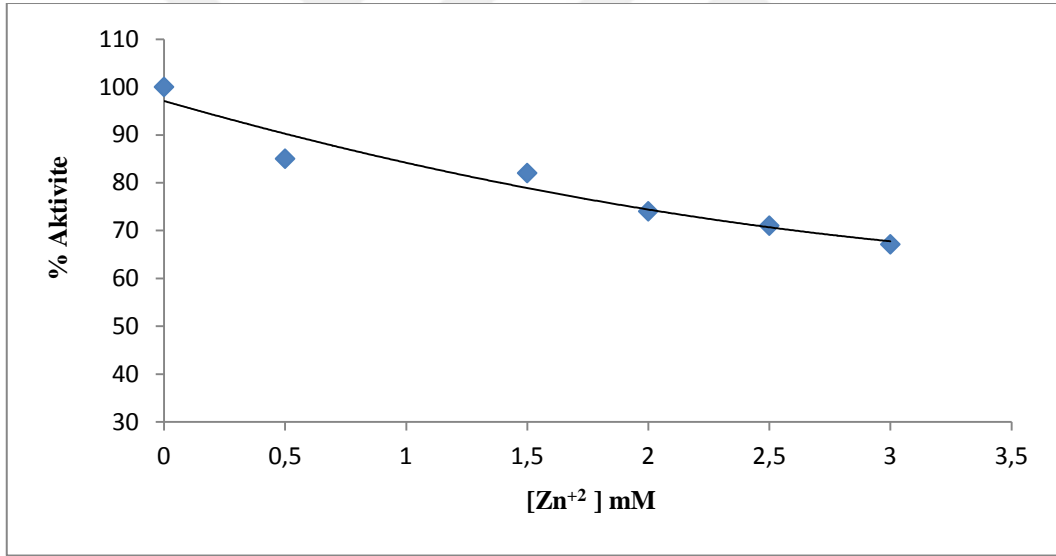
| Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|---------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 10 | 1 | 0,138 | 1,435 | 89 |
| 15 | 1,5 | 0,134 | 1,393 | 86 |
| 20 | 2 | 0,128 | 1,331 | 83 |
| 25 | 2,5 | 0,126 | 1,310 | 81 |



Şekil 3.9: Cr⁺³ iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.8: Zn^{+2} nun bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

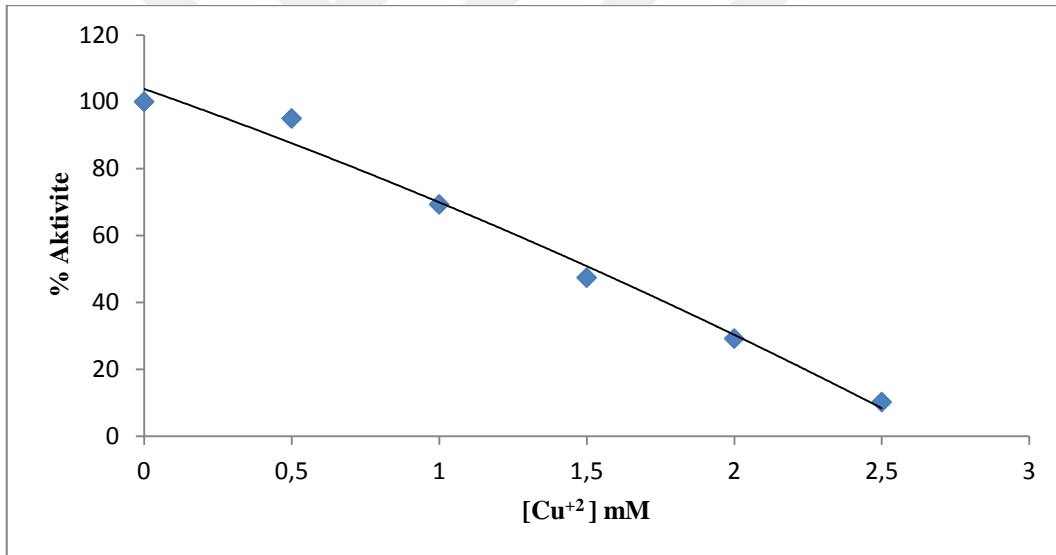
| Metal Çözeltilisinin Hacmi (μ L)) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (μ mol/mL/min) | % Aktivite |
|--|---|--------------------|------------------------------|------------|
| - | - | 0,137 | 1,42 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,116 | 1,20 | 85 |
| 15 | 1,5 | 0,112 | 1,16 | 82 |
| 20 | 2 | 0,102 | 1,06 | 75 |
| 25 | 2,5 | 0,097 | 1,00 | 70 |
| 30 | 3 | 0,092 | 0,95 | 67 |



Şekil 3.10: Zn^{+2} iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.9: Cu^{+2} m. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

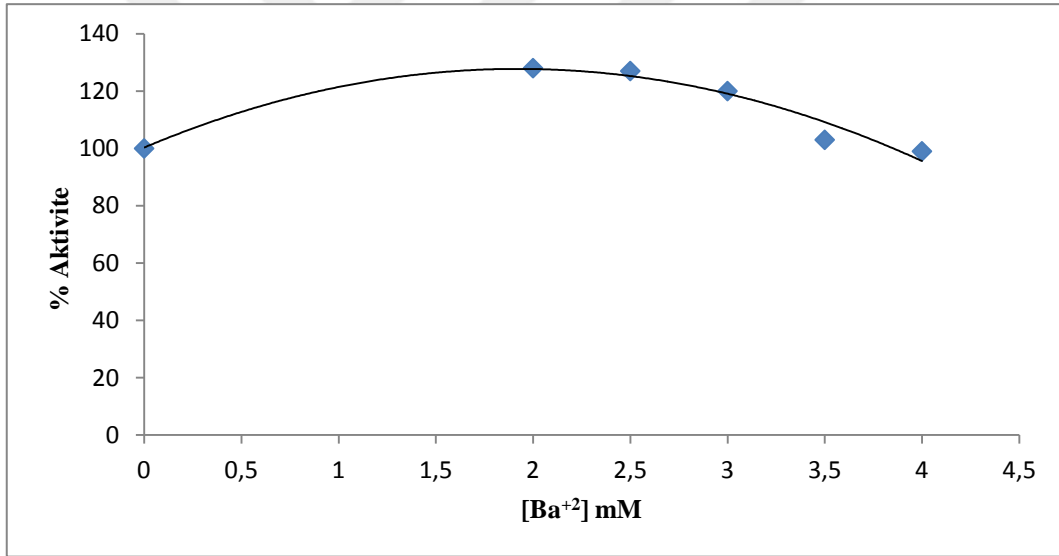
| Metal Çözeltisinin Hacmi (μl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$) | % Aktivite |
|--|---|--------------------------|-------------------------------------|------------|
| -- | - | 0,137 | 1,424 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,130 | 1,352 | 95 |
| 10 | 1 | 0,095 | 0,988 | 69 |
| 15 | 1,5 | 0,065 | 0,676 | 47 |
| 20 | 2 | 0,040 | 0,416 | 29 |
| 25 | 2,5 | 0,014 | 0,145 | 10 |



Şekil 3.11: Cu^{+2} iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.10: Ba²⁺ un bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

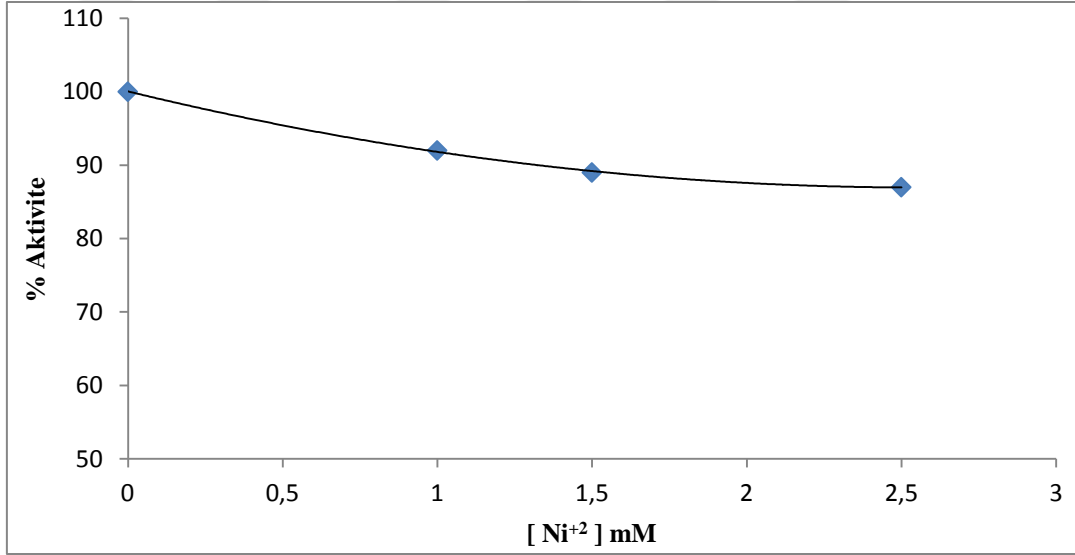
| Metal Çözeltisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/ml/min) | % Aktivite |
|-------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 20 | 2 | 0,198 | 2,059 | 128 |
| 25 | 2,5 | 0,197 | 2,048 | 127 |
| 30 | 3 | 0,187 | 1,944 | 120 |
| 35 | 3,5 | 0,161 | 1,674 | 103 |
| 40 | 4 | 0,153 | 1,591 | 99 |



Şekil 3.12: Ba²⁺iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.11: Ni²⁺'in bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

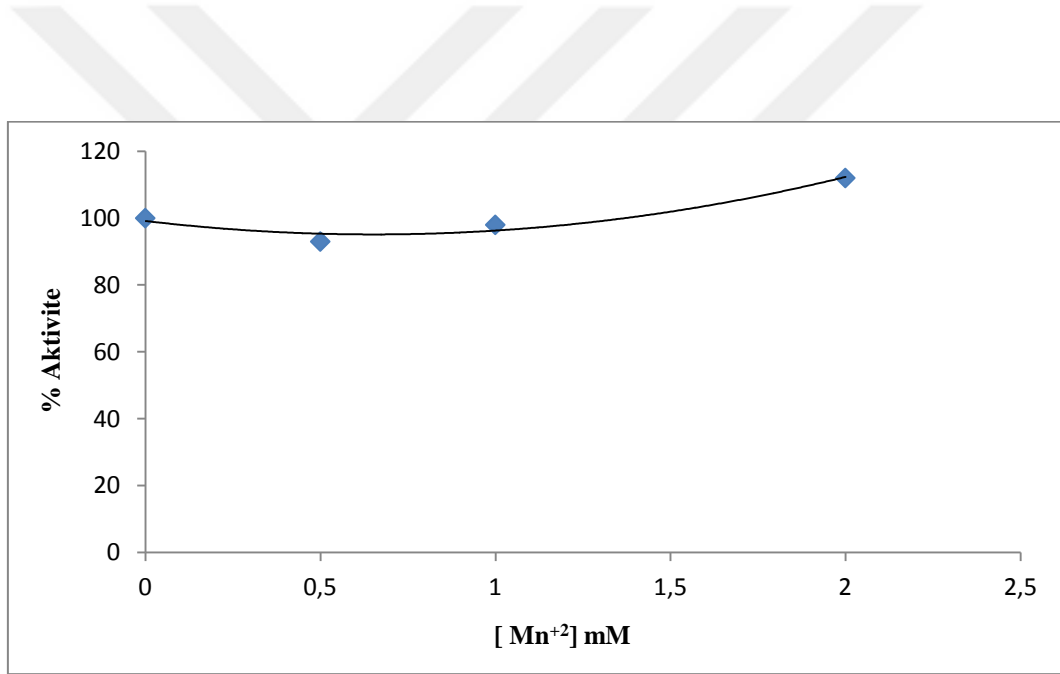
| Metal Çözeltisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|-------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 10 | 1 | 0,143 | 1,487 | 92 |
| 15 | 1,5 | 0,138 | 1,435 | 89 |
| 20 | 2 | 0,135 | 1,404 | 87 |



Şekil 3.13: Ni²⁺iyonunun% Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.12: Mn^{+2} nın bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

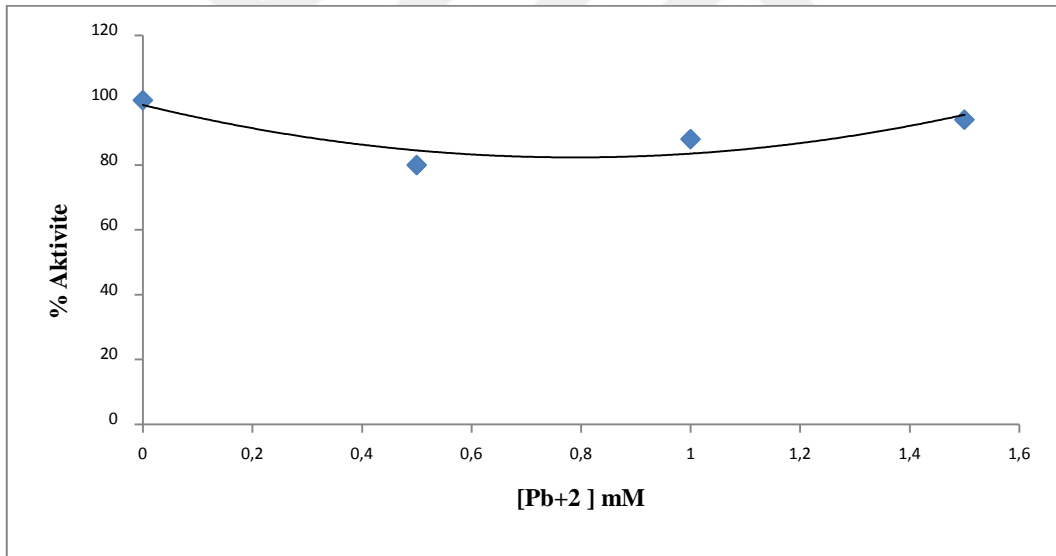
| Metal Çözeltilisinin Hacmi (μ l) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (μ mol/ml/min) | % Aktivite |
|---------------------------------------|---|--------------------|------------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,144 | 1,4976 | 93 |
| 1 | 1 | 0,152 | 1,580 | 98 |
| 2 | 2 | 0,174 | 1,809 | 112 |



Şekil 3.14: Mn^{+2} iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.13: Pb⁺² nun. bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

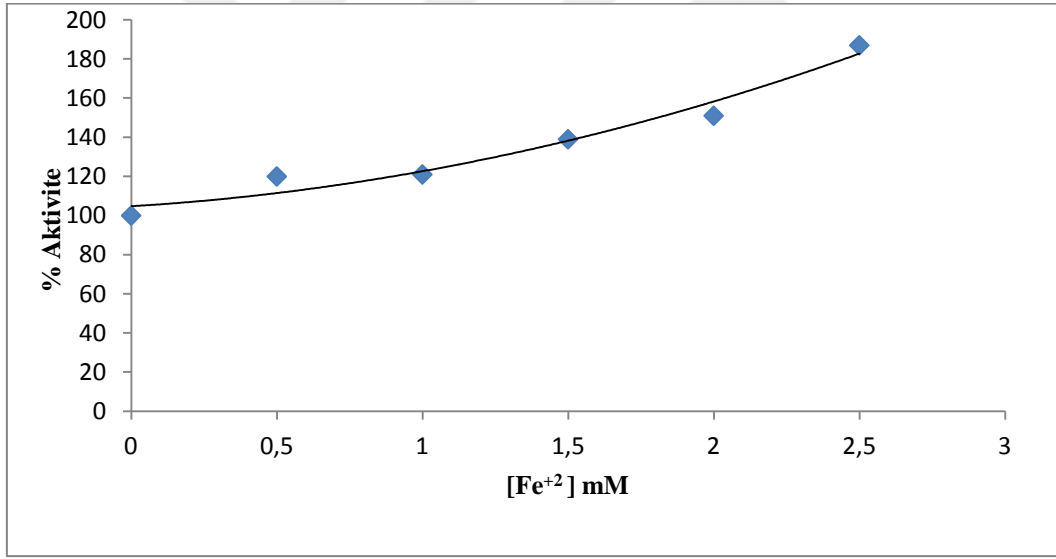
| Metal Çözeltisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|-------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,155 | 1,612 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,123 | 1,279 | 80 |
| 1 | 1 | 0,136 | 1,414 | 88 |
| 1,5 | 2 | 0,145 | 1,508 | 94 |



Şekil 3.15: Pb⁺² iyonunun %Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.14: Fe⁺²'nin bGST enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

| Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl) | Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (340nm) | Aktivite (µmol/mL/min) | % Aktivite |
|---------------------------------|---|------------|------------------------|------------|
| - | - | 0,13 | 1,424 | 100 |
| 5 | 0,5 | 0,16 | 1,705 | 120 |
| 10 | 1 | 0,16 | 1,726 | 121 |
| 15 | 1,5 | 0,19 | 1,976 | 139 |
| 20 | 2 | 0,207 | 2,152 | 151 |



Şekil 3.16: Fe⁺² iyonunun % Aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.15: bGST enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarına ait değerler.

| Metal iyon | IC ₅₀ | IC ₈₀ |
|------------------|------------------|------------------|
| Cd ⁺² | 0,64 mM | |
| Cu ⁺¹ | 0,84 mM | |
| Cu ⁺² | 1,53 mM | |
| Cr ⁺³ | | 0,10 mM |
| Hg ⁺² | 1,2 Mm | |
| Zn ⁺² | | 1,5 Mm |

Etkisi incelenen metal iyonlarından Ba⁺² ve Ni⁺², nin bGST üzerinde önemli bir etki göstermediği tarafımızca saptanmıştır. Ca⁺², Fe⁺², Pb⁺² ve Mn⁺² iyonlarının ise enzim üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ilk defa Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılarak direkt karaciğerden GST enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim üzerinde Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Araştırmamızda enzim kaynağı olarak Broyler karaciğeri kullanılmıştır. Üretiminin kolay ve hızlı olmasının yanında maliyetininde düşük olması, hayvansal protein açığının kapatılmasında Broyler üretimi önemli bir sektör haline gelmiştir. Ancak daha fazla üretim yapma kaygısı ile kullanılan ilaçlar ve çevre kirleticilerin yemlerde bulunma olasılığı ve kullanılan dezenfektanlar gibi faktörlerin etkisi ile söz konusu hayvanlar sürekli ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır[4,5].

Bu nedenle araştırmamızda GST' nin ağır metallerle karşı afinitesi araştırılmıştır. GST, giriş bölümünde de belirtildiği gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Bunlardan en önemlisi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda Faz II aşamasında önemli rol oynar [40,41] Buna ilaveten GSH-bağımlı peroksidaz aktivitesi ile birçok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinde antioksidan olarak fonksiyonu vardır [42]. Ayrıca farklı doymamış hidrokarbonların izomerleşmesinde de görev alır [43,44] Bu enzimlerin, non-katalitik aktiviteleri ile karsinojenik maddeleride dâhil birçok hidrofobik ligandı bağlayarak onların transportunda temel işlevleri vardır [45,46].

GST' lerin detoksifikasyon aktivitesi yanında, canlı organizmalarda metabolize edilemeyen lipofilik çoğu bileşiği bağlamaları ve bunların hücre içerisindeki mobilitelerini artırmaları kinetik öneme sahiptir [65]. Sıçan karaciğerinde karsinojenleri, bilirubini ve diğer azotlu bileşikleri bağlayan bir protein tanımlanmıştır [65]. Söz konusu proteinin GST-1 izoenzimi olduğu saptanmıştır [65]. Ayrıca bilirubin gibi çoğu pigment polisiklik aromatik hidrokarbonlar, kolik asitler ve proteinler tarafından bağlanarak taşındığı bilinmektedir [65]. Buna ilaveten GST' lerin sitoplazmada yüksek miktarda bulunması tıpkı albüminin kan dolaşımında üstlendiği rolü hücre içerisinde söz konusu enzimin yerine getirdiği düşüncesi ortaya konulmuştur [90]. Yapılan bir çalışmada “hem” bileşiğinin sentezinin son

aşamasında iç mitokondri zarından dışarıya hareketini GST' ler tarafından kolaylaştırdığı bulunmuştur. GST' lerin aynı zamanda bazı steroid hormonlarını da bağladığı tespit edilmiştir. Ancak bu olayın fizyolojik sonuçları tam olarak anlaşılamamıştır [71].

Bu ksenobiyotiklerin büyük bir kısmı Faz I ve Faz II evreleriyle dışarıya atılmaktadır. GST ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda anahtar role sahip bir Faz II enzimidir. GST etkisi ile söz konusu ksenobiyotiklere, glutasyon transfer edilerek, molekülün toksisitesi düştüğü gibi organizmadan atılması da kolay hale gelir [38-39]. Bu nedenle Broyler karaciğerinde GST aktivitesi oldukça önemlidir. Literatürde GST aktivitesi üzerine başta karaciğer olmak üzere birçok çalışmaya rastlamak mümkündür [75-82].

Araştırmamızda kullanılan ağır metallerin yapısı ve toksisitesi hakkında genel bilgiler bölüm 1. 3' de verilmiştir. Bu metal iyonlarının GST üzerindeki etkisini ortaya çıkartmanın oldukça önemli olduğu kanısındayız.

Araştırmamızda bGST enzimi hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılmıştır. Enzimin GSH dışında farklı hidrofobik substratları bağlama bölgesine sahip olması söz konusu tekniği uygulama düşüncesi geliştirmiştir. Araştırma grubumuz tarafından farklı hidrofobik jeller sentezlenerek değişik kaynaklardan birçok izoenzimin yüksek verimde saflaştırılması gerçekleştirilmiştir[104]. Bu amaçla sentezlenen Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin jeli kullanılarak bGST enzimi tarafımızdan saflaştırılmıştır.

Literatürde GST izoenzimlerinin saflaştırılması konusunda çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Bu çalışmalardan birinde balık bağırsak mukozosundan GST enzimi afinite tekniğiyle saflaştırılarak özellikleri aydınlatılmıştır. Kullanılan afinite kolonunun kimyasal yapısının, glutasyon-agaroz olduğu görülmektedir [75]. Bir başka çalışmada Angelucci ve ark. Levrek karaciğerinden GST enzimini yine aynı kromatografik teknik kullanılarak saflaştırmışlardır [76]. GST enziminin saflaştırılması konusunda bir diğer çalışmada, Down sendromlu çocukların eritrositlerinden enzim afinite tekniğiyle saflaştırılarak sağlıklı çocukların enzimleriyle karşılaştırılmıştır. Söz konusu çalışmada jelin yapısı diğer çalışmalarda da olduğu gibi glutasyon-agaroz şeklindedir [77].

GST enziminin saflaştırılması için anyon değişim kromatografisi tekniğide kullanılmıştır. Bu çalışmalardan birinde Kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan enzimin alt birimlerinin moleköl kütleleri 23-28 kDa olarak saptanmıştır [81]. Bir diğer çalışmada GST insan plasentasından afinite tekniğiyle %0,5 verimle 16 kat saflaştırılmıştır [78].

Afinite tekniğinde kullanılan gerek ligand ve gerekse matriks oldukça pahalı olduğu gibi sentez sırasındaki olumsuzluklar tekniğin uygulanışını sınırlandırmaktadır. HEK tekniğinde ise aynı jelle birçok enzimin daha ılıman koşullarda tarafımızdan saflaştırılması büyük avantajdır.

Araştırmamızda bGST enzimi için GSH ve CDNB substratlarının K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit GSH konsantrasyonunda, CDNB' nin 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak Linewear- Burk grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,77mM, 7,14 EÜ/ mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin bir diğer substratı olan GSH için benzer şekilde K_M değeri 0,97 mM ve V_{max} değeri de 1,36 EÜ/mL olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bGST enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan GSH substratına ilgisinin daha yüksek olduğu grlmektedir. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen enzimler için hesaplanan K_M ve V_{max} değerlerinin farklı olduğu grlmektedir. rnek olarak; E.coli ekstratlarından saflaştırılan GST enziminin CDNB ve GSH substratları için K_M değerleri sırasıyla 1,43 ve 0,33 mM olarak belirlenmiştir [80]. Farklı bir çalışmada ise Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığı karaciğeri GST enziminin CDNB ve GSH substratları için K_M değerleri yaklaşık olarak 0,42- 0,35 mM olarak belirtilmiştir[107]. Bu çalışmalarda enzimin GSH' a karşı afinitesinin CDNB' den daha yüksek olduğu grlmektedir. Söz konusu araştırmalar tarafımızca belirlenen değerlerle uyum içerisindedir. Ancak benzer şekilde çalışılan sığır karaciğerinden orange A agaroz tekniğiyle saflaştırılmış olan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için 1. izoenzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,55- 0,10 mM ve 320- 6,9 EÜ/mg olarak belirlenirken 2. izoenzim için olan değerler ise sırasıyla 0,83-0,165 mM ve 380- 0,86 EÜ/mg olarak belirlenmiştir [108]. Buna göre enzimin CDNB' ye karşı daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu grlmektedir.

Araştırmamızda kullanılan ağır metallere inhibisyon etkisi gösteren iyonların IC₅₀ ve IC₈₀ değerleri % Aktivite – metal iyonu konsantrasyonları grafiklerinden belirlenmiştir. Çalışılan konsantrasyonları (0,5- 4 mM) GST’ ye karşı en güçlü inhibitörün Cd⁺² olduğu saptanmıştır (IC₅₀: 0,64 mM). Cd⁺² genel olarak diğer kaynaklardan elde edilen GST’ ler üzerinde önemli ölçüde inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmektedir. Örnek olarak; Sheweita ve ark. ağır metallere fare karaciğerindeki GST enzimleri üzerine *in vivo* etkisini incelemiş, Cd⁺², ün GST aktivitesini test edilen diğer ağır metallere göre daha fazla inhibe ettiğini göstermiştir [109]. Tarafımızdan yapılan *in vitro* çalışmada da Cd⁺² iyonunun GST üzerinde en güçlü inhibitör olması oldukça dikkat çekicidir. Ancak bir başka çalışmada Cd⁺² nin GST üzerinde önemli bir etki göstermediği saptanmıştır [13].

Araştırmamızda elde edilen bir başka sonuç ise; Cu⁺¹, Cu⁺² ve Hg⁺² bGST üzerinde belirli ölçüde inhibitör etkisi gösterdiği bulunmuştur (IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,84- 1,53 ve 1,2 mM) . Söz konusu sonuçlara benzer şekilde Balık karaciğer GST’ si üzerinde Cu⁺² ve Hg⁺² nin güçlü bir inhibitör olduğu belirlenmiştir [13]. Bu çalışmadaki IC₅₀ değerleri elde ettiğimiz sonuçlarla belirli ölçüde benzerlik göstermektedir. Bir başka çalışmada Hindi karaciğer GST enzimi üzerinde Hg⁺² ve Cu⁺², in inhibisyon etkileri çalışmamızla büyük bir benzerlik göstermektedir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,37 ve 0,24 mM olduğu tespit edilmiştir [14].

Araştırmamızda bGST üzerinde Cr⁺³, ve Zn⁺² ün etkisi incelenmiştir. Çalışılan konsantrasyonlarda (0,5- 2,5 mM) IC₈₀ değerleri tespit edilmiştir.

bGST üzerinde etkisi incelenen metal iyonlarından Ba⁺² ve Ni⁺², in bGST üzerinde önemli bir etki göstermediği tarafımızca saptanmıştır. Ca⁺², Fe⁺², Pb⁺² ve Mn⁺² iyonlarının ise enzim üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi metal iyonlarının GST üzerindeki etkilerinde büyük farklılıklar vardır. Bu bulgular daha önce rapor edilen çalışmalarla uyum içerisindedir[17,20,109]. Bir metal iyonunun inhibisyonu, çözünürlüğü, absorbe olabilme kabiliyeti, transportu, kimyasal reaktivitesi ve kompleks oluşturma özelliği gibi faktörlerle değiştiği bilinmektedir. [110].

Son yıllarda ağır metal kirliliğinin önemli bir global sorun haline geldiği tartışılmaz bir gerçektir. Söz konusu metal iyonlarının hayvan yemlerinde de bulunması sürpriz değildir. Zhang ve ark. farklı bölgelerden alınan hayvan yemlerinde ağır metal analizi yapmışlardır. Bu amaçla 10 farklı yemde Cu, Zn, As, Cr, Cd ve Cu analizi yapılmış ve Cu ve Cd' un 2,3- 1,13 mg/ kg gibi çok yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Bunun dışında diğer ağır metallerinde benzer konsantrasyonları rapor edilmiştir [111]

bGST enziminin ağır metallerle inhibisyonu, tavuğun detoksifikasyon kabiliyetinin belirli ölçüde düşmesine sebep olur. Bunun doğal sonucu olarak ksenobiyotikler, hayvanın çeşitli dokularında birikecektir. Bu nedenle bGST aktivitesinin düşmesi sonucu ksenobiyotiklerin canlıda birikmesi tavuk için önemli olmadığı düşünülebilir, ancak insan sağlığı için bir risk olacağı düşüncesindeyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Bilgili, A., “Kanatlılarda antibakteriyel ilaç kullanım seçenekleri ve sakıncalar”, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 41, 243-253, (1994).
- [2] Kaya, S. ve Şahal, M., “Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri, ilaç verilmiş hayvanlarda uyulması gereken kesim öncesi bekletme veya sütün kullanılmama süreleri”, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 36(2), 390-403, (1989).
- [3] Kaya, S., “Hayvansal üretimde gelişmeyi hızlandırıcı maddeler ve sakıncaları”, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 31(3), 410-423, (1984).
- [4] Şanlı, Y. ve Kaya, S., *Veteriner İlaç Rehberi ve Uygulamalı Bilgiler El Kitabı*, Medisan Yayınevi, Yayın No, 16, 363-402, (1993).
- [5] Şanlı, Y. ve Sarıgöl, C., “Hayvansal besinlerdeki çeşitli artık maddelerinin insan sağlığına etkileri”, *Fırat Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 6, (1981).
- [6] Zhuang, P., Zou, B., Lu, H. and Li, Z., “Heavy metal concentrations in five tissues of chickens from a mining area”, *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(6), (2014).
- [7] Sedki, A., Lekouch, N., Gamon, S. and Pineau, A., “Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Morocco”, *Science of the total environment*, 317(1-3), 201-205, (2003).
- [8] Kim, J. Koo, T. H., “Heavy metal concentrations in diet and livers of Black-crowned Night Heron *Nycticorax nycticorax* and Grey Heron *Ardea cinerea* chicks from Pyeongtaek Korea”, *Ecotoxicology*, 16(5), 411-416, (2007).
- [9] Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G. and Landriscina, C., “Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication”, *Toxicology*, 200(1), 29-38, (2004).
- [10] Al-Mustafa, A. H., “In vitro Study Involving the Comparative Effect of Heavy Metal Ions on Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxide Levels in Human Erythrocytes”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(14), 2586-2592, (2006).

- [11] Orhan, H., “Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi”, *Ankara Bilim Uzmanlığı Tezi*, 1994.
- [12] Turkanoglu, A., “Human Serum Arylesterase And Glutathione S-Transferase Activities In Patients With Ischemic Stroke Compared To Healthy Controls”, *The Middle East Technical University*, (2007).
- [13] Aksoy, M., Ozaslan, M. S. and Kufrevioglu, O. I., “Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity”, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(4), 546-550, (2016).
- [14] Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H. and Ciftci, M., “Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity”, *Environmental Toxicology and pharmacology*, 34(3), 888-894, (2012).
- [15] Cummins, I., Cole, D. J. and “Edwards, R., “A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black- grass”, *The Plant Journal*, 18(3), 285-292, (1999).
- [16] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. “Free radicals in biology and medicine”, (1985).
- [17] Crupkin, A. C. and Menone, M. L., “Changes in the activities of glutathione-S-transferases, glutathione reductase and catalase after exposure to different concentrations of cadmium in *Australoheros facetus* (Cichlidae, Pisces)”, (2013).
- [18] Dickinson, D. A. and Forman, H. J., “Glutathione in defense and signaling”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973(1), 488-504, (2002).
- [19] Ketterer, B., “The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism”, *Drug metabolism reviews*, 13(1), 161-187, (1982).
- [20] Loeb, G. A., Skelton, D. C. and Forman, H. J., “Dependence of mixed disulfide formation in alveolar macrophages upon production of oxidized glutathione: effect of selenium depletion”, *Biochemical pharmacology*, 38(18), 3119-3121, (1989).
- [21] Josephy, P. D. and Mannervik, B., “Molecular toxicology”, *Oxford University Press on Demand*, (2006).

- [22] Kosower, E. M., "Chemical properties of glutathione", *Glutathione: metabolism and function*, 6, 1, (1976).
- [23] Kidd, P.M., "Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage", *Ph.D. Alternative Medicine Review*, (1999).
- [24] Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., "Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes", *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97, (1996).
- [25] Liebman, J.F. and Greenberg, A., "Mechanistic principles of enzyme activity", *VCH Publishers*, New York, (1988).
- [26] Keha, E.E. ve Küfrelioğlu, Ö.İ., *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum, 637, (2009).
- [27] Sharma, R., Gupta, S., Ahmad, H., Ansari, G. A. S. and Awasthi, Y. C., "Stimulation of a human erythrocyte membrane ATPase by glutathione conjugates", *Toxicology and applied pharmacology*, 104(3), 421-428, (1990).
- [28] Droog, F., "Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau", *Journal of Plant Growth Regulation*, 16(2), 95-107, (1997).
- [29] Schröder, P., "The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics", *In Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment Springer*, Dordrecht, (pp. 155-183), (2001).
- [30] Yalçın, A. S., "Antioksidanlar", *Klinik Gelişim*, 11(342-346), (1998).
- [31] Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V., "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review", *Annals of botany*, 91(2), 179-194, (2003).
- [32] Özel, R., "Prostat Kanseri Olgularında Glutathion S-Transferaz P1 Geninin İLE105VAL Polimorfizminin ve Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, Türkiye, 26-30, (2006).
- [33] Güven, A., "Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür ve Etil Alkol İle Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutathion (GSH), Glutathion-S-Transferaz (GST) ve Selenyum Düzeylerinin Araştırılması", Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, *Sağlık*

Bilimleri Enstitüsü, Kars, Türkiye, 37-44, (2003).

- [34] Booth, J., Boyland, E. and Sims, A. P., "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione", *Biochemical Journal*, 79(3), 516, (1961).
- [35] Boyland, E. and Chasseaud, L. F., "The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis", *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volume 32, 173-219, (1969).
- [36] Boyer, T. D. and Kenney, W. C., "Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases", *Biochemical pharmacology and toxicology*, 1, 297-363, (1985).
- [37] Morgenstern, R., Lundqvist, G., Hancock, V. and DePierre, J. W., "Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series", *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6671-6675, (1988).
- [38] Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B., "Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation", *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139, (1974).
- [39] Hayes, J. D. and Pulford, D. J., "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II.", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), 521-600, (1995).
- [40] Chasseaud, L. F., "The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents", *In Advances in cancer research Academic Press*, 29, 175-274, (1979).
- [41] Mannervik, B. E. N. G. T., "The isoenzymes of glutathione transferase", *Adv. Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 57, 357-417, (1985).
- [42] Ketterer, B., Meyer, D. J., Taylor, J. B., Pemble, S., Coles, B. and Fraser, G., "GSTs and protection against oxidative stress. Glutathione S-transferase and drug resistance", *London: Taylor and Frances*, 109, (1990).
- [43] Jakoby, W. B. and Habig, W. H., "Glutathione transferases", *Enzymatic basis of detoxication*, 2, 63-94, (1980).

- [44] Benson, A. M., Talalay, P., Keen, J. H. and Jakoby, W. B., "Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(1), 158-162, (1977).
- [45] Listowsky, I., Tew, K. D., Pickett, C. B., Mantle, T. J., Mannervik, B. and Hayes, J. D., "High capacity binding by glutathione S-transferases and glucocorticoid resistance", *Structure and Function of glutathione transferases*, 199-209, (1993).
- [46] Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., et al., "Regulation of JNK signaling by GSTp", *The EMBO journal*, 18(5), 1321-1334, (1999).
- [47] Jancova, P., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E., "Phase II drug metabolizing enzymes", *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154(2), 103-116, (2010).
- [48] Commandeur, J. N., Stijntjes, G. J. and Vermeulen, N. P., "Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics", *Pharmacological Reviews*, 47(2), 271-330, (1995).
- [49] Van Bladeren, P. J., "Glutathione conjugation as a bioactivation reaction", *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 61-76, (2000).
- [50] Ha, T. J., Yang, M. S., Jang, D. S., Choi, S. U. and Park, K. H., "Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophoreflaescens* for melanogenesis", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 22, 97-99, (2001).
- [51] Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I. and Pearson, W. R., "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases", *Methods in enzymology*, 401, 1-8, (2005).
- [52] Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., et al., "Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*", *Biochemical Journal*, 359(Pt 2), 295, (2001).
- [53] Dixon, D. P., Laphorn, A. and Edwards, R., "Plant glutathione transferases", *Genome biology*, 3(3), reviews3004-1, (2002).

- [54] Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., et al., "A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications", *Structure*, 6(6), 721-734, 1998.
- [55] Dixon, D. P., Cole, D. J. and Edwards, R., "Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), 407-412, (2000).
- [56] Danielson, U. H. and Mannervik, B., "Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat", *Biochemical Journal*, 231(2), 263, (1985).
- [57] Alparslan, M. M., "Bazı Kumarin Türevlerinin Glutasyon S-transferaz Enzimi Üzerindeki İnhibe Edici Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı*, İstanbul, (2012).
- [58] Armstrong, R. N., "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases", *Chemical research in toxicology*, 10(1), 2-18, (1997).
- [59] Litwack, Gerald, BRIAN KETTERER. and IRWIN M. ARIAS., "Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions", *Nature* 234.5330 466, (1971).
- [60] Coles, B., Ketterer, B. and Hinson, J. A., "The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(1), 47-70, (1990).
- [61] Hayes, J. D. and Pulford, D. J., "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), 521-600, (1995).
- [62] Marnett, L. J., "Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism", *Cancer and Metastasis Reviews*, 13(3-4), 303-308, (1994).
- [63] Trush, M. A. and Kensler, T. W., "An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis", *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3-4), 201-209, (1991).
- [64] Kaya KOÇDOĞAN. A., "Meme kanserli Hastalarda Glutasyon S-Transferaz

İzozimlerin Çoklu İlaç Direnç Mekanizmasındaki Proteinlerle Olan İlişkinin İncelenmesi”, Kırıkkale Üniversitesi Doktora Tezi, Eylül, (2016).

- [65] Vatansev, H., “Çeşitli kanser vakalarında serum Glutasyon-S Transferaz (GST) izoenzimlerinin araştırılması “(Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (1995).
- [66] Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W., “Harper's illustrated biochemistry” (No. 577.1 HAR), (2006).
- [67] Seviar, D. K., Pelkonen, O. and Ahokas, J. T., “Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(2), 257-261, (2012).
- [68] Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B., “Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139,(1974).
- [69] Rihkanen, H., Peltomaa, J. and Syrjänen, S., “Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas”, *Acta otolaryngologica*, 114(3), 348-351, (1994).
- [70] Husby, P., Srai, K. S., Ketterer, B. and Romslo, I., “Effect of ligandin on the efflux of co-deuteroporphyrin from isolated rat liver mitochondria”, *Biochemical and biophysical research communications*, 100(2), 651-659, (1981).
- [71] Eimoto, H., Tsutsumi, M., Nakajima, A., Yamamoto, K., Takashima, Y., Maruyama, H., et al., “Expression of the glutathione S-transferase placental form in human lung carcinomas”, *Carcinogenesis*, 9(12), 2325-2327, (1988).
- [72] Morgenstern, R., Lundqvist, G., Hancock, V. and DePierre, J. W. “Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series”, *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6671-6675, (1988).
- [73] La Creis, R. K., Woodson, K., Taylor, P. R., Albanes, D., Virtamo, J. and Tangrea, J. A. , “Polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GST-M1, GST-T1 and GST-P1) and susceptibility to prostate cancer among male smokers of the ATBC cancer prevention study”, *European journal of cancer prevention*, 12(4), 317-320, (2003).
- [74] Temellini, A., Castiglioni, M., Giuliani, L., Mussi, A., Giulianotti, P. C., Pietrabissa, A., et al., “Glutathione conjugation with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB):

interindividual variability in human liver, lung, kidney and intestine”, *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 33(9), 498-503, (1995).

- [75] Gadagbui, B. K. and James, M. O. (2000). “Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine”, *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), 27-37.
- [76] Angelucci, S., Sacchetta, P., Moio, P., Melino, S., Petruzzelli, R., Gervasi, P., et al., “Purification and characterization of glutathione transferases from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 373(2), 435-441, (2000).
- [77] Hamed, R. R., Maharem, T. M., Abdel-Meguid, N., Sabry, G. M., Abdalla, A. M. and Guneidy, R. A. “Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: A comparative study”, *Research in developmental disabilities*, 32(5), 1470-1482, (2011).
- [78] Celik, V. K., Armutcu, F. and Aker, A. “Human placental glutathione-S-Transferase: Isolation, kinetic properties and in vitro interactions with several drugs” *CU Tip Fakultesi Dergisi*, 25, 187-192, (2003).
- [79] Turkanoglu, A., “Human Serum Arylesterase And Glutathione S-Transferase Activities In Patients With Ischemic Stroke Compared To Healthy Controls”, *The Middle East Technical University*, (2007).
- [80] Iizuka, M. A. S. A. K. I., Inoue, Y. O. S. H. I. H. A. R. U., Murata, K. O. U. S. A. K. U., and Kimura, A. K. I. R. A., “Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B” *Journal of bacteriology*, 171(11), 6039-60420, (1989).
- [81] Martinez-Lara, E., George, S. G., Lopez-Barea, J., and Bárcena, J. A., “Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(9), 759-768, (1997).
- [82] DERYAOĞLU, N., “Adapazarı havasında bulunan tozlarda ağır metallerin Alevli AAS ile tayini”, Yüksek Lisans Tezi, SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, (2004).
- [83] THAKUR, M., DEB, M.K., IMAI, S., SUZUKI, Y., UEKI, K., HASEGAWA, A., “Load of heavy metals in the airborne dust particulates of an urban city of central India”, *Environmental Monitoring and Assessment*, 95, 257–268, (2004).

- [84] PALA, M.F., “17 Ağustos depremi sonrası Adapazarı cadde ve sokak tozlarında ağır metal tayini”, Yüksek Lisans Tezi, SAÜ *Fen Bilimleri Enstitüsü* Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, (2001).
- [85] MERESOVA, J., FLOREK, M., HOLY, K., JESKOVSKY, M., SYKORA, I., FRONTASYEVA, M.V., PAVLOV, S.S., BUJDOS, M., “Evaluation of elemental content in air-borne particulate matter in low-level atmosphere of Bratislava”, , *Atmospheric Environment* ,42, 8079-8085, 2008.
- [86] HENDEN, E., GÖKÇEL, H.Ğ., ERTAG, F.N., ERTAG, H., DURSUN, Z., “Eser element analiz metodu ders notları”, Eser Analiz Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, İzmir, 25-29 Haziran, (2001).
- [87] (13.03.2016) http://www.heall.com/healingnews/may/heavy_metals.html,2010
- [88] Michaeli-Yossef, Y., Berkovitch, M. and Goldman, M. “Mercury intoxication in a 2-year-old girl: a diagnostic challenge for the physician”, *Pediatric Nephrology*, 22(6), 903-906, (2007).
- [89] Habashi, F., *Handbook of extractive metallurgy*. Wiley-Vch, (1997).
- [90] Kahveciolu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., “Metallerin Çevresel Etkileri I-II, TÜ Metalurji ve Malzeme Mühendislii Bölümü (Seminer çalışması 24s)”, 2004.
- [91] Hegarty, P. V. “Trace Elements in Human Nutrition and Health, World Health Organization” Sw. Fr. 85.00/\$76.50 (xviii+ 343 pages), ISBN: 92 4 156173 4, (1996), (1997).
- [92] T.C. Sağlık Bakanlığı *Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü*, (13.03.2016) (<http://www.rshm.gov.tr>), (2009).
- [93] ÖZDEMİR, F., “Ev havasından çöken tozların ağır metaller yönünden incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, SAÜ *Fen Bilimleri Enstitüsü* Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, (2004).
- [94] WHO,” Health risks of heavy metals from long-range transboundary air”, (13.03.2016) (www.euro.who.int/document/E91044.pdf), (2007).

- [95] Görmüş, S., and Ergene, N.,” Magnezyumun klinik önemi”. *Genel tıp dergisi*, 12(2), 69-75, (2003).
- [96] ÖZTÜRK, M., “Kurşun kirliliğinin sağlık üzerine etkileri”, (<http://www.mozturk.net>),(2006).
- [97] Bigersson, B., Sterner, O., and Zimerson, E., *Chemie und Gesundheit “Eineverständliche Einführung in die Toxikologie”*, VCHVerlagsgesellschaft, ISBN 3-527- 26455-8, 1988.
- [98] Dar, N., “Isolation and Characterizations of Havy Metal Resistant Yeast from Industrial Effluents and Their Use In Evironmental Clean Up”. University of the Punjab, Department of Zoology/ Pakistan (MSc theies, 212s), (2004).
- [99] GÜRPINAR, Y. D. D. T., & AŞIRDİZER, M., “Baryum Bileşikleriyle Meydana Gelen İYTOKSİKASYONLAR”, *Toksikoloji dergisi*, 5(1-2), 5-9r, (2007).
- [100] WHO, “Inorganic chromium (III) compounds”, (13.03.2016) (www.who.int/entity/ipcs/publications/cicad/cicad76.pdf), (2009).
- [101] SÜREN, P., “Zonguldak kent merkezi atmosferik partikül madde kirliliğinin; PM_{2,5} ve PM₁₀ boyut dağılımı, kaynak ve metalik kompozisyon temelinde incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı*, Balıkesir, (2007)
- [102] US-EPA., “Toxicological review of zinc and compounds”, (<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P10038U5.txt>), (2003).
- [103] MUSLU, C., “Sakarya ilinde yetiştirilen fındık türlerinde demir ve bakır elementlerinin AAS ile tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Sakarya, (2002).
- [104] Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties”, *Food Chemistry*, 88, 479-484, (2004).
- [105] Laemelli, D. K., “Cleavege of structural potetins during in assembly of thehead of bakteriophage”, *Nature*, 227-680, (1970).
- [106] Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B., “Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139, (1974).

- [107] Hamed, R.R., Maharem, T.M. and .Guinidi, R.A.M., “Glutathione and its Related Enzymes in the Nile Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*”, 30, (3-4) 189-199, (2004).
- [108] Asaoka, K., “Affinity Purification and Characterization of Glutathione STransferases from Bovine Liver”, *J. Biochem.*, 95, 685-696, (1984).
- [109] Sheweita, S. A. Heavy metal-induced changes in the Glutathione levels and Glutathione Reductase/Glutathione S-Transferase activities in the liver of male mice. *International journal of toxicology*, 17(4), 383-392, (1998).
- [110] Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, 18(2), 321-336.
- [111] Zhang, F., Li, Y., Yang, M. and Li, W., “Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China”, *International journal of environmental research and public health*, 9(8), 2658-2668,(2012).