



**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ İNCİ KEFALİ
BALIĞI (*chalcalburnus tarichi*) SOLUNGACINDAN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL VE PESTİSİTLERİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yakup ZARİÇ

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ-Yrd. Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA

AĞRI-2018

Her Hakkı Saklıdır

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

Yakup ZARİÇ

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ İNCİ
KEFALİ BALIĞI (*chalcalburnus tarichi*) SOLUNGACINDAN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL VE
PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİLERİ

Danışman: Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA

AĞRI-2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Glutasyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü İnci Kefali Balığı (*Chalcalburnus Tarichi*) Solungacından Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Metal ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

- Tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.
- Tezim sadece Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.
- Tezimin yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

05 Aralık 2017

Yakup ZARİÇ



AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ İNCİ KEFALİ BALIĞI
(CHALCALBURNUS TARİCHİ) SOLUNGACINDAN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL VE PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç.Dr. Ramazan DEMİRDAĞ ve Yrd.Doç.Dr. Emrah YERLİKAYA ortak danışmanlığında Yakup ZARİÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 11/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:Doç.Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

İmza:

Jüri Üyesi:Doç.Dr. Müslüm KUZU

İmza:

Jüri Üyesi:Yard.Doç.Dr. Ebru AKKEMİK

İmza:

Jüri Üyesi:Yard.Doç.Dr. Emrah YERLİKAYA

İmza:

Jüri Üyesi:Yard.Doç.Dr. Aykut ÖZTEKİN

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

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

Doç. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi BAP birimince desteklenmiştir.

Proje No : SYO.15.002

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

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ İNCİ KEFALİ
BALIĞI (*chalcalburnus tarichi*) SOLUNGACINDAN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL İYONLARININ VE
PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ
Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA
Jüri: Doç. Doç. Dr. Müslüm KUZU
Yrd. Dr. Ebru AKKEMİK
Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN

Bu çalışmada, Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacından glutatyon S-transferaz (E.C 1.8.1.7.; GST) enzimi glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 11344,83 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve %82,25 verimle 1543,51 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant elde edildi. Molekül kütlesi yaklaşık 32,218 kDa olarak belirlendi. Enzim için K-fosfat tamponunda optimum pH 7,3, optimum iyonik şiddet 120 mM K-fosfat, optimum sıcaklık 35°C, stabil pH ise K-fosfat tamponunda pH 8,0 olarak bulundu. Ayrıca CDNB için K_M sabiti 1,0574 mM ve V_{max} değeri 0,373 EÜ/mL olarak; GSH için ise, K_M sabiti 0,1590 mM ve V_{max} değeri 0,0854 EÜ/mL olarak tespit edildi. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacı GST enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ile pestisitlerin etkileri incelendi ve inhibisyon etkisi gösteren Al^{+3} , B^{+3} , Ba^{+2} ve Se^{-2} iyonları ile Oxamyl, Diniconazole, Carbofuran, Tebuconazole ve Atrazine pestisitleri için IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplandı.

2018, 63 sayfa + xii sayfa

Anahtar Kelimeler: Van Gölü İnci Kefali Balığı, İnci Kefali solungaç, glutatyon S-transferaz, saflaştırma, karakterizasyon, metal, inhibisyon.

ABSTRACT
MASTER THESIS
**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-
TRANSFERASE FROM PEARL MULLET'S GILL OF VAN LAKE'S
FISH(*chalcaburnustarichi*), EXAMINATION OF SOME METALS AND
PESTICIDES' EFFECTS OF ENZYME ACTIVITY**

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Ramazan DEMIRDAG

Partner Advisor: Asst. Assoc. Dr. Emrah YERLIKAYA

Jury: Assoc. Dr. Muslum KUZU

Asst. Assoc. Dr. Ebru AKKEMIK

Asst. Assoc. Dr. Aykut OZTEKIN

In this study, glutathione S-transferase (E.C 1.8.1.7; GST) enzyme from Van Lake pearl mullet fish refined using glutathione agarose affinity chromatography with a specific activity of 11344.83 EU / mg protein and 82.25% efficiency 1543.51 fold purified. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on the purpose of checking the purity of the purified enzyme and a single band was obtained. The molecular mass was found to be approximately 32.218 kDa. Optimum pH in the K-Phosphate was 7.3, optimum ionic strength was 120 mM K-Phosphate, optimum temperature was 35 °C, for the enzyme and stable pH was found in the K-phosphate buffer at pH 8.0. Also for CDNB, the K_M constant was 1.0574 mM and the V_{max} value was 0.373 EU/mL; For GSH, the K_M constant was 0.1590 mM and the V_{max} value was 0.0854 EU/mL. The effects of some metal ions and pesticides of Van Lake pearl mullet's gill. Enzyme were investigated and Al^{3+} , B^{3+} , Ba^{2+} and Se^{2-} ions which show effect of inhibition and values of IC_{50} and K_i constants are calculated for Oxamyl, Diniconazole, Carbofuran, Tebuconazole and Atrazine pesticides.

2018, 63 pages + xii pages

Keywords: Van fish, *chalcaburnus tarichi*, pearl mullet gill Glutathione S-transferase, purification, characterization, metal, inhibition.

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim een Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoőtörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez danıőtmanlarım Sayın Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ ve Yrd. Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA'a teőtekkürü borç bilirim.

alıőtmalarım boyunca katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Doç. Dr.Murat GÜNEY, Doç. Dr. Kani ZİLBEYAZ, Sayın Doç. Dr.Murat ŐENTÖRK, Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI ve Sayın Doç. Dr. Müslüm KUZU'ya teőtekkürlerimi sunarım.

alıőtmalarımın her aőamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiőt oldukları sabır ve anlayıőtandan dolayı eőtime, ocuklarım Muhammed Said, Ahmet Yusuf ve sevgili kızım Feyza'ya sonsuz teőtekkürlerimi sunarım.

5 Aralık 2017

Yakup ZARİÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Glutasyon	4
1.3. Glutasyon S-Transferaz	4
1.4. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri	9
1.5. Pestisitler	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	18
3.1.2. Faydalanılan alet ve cihazlar	18
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	19
3.1.3.a. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	19
3.1.3.b. Solungaç dokusundan homojenat hazırlamak için kullanılan çözeltiler	19
3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	19
3.1.3.d. Protein tayini için (Bradford yöntemiyle) kullanılan çözeltiler.....	20
3.1.3.e. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	20
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini	21
3.2.2. Protein Tayini	23
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini.....	23
3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini	23
3.2.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan GST enziminin saflaştırılması	24
3.2.3.a. Solungaç dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	24
3.2.3.b. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması	24
3.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi ile İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	26
3.3.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaçından saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile tayini	26
3.3.2. GST enzimi için optimum pH'nın belirlenmesi	27

3.3.3. GST enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	27
3.3.4. GST enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	27
3.3.5. GST enzimi için stabil pH belirlenmesi	27
3.3.6. GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	27
3.3.7. Al^{+3} , B^{+3} , Ba^{+2} ve Se^{-2} iyonlarının GST enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	29
4.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusu GST Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	29
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları	29
4.2.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin SDS- PAGE ile saflık kontrolü	30
4.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları	32
4.3.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütesinin belirlenmesi sonuçları.....	32
4.3.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	32
4.3.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	34
4.3.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar	35
4.3.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar	36
4.3.6. CDNB ve GSH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	37
4.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Metal İyonları İçin IC_{50} Ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	39
4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	39
4.6. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Pestisitler İçin IC_{50} Ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozindifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
CDNB	1-Kloro, 2,4-Dinitrobenzen
CM	Karboksi Metil
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiyotreitol
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilen diamin tetraasetikasit
ES	Enzim substrat kompleksi
FAD	Flavin adenindinükleotid
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GST	GlutasyonS-transferaz
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma dengesi
K _M	Michaelis-Menten sabiti
MAPEG	Glutasyon metabolizmasında membrane bağlı proteinler
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	Ribonükleikasit
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Triklor asetikasit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 1.1. Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III)	6
Şekil 1.2. GST enziminin katalizlediği reaksiyon	7
Şekil 1.3. Oxamyl molekülünün yapısal formülü	12
Şekil 1.4. Diniconazol molekülünün yapısal formülü	12
Şekil 1.5. Carbofuran molekülünün yapısal formülü.....	13
Şekil 1.6. Tebuconazol molekülünün yapısal formülü	13
Şekil 1.7. Atrazin molekülünün yapısal formülü	13
Şekil 4.1. Proteinlerin Bradford yöntemiyle kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	29
Şekil 4.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enziminin glutatyon agaroz afinite kolonundan elüsyon grafiği	30
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.	31
Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucu çizilen Rf- log MA grafiği.....	32
Şekil 4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	33
Şekil 4.6. Değişik konsantrasyonlardaki KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak Van Gölü Balığı solungaç GST enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği	34
Şekil 4.7. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik	35
Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği	37
Şekil 4.9. GSH için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	38
Şekil 4.10. CDNB için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	38
Şekil 4.11. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine B ⁺³ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	40
Şekil 4.12. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Ba ⁺² iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	41
Şekil 4.13. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Al ⁺³ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	42
Şekil 4.14. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Se ⁻² iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	43
Şekil 4.15. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Oxamyl pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.	44

Şekil 4.16. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Diniconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.	45
Şekil 4.17. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Carbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.	46
Şekil 4.18. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Tebuconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.	47
Şekil 4.19. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Atrazine pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.	48
Çizelge 1.1. Sitozolik GST sınıfları, alt birimleri ve bulunduğu dokular.	9
Çizelge 3.1. GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür.	22
Çizelge 3.2. Elektroforez jellerinin hazırlanması.	26
Çizelge 4.1. Glutasyon S-Transferaz enziminin saflaştırma basamakları.	30
Çizelge 4.2. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	33
Çizelge 4.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum iyonik şiddeti için KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	34
Çizelge 4.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları.	35
Çizelge 4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için 120 mM KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.	36
Çizelge 4.6. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enziminin GSH substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.	38
Çizelge 4.7. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enziminin CDNB substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.	38
Çizelge 4.8. B ⁺³ iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	39
Çizelge 4.9. Ba ⁺² iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	40
Çizelge 4.10. Al ⁺³ iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	41
Çizelge 4.11. Se ⁻² iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	42
Çizelge 4.12. Oxamyl pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	43

Çizelge 4.13. Diniconazole pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.14. Carbofuran pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi	45
Çizelge 4.15. Tebuconazole pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Çizelge 4.16. Atrazine pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi	47
Çizelge 5.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enzimi için karakterizasyon sonuçları	57
Çizelge 5.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların için IC ₅₀ ve K _i değerleri sonuçları.....	57
Çizelge 5.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC ₅₀ ve K _i değerleri sonuçları.....	58

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Her canlının hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere seçici ve etkili bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Enzimler aynı tür reaksiyonları defalarca gerçekleştirebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Enzimler katalizledikleri tepkimelerin aktivasyon enerjilerini düşürürler.
5. Oluşacak reaksiyonun hızlı bir şekilde dengeye ulaşmalarına vesile olurlar.
6. Enzimler hem canlı hem de cansız ortamda görev yaparlar.

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimleri ile ilgili olup bu çalışmalara 1760 ile 1825 yılları arasında rastlanmaktadır. 1825 yılında Jön Jacob Berzelliuss, nişastanın sülfirik asitten daha hızlı bir şekilde parçalanmasında, buğdaygillerden kazanılan bir enzim karışımının etki etmesinden son derece etkilenmiştir. İlk defa James B. Sumner 1926 yıllarında Canavalia ensiformis adındaki bir fasulye türünden saf ve kristal halde üreaz enzimi elde etmeyi başardı. Bu şekilde enzimlerin protein yapısında olduğunu ileri sürdü. Bugün yaklaşık 5000 enzim tanınmaktadır. Bunların pek çoğu homojen halde ve saf olarak elde edilmiştir.

Bunlardan en az 200 kadarı saflaştırıldıktan sonra kristalize hale getirilmiştir (Gözükara 1997).

Tüm enzimler, enzim kataloğuna dört basamaklı bir sayı olan EC (Enzim Komisyonu) numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtir. Sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise ilk üç numaraya sahip enzimler arasındaki sırasını gösterir. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir (Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

1. Oksidoredüktazlar; İki substrat arasındaki elektron alışverişini katalizleyen enzimlerdir.

2. Transferazlar; Bir verici substrattan alıcı bir substrata hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar; Bir su (H₂O) molekülünün katılmasıyla ester, peptit, eter, glikozit, C-halojenür, anhidrit veya P-N bağların parçalanmasını sağlayan enzimlerdir.

4. Liyazlar; Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlarda grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar; Optik, geometrik yada yapısal izomerlerin birbirine dönüşümü şeklinde tekrar düzenlenmesini gerçekleştiren enzimlerdir.

6. Ligazlar; ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözültideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya

reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir (Söyüt2006).

Enzim aktivitesini yani enzimli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. İyonik şiddet
5. İnhibitör ve aktivatörlerin varlığı
6. Sıcaklık

Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çoğu kez bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Adsorpsiyon kromatografilerinin bir çeşidi olan afinite kromatografisi, istenen molekülün saflaştırılmasında, matriks adındaki bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine yani liganda tersinir ve spesifik olarak bağlandığı bir yöntemdir. Farklı jeller matriks olarak kullanılabilir. Bunlardan birkaçı; Sephadex, Sepharose, Biogeldir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitör” denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine

sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur. V_{max} azalırken, K_M değişmeden kalır. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge tepkimesi şeklindedir (Özaslan 2014).

1.2. Glutasyon

Glutasyon glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir (Herschbach and Rennenberg 1994; Karam 1996). Bitki, hayvan ve mikroorganizmaların hücre sitozolünde çokça bulunan glutasyonun iki önemli görevi vardır. Bunlardan biri hücreden toksik maddeleri uzaklaştırmak, diğeri ise indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlamaktır. Glutasyonun hayvanlardaki işlevleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Aminoasit taşınımı
2. Enzim regülasyonu
3. Peroksidaz metabolizması
4. Sinyal molekülü
5. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu (Liebman and Greenberg 1988).

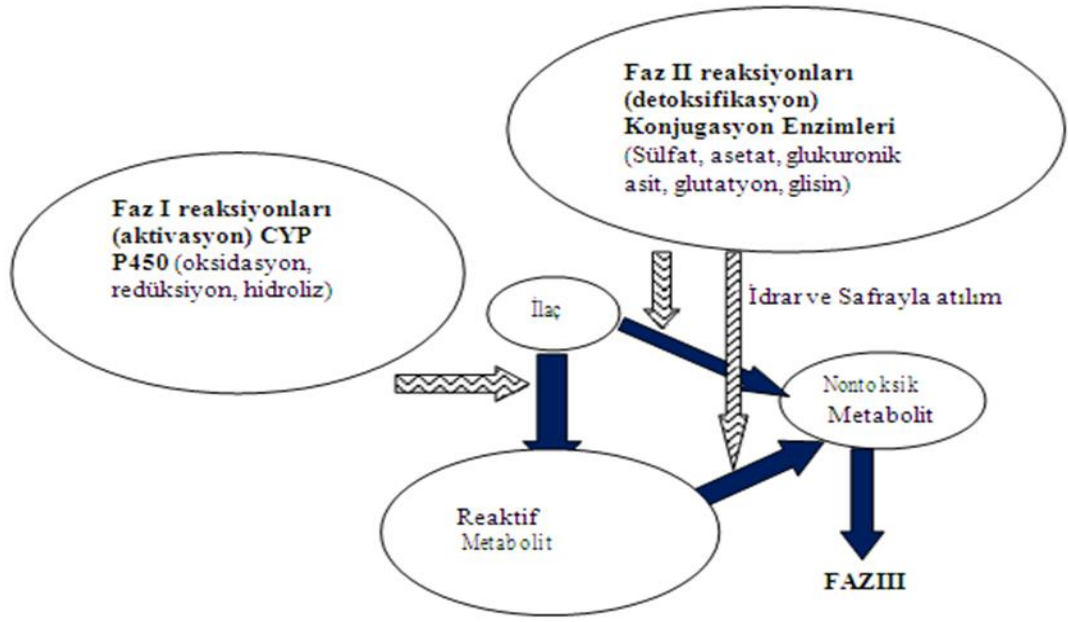
1.3. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon S-transferaz'lar, GSH ile elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, çok fonksiyonlu faz II biyotransformasyonunda görev alan enzim ailesinin üyeleridir (Hamed ve ark. 2003).

Glutasyon S-transferaz'lar (GST), EC 2.5.1.18 kodlu ve her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir (Altınışık1999).

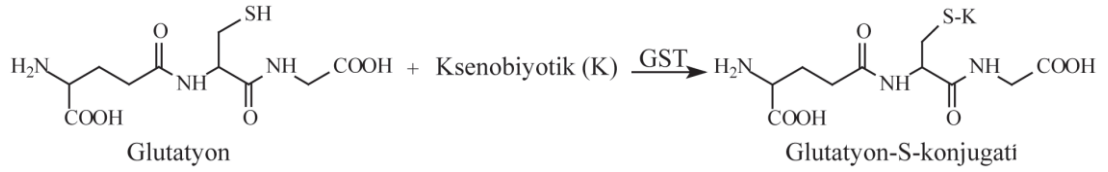
GST'ler her bir altbirim için katalitik bölgeye sahip küresel dimerik proteinlerdir. 23 kDa-29 kDa molekül kütesine sahiptirler. Her bir alt birimdeki aminoasit sayısı 200-240 arasında değişim göstermektedir. Her bir GST alt biriminin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşur. N-terminal domain bir β -tabaka ve üç α -heliks yapısında düzenlenmiş aşağı yukarı 80 aminoasitten oluşan GSH'nin bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanmaları için olan H bölgesinden oluşmaktadır. C-terminal domain kalan 5 veya 6 α -heliks yapısındaki aminoasitten oluşmaktadır (Tuna 2008).

Canlılar toksik bileşiklere sürekli maruz kalmaktadır. Endüstriyel yaşam, doğal yaşamla birlikte birçok zehirli molekül oluşturmaktadır. Örneğin reaktif oksijen vücudumuzda normal oksijen metabolizması içerisinde üretilmektedir. Bazı metabolik yollarda üretilen toksik moleküller, endüstriyel yaşam nedeniyle çok daha fazla zehirli moleküllere dönüşmektedir. Toksik moleküller metabolizmanın bozulmasına ve hücrenin ölmesine sebep olur. Canlılarda toksik moleküllerin etkisini azaltmak için detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu üç farklı fazda gerçekleşmektedir. Faz I tepkimeleri yükseltgenme-indirgenme yani redoks tepkimeleri ve hidroliz reaksiyonları ile aktif grupları substrata ekleyerek, faz II tepkimelerine substrat hazırlar. Faz II konjugasyon sisteminde yer alan en önemli enzimlerden biri glutatyon S-transferazlardır. Faz III reaksiyonlarında faz II'de oluşan daha fazla suda eriyebilen nonpolar ksenobiyotikler ve dolayısıyla daha az toksik olan metabolitler elde edilirler (Şekil 1.2) (Astrup 2000; Sheehan *et al.* 2001; Lee 2003).



Şekil 1.1. Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III).

Glutatyon S-transferazlar, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir.

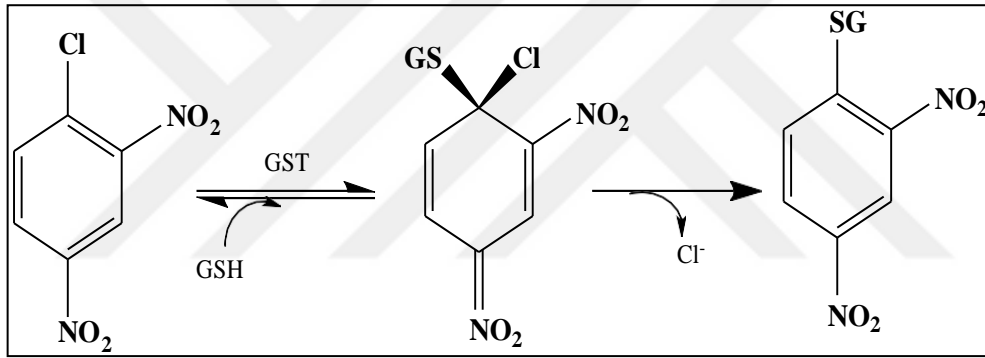


Dimerik enzimin alt ünitelerinin her birinde iki fonksiyonel grup içeren bir aktif merkezi bulunmaktadır. GSH'nin elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu enzim üzerindeki G ve H olmak üzere iki farklı bölge ile katalizlenmektedir. G bölgesi GSH'nin, H bölgesi ise elektrofilik bileşiklerin bağlanma bölgesidir (Şekil 1.2) (Aliya *et al.* 2003). G bölgesi yüksek GSH spesifitesi ile tüm GST'lerde oldukça benzerdir. H bölgesi ise GST'ler arasında oldukça farklıdır. Enzimin substrat bağlama kapasitesi ve çeşitliliği bu bölgenin farklılığından kaynaklanmaktadır (Armstrong1997).

Ksenobiyotiklerin çoğunluğu biyolojik olarak aktiftir ve canlılarda fizyolojik aşamalarda değişimlere sebep olmaktadır. Bunların bir kısmı lipid membranlarından geçebilen lipofilik bileşiklerdir ve canlılar bu taneciklerin vücuttan daha kolay uzaklaşmasını sağlamak için bunları elektrofilik

metabolitlerine dönüştürmektedirler. Lipofilik bileşiklerin polar metabolitlerine dönüştürülmesi iki metabolik fazda gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonlarında tanecik yükseltgenerek ya da indirgenerek (-OH ve -COOH gibi) daha fonksiyonel gruplar oluşturulmaktadır. Ana tanecikten daha hidrofilik olan bu metabolitler Faz II tepkimelerinde GSH gibi endojen bir substratla konjugasyonunu sağlayan **glutasyon S-transferaz** enzimi aracılığı ile vücuttan atılımları kolaylaştırmaktadırlar (Ioannides2002).

Enzimin fonksiyonu: GSH'ı ve elektrofilik substratı aktif merkezine bağlayarak substrat ile GSH etkileşimini gerçekleştirmek ve GSH'ın elektrofilik substrat üzerindeki nükleofilik atağını, glutatyonun sülfidril grubunu aktive etmesi ile başlatmaktadır (Armstrong1997).



Şekil 1.2. GST enziminin katalizlediği reaksiyon (Habdous et al. 2002).

Besinlerin yanında alınan toksik moleküllerin eliminasyonunu sağlayan GST, aynı zamanda prostoglandinlerin izomerizasyonu, safra tuzları, bilirubin ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH'la bağlayarak bu maddelerin taşınımını da sağlamaktadır (Boyer, T.D.1989).

Glutasyon S-transferazlar üç gruba ayrılırlar. Bunlar; sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomaldır. Sitozolik ve mitokondriyal GST'ler üç boyutlu yapılar bakımından birbirlerine benzerler. Aynı zamanda çözünebilen GST'ler olarak adlandırılırlar. Bu iki gruptaki GST'ler, farklı dokularda farklı miktarlarda bulunabilen çok sayıda izoenzime sahiptirler. Mikrozomal GST'ler (MAPEG), primer yapılarının farklılığı sebebi ile çözünebilen gruplardan farklıdır (Mannervik *et al.* 2005).

GST'ye en sık rastlanılan dokular başta karaciğer olmak üzere solungaç, böbrek, akciğer, meme, incebağırsak ve kalınbağırsak gibi organlardır. GST enzimi, bu organların sitozollerinin total protein içeriğinin %5'ini oluşturmaktadır. Bu organlarda yüksek oranda bulunmasının nedeni; sözü edilen organların dışarıdan alınan ksenobiyotikler ile doğrudan temas halinde bulunmalarıdır (Gyamfi *et al.* 2004; Hayes *et al* 2005; Baş 2006).

GST'lerin enzimatik işlevlerinin yanı sıra önemli olan ikinci bir görevi ise bazı endojen ve ekzojen kaynaklı maddeleri (steroidler ve metabolitleri, ilaçlar ve anyonlar) katalitik olmayan yolla bağlayarak bunların hücre içi taşınımını sağlamaktır (Boyer and Kenney 1985). Enzim üzerinde bu maddelerin bağlandığı spesifik olmayan hidrofobik bir bağlanma bölgesi vardır (Vessey and Boyer 1988).

GST'ler doğal koruyucu sistemlerden biri olarak kabul edilir. Antikanser ilaçlar, pestisid, herbisid, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da büyük bir önem arz ederler (Gyamfi *et al.*2004).

Glutatyon S-transferazların laktonlar, esterler, alkiller, kinonlar, aril halidler, epoksitler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir çoğunluğunu katalizleyebilme özelliğine sahip olmalarından dolayı pek çok araştırmaya konu olmuştur. Bu substratların sayısının çok olmasına rağmen, hidrofilik olmaları ve çoğunun elektrofilik bir merkez taşımaları substratların ortak özellikleridir (Coşkun 2007).

Kanserojenlerle ve kemoterapötik ajanlarla etkileşimlerinden dolayı, GST'ler kanserle mücadele açısından önem taşımaktadır. GST'ler antiastmatik ve antitümör ilaçların hedefi halindedir (Matshushita *et al.* 1998). GST enziminin memelilerin tümör hücrelerinde aşırı miktarda üretilmesi, bazı antikanser ilaçlara ve kimyasal karsinojenlere karşı direnç oluşmasına sebep olmaktadır (Hayes *and* Pulford 1995).

Memeli GST'leri yedi sınıfa ayrılır. Bu enzim sınıflarından beş tanesi sitozolik, iki tanesi ise membrana bağlıdır. Sitozolik enzim sınıflarının 13 adet alt

birimi bulunmaktadır (Experimental And Therapeutic Medicine 2016). Aynı GST sınıfından olan alt birimler kendi aralarında dimer oluşturabilirken farklı sınıfta bulunan alt birimlerle dimer oluşturamazlar (Carver and Hines 2002). Sitozolik GST'ler dimerik proteinlerdir ve her bir alt birimin tahmini molekül kütlesi 25 kDa'dur. GST proteinlerinin büyük bir kısmı karaciğerde bulunur ve toplam çözünür proteinin %3-5'ini teşkil eder (Seidegard and Ekström 1997).

Çizelge 1.1. Sitozolik GST sınıfları, alt birimleri ve bulunduğu dokular.

Sitozolik sınıfları	GST	Sitozolik GST alt birimleri	Bulunduğu dokular
Alfa		GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4	Karaciğer, Böbrek, Beyin, Testis
Mü		GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5	Karaciğer, Beyin, Testis
Pi		GSTP1	Karaciğer, Beyin, Testis
Teta		GSTT1, GSTT2	Karaciğer
Sigma		GSTS1-1	Dalak

1.4. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri

Ağır metaller, genellikle zehirlidirler ve çevre kirliliğine neden olurlar. Fiziksel özellik açısından tanımı, yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller olarak tanımlanır. Bu ağır metaller 60'tan fazla metal dahildir. Örneğin; demir, bakır, kurşun, kobalt, kadmiyum, krom, cıva, çinko vb (Kahvecioğlu vd 2004).

Ağır metaller, biyolojik süreçlere katılma durumlarına göre ikiye ayrılır. Bunlar; yaşamsal ve yaşamsal olmayandır. Yaşamsal olan grubun, canlıların yapısında belli bir oranda bulunmaları gerekir. Bu metaller tepkimelere katıldıkları için besin yolu ile düzenli olarak alınmalıdırlar. Örnek olarak; bakır (Cu) insanlarda ve hayvanlarda alyuvarların, redüksiyon prosesinin ve pekçok oksidasyonun değişmez parçasıdır. Bunun aksine yaşamsal olmayan ağır metallerin çok az konsantrasyonda bile fizyolojiyi etkileyerek ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedirler. Kükürtlü enzimlere bağlanan cıva, bu grubun en iyi örneğidir (Bigersson *et al.* 1988).

Alüminyum: Gümüş renkte bir metal olan alüminyumun simgesi Al'dir. Atom numarası 13 tür. Doğada çoğunlukla cevher halinde bulunur. Oksidasyona karşı yüksek bir direnci vardır. Alüminyumun canlı hücreler üzerinde yararlı bir işleve sahip olduğu gözlemlenmemiştir. Bazı kişilerde, alüminyumun herhangi bir izotopu, temas dermatiti (deri iltihabı), stiptik (kan durdurucu) vb. alejik reaksiyonlara neden olabilir (**Error! Hyperlink reference not valid.**).

Baryum: En ağır elementler arasında yer alan elementlerdendir. Atom numarası 56, simgesi Ba, atom ağırlığı 137,32 ve yoğunluğu 3,51 gr/cm³tür. Baryumun bütün bileşikleri toksik özellikler gösterir, yani zehirlidir. Mineralleri, genellikle sıcak su çıkan bölgelerde yoğun olarak görülür. Deniz yosunları, balıklar, bazı bitkiler, toprak ve bazı besinler de baryum içerir (<https://www.makaleler.com/baryum>).

Bor: Atom numarası 5, simgesi B, atom ağırlığı 10,81 g ve yoğunluğu 2,84 g/cm³ tür. Canlı beslenmesinde bor bir mikro besin elementidir. Bor ve bor bileşikleri kayalar, denizler ve yeraltı-üstü suları bor içermektedirler. Sebze ve meyve türleri dahil bitkiler elementi toprak ve sudan alırlar, o yolla da hayvan ve insanlara geçer. Vücut ağırlığına göre alınan yüksek dozlar depresyon, sarsaklık, titremeler yaratıp hayvanı ölüme götürür (A. Demirtaş 2010).

Selenyum: Periyodik cetvelde 4. Periyot 6A grubunda olan bir ametaldir. Selenyumun atom numarası 34 olup simgesi Se'dir. Jöns Jakob Barzelius, selenyumu 1817 yılında keşfetmiştir. Güçlü bir antioksidan olan selenyum, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kanser riskini azaltır. Hücreleri korur ve yaşlanmayı geciktirir. Ancak fazla alındığında sindirim sistemi sorunları, saç, tırnak ve diş kaybı, çeşitli deri, omurilik ve kemik iliği hastalıkları, ateş gibi sağlık sorunları görülür (www.nkfu.com/Selenyum)

1.5. Pestisitler

Pestisitler, gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanması sırasında zarar veren mikroorganizmaları veya zararlı maddeleri o gıdadan uzaklaştırmak ya da yok etmekte kullanılırlar. İlaveten bitki büyümesini düzenlemek için, gıdalara ya da

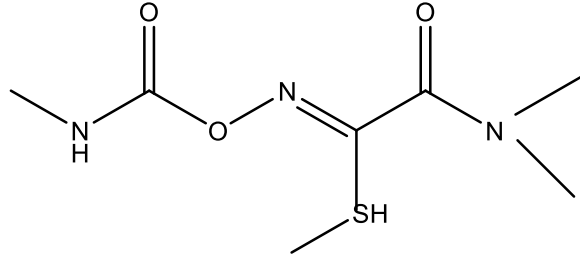
direkt olarak insanlar ve hayvanlar için hastalık taşıyan halk sağlığı zararlılarını kontrol altında tutmakta pestisitler kullanılır. Biyolojik veya kimyasal ürün olarak karşımıza çıkabilir (Anonim 2015).

Pestisitlerin büyük bir kısmı organik moleküler yapıda ve hidrofobik özellikte olduklarından su yüzeyindeki süspanse partiküllere bağlanırlar veya göl vedenizlerin dip kısmında bulunan çökelti tabakasında birikirler. Bu ortamlarda beslenen omurgasızlar, dip balıkları ve diğer omurgalılar büyük risk altındadırlar (M. Leppanen 1995).

Balıklar pestisitlere deri yolu, solunum yolu (solungaçlar) ve ağız yolu olmak üzere doğrudan veya pestisitten zehirlenen başka bir hayvanı yemek suretiyle dolaylı olarak maruz kalabilirler. Pestisitlere akut maruziyetlerde zehirlenmeler veya düşük dozlarda kronik olarak maruz kalmaları sonucunda davranış bozukluğu üreme sistemi problemleri ve fizyolojik bozukluklar gibi akut zehirlenmelerden daha önemli etkiler ortaya çıkabilir.

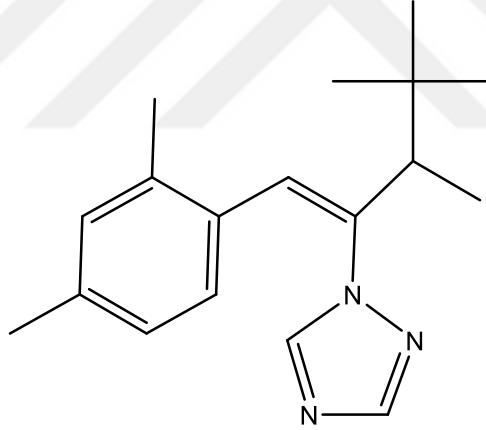
Ayrıca organizmada meydana getirdikleri stres sonucu hiperaktivite, konvülziyon, solunum güçlüğü, solungaçlarda aşırı mukus salgısı ve renk değişikliği, solungaç yaylarında açıklık, denge bozukluğu, metabolik bozukluklar, büyüme geriliği, enzim inhibisyonu, yumurta verimi ve yaşam süresinin azalması gibi birçok olumsuz etkilere neden olurlar. Karaciğer, kan damarları, böbrekler ve solungaçlar balıklarda pestisit maruziyeti sonrası en çok zarar gören organlardır (Anonim 2016).

Oxamyl: $C_7H_{13}N_3O_3S$ kimyasal formüle ve 219,26 g/mol molekül ağırlığı olan, kokusuz, beyaz renkte, kristal formunda katı bir hammaddedir. Zirai bir ilaçtır. Bitkilerde böceklere karşı kullanılır. Oxamyl hemnematodlara (solucan) hem de bitkilerin yeşil aksamalarında zarar yapan bazı böceklere etkisi vardır (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



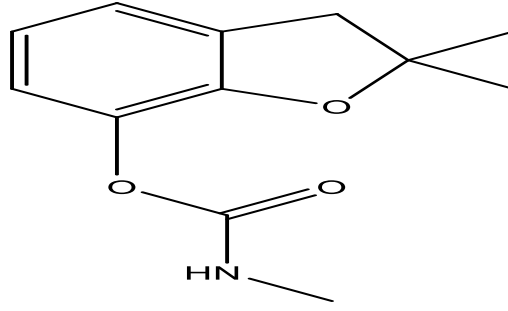
Şekil1.3. Oxamyl molekülünün yapısal formülü.

Diniconazol: $C_{15}H_{17}N_3O$ kimyasal formüle ve 326,22 g/mol molekül ağırlığı olan zirai bir ilaç etken maddesidir. Fungisit bir grupta bulunmaktadır. Külleme, pas, rastık, yaprak lekeli gibi hastalıklara tedavi olarak ya da uzun süreli koruma için kullanılırlar. Yeşil aksam, tohum ve toprak ilaçlaması gibi uygulama yöntemleri vardır (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



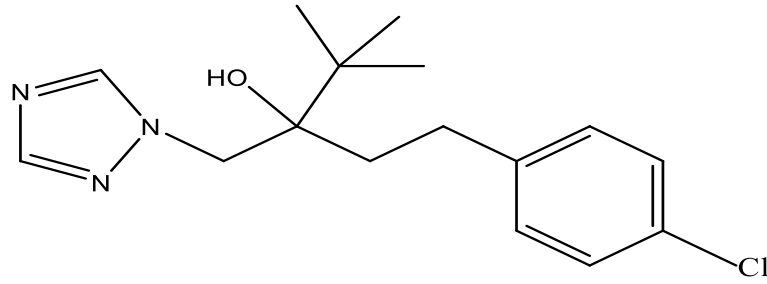
Şekil1.4. Diniconazol molekülünün yapısal formülü.

Carbofuran: Carbofuran, etken madde $C_{12}H_{15}NO_3$ kimyasal formüle ve 221,25 g/mol molekül ağırlığı olan, karakteristik bir kokusu olan, beyaz renkte, kristal formunda katı bir hammaddedir. Carbofuran, tarım ilaçlarında ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Bu etken madde ile geliştirilen formüllerle, mısırdaki koçan kurdu ve mısır kurdu ve şeker pancarında yeraltı zararlıları ile mücadelede kullanım alanı bulur (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



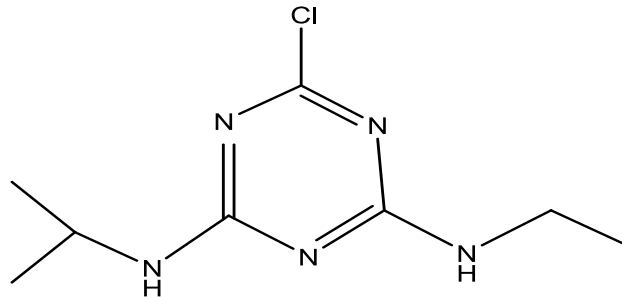
Şekil1.5. Carbofuran molekülünün yapısal formülü.

Tebuconazol: Tebuconazole, etken madde $C_{16}H_{22}ClN_3O$ kimyasal formüle ve 307,82 g/mol molekül ağırlığı olan, kendine has hafif bir kokusu olan, renksiz veya beyaz renkte, kristal formunda katı bir hammaddedir. Tebuconazole, tarım ilaçlarında, fungusitlere karşı üretilen bazı tarım ilaçlarının ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



Şekil1.6. Tebuconazol molekülünün yapısal formülü.

Atrazin: $C_8H_{14}ClN_5$ kimyasal formüle ve 215,68 g/mol molekül ağırlığı olan bir pestisitir. Bitki öldürücü, istenmeyen otları öldürmek için kullanılan bitki öldürücü anlamına gelir (<http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>).



Şekil 1.7. Atrazin molekülünün yapısal formülü.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ksenobiyotiklerin çoğunluğu biyolojik olarak aktiftir ve canlılarda fizyolojik aşamalarda değişimlere sebep olmaktadır. Bunların bir kısmı lipid membranlarından geçebilen lipofilik bileşiklerdir ve canlılar bu taneciklerin vücuttan daha kolay uzaklaşmasını sağlamak için bunları elektrofilik metabolitlerine dönüştürmektedirler. Lipofilik bileşiklerin polar metabolitlerine dönüştürülmesi iki metabolik fazda gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonlarında tanecik yükseltgenerek ya da indirgenerek (-OH ve -COOH gibi) daha fonksiyonel gruplar oluşturulmaktadır. Ana tanecikten daha hidrofilik olan bu metabolitler Faz II tepkimelerinde GSH gibi endojen bir substratla konjugasyonunu sağlayan **glutatyon S-transferaz** enzimi aracılığı ile vücuttan atılımları kolaylaştırmaktadırlar (Ioannides 2002).

Glutatyon S-transferaz enzimi çok sayıda, farklı elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenziminin bulunmasıdır. Böylece GST kansere neden olan bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır (Cnubben *et al.* 2001).

GST enzimi, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid (halkalı kurt), mollusk (yumuşakçalar) ve birçok mikroorganizmada bulunmuştur. En sık rastlandığı dokular, başta karaciğer olmak üzere, ince bağırsak, kalın bağırsak, böbrek, akciğer, meme, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok organın sitozolü ve membranında bulunduğu rapor edilmiştir (Habig *et al.* 1974).

Şu ana kadar bazı enzimler için saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilmiştir. Örneğin gökkuşağı alabalığı karaciğerinden glutatyon S-transferaz enzimi saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir (Ohkubo *et al.* 2004).

Enzimin sınıflandırılmasında proteinin fiziksel ve yapısal özellikleri esas alınmıştır. Glutatyon S-transferaz enzimi daha çok hücrelerin sitozolünde bulunmaktadır. Ancak, solungaç hücrelerinin mikrozomal kısmında da glutatyon S-

transferaz aktivitesine rastlanmıştır (Boyer *et al.* 1985; Morgenstern *et al.* 1988).

Hee-Joong ve arkadaşları, GST enzimini maruldan (*Lactuca sativa*'dan) glutatyon-sepharose kolon kromatografisi ile %9,6 verimle 403 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 23 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık olarak 48 kDa olarak belirlenmiştir (Hee-Joong *et al.* 2005).

GST enzimi Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının solungacından glutatyon-sepharoz afinite kolonuyla saflaştırılmıştır. SDS-PAGE yardımıyla enzimin alt biriminin molekül ağırlığı 25,460 kDa ve enzimin optimum pH'sı 8,0 olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten grafiği yardımıyla enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerinin yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Hamed *et al.* 2004).

Bir balık türü olan *monopterus albus* solungacından GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize edilmiştir. Enzimi, glutatyon- sepharoz 6B afinite kolonuyla 13,07 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktiviteyle, %14 verimle, 300 kat saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığının 26 kDa olan iki alt birimden oluştuğu (homodimer) belirtilmiştir. Enzimin optimum pH'sını 7,0-7,5 arasında, optimum sıcaklığını 45 °C olarak bulunmuştur. GSH ve CDNB için K_M sabitlerini sırasıyla 0,20 mM ve 0,28 mM olarak V_{max} değerlerini ise 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ve 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ olarak belirlenmiştir (Huang *et al.* 2008) .

Sitozolik GST Atlantik somunun ve kahverengi alabalığın solungaç ve böbreklerinden glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanarak saflaştırılmıştır. Enzimi Atlantik somunun solungacından 0, 26 $\pm 0,081$ EÜ/mg spesifik aktivite ile %70,58 verimle 57,2 kat, böbreğinden ise 37,50 $\pm 5,39$ EÜ/mg spesifik aktivite ile %86,9 verimle 187 kat saflaştırmışlardır. Kahverengi alabalık solungacından 27,69 $\pm 3,34$ EÜ/mg spesifik aktiviteyle %74,54 verimle 42,66 kat, böbreğinden ise 21,96 $\pm 4,531$ EÜ/ml spesifik aktivite ile %67,48 verimle 56,30 kat saflaştırmışlardır (Novoa-Valinas 2001).

Ağır metal zehirlenmelerine neden olan Cd^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının solungaç GST enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. $CdCl_2$ (2,5 mgCd/kg $CdCl_2$) ya da $MnCl_2$ (2,0 mgMn/kg $MnCl_2$) miktarları tek doz olarak verildiğinde, enzim aktivitesinin bir gün sonra %36 oranında azalttığı belirtilmiştir (Casalino *et al* 2004).

Metal iyonlarının *in vitro* şatlarda insan eritrositlerine etkilerini incelemek için yapılan çalışmada Cr^{+6} metal iyonunun glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini artırırken, glutatyon redüktaz aktivitesini azaltmakta olduğu, GST ve katalaz enzim aktivitelerinde ise bir farklılık oluşturmadığı bulunmuştur (Al-Mustafa 2006).

GST enzimi aktivitesi üzerine pestisitlerin de etkileri incelenmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada iribaşlara konsantrasyonu 1,85-240 mg/L arasında değişen glifosat (herbisit etken maddesi) uygulanmıştır. Çalışmada glifosatın asetilkolin esteraz, butirilkinolin esteraz, karboksil esteraz ve GST aktivitesi üzerine etkisine bakılmış, kontrolle kıyaslandığında tüm enzimlerin inhibe olduğu görülmüştür. GST tükenmesinin oksidadif strese ve pro-oksidan ksenobiyotiklerin stotoksitesiyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Hazarika *et al.* (2003), Relyea (2006) ve Costa *et al.* (2008)'e göre iribaşlar değişen glifosat miktarına karşı oksidadif strese girmişlerdir ve GST konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla önemli derece düşmüştür. Luschchok *et al.* (2009)'un çalışmasına göre bu şekilde zehirlenen ve oksidadif strese maruz kalan balıklarda GST aktivitesi %29-34 oranında azalmaktadır (Lajmanovich *et al.* 2011).

Plasental glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi zamanında doğum yapmış hastanın plasentasından alınarak glutatyon-agaroz affinite kolonu yardımıyla saflaştırılmıştır. GST- π 2,628 μ mol/mg dk spesifik aktivite ve % 0,5 verimle 16 kat saflaştırılmıştır. Enzimin substratı olan glutatyon (GSH) için K_M değeri 2 mM, V_{max} değeri 11,1 EÜ/mg dk; kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) için K_M değeri 0,55mM, V_{max} değeri 35 EÜ/mg dk olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine ilaçların etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda antibakteriyel bir ilaç olan Ampisilinin, enzim aktivitesini %50-55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir

(Çelik ve ark. 2003).

Ağır metal atıkları, bulunduğu ortamlarındaki balıklar üzerinde, konsantrasyonlarına bağlı olarak toksik etki yaparlar. Bazı ağır metaller (krom, kadmiyum) besin zincirleriyle girdikleri canlı bünyelerinden atılamadıkları için balıklarda fizyolojik olarak birikime neden olurlar ve bünyede belirli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yaparlar ve hatta ölüme neden olabilirler. Bu birikim balıkların kan parametrelerine de etki eder ve fizyolojik bozukluklara neden olur (Sehgal and Saxena 1986).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmamızda kullanılan standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), indirgenmiş glutatyon (GSH), akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, β -merkaptoetanol, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Glutatyon Agaroz Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, sodyum klorür, hidroklorik asit, sodyum azotür, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E. Merck AG'den temin edildi. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Faydalanılan alet ve cihazlar

Çalışmamız esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Alet ve Cihazlar	Markası
Santrifüj	ThermoSL 16R
Spektrofotometre	SHIMADZU (UV-1800)
pH Metre	İnoLab pH-
Meter CG840 Elektroforez tankı	Consort EV265
Peristaltik pompa	GILSON
Karıştırıcı (Shaker)	COMBI-Shaker
Karıştırıcı (Vorteks)	WiseMix
Karıştırıcı (Shaker)	İsoLab
Hassas terazi	OHAUS pioneer
Magnetik karıştırıcı	BioCote
Saf su cihazı	Ultra Pure (Typ1) Water
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000
Corporation EC Buzdolapları	Arçelik
Derindon durucu (-20°C)	Arçelik

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çözelti hazırlamak amacıyla saf su kullanılmıştır.

3.1.3.a. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,5 M KH_2PO_4 (pH:7,4): 13,6 g KH_2PO_4 tartılarak 180 mL saf su içinde çözüldü ve pH 7,4'e getirildi. Hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

2. 20 mM GSH Çözeltisi: 122,0 mg GSH (0,4 mmol) alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,101 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (0,5 mmol) alınarak 8 mL %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Solungaç dokusundan homojenat hazırlamak için kullanılan çözeltiler

Tris-HCl 50 mM (pH: 7,4) Tamponu: 0,3 g Tris 40 mL su içinde çözüldü daha sonra pH'sı 7,4'e ayarlandı ve hacmi saf suyla 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. Dengeleme Çözeltisi : 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) 0,34 g KH_2PO_4 (2,5 mmol) ve 2,15 g NaCl alınarak 200 mL suda çözülüp pH 7,4'e getirildikten sonra hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. Elüsyon Çözeltisi: 1,4 mM 2- merkaptoetanol içeren 50 mM Tris-HCl 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi, 50 mM Tris- HCl çözeltisi (pH: 9,5) içerisinde katı olarak GSH çözülerek 10 mM' lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 3 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulanıp elüatlar alındı.

3. Borat Tamponu (0,1 M H_3BO_3 ve 0,5 M NaCl, pH:8,5): 0,31 g H_3BO_3 ve 1,46 g NaCl alınarak 40 mL saf su da çözülüp, pH 8,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4. Asetat Tamponu (0,1 M $NaCH_3COO$ ve 0,5 M NaCl, pH:4,5) : 0,41 g $NaCH_3COO$ ve 1,46 g NaCl alınarak 40 mL saf su da çözülüp pH:4,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

5. %0,02 NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolonunu bakterilerden korumak için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Protein tayini için (Bradford yöntemiyle) kullanılan çözeltiler

1. CoomassieBrillant Blue çözeltisi: %95 'lik etanol içerisinde 100 mg CoomassieBrillant Blue G-250 reaktifi çözüldükten sonra 100 mL %95 'lik H_3PO_4 eklendi ve saf su ile bir litreye tamamlandı.

3.1.3.e. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH: 8,8) : 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü ve pH metre ile pH:8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH: 6,8) : 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü ve pH metre ile pH:6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid Çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid tartıldıktan sonra üzerine 34,6 mL saf su eklenerek çözüldü. Hazırlanan çözeltiye saf su eklenerek son hacmi 50 mL elde edildi.

4. SDS Çözeltisi (%10'luk) : 1 g sodyum dodesil 9 mL saf su içerisinde çözümlenerek hacmi 10 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

5. Amonyum Persulfat Çözeltisi (%10'luk): 1 g sodyum amonyum persulfat reaktifi tartıldıktan sonra 9 mL saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

6. Yürütme Tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 mL suda çözüldü. Önceden hazırlanmış olan %10'luk SDS çözeltisinden 5 mL eklenerek çözelti pH'ı 8,8'e ayarlandı. Ayarlanma tamamlandıktan sonra çözeltinin toplam hacmi saf su ilavesi ile 500 mL olarak elde edildi.

7. Örnek Tamponu: Önceden hazırlanan pH'ı 6,8 olan 1 M derişimdeki 0,65 mL Tris-HCl çözeltisinden, 1 mL %100 'lük gliserinden, 1 mL %10 'luk SDS çözeltisinden ve 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi çözeltisinden alınıp karıştırıldıktan sonra çözeltinin toplam hacmi saf su ilavesi ile 10 mL olacak şekilde tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numuneye karşılık 50 µl β-merkaptto etanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme Çözeltisi: Jel de yürütülen proteinleri sabitleştirmek amacıyla %40 su, %50 izopropanol ve %10 TCA (Trikloro asetik asit) içeren bir karışım hazırlandı.

9. Jel boyama Çözeltisi: Çeker ocak içerisinde 40 mL saf su, 50 mL metil alkol ve 10 mL asetik asit karıştırıldı. Bu solüsyon içerisine 0,1 g CoomassieBrillant Blue R-250 reaktifi tartılıp eklendi ve çözülmesi sağlandı.

10. Jel Yıkama Çözeltisi: 40 mL su, 50 mL metanol ve 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

11. % 0,1'lik Bromtimol Mavisi Çözeltisi: 0,1 gram indikatör 0,01 M 16 mL NaOH içerisinde çözüldü ve hacmi saf suyla 100 mL ye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik

elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En sık kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro- 2, 4- dinitrobenzen'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen 5- glutatyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbands gösterir (Şekil 3.1). Böylece bu dalga boyundaki absorbands artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Çalışmalarımızda bu aktivite ölçüm metodu kullanıldı.

GSH'ın yokluğunda, CDNB hızlı bir şekilde glutatyon S-transferazı inaktive eder. Bu sebepten reaksiyonun CDNB ile başlatmamak gerekir.

Aktivite ölçümü için toplam hacim 1 mL olacak şekilde karışım hazırlandı. (Çizelge 3.1) Küvetler spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve yarım dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbands değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig *et al.*1974).

Çizelge 3.1. GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür.

Küvet İçeriği	Kör	Numune
0,5 M aktivite tamponu	200 µL	200 µL
25 mM CDNB	20 µL	20 µL
20 mM GSH	50 µL	50 µL
Saf su	730 µL	700 µL
Enzim numunesi	-	30 µL

Bir enzim ünitesi bir dakikada, 25°C'de ve pH 7,4'de 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak tanımlanır.

Enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$EU = \frac{\Delta OD}{9,6} \times \frac{VT}{VE} \times SF$$

EÜ: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbands değişimi

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

VT: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

VE: Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.2.2. Protein Tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Bu tayin, 280 nm'de proteinlerin yapısındaki triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbens göstermesine bağlıdır (Segel 1968). Kromatografi işlemi sonrası toplanan fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbensları spektrofotometrede köre (elüsyon tamponuna) karşı okundu.

3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim ve homojenattaki protein miktarları bu yöntemiyle bulundu. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbens gösterir. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı gerçekleşir. Protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalması büyük bir avantajdır. Kullanılan bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Protein tayin işlemlerindeki prosedür şu şekildedir; 1mL'sinde 1 mg protein içeren standart homojenat çözeltisi tüplere sırası ile 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL olacak şekilde konuldu. Tüm tüpler saf su ile birlikte toplam hacmi 100 µL'ye tamamlandı. Tüplere 4,9 mL renklendirici eklendi ve vorteks ile birlikte karıştırıldı. İnkübasyonda 10 dakika bekletilmesinin ardından 595 nm'de 2 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbens değerlerine bakıldı. Karışımın içinde 4,9 mL renklendirici ve kör olarak 100 µL saf su vardı ve absorbens değerlerine denk olan mg protein değerleri, standart grafik olarak çizildi. Numune çalışmaları için, 10 kat seyreltilmiş solungaç homojenatı ve afinite kromatografisinden elüe edilen saflaştırılmış enzim çözeltilerinden aynı şekilde tüpler hazırlandı. Vorteks ile karıştırılan tüpler 10 dakikalığına inkübasyona bırakıldı. Absorbans değerleri 595 nm'de okundu. 3 defa tekrarlanan bu işlemde 3 farklı ölçüm elde edilmiştir ve bu ölçümlerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Protein miktarları standart grafik

sayesinde belirlenmiştir.

3.2.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan GST enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Solungaç dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Van gölünden elde edilen balıklar (İnci Kefali) soğuk zincir kurallarına göre Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirildi ve -80 °C'de muhafaza edildi. Balıkların solungaçları ayrıldıktan sonra küçük parçalara ayrıldı, daha sonra sıvı azot ile hücre zarları parçalandı ve homojenat tamponunda süspanse edildi. Homojenat karışımı tülbentle süzüldükten sonra 12.500 rpm'de 1 saat santrifüj edildi ve çökelti atıldı. Böylece homojenat elde edildi. Bu işlemlerin tümü yaklaşık +4 °C de gerçekleştirildi.

3.2.3.b. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan ve bizim de kullandığımız yöntem afinite kromatografisi yöntemidir. Glutasyon-Agaroz jeli 1 gram tartılarak safsızlıkları uzaklaştırmak için 200 mL saf su ile birkaç kez yıkandı. Yıkama sırasında jel bu şekilde şişirilmiş oldu. Hazırlanan jel, kapalı bir sistem olan 1x10 cm'lik kolona paketlenildi. Jelin çöküşü ile birlikte peristaltik pompa ve dengeleme tamponu yardımı ile dengelendi. Elüat ve tamponun 280 nm'de absorbans edilmesinden ya da pH'larının eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu farkedildi. Böylece afinite kolonu hazırlandı (Güvercin *et al.* 2008; Toribio *et al.* 1996).

Önceden hazırlanan homojenat dengelenen Glutasyon Agaroz afinite kolonuna uygulandı. Bunu takiben kolondan 10 mM KH₂PO₄ ve 0,1M KCl, pH:8 geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Sonra 10 mM GSH içeren 50 mM K-Fosfat (pH=7,5) tamponuyla gradientli elüsyon yapıldı. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alındı ve 340 nm'deki aktivitelere

bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Aktif elüsyonlar sonraki çalışmalar için birleştirildi.

3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

Saflaştırılan enzimin saflık derecesinin kontrol edilmesi amacıyla % 3-15 kesikli SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre uygulandı (Laemmli 1970).

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

Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu doldurduktan sonra enzim örnekleri ve standart proteinler numune kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı kapatıldıktan sonra alt kısmından (+) anot, üst kısmından da (-) katot yerleştirildi. İlk olarak 80 voltta 30 dakika örneğin yürütmesi beklendikten sonra örnek ayırma jeline kadar ulaştı. Bu aşamanın ardından gerilim 120 volt'a yükseltilerek örneklerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütülmesi sürdürüldü.

Örneklerin jel üzerindeki ilerlemesi örnek tamponuna ilave edilmiş olan brom timol mavisi ile sağlandı. Örneklerin yürütülmesi tamamlandıktan sonra akım kesildi ve plakalar arasındaki jel yavaş ve dikkatlice çıkarıldı. Jel, sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra boyama çözeltisi içerisinde çalkalayıcı

üzerinde 2 saat inkübe edildi. Jelin boyanmasından sonra boyama çözeltisinden çıkarılıp yıkama çözeltisine koyuldu. Protein bantları belirginleşip, rengi açılana kadar yıkanan jel, çalkalayıcıdan çıkartıldı ve fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.2. Elektroforez jellerinin hazırlanması.

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

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

3.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi ile İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacından saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile tayini

Molekül ağırlığı tayini Laemmli (1970) metodu kullanılarak yapıldı. Öncelikle standart protein olarak, 170 kDa 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa,'lık proteinler kullanıldı. Van Gölü Balığı solungacı için elektroforez işlemleri uygulandı. Sonrasında R_f-log M_A grafiği, standart proteinlerin R_f değerlerinin hesaplanması ile çizildi. Balık solungacından sağlanan GST enziminin R_f değeri hesaplandı. Bu değerlerin standart grafikte yerine konulmasıyla log M_A değeri tayin edildi. Antilogaritması alınarak numunenin molekül ağırlığı tespit edildi. Proteinlerin R_f değerleri şu formülün kullanılmasıyla belirlenmiştir;

$$Rf = \frac{Xe}{X_{boya}}$$

formülü ile belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.3.2. GST enzimi için optimum pH'nın belirlenmesi

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacından GST enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5,0-8,0 aralığında değişen K-Fosfat tamponu hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile tamponda enzim aktivitesi belirlendi.

3.3.3. GST enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacı GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda K-Fosfat tamponlarında sırayla aktivite ölçümü yapıldı.

3.3.4. GST enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C ile 70°C arasında 5'er °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

3.3.5. GST enzimi için stabil pH belirlenmesi

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5,5-8,0 aralığında değişen K-fosfat tamponları kullanıldı. Bir mL enzim çözeltisi ile belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin bir ml'si karıştırılarak +4 °C'de saklandı. Yedi gün süresince 24 saat aralıkla aktivite ölçümü yapıldığında enzimin stabil olduğu pH değeri tespit edildi.

3.3.6. GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacı Glutatyon S-Transferaz enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit GSH konsantrasyonunda CDNB'nin 5 ayrı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak CDNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde CDNB'nin sabit konsantrasyonunda GSH'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.3.7. Al⁺³, B⁺³, Ba⁺², Se⁻² iyonlarının GST enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

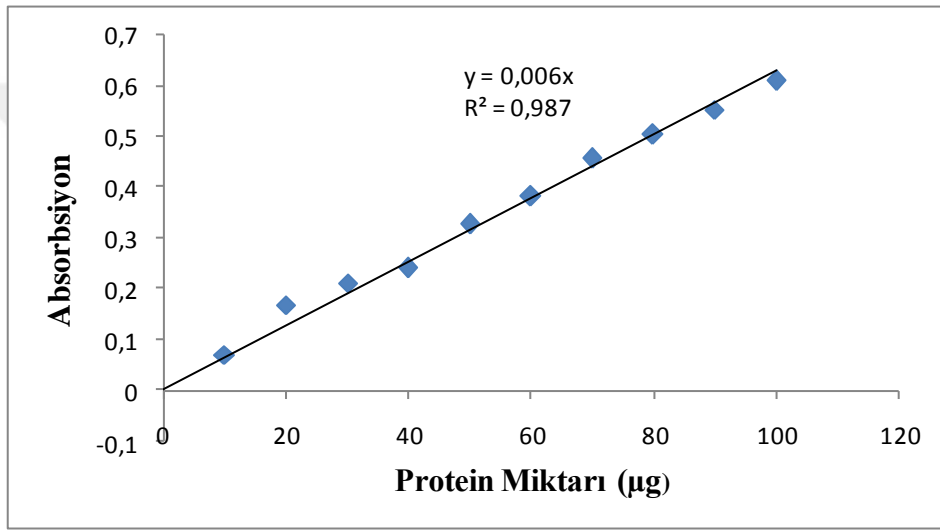
Metal iyonlarının inhibisyon üzerine etkisini değerlendirmek için ilk olarak sırasıyla metallerin beşer farklı derişimlerdeki aktiviteleri ölçüldü. İnhibisyon olmayan koşuldaki aktivite değeri %100 olarak kabul edildi ve inhibitör bulunan ortamlarda aktiviteler bağıl yüzde olarak belirlendi. İnhibitör konsantrasyonuna karşı gelen aktivite yüzdelerinin grafikleri çizildi. Enzim aktivitesinin yarıya indiği inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı. İnhibisyona neden olan iyonların K_i sabitlerini belirlemek amacıyla Cheng Prusoff denkleminde yararlanılarak K_i sabitleri hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (S)/KM}$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Homojenat, ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterildi.

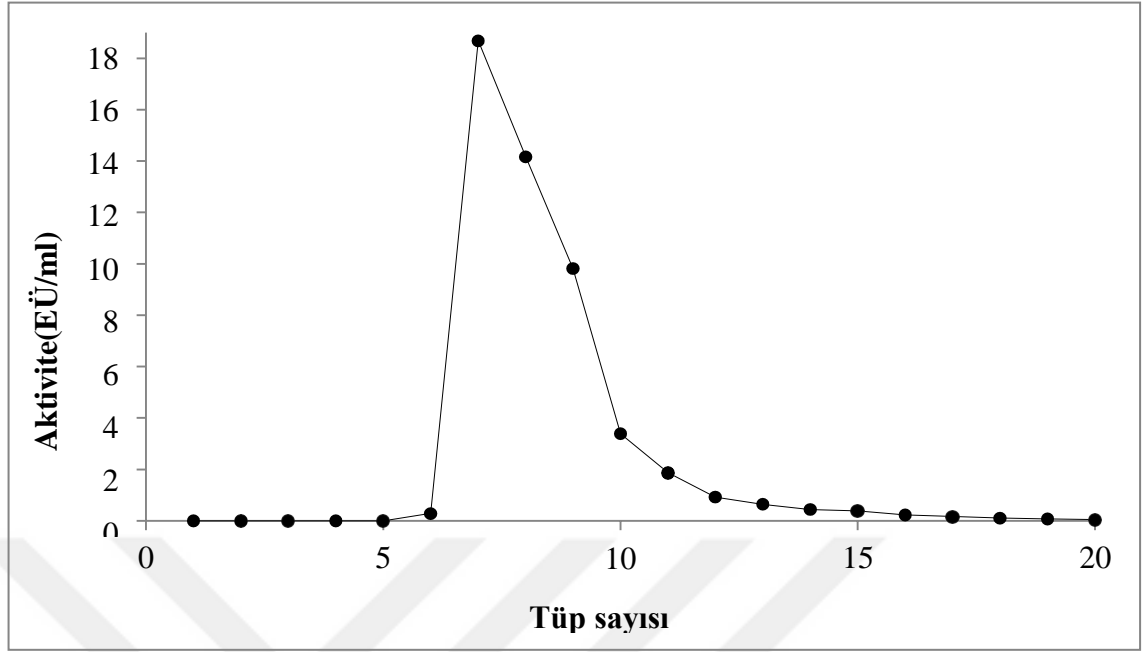


Şekil 4.1. Proteinlerin Bradford yöntemiyle kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

4.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusu GST Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları

Hazırlanan homojenat dengelenen Glutatyon Agaroz afinite kolonuna yüklendi. Kolon uygun tamponla yıkandı ve enzim gradientli elüsyon yapılarak 11344,83 EÜ/mg spesifik aktiviteyle %82,25 verimle 1543,51 kat elde edildi. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.1'de gösterildi. Elüe edilen elüatlardaki aktivite değerleri ölçülerek Şekil 4.2'deki elüsyon grafiği çizildi.



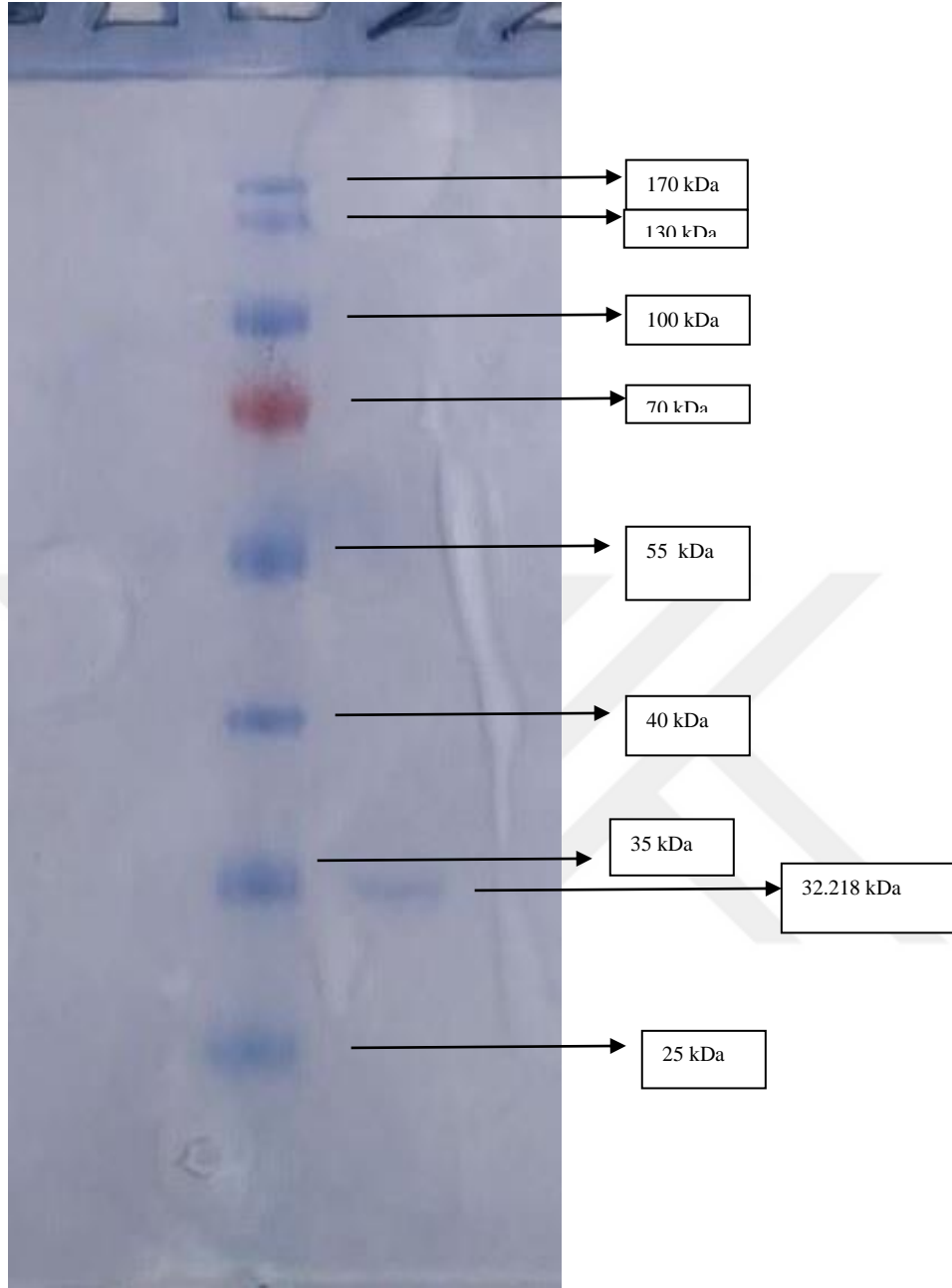
Şekil 4.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç Dokusu GST Enziminin Glutasyon Agaroz afinite kolonundan elüsyon grafiği.

Çizelge 4.1. Glutasyon S-Transteraz enziminin saflaştırma basamakları.

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	20	240	32,65	653	4800	7,35	100	1
Afinite Kromotografisi	6	658	0,058	0,348	3948	11344,83	82,25	1543,511

4.2.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin SDS- PAGE ile saflık kontrolü

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan afinite kromotografisinden elde edilen GST enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4.'de izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3'te verildi.



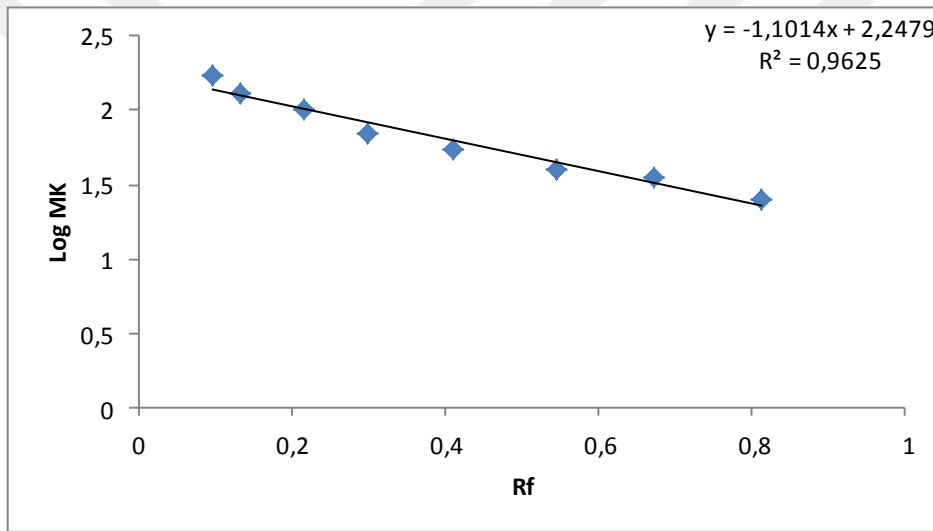
(Standart proteinler) (Safıaştırılan enzim)

Şekil 4.3. Afinite kromotografisi ile safıaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile safılık kontrolü.

4.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları

4.3.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütesinin belirlenmesi sonuçları

Afinite kolonundan alınan enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. R_f değerleri-log M_A grafiği çizildi (Şekil 4.4). Molekül kütesi ise yaklaşık 32,218 kDa olarak hesaplandı.



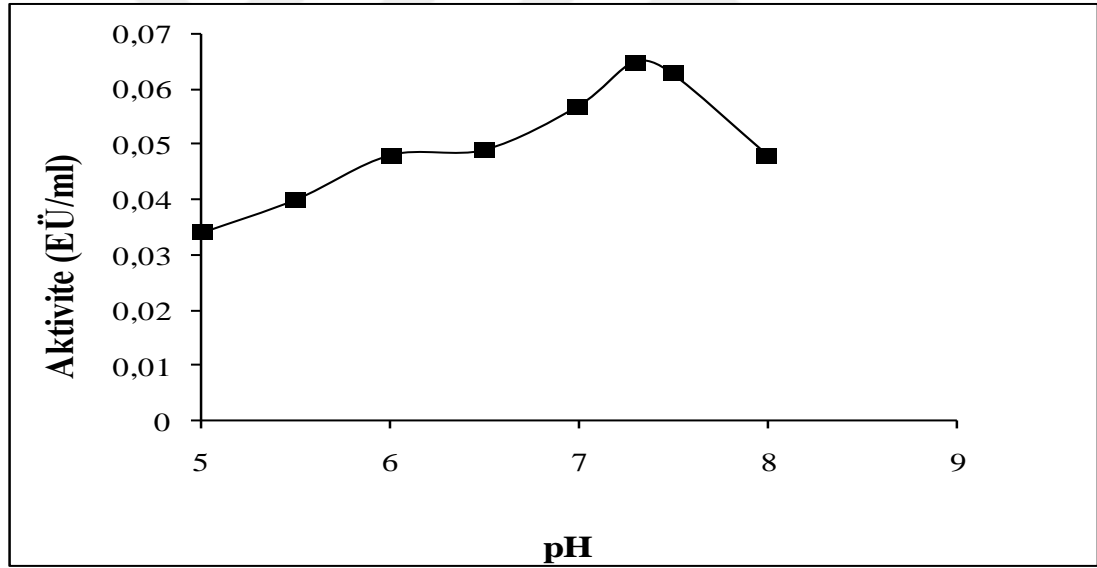
Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucu çizilen R_f -log M_A grafiği.

4.3.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç dokusundan saflaştırılan GST Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sını tespiti için pH değeri 5,0 ile 8,0 arasında değişen, K-Fosfat tamponlardan oluşan 8 adet çözelti kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı. İnci Kefali solungaç GST enziminin optimum pH değeri 7,3 olarak belirlendi

Çizelge 4.2. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0346
5,5	0,0404
6,0	0,0485
6,5	0,0497
7,0	0,0578
7,3	0,0659
7,5	0,0635
8,0	0,048



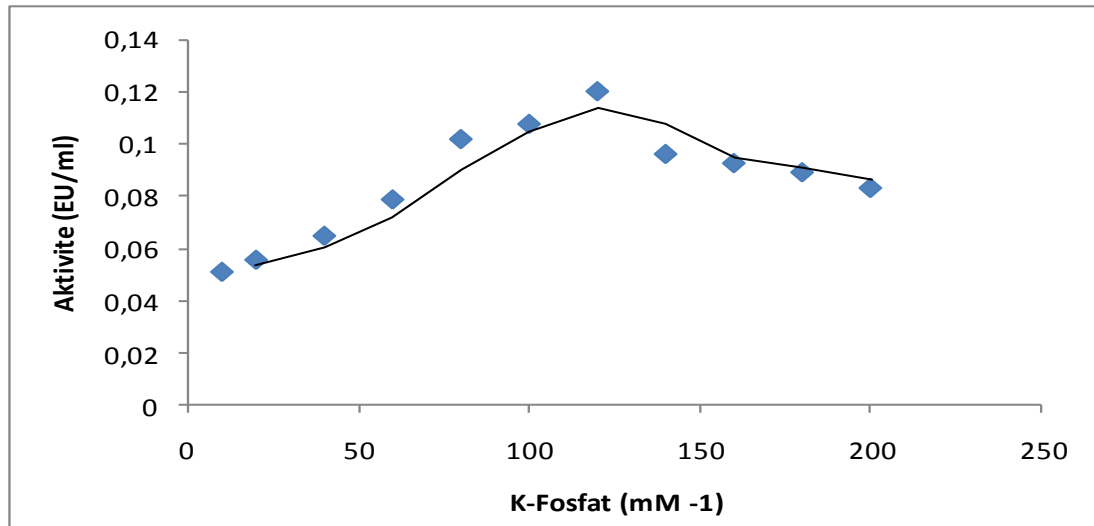
Şekil 4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.

4.3.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin aktivite ölçümünde en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi için önceki çalışmalar sayesinde uygunluğu tespit edilen optimum pH'ya sahip fosfat tamponuyla değişik konsantrasyonlardaki çözeltiler hazırlandı ve farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları kullanılarak enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra her bir tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin iyonik şiddet değeri 120 mM olarak belirlendi (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (M)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Aktivite (EÜ/ml)	0,050	0,055	0,064	0,078	0,101	0,107	0,120	0,096	0,092	0,089	0,083



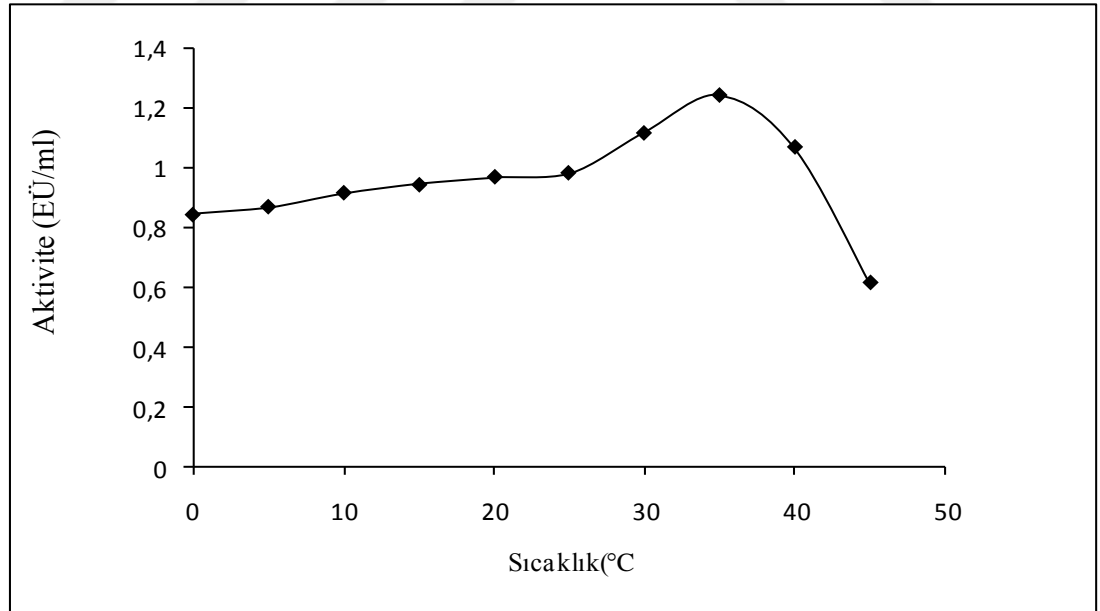
Şekil 4.6. Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 tamponu kullanılarak Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.

4.3.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip (pH 8,0 ve 120 mM) K-Fosfat tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 5 °C’de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen eğriler Şekil 4.7’de ve Çizelge 4.4’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları.

Sıcaklık (°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Aktivite (EÜ/mL)	0,844	0,870	0,915	0,945	0,968	0,984	1,121	1,243	1,069	0,615



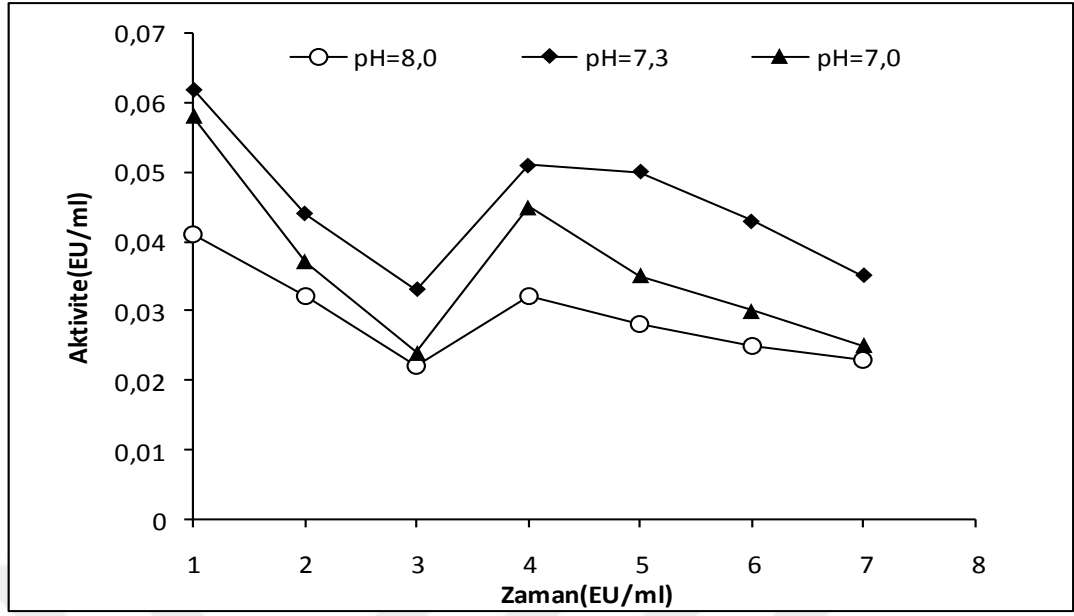
Şekil 4.7. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik.

4.3.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için uygun iyonik şiddete sahip değişik pH değerlerinde tampon hazırlandı. 1/1 oranında saf enzim ile tampon karıştırılarak her gün olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin stabil pH değeri pH: 8,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için 120 mM KH₂PO₄ tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.

Gün	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=7,3) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/mL)
1	0,041	0,062	0,058
2	0,032	0,044	0,037
3	0,022	0,033	0,024
4	0,032	0,051	0,045
5	0,028	0,050	0,035
6	0,025	0,043	0,030
7	0,023	0,035	0,025



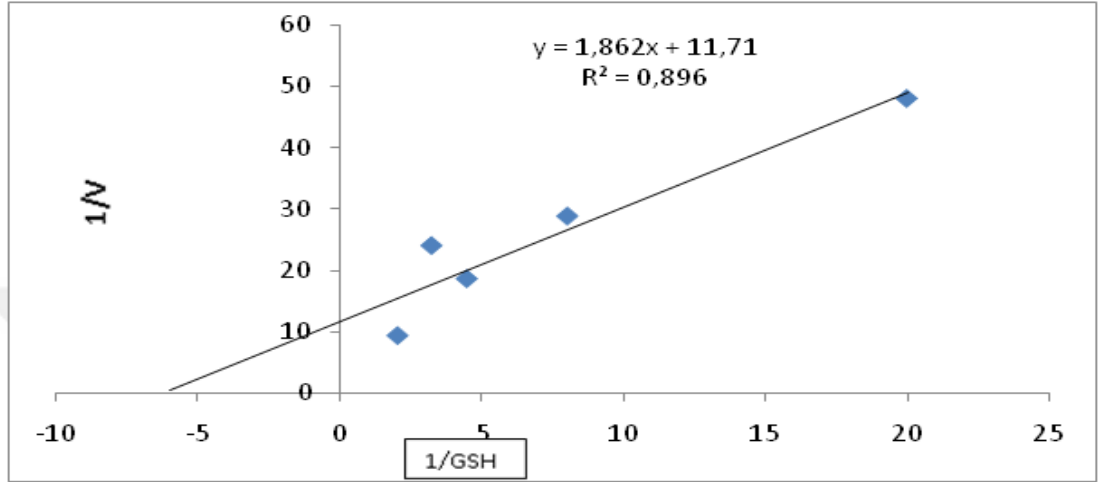
Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.

4.3.6. CDNB ve GSH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit GSH konsantrasyonunda CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/[\text{CDNB}]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak CDNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde CDNB'nin sabit konsantrasyonunda GSH'in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/[\text{GSH}]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda CDNB için K_M değeri 1,0574 mM ve V_{max} değeri 0,0373 EÜ/mL olarak; GSH için ise, K_M değeri 0,1590 mM ve V_{max} değeri 0,0854 EÜ/mL olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6-4.7 ve Şekil 4.9-4.10'da gösterildi.

Çizelge 4.6. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enziminin GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.

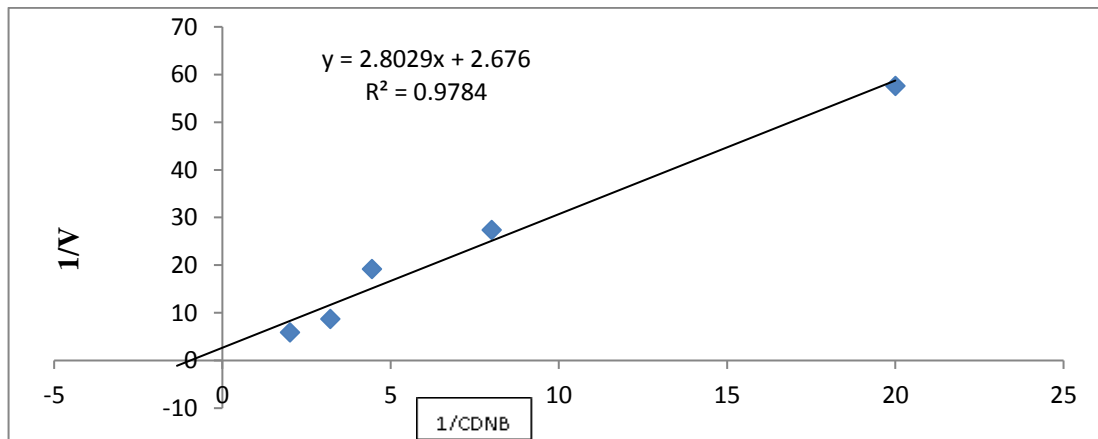
[GSH] (mM)	20	50	90	125	200
Aktivite (EÜ/ml)	12	20	31	34	62



Şekil 4.9. GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.

Çizelge 4.7. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enziminin CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.

[CDNB] (mM)	20	50	90	125	200
Aktivite (EÜ/mL)	10	21	30	66	97



Şekil 4.10. CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.

4.4. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Metal İyonları İçin IC₅₀ Ve Ki Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

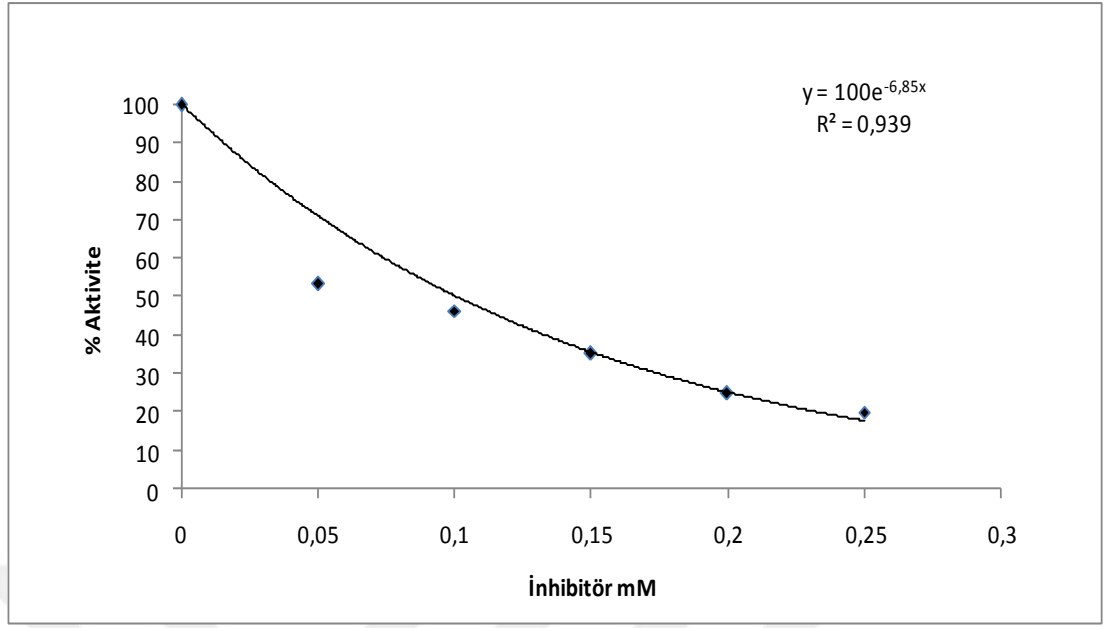
Çalışılan ağır metaller arasında Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenler içinde en az 5 farklı metal ile çalışıldı.

Metal	IC ₅₀	Ki Değerleri
	GST	
B ⁺³	0,100	0,0040
Ba ⁺²	0,082	0,0032
Al ⁺³	0,072	0,0028
Se ⁻²	0,083	0,0033

4.5. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Çizelge 4.8. B⁺³ iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

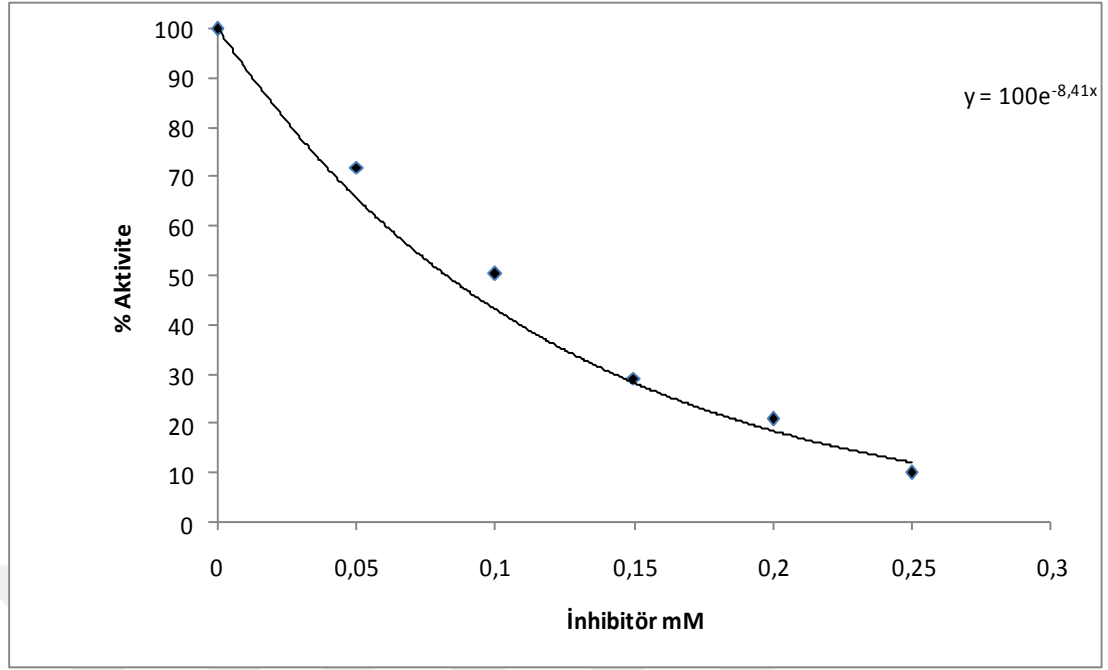
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,05	53,40
0,10	46,52
0,15	35,40
0,20	25,00
0,25	20,10



Şekil 4.11. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine B⁺³ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik.

Çizelge 4.9. Ba⁺² iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

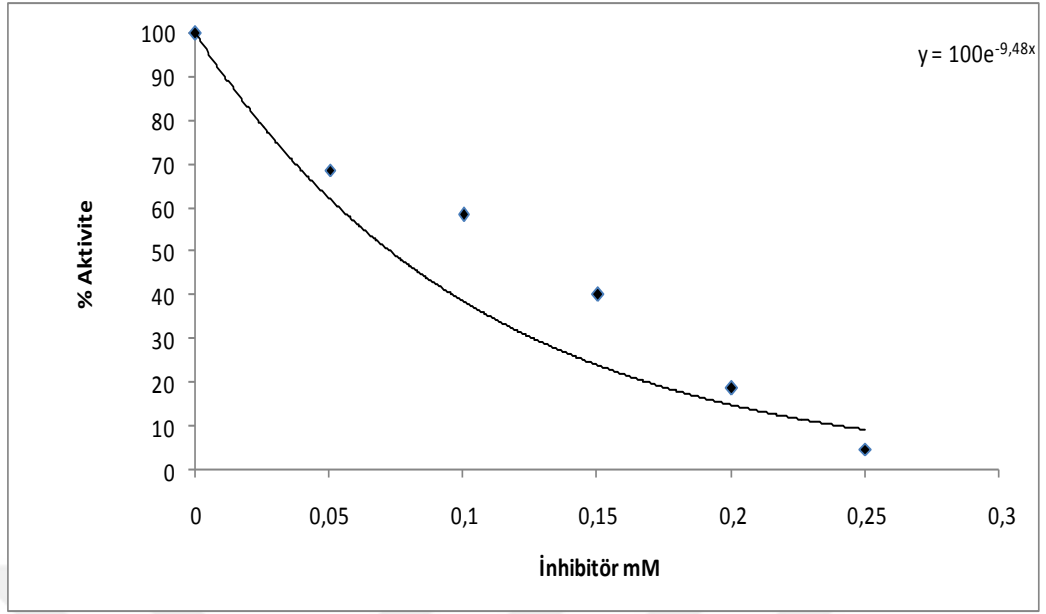
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,05	72
0,10	50,3
0,15	29,3
0,20	21
0,25	10



Şekil 4.12. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Ba^{+2} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik.

Çizelge 4.10. Al^{+3} iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

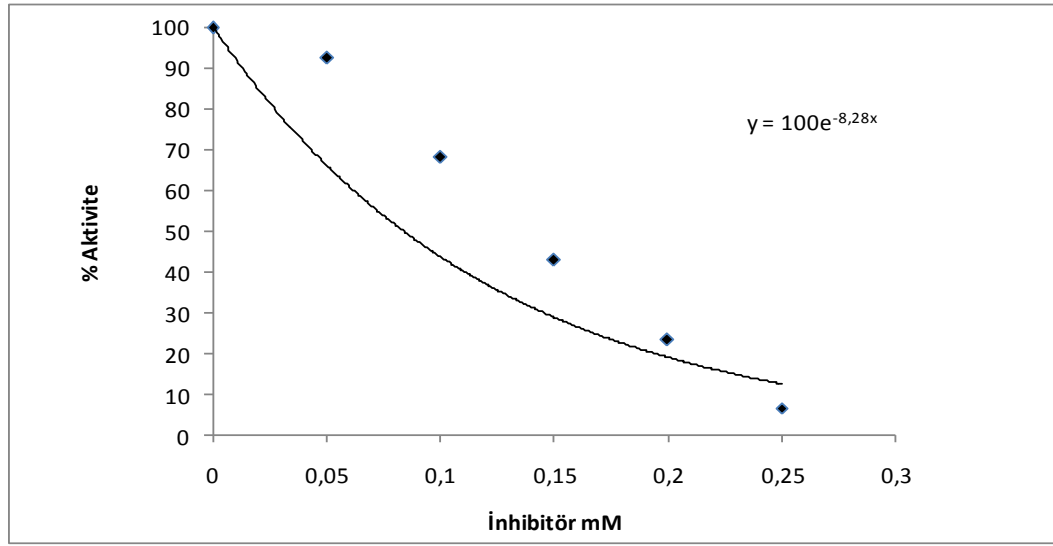
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,05	68,70
0,10	58,30
0,15	40,20
0,20	18,70
0,25	4,80



Şekil 4.13. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Al^{+3} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik.

Çizelge 4.11. Se^{-2} iyonunun Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,10	92,6
0,15	68,3
0,20	43
0,25	23,3
0,30	6,6



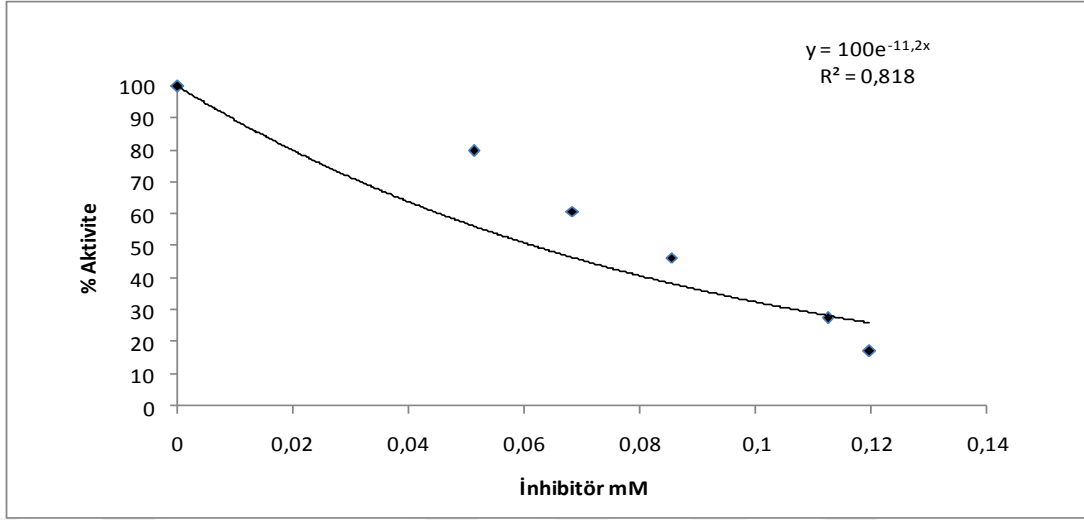
Şekil 4.14. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine Se^{-2} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik.

4.6. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç Dokusundan Saflaştırılan GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Pestisitler İçin IC_{50} Ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

Pestisit	IC_{50} (mM)	K_i Değerleri (mM)
	Oxamyl	0,062
Diniconazole	1,604	0,0644
Carbofuran	0,0415	0,0016
Tebuconazole	0,056	0,0022
Atrazine	0,750	0,0301

Çizelge 4.12. Oxamyl pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

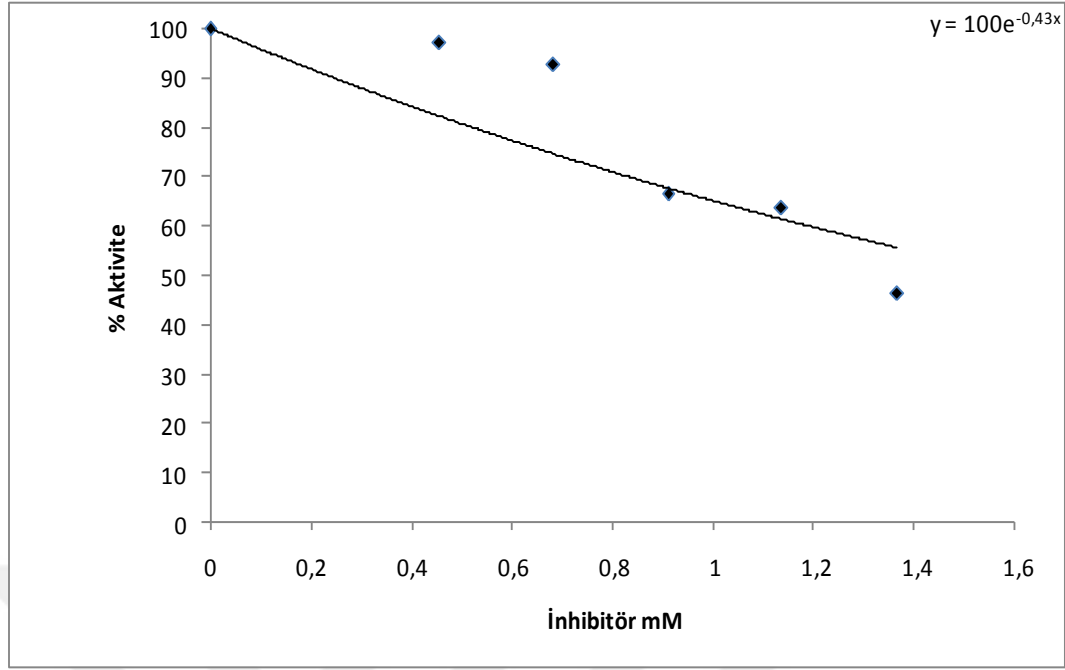
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,051	79,7
0,068	60,9
0,085	46,0
0,112	27,5
0,119	17,4



Şekil 4.15. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Oxamyl pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.13. Diniconazole pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

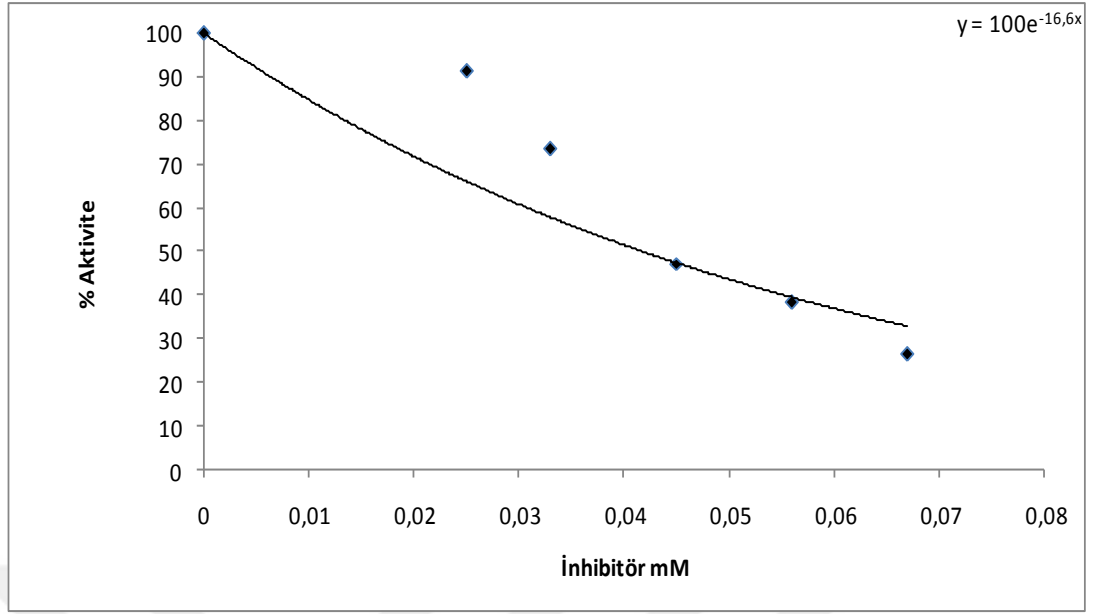
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,455	97,1
0,682	92,7
0,910	66,6
1,135	63,7
1,365	46,3



Şekil 4.16. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Diniconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.14. Carbofuran pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

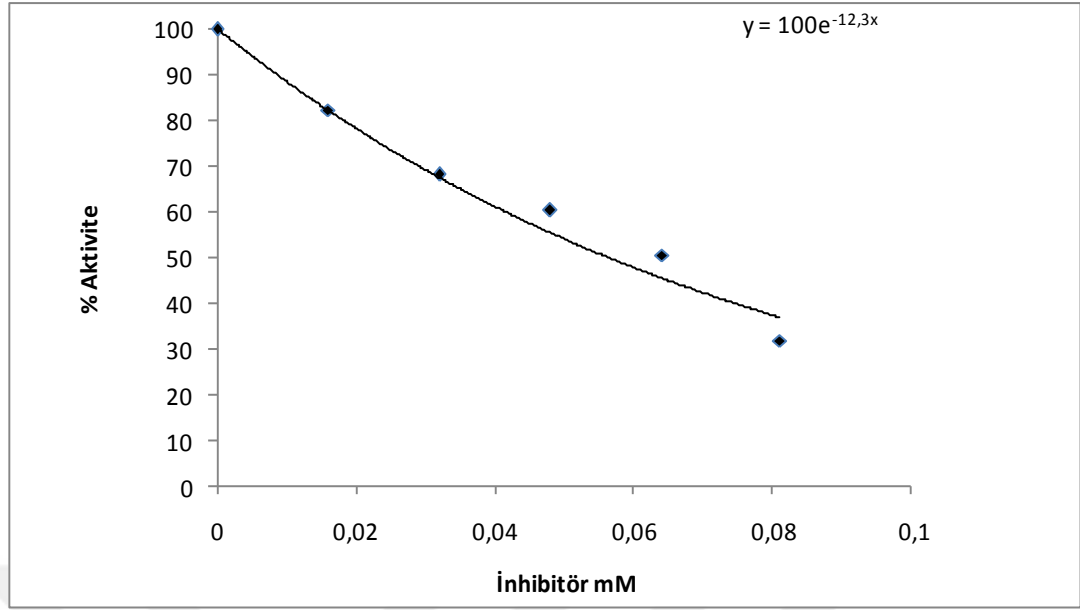
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,025	91,2
0,033	73,6
0,045	47,2
0,056	38,4
0,067	26,3



Şekil 4.17. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Carbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.15. Tebuconazole pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

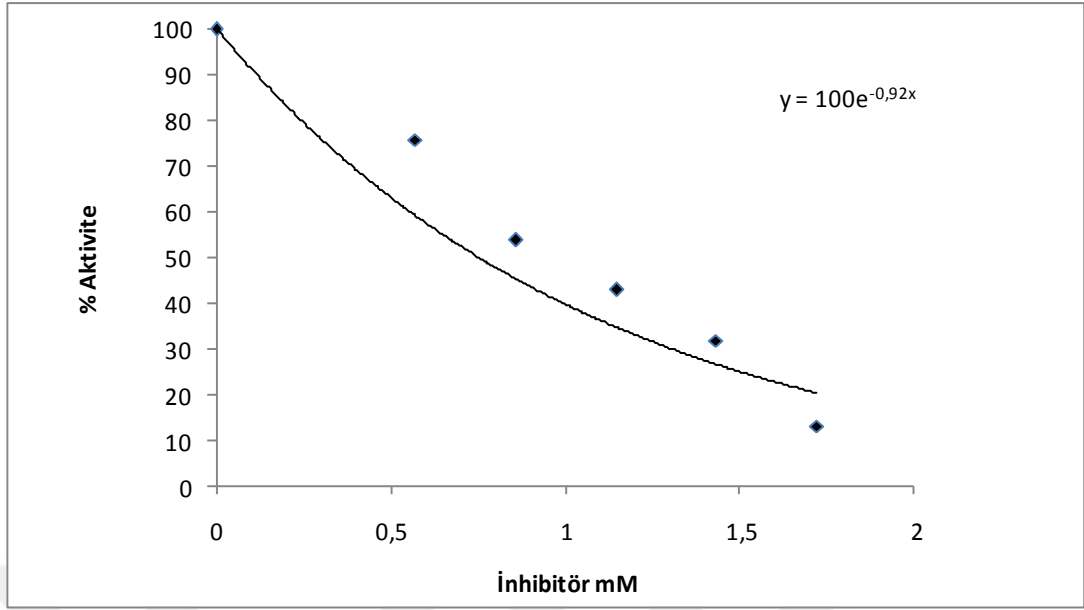
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,016	82,4
0,032	68,1
0,048	60,4
0,064	50,5
0,081	31,8



Şekil 4.18. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Tebuconazole pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC_{50} grafiği.

Çizelge 4.16. Atrazine pestisitinin Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
0,57	75,8
0,86	53,8
1,15	42,8
1,43	31,8
1,72	13,1



Şekil 4.19. İnci Kefali solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine Atrazine pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz dünyasındaki nüfus artışı, hızlı kentleşme ve teknolojik gelişmeler çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu da başta insan olmak üzere tüm canlılar için tehditler oluşturmaktadır. Canlı organizmalarda bu tehditlere karşı vücudun savunma sisteminde yer alan birçok enzim bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden biri ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon S-transferaz enzimidir.

Glutatyon S-transferaz metabolizmada birkaç mekanizmayla beraber ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasını sağlayan çok önemli bir role sahiptir. Bu enzim elektrofilik ksenobiyotiklerin, indirgenmiş glutatyonla (GSH) konjugasyonunu gerçekleştirerek inaktif hale getirdikten sonra vücuttan atılmalarını sağlamaktadır (Güvercin *et al.* 2008).

Canlı sistemine giren zararlı maddeler metabolizmada savunma mekanizmasıyla karşılaşırlar. Savunma sistemi faz I, faz II ve faz III olmak üzere 3 basamaktan oluşur. Faz II' reaksiyonlarında görev yapan önemli enzimlerden bir tanesi Glutatyon S-Transferaz enzimidir. GST'ler ksenobiyotik metabolizmasının önemli enzimlerinden biridir ve geniş spektrumda substrat spesifitesine sahiptir. Bu özelliğiyle GST endojen ve eksojen kimyasallara maruz kalan organizmada savunma görevi üstlenir. Bu enzim toksik bileşiklerin elektrofilik bölgelerini indirgenmiş glutatyonun –SH grubuyla etkisizleştirir. Ürün olarak suda çözünen merkaptürik asit (N-asetil-S-arilsistein) oluşur ve vücuttan idrarla atılır. GST'ler ince bağırsak, kalın bağırsak, böbrek, akciğer, kas, plesanta ve özelliklede solungaç gibi organların sitozol ve membranlarında bulunurlar (Hayes *et al.* 2005).

Enzimin birçok formunun saflaştırılması ve bu formların yapısal özelliklerinin incelenmesiyle iç içe geçmiş substrat spesifitelerinin olduğu anlaşılmıştır (Pabst *et al.* 1973; Askelöf *et al.* 1975). Enzimin sınıflandırılmasında proteinin fiziksel ve yapısal özellikleri esas alınmıştır. Bunun dışında GST bakterilerden, bitkilere, balıklara ve memelilere kadar birçok canlıdan saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve enzimin aktivitesi üzerine kimyasalların, metallerin ve pestisitlerin etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada zehirsizleştirme reaksiyonları için son derece önemli olan glutatyon S- transferaz enziminin endemik bir tür olan Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç hücrelerinin sitozolünden afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi, bazı metal iyonlarının ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Van gölünden elde edilen balıklar soğuk zincir kurallarına göre Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilmiş ve balıkların solungaçları ayrıldıktan sonra küçük parçalara ayrılarak homojenizasyon yöntemlerinden en etkili olan sıvı azot ile parçalanmıştır.

Tülbentle süzöldükten sonra hazırlanan homojenat uygun tampon içerisine alınıp 12500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj ile çöktürölen hücre atıkları atılarak süzöntü dengelenen Glutatyon agaroz afinite kolonuna yüklöneröek enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

GST'lerin saflaştırılma işleminde Glutatyon-agaroz afinite kolon ligandı olan glutatyonu GST'nin afinitesinin yüksek olması nedeniyle etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Saflaştırma işleminde sadece bir kromatografi tekniğinin kullanılmış olması, saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlar sağlamaktadır. Bu saflaştırma prosedürü sayesinde GST enzimi çok kısa bir sürede 11344 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %82,25 verimle 1543,51 kat saflaştırılmıştır.

Literatürler incelendiğinde, Huang *et al.* (2008)'un bir balık türünün (*monopterus albus*) solungacından GST enzimini glutatyon-sepharose 6B afinite kolonu ile saflaştırıp karakterize ettiğı görölmüştür. Enzimi 13,07 EÜ/mg spesifik aktiviteyle %14 verimle 300 kat saflaştırmışlardır. Yine benzer bir çalışmada Gökkuşacağı alabalığı eritrositlerinden GST enzimi 16,54 EÜ/ mg protein spesifik aktiviteyle %59 verimle 11026 kat saflaştırılmıştır (Çomaklı 2011).

Yapılan bir çalışmada insan eritrositlerinden GST enzimi glutatyon agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 16,00 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %80 verimle ve 1143 kat saflaştırılmıştır (Erat ve Şakiroğlu 2012). *E.coli*'den yapılan bir çalışmada ise GST, %11 verimle 800 kat saflaştırılmıştır (Arca ve ark.1990).

Yapılan başka bir çalışmada GST enzimi maruldan (*Lactuca sativa*'dan) DEAE- sephacel ve glutatyon-sepharose kolon kromatografisi olmak üzere 2 basamakta %9,6 verimle yaklaşık olarak 403 kat saflaştırılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda ise en az 3 basamaktan oluşan saflaştırma teknikleri kullanılmıştır. Örneğin GST enzimi insan trombositinden saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde CM-selüloz, Sephadex G-75, Afinite kromatografisi, Amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılmıştır. Enzim 7,5 EÜ/mg spesifik aktiviteyle 1071,4 kat saflaştırılmıştır (Loscalzo ve Freedman 1986). Daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında GST enzimini oldukça yüksek spesifik aktiviteyle ve verimle elde etmiş olduğumuz görülmektedir.

Glutatyon S-transferaz enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sı K-fosfat tamponuyla 7,3 olarak belirlendi. Huang *et al.* (2008) bir balık türü olan (*monopterus albus*) solungacından saflaştırdıkları GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH'yı 7,0-7,5 olarak gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Hamed *ve ark.* (2004) yaptıkları bir çalışmada glutatyon S-transferaz enzimini Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının solungacından saflaştırılıp enzimin optimum pH'sını 8,0 olarak belirlemişlerdir.

E.coli ekstraktlarından GST enziminin saflaştırıldığı bir çalışmada enzimin optimum pH'sı 7,0 olarak belirlenmiştir (Izuka *et al.* 1989). Bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi farklı kaynaklardan saflaştırılan Glutatyon S- transferaz enziminin optimum pH'sı 7,0-8,0 arasında değişmektedir. Çalışmamız sonucunda bulduğumuz optimum pH literatürlerle uyumludur.

Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin maksimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet optimum pH'da Fosfat tamponunda 120 mM olarak belirlenmiştir. Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç dokusundan elde ettiğimiz GST enziminin stabil pH'sını belirlemek amacıyla, fosfat tamponu alınan enzimlerde 7 gün süreyle aktivite ölçümü yapılmıştır. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungacı GST enziminin fosfat tamponu pH 8,0 de stabil olduğu, görülmüştür.

Enzimlerin aktiviteleri belirli bir sıcaklığa kadar genellikle artar ancak sıcaklık artırılmaya devam ettiğinde aktivite azalır hatta yüksek sıcaklıklarda enzimler denatüre olurlar. Şekil 4.7’de 60°C’den sonra enzimin hemen hemen aktivitesinin tamamını kaybettiği görülmektedir. Yaptığımız çalışmada Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç dokusundan saflaştırılan GST enziminin aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklığı bulmak amacıyla 0°C ile 70°C arasında her 5°C’ de bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve optimum sıcaklığı 35°C olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda Huang *et al.* (2008) *monopterus albus* balık solungacından saflaştırdığı GST enziminin optimum sıcaklığını 35°C, Çomaklı (2011) Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi için optimum sıcaklık 30°C olarak bulmuşlardır. Görüldüğü gibi elde ettiğimiz sonuçların literatürle uyumlu olması oldukça önemlidir.

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen GST enziminin molekül kütlesinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi 23 kDa (homodimer) olarak belirlenmiştir (Riol *et al.* 2001). Buna ek olarak *E.coli*’den izole edilen GST enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 22,5 kDa olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra yılan balığı karaciğerinden elde edilen GST enziminin molekül kütlesi 22,3 kDa (homodimer) olduğu görülmüştür (Novoa *et al.* 2004).

Van Gölü İnci Kefali Balığının solungaç dokusundan saflaştırdığımız GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerini belirlemek için denatüre edici faktörlerin ortamda bulunduğu SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Hem enzim numunesinin hem de standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak R_f -log M_A grafiği çizilmiştir. Daha sonra standart grafikten faydalanarak Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin alt birimlerinin molekül kütlesi yaklaşık 32 kDa olarak hesaplanmıştır.

Enzimin aktif bölgesinin yarısının olduğu andaki substrat konsantrasyonu olan K_M değeri aynı zamanda ES kompleksinin ayrışma sabitidir ve enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir. K_M sabitinin yüksek olması enzimin substrata ilgisinin az oluşu, K_M sabitinin düşük olması ise enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Çalışmamızda Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırdığımız GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit CDNB konsantrasyonunda, 5 farklı GSH konsantrasyonu kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüş ve Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten GSH substratı için K_M sabiti 0,1590 mM, V_{max} değeri ise 0,0854 EÜ/mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin diğer substratı olan CDNB için ise sabit GSH konsantrasyonun da, 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüş, Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten CDNB substratı için K_M sabiti 1,0574 mM, V_{max} değeri ise 0,373 EÜ/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Bir balık türü olan *monopterus albus* (Asya bataklık yılan balığı) karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin yapılan kinetik çalışmada enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 EÜ/mg, 15,68 EÜ/mg protein olarak belirlenmiştir (Huang et al. 2008). Hamed *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığı solungacı GST enziminin GSH ve CDNB için K_M sabitlerini yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM olarak belirtmişlerdir. Gökkuşacağı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin GSH için K_M sabiti 0,0395 mM, V_{max} değeri ise 0,0328 EÜ/mL olarak hesaplanmış, CDNB için K_M sabiti 0,2590 mM, V_{max} değeri ise 0,0655 EÜ/mL olarak belirlenmiştir (Çomaklı 2011).

Literatürler incelendiğinde çoğunlukla GST enziminin GSH substratı için K_M sabitinin düşük olduğu yani kosubstratı olan GSH'a ilgisinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebi GSH'ın GST enziminin kosubstratı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Çalışmamızın sonucu literatürlerle

uyumludur.

Endüstriyel atıklar gibi çeşitli yollarla yer altı sularına, göllere ve denizlere karışan kirleticiler (ağır metaller, tarım ilaçları, böcek ilaçları, vs.) beslenme yoluyla canlılar tarafından metabolizmaya alınmaktadır ve canlıyı olumsuz olarak etkilemektedir. Ağır metaller maruz kalmak çevresel toksikolojinin önemli bir problemidir. Bazı metaller ve ilaçlar ise canlılar için çok hayati öneme sahiptir. Ağır metaller ile ilaçların etken maddesi olan pestisitler atıkların bulunduğu ortamlarındaki balıklar üzerinde, konsantrasyonlarına bağlı olarak toksik etki yaparlar. Bazı ağır metaller (krom, kadmiyum), besin zincirleriyle girdikleri canlı bünyelerinden atılamadıkları için balıklarda fizyolojik olarak birikime neden olurlar ve bünyede belirli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yaparlar ve hatta ölüme neden olabilirler. Bu birikim balıklarda fizyolojik bozukluklara neden olur (Sehgal and Saxena1986).

Yapmış olduğumuz çalışmada Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerine alüminyum (Al^{+3}), baryum (Ba^{+2}), bor (B^{+3}) ve selenyum (Se^{-2}) iyonlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda Al^{+3} , Ba^{+2} , B^{+3} ve Se^{-2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerlerini belirlemek için % Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla Al^{+3} iyonu için 0,072 mM, B^{+3} iyonu için 0,100 mM, Ba^{+2} iyonu için 0,082 mM ve Se^{-2} iyonu için 0,083 mM olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi en kuvvetli inhibisyon gösteren metal iyonunun, IC_{50} değeri en küçük olan (0,072mM) Al^{+3} iyonunun olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerine Oxamyl, Diniconazole,

Carbofuran, Tebuconazole ve Atrazine pestisitlerinin *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda Oxamyl, Diniconazole, Carbofuran, Tebuconazole ve Atrazine pestisitlerin inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerlerini belirlemek için %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Pestisitlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla Oxamyl için 0,092 mM, Diniconazole için 1,604 mM, Carbofuran için 0,041 mM, Tebuconazole için 0,056 mM ve Atrazine için 0,750 mM olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi en kuvvetli inhibisyon gösteren pestisidin, IC₅₀ değeri en küçük olan (0,041mM) Carbofuran olduğu tespit edilmiştir.

CAT, SOD ve GST gibi antioksidant enzimler üzerine yapılan bir çalışmada *Channa punctata*'nın solungaçlarından sözkonusu enzimler saflaştırılmış ve Cu⁺², Cd⁺², Fe⁺² ve Ni⁺² metallerinin enzimlerin aktivitelerini zamanla azalttıklarını gözlemlenmiştir (Pandey *et al.* 2008).

Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusu GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının K_i sabitleri B⁺³ iyonu için 0,0040 mM, Ba⁺² iyonu için 0,0032 mM, Al⁺³ iyonu için 0,0028 mM, Se⁻² iyonu için 0,0033 mM olarak hesaplanmıştır.

Sonuç Olarak Bu Tez Kapsamında;

1. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan GST enziminin saflaştırılması işlemi için glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle enzim saf olarak elde edilmiş ve saflaştırma sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu yapılan araştırmalarda görülmüştür.

2. Çalışma sonucunda Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan GST enzimi 11344,83 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip %82,25 verimle 1543,51 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforezde bulunan tek bant ile tespit edilmiştir.

3. Saflaştırılan Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH 7,3 ve stabil pH 8,0 ; optimum iyonik şiddet 120 mM KH_2PO_4 ; optimum sıcaklık 35°C olarak belirlenmiştir.

4. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırılan GST enzimi üzerine bazı pestisit ve metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Oxamyl, Diniconazole, Carbofuran, Tebuconazole ve Atrazine pestisitleri ile Al^{+3} , B^{+3} , Ba^{+2} ve Se^{-2} metal iyonları ile çalışılmıştır.

5. Bu pestisitler ve metal iyonları için IC_{50} ve K_i sabitleri hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu pestisit ve metal iyonlarının düşük dozlarda GST enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. GST enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda canlıların hayatlarında doğrudan veya dolaylı olarak tehlikeli sonuçlara neden olabilir.

6. Bu nedenle bu enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir. Özellikle çevre kirliliğinde çok büyük bir pay sahibi olan ağır metallerin ve genelde tarım ilacı olarak kullanılan pestisitlerin düşük dozlarda bile enzimi inhibe etmelerine dair elde edilen bulgulara bakıldığında bu çalışmanın literatüre önemli katkılarda bulunacağı ve GST enzimi ile ilgili ileride

yapılacak çalışmalara ışık tutacağı açıkça görülmektedir.

Van gölüne dökülen akarsuların, kentsel ve endüstriyel atık suların ağır metal ve pestisit yükleri bakımından analiz edilmesi, bu yükün kaynağının ortaya konularak azaltma veya önleme çarelerinin bulunması gereklidir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir;

Çizelge 5.1. Van Gölü İnci Kefali Balığı Solungaç GST enzimi için karakterizasyon sonuçları.

Çalışma tipi	Sonuç
Optimum pH	7,3
Optimum iyonik şiddet	120 mM
Optimum sıcaklık	35°C
Stabil pH	8,0
Mol kütlesi	32,218 kDa
GSH K_M	0,1590 mM
GSH V_{max}	0,0854 EÜ/mL
CDNB K_M	1,0574 mM
CDNB V_{max}	0,373 EÜ/mL

Çizelge 5.2. Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların için IC_{50} ve K_i değerleri sonuçları.

Metal	IC_{50} (mM)	K_i Değerleri(mM)
	fGST	
B^{+3}	0,100	0,0040
Ba^{+2}	0,082	0,0032
Al^{+3}	0,072	0,0028
Se^{-2}	0,083	0,0033

Çizelge 5.3.Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC_{50} ve K_i değerleri sonuçları.

Pestisit	IC_{50}(mM)	K_i Değerleri(mM)
Oxamyl	0,062	0,0024
Diniconazole	1,604	0,0644
Carbofuran	0,0415	0,0016
Tebuconazole	0,056	0,0022
Atrazine	0,750	0,0301

KAYNAKLAR

- Al-Mustafa, A.H., 2006. *In vitro* Study Involving the Comparative Effect of Heavy Metal Ions on Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxide Levels in Human Erythrocytes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2, 9 (14), 2586-2592.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10, (1) 2-18.
- Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of two glutathione S- aryltransferase activities from rat liver, *Biochem.J.* 147, 513.
- Autrup. H., 2000. Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Matebolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research*, 464,65-76.
- Ayten DEMİRTAŞ 2010 Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41 (1), 75-80, 2010.
- Baş, O., 2006. Dinitrocresol'ün (*Rat Rattus Norvegicus*) Sıçan Glutatyon S-Transferaz Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., 1988. Eineverstdliche EinführungindeToxilologie. *Cheime und Gesundheit*, ISBN. 3-527-26-455-8.
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P., 1961. *Biochem. J.*, 79, 516-524.
- Boyer, T.D., Kenney, W.C., 1985. Preparation, characterization and propoities of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes*. New York: John Wiley&Sons Inc., 297-363.
- Bradford 1976 (A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Marion M. Bradford).
- Cabagna, M.C., 2011. Arch Environ Contam Toxicol, Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors, 60, 681-689. Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200,29-38.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
- Çoban *et al.* (2007). Tekman *et al.* (2008)
- Çomaklı V., M. Çiftçi, Ö. İ. Küfrevioğlu / *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2011, 39 (4), 413-419.

- Coşkun, G., 2007. Glutation-S-transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Erat, M. and Şakiroğlu, H., 2013. The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, (4) 711-6.
- Experimental And Therapeutic Medicine 2016 Association between glutathione S-transferase M1/T1 gene polymorphisms and susceptibility to endometriosis: A systematic review and meta-analysis.
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 1225.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination of Some Kinetic and Characteristic Properties of Glutathione S-transferase from Bovine Erythrocytes. *Protein & Peptide Letters*, 15, (1) 6-12.
- Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., 2004. Inhibition of Glutathione s-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 42, (9) 1401-418.
- Habig, W. H; Pabst, M. J and Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249:7130-7139.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M. and Guinidi, R.A.M., 2004. Glutathione and its Related Enzymes in the Nile Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, (3-4) 189-199.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- Hazarika, A., Sarkara, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185, 1-8.
- Hee-Joong, P., Hyun-Young, C. and Kwang-Hoon, K., 2005. Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 232-237.
- <http://www.tarimkutuphanesi.com/tarimilaclari>
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q.Y., 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147, 96-100.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. And Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli B*. *Journal Of Bacteriology*, 6039-6042.
- Ioannides, C., 2002. *Xenobiotic metabolism: An overview* (C. Ioannides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 1-32.

- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2003. Metallerin Çevresel Etkileri -I, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. Biyokimya, Aktif yayınları, Erzurum.
- Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2012).
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Lajmanovich, R.C., Andre's, M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M.,
- Lajmanovich, R.C., Andre's, M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C., 2011. Arch Environ Contam Toxicol, Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors, 60, 681–689.
- Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med., 349, 474-485.
- Liebman, J.F. and Greenberg, A., 1988. Mechanistic principles of enzyme activity. VCH Publishers, New York.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 57, 685.
- Loscalzo, J. and Freedman, J., 1986. Purification and characterization of human platelet glutathione-S transferase From bloodjournal.hematologylibrary.org by guest on, (67) 1595-1599.
- Lushchak, O.K., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. Chemosphere, 76, 932–937.
- Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. Methods in Enzymology 2005; 401, 1-8.
- Novoa-Valinas, M.C., Perez-Lopez, M., Melgar, M.J., 2002. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic Glutathione S-transferase from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo solar*) and Brown trout (*Salmo Trutta*) Comparative Biochemistry and physiology, part C 131, 207-213.
- Pabst, M., Habig, W.H. and Jakoby, W.B., 1973. Mercapturic acid formation: theseveral glutathione transferases of rat liver, Biochem. Biophys. Res. Commun, 52, 1123-1128.
- Relyea, R.A., 2006. The impact of insecticides and herbicide on the biodiversity and productivity of aquatic communities: response. Ecol. Appl., 16, 2027–2034.
- Sehgal, R. and Saxena, A.B., 1986. Toxicity of zinc to a viviparous fish *Lebistes reticulatus* (Peters). Bull. Environm. Contam. Toxicol., 36, 888-894.
- Sheehan, J., Templer, M., Gregory, M., Hanumanthaiah, R., Troyer, D., Phan, T., Thankavel, B., and Jagadeeswaran, P., 2001. Demonstration of the extrinsic coagulation pathway in teleostei: Identification of zebrafish coagulation factor VII., Proc. Natl. Acad. Sci., 98, (15), 8768-8773.

Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Erzurum.

T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi Temmuz 2015.

Trends in Pharmacological Sciences December 2012, Vol. 33, No. 12.

Türkanoglu, A., 2007. Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University.

Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics 2016



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yakup ZARİÇ
Doğum Yeri ve Tarihi	AĞRI / 25.05.1978
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü/Biyokimya Ana Bilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller	İngilizce
Bilimsel Faaliyetler	
İş Deneyimi	
Stajlar	
Projeler	
Çalıştığı Kurumlar	Ağrı İl Milli Eğitim Müdürlüğü
İletişim	
E-posta Adresi	yakupzaric@gmail.com
Mezuniyet Tarihi	