

**KARAYEMİŞ MEYVESİNDEN (*Prunus Laurocerasus* L.)
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Fikret TÜRKAN

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
2015
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KARAYEMİŞ MEYVESİNDEN (*Prunus Laurocerasus* L.)
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Fikret TÜRKAN

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KARAYEMİŞ MEYVESİNDEN (*Prunus Laurocerasus L.*) GLUTATYON S-
TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KAREKTERİZASYONU VE
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU danışmanlığında, Fikret TÜRKAN tarafından hazırlanan bu çalışma **23/02/2015** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **12.03.2015** tarih ve **10.../437** nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

KARAYEMİŞ MEYVESİNDEN (*Prunus Laurocerasus* L.) GLUTATYON S- TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Fikret TÜRKAN
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

Karayemiş meyvesi (*Prunus Laurocerasus* L.) antioksidan özelliğiyle bilinen ve özellikle halk hekimliğinde çokça kullanılan bir meyvedir. Bu tezde karayemişin meyve etinden Glutatyon S- transferaz enzimi (E.C. 2.5.1.18) saflaştırıldı. Saflaştırılma işlemi afinite ve jel filtrasyon kromatografileriyle ayrı ayrı yapıldı. Enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE elektroforezi uygulandı. Enzim için karakterizasyon çalışmaları olarak optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, stabil pH ile GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} çalışmaları yapıldı. Enzimin optimum pH' sı K-fosfat tamponunda 7,0; optimum sıcaklığı 30°C, optimum iyonik şiddeti 0,125 M, stabil pH'sı K-fosfat tamponunda 6,5; GSH ve CDNB için sırasıyla K_M değeri 0,344 mM; 0,89 mM, V_{max} değeri 0,098 EÜ/ml, 0,214 EÜ/ml olarak bulundu. Buna ilaveten, enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonların (Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2}) ve pestisitlerin (Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Askorbik Asit (Vitamin C), Benzoik Asit ve Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) organik bileşik olarak, glifosat izopropilamin tuzu, fenoxaprop-p-etil, cypermethrin, dichlorvos, imidacloprid) inhibisyon etkileri çalışıldı Lineweaver–Burk grafiği metal iyonları ve pestisitler için çizilerek IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlendi.

2015, 125 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karayemiş, Glutatyon S-transferaz, Saflaştırma, Karakterizasyon İnhibisyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRUFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM LAUREL FRUIT (*Prunus Laurocerasus L.*) AND INVESTIGATION OF THE KINETIC PROPERTIES

Fikret TÜRKAN

Atatürk University
Graduated School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry
Biochemistry Science

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

The laurel fruit (*Prunus Laurocerasus L.*) is a plant, widely used in folk medicine and is well known for *its* antioxidant properties. In this thesis, Glutathione S-transferase (GST), one of well-known antioxidant enzyme, was purified from the laurel fruit flesh. The purification of the enzyme was performed separately by affinity and gel filtration chromatography. The purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE electrophoresis. Characterization studies were done for the enzyme. For this purpose, optimal pH, optimal temperature, optimum ionic strength, stable pH, Km and Vmax values for GSH and CDNB were also determined for the enzyme as 7.0 in K-phosphate buffer, 30°C, 0.125 M, 6.5 in K-phosphate buffer, 0.344 mM, 0.89 mM, and 0.098 EU / ml, 0.214 EU / ml, respectively. Additionally, inhibitory effects of some metal ions (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+}) and pesticides (Sodium dodecyl sulfate (SDS), Ascorbic acid (Vitamin C), Benzoic acid, and Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) as an organic compounds; Glyphosate isopropylamine salt, Fenoxaprop-p-ethyl, Cypermethrin, Dichlorvos, and Imidacloprid) were examined the enzyme's activity in vitro by performing Lineweaver–Burk graphs and plotting activity%. IC_{50} and K_i values were calculated for each of metal ions and pesticides.

2015, 125 pages

Keywords: Laurel fruit, Glutathione S-transferase, Purification, Characterization, Inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmalarım esnasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirilerinden yararlandığım ve ihtiyaç duyduğum heran fedakarca yanımda olan saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis şAKİROĞLU'na

Biyokimya Bilim Dalının değerli öğretim üyelerine çalışmalarım esnasında verdikleri desteklerden dolayı başta Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVIÖĞLU olmak üzere, Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e; Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a

Çalışmalarım esnasında ekip ruhunu tam anlamıyla bilen ve emeklerini esirgemeyen Biyokimya Laboratuvarındaki tüm araştırmacı arkadaşlarıma,

Çalışmalarımın her aşamasında bana gösterdikleri ilgi, sevgi ve sabırlarından dolayı aileme, sevgili eşime ve biricik kızım Ahsen Erva'ya sonsuz teşekkür ederim.

Fikret TÜRKAN

şubat, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Glutasyon S- transferaz Enzimi.....	7
1.2.1. GST enziminin görevleri.....	13
1.2.2. GST enziminin substrat özgüllüğü.....	16
1.2.3. GST enzim metabolizması.....	20
1.2.4. GST enzim aktivitesini etkileyen faktörler.....	21
1.3. Karayemiş.....	23
1.4. Metal İyonları.....	25
1.5. Pestisitler.....	27
1.5.1. GST enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitler ve özellikleri.....	28
1.5.1.a. Diklorvos.....	28
1.5.1.b. Cypermethrin.....	29
1.5.1.c. Glifosat-izopropilamin tuzu (N-(fosfonik asit) glisin).....	29
1.5.1.d. Fenoxaprop- p-ethyl.....	30
1.5.1.e. Imidacloprid.....	30
1.6. Organik Bileşikler.....	31
1.6.1. Askorbik asit (C Vitamini).....	31
1.6.2. Benzoik asit.....	31
1.6.3. Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA).....	32
1.6.4. Sodyum dodesil sülfat (SDS).....	32
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43

3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	43
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	43
3.1.3. GST Enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	44
3.1.4. Homojenat hazırlama çözeltisi.....	45
3.1.5. Diyaliz çözeltisi ve hazırlanması.....	45
3.1.6. GST enziminin afinite kolonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları.....	45
3.1.7. Elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	47
3.1.8. Gümüş boyama çözeltileri.....	48
3.1.9. Diğer çözeltiler.....	48
3.1.10. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler.....	49
3.2. Yöntem.....	50
3.2.1. Protein tayini.....	50
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini.....	50
3.2.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	50
3.2.2. Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini.....	51
3.2.3. GST enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması.....	53
3.2.4. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması.....	54
3.2.5. Karayemiş meyvesinden GST'nin saflaştırılması.....	54
3.2.5.a. Karayemiş temini ve homojenat hazırlanması.....	54
3.2.5.b. Homojenattaki enzimin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması.....	55
3.2.5.c. Homojenattaki enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	55
3.2.6. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	56
3.3. Karayemiş Meyvesinden Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları.....	57
3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	57
3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi.....	57
3.3.3. Optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi.....	58

3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi.....	59
3.3.5. Karayemiş GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar.....	59
3.4. Karayemiş GST Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisit, Organik Bileşik ve Metal İyonlarının İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	60
3.5. Karayemiş Meyvesinden Elde Edilen GST Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Pestisit, Metal İyonları ve Organik Bileşiklerin K_i Sabitlerinin Bulunması.....	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	62
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	62
4.2. Karayemiş Bitkisi GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar	62
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları	62
4.2.2. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografi sonuçları	63
4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile GST Enzim Saflığının Kontrolü.....	64
4.4. Karayemiş Meyvesi GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları	65
4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	65
4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları	67
4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları.....	68
4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları	70
4.4.5. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	72
4.5. Karayemiş Meyvesi GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Organik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	74
4.5.1. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları.....	74
4.5.2. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	80
4.5.3. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren organik bileşikler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	85

4.5.4. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	90
4.5.5. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları.....	97
4.5.6. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren organik bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	103
4.6. Karayemiş Meyvesi GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi İncelenen Diğer Kimyasallar	108
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	109
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	126

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli	5
Şekil 1.2. Sitosolik GST enzimleri	10
Şekil 1.3. GST enziminin görevleri	15
Şekil 1.4. Glutasyon molekülünün yapısı.....	17
Şekil 1.5. Okside glutasyon.....	18
Şekil 1.6. Karayemiş meyvesi, karayemiş tohumu, karayemiş yaprağı	23
Şekil 1.7. Diklorvos molekülünün yapısal formülü.....	28
Şekil 1.8. Cypermethrin molekülünün yapısal formülü.....	29
Şekil 1.9. Glifosat-izopropilamin molekülünün yapısal formülü	30
Şekil 1.10. Fenoxaprop- p-ethyl molekülünün yapısal formülü	30
Şekil 1.11. Imidacloprid molekülünün yapısal formülü	31
Şekil 1.12. Askorbik asit molekülünün yapısal formülü	31
Şekil 1.13. Benzoik asit molekülünün yapısal formülü	32
Şekil 1.14. EDTA molekülünün yapısal formülü	32
Şekil 1.15. SDS molekülünün yapısal formülü.....	33
Şekil 2.1. GST enziminin ilk zamanlar adlandırılması	34
Şekil 3.1. GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması .	52
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	62
Şekil 4.2. Karayemiş meyvesi GST enziminin glutasyon agaroz afinite kolonundan GSH ile elüsyon grafiği	63
Şekil 4.3. Karayemiş meyvesi GST enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği	64
Şekil 4.4. Glutasyon-agaroz afinite kolonuyla saflaştırılan karayemiş meyvesi GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	65
Şekil 4.5. Karayemiş meyvesi GST enziminin K-fosfat tamponu ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği.....	66
Şekil 4.6. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için yapılan aktivite-K-fosfat (M) grafiği	68

Şekil 4.7. Karayemiş meyvesi GST enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	69
Şekil 4.8. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik	71
Şekil 4.9. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için K-fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafi.....	72
Şekil 4.10. Karayemiş meyvesi GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	73
Şekil 4.11. Karayemiş meyvesi GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği	74
Şekil 4.12. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Glifosat izopropilamin tuzu] grafiği	75
Şekil 4.13. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine fenoxaprop-p-ethyl'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [fenoxaprop-p-ethyl] grafiği.....	76
Şekil 4.14. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine cypermethrin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [cypermethrin] grafiği	77
Şekil 4.15. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine dichlorvos'un farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [dichlorvos] grafiği.....	78
Şekil 4.16. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine İmidacloprid'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [İmidacloprid] grafiği.....	79
Şekil 4.17. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Cd^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Cd^{+2}] grafiği.....	81
Şekil 4.18. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Ni^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Ni^{+2}] grafiği.....	82
Şekil 4.19. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Cu^{+2}] grafiği	83

Şekil 4.20. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Mg^{+2}]$ grafiği	84
Şekil 4.21. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ca^{+2}]$ grafiği	85
Şekil 4.22. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine EDTA'nın farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[EDTA]$ grafiği	86
Şekil 4.23. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Askorbik Asit'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Askorbik Asit]$ grafiği	87
Şekil 4.24. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Benzoik Asit'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Benzoik Asit]$ grafiği	88
Şekil 4.25. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine SDS'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[SDS]$ grafiği	89
Şeil 4.26. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) etkisi	92
Şekil 4.27. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Fenoxaprop- p-ethylh'in etkisi ..	93
Şekil 4.28. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cypermethrin'in etkisi	94
Şekil 4.29. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Dichlorvos'un etkisi	95
Şekil 4.30. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine İmidacloprid'in etkisi	96
Şekil 4.31. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cd^{+2} 'un etkisi	98
Şekil 4.32. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Ni^{+2} 'nin etkisi	99
Şekil 4.33. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'in etkisi	100
Şekil 4.34. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'un etkisi	101
Şekil 4.35. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi	102
Şekil 4.36. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi	104
Şekil 4.37. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Askorbik Asit'in etkisi	105
Şekil 4.38. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Benzoik Asit'in etkisi	106
Şekil 4.39. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi	107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. GST Enziminin Aminoasit Analizi (mol başına).....	11
Çizelge 3.1. Gradientli elüsyon için hazırlanan tüpler ve içerikleri	46
Çizelge 3.2. Karayemiş GST enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	53
Çizelge 4.1. Karayemiş meyvesi jel filtrasyon ve afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları	64
Çizelge 4.2. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi ile 0,1 M Tris-HCl çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	66
Çizelge 4.3. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddeti için 0,1 M KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi ile kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	67
Çizelge 4.4. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	69
Çizelge 4.5. Karayemiş meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık, Ea, ΔH ve Q ₁₀ değerlerinin belirlenmesi çalışmaları	70
Çizelge 4.6. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	70
Çizelge 4.7. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için K-fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	71
Çizelge 4.8. Karayemiş bitkisi GST enzimi için belirlenen optimal aktivite şartları ve stabil pH değeri	72
Çizelge 4.9. Karayemiş bitkisi GST enzimi için GSH ve CDNB substratları için K _M , V _{max} , k _{cat} ve V ₀ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.....	74
Çizelge 4.10. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör	75

Çizelge 4.11. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Fenoxaprop - p-ethylh'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	76
Çizelge 4.12. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cypermethrin'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	77
Çizelge 4.13. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine dichlorvos'un IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	78
Çizelge 4.14. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Imidacloprid'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	79
Çizelge 4.15. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin IC ₅₀ değerleri	80
Çizelge 4.16. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cd ⁺² 'un IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	80
Çizelge 4.17. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ni ⁺² 'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	81
Çizelge 4.18. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cu ⁺² 'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	82
Çizelge 4.19. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Mg ⁺² 'un IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	83

Çizelge 4.20. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ca^{+2} 'un IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonlar	84
Çizelge 4.21. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların IC_{50} değerleri.....	85
Çizelge 4.22. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine EDTA'nın IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	86
Çizelge 4.23. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Askorbik Asit'in IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	87
Çizelge 4.24. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Benzoik Asit'in IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	88
Çizelge 4.25. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine SDS'nin IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	89
Çizelge 4.26. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC_{50} değerleri	90
Çizelge 4.27. Karayemiş GST enzimi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	91
Çizelge 4.28. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Fenoxaprop- p-ethylh'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	92

Çizelge 4.29. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cypermethrin'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	93
Çizelge 4.30. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine dichlorvos'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	94
Çizelge 4.31. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Imidacloprid'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	95
Çizelge 4.32. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan pestisitler	96
Çizelge 4.33. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cd^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	98
Çizelge 4.34. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ni^{+2} 'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	99
Çizelge 4.35. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cu^{+2} 'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	100
Çizelge 4.36. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Mg^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	101
Çizelge 4.37. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ca^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	102
Çizelge 4.38. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan metal iyonları.....	103

Çizelge 4.39. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine EDTA'nın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	104
Çizelge 4.40. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Askorbik Asit'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	105
Çizelge 4.41. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Benzoik Asit'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	106
Çizelge 4.42. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine SDS'nin K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	107
Çizelge 4.43. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan organik bileşikler	108
Çizelge 4.44. Karayemiş meyvesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan diğer kimyasal maddeler	108

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlı organizmalarda meydana gelen kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve herhangi bir yan ürün oluşturmadan %100'lük bir ürün verimi sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörler enzim olarak adlandırılır (Smitt *et al.* 1997; Garrett and Grisham 1999). Bu biyolojik katalizlerin en önemli özellikleri, katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Enerji açısından mümkün kullanışlı yollara kanalize eder. Böylece enzimler metabolizmadaki tüm olayları yönlendirirler (Gözükara 1997).

Biyokimya tarihinde enzim çalışmaları oldukça eskiye dayanır. Bu çalışmalar ilk olarak, 1700'lü yılların sonlarında, mide salgılarıyla etin sindirilmesi üzerine yapılan araştırmalar neticesinde keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalar, 1800'lü yıllarda tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle, nişastanın şekere dönüşümü araştırmalarıyla devam ettirilmiştir. 1850'lerde Louis Pasteur, şekerin mayayla alkole fermentleşmesinde, şekerin fermentler tarafından katalizlendiği sonucuna varmıştır. Pasteur, bu fermentlerin, canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu ileri sürdü. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner, maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da fermantasyonun hücreden uzaklaştırıldığında, işlevini devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W. Kühne ise bu molekülleri, enzimler olarak adlandırdı. 1926'da James Sumner'ın üreaz enzimini saf kristal halde izole etmesiyle enzim çalışmaları hız kazanmıştır. Daha sonra yeni enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması biyokimya bilimini geliştirdi (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009; Gürdöl ve Ademoğlu 2010).

Enzimler protein yapısındadırlar (Bazı katalitik RNA molekülleri hariç). Bütün enzimler bu katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Bir enzimin katalitik aktivitesi kaybolursa enzim denatüre olmuş demektir. Enzim, kendisini oluşturan amino asitlerine dönüştürülürse, katalitik aktivitesi kaybolur.

Bu nedenle proteinlerin, birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı enzimlerin katalitik aktivitesi için esastır (Lehninger 2005). Enzimler organizmada gerçekleşen reaksiyonların hızını enzimsiz gerçekleşen bir reaksiyona göre yaklaşık 10^8 - 10^{20} kat hızlandırabilir. Katalizsiz olarak yarılanma zamanı 300 yıl olan bir reaksiyon, enzim tarafından 10^{10} kat hızlandırılırsa yarılanma zamanı sadece 1 s olur. Sonuç olarak hücredeki birçok reaksiyonun ancak enzimler sayesinde mümkün olacağı söylenebilir (Lehninger 1982).

Bazı enzimlerin katalitik aktivite gösterebilmeleri için protein yapısında olmaları yeterliyken bazıları aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak bilinen ve protein yapısında olmayan moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Kofaktör bir metal iyonu (Zn^{2+} , Fe^{2+} vd.) veya koenzim olarak adlandırılan bir organik molekül (NAD^+ , FAD, koenzim A) olabilir. Enzimlerin bir kısmı aktivite gösterebilmek için koenzime ve metal iyonuna birlikte ihtiyaç duymaktadır. Koenzimler proteinlerin denatüre olduğu durumlardan etkilenmemektedirler (Voet and Voet 1995). Kimyasal bakımdan enzimler protein ana yapısında bulunan moleküllerdir. Bir enzimin sadece proteinden oluşan kısmına apoenzim, tüm kofaktörleri ve koenzimleri içeren katalitik aktif haline ise haloenzim denir (Yıldırım vd 2010). Enzimlerin aktivitelerini artıran bileşiklere aktivatör denir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerden oluşmaktadır. Bunlar kofaktörler gibi kataliz olayına her zaman katılmazlar (Gözükara 1989).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de reaksiyona özgün olmalarıdır. Katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik moleküllerdir. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzim varlığında saniyelik zaman diliminde gerçekleşebilmektedir. Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Enzim Ünitesi, $25^{\circ}C$ 'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim

ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger 1982; Bingöl 1983).

Enzimler sınıflandırılırken hem katalizledikleri reaksiyon tipleri, hem de substrat özgülükleri dikkate alınarak bir sınıflandırma geliştirilmiştir (Koolman and Röhm 2003). Bütün enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılmış ve bu sınıflarda yer alan her enzim 4 rakamdan oluşan bir enzim kod numarası (EC) ile ifade edilmiştir. EC numarasının ilk rakamı enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam alıcı grubu ve dördüncü rakam ise o serideki sıra numarasını ifade eder (Yıldırım vd 2010).

Enzimler 6 ana grupta sınıflandırılır.

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme (redoks) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup önceden dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksigenazlar, peroksidazlar olarakta anılan enzimlerdir.

2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

3. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

4. Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

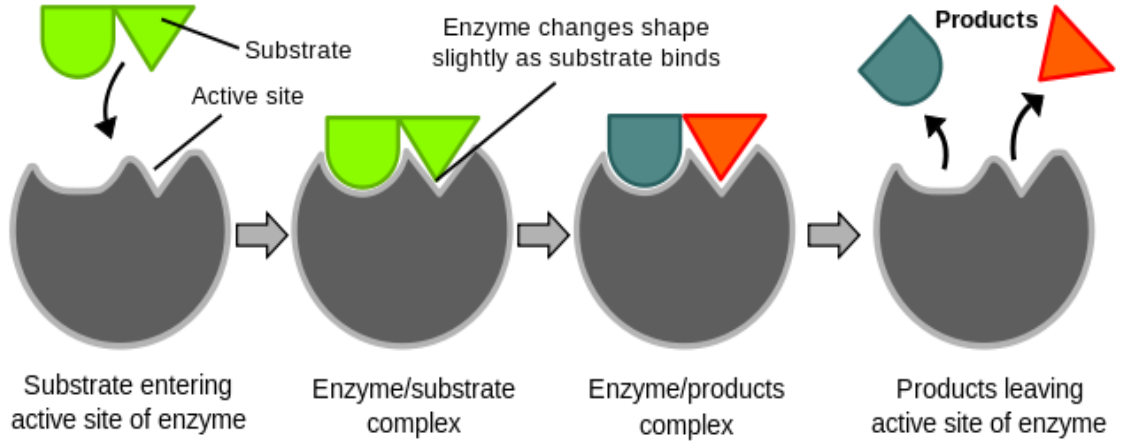
5. İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Molekül içinde oksidasyon-redüksiyonu, grup transferini ve çifte bağ oluşumunu gerçekleştirirler. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

6. Ligazlar: ATP'nin hidrolizi yardımıyla açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü bağlayıp sentez yapan enzimlerdir (Yıldırım vd 2010).

Canlı organizmalardaki reaksiyonlarda enzimatik kataliz şarttır. Biyolojik olarak uygun koşullarda katalizlenmeyen reaksiyolar, son derece yavaş ilerlerler. Genellikle biyolojik moleküller, nötral pH, orta derecede sıcaklık ve hücre içi sıvı ortamında çok kararlıdır. Ayrıca biyokimyasal birçok tepkime, reaksiyon için gerekli olan iki veya daha fazla molekülün çarpışması ya da kararlı olmayan yüklü araçların geçici oluşumu gibi hücre ortamında olanaksız veya tercih edilmeyen kimyasal olayları gerektirirler (Lehninger 2005).

Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayırıcı özelliği; aktif bölge olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış özel bir cep ya da bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül, substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur (Lehninger 2005).

İlk olarak 1880'de Adolphe Wurtz tarafından varlığı gösterilmiş olan enzim-substrat kompleksi; enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar. E-S kompleksi, aynı zamanda enzim mekanizmalarının teorik tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışını açıklayan matematiksel işlemler için başlama noktasıdır (Lehninger 2005).



Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli

Kinetikler, enzim mekanizmalarının çalışması için önemli bir yöntemdir. Birçok enzim ortak bazı kinetik özelliklere sahiptir. Substrat değişimi artarken sabit değişimdeki bir enzimin katalitik aktivitesi, ES kompleksi oluşturan bütün enzimlerde esansiyel olan karakteristik maksimum hız olan V_{max} 'a yaklaşmak için hiperbolik bir biçimde artar. Yarı hız V_{max} 'ı veren substrat değişimi bir substratı etkileyen her bir enzim için karakteristik olan Michaelis Menten sabiti K_M 'dir. Michaelis Menten eşitliği şudur:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Bu eşitlik, bir enzimatik tepkimenin ilk hızının substrat değişimi ve K_M (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) sabiti üzerinden V_{max} ile ilişkili olduğunu anlatır. K_M ve V_{max} 'ın her biri ölçülebilir. Bu sabitler farklı enzimler için farklı anlamlara sahiptir (Lehninger 2005).

Enzimatik reaksiyonların hızı yani aktivitesi ise; pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin varlığı gibi pek çok faktörlerden etkilenmektedir (Yıldırım vd 2010). Bu reaksiyonların hızını azaltan veya enzimlerin kataliz görevlerini yerine getirmelerinin tamamen engelleyen maddelere inhibitör denir. Enzimlere bağlanabildikleri halde, substrat gibi hareket etmeyen ve ürün

oluşturmayan bu maddeler, enzimin katalitik görevini yerine getirmesini engeller. Bu olaya da inhibisyon denir (Gürdöl ve Ademoğlu 2010). Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekteştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

İnhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_M (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim-inhibitör kompleksi hızla ayrışabilir özellikle bir denge hali söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif), yarı yarışmalı (unkompetitif) ve lineer karışık tip (mixed) inhibisyon olmak üzere dört kısma ayrılır.

Yarışmalı inhibitör, yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece enzimin substrata bağlanması engellenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken K_M değeri artar.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon çeşidinde ise inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumunun vasıtasıyla ES kompleksi ortamdaki sürekli çekildiğinden enzim substratta ES kompleksinin oluşum dengesini daha fazla sağa kaydırır ve K_M değeri küçülür.

Lineer karışık tip inhibisyon yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir türü olup dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptit zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir (Lehninger *et al.* 2005).

1.2. Glutatyon S- transferaz Enzimi

GST şeklinde sembolize edilen Glutatyon S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzimi, detoksifikasyon metabolik yolunda, suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek, homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. GST tarafından katalizlenen bu ilk basamakta, Glutatyon (GSH) ile endojen ve eksojen hidrofobik elektrofillerin bağlanması gerçekleşir. GSH, GST enziminin çalışabilmesi için tepkime ortamında mutlaka bulunmalıdır. GST enzimi, GSH bağımlı çalıştığı için, GSH’a kosubstratta denmektedir. GSH dışındaki diğer substratlar, oldukça geniş bir yayılım gösterdiklerinden dolayı, GST enzimi, kısmi substrat özgülüğü gösteren bir enzimdir.

GST enzimi; memelilerde, böceklerde, balıklarda, bitkilerde, Crustacea'da, Planaria'da ve mikroorganizmalarda ve bu organizmaların bazı dokularında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. GST'nin en sık rastlandığı dokular başta karaciğer olmak üzere böbrek, incebağırsak, kalınbağırsak, akciğer ve meme gibi organlardır. GST enzimi, bu organların sitosollerinin total protein içeriğinin %5'ini oluşturmaktadır. Bu organlarda yüksek oranda bulunmasının nedeni; sözü edilen organların dışarıdan alınan ksenobiyotikler ile doğrudan temas halinde bulunmalarındır.

GST izoenzimleri, hücredeki lokalizasyonlarına göre 4 gruba ayrılmaktadır.

Sitosolik alfa sınıfı izoenzimler (GST α)

Sitosolik mü sınıfı izoenzimler (GST μ)

Sitosolik pi sınıfı izoenzimler (GST π)

Mikrozomal izoenzimler (m GST)

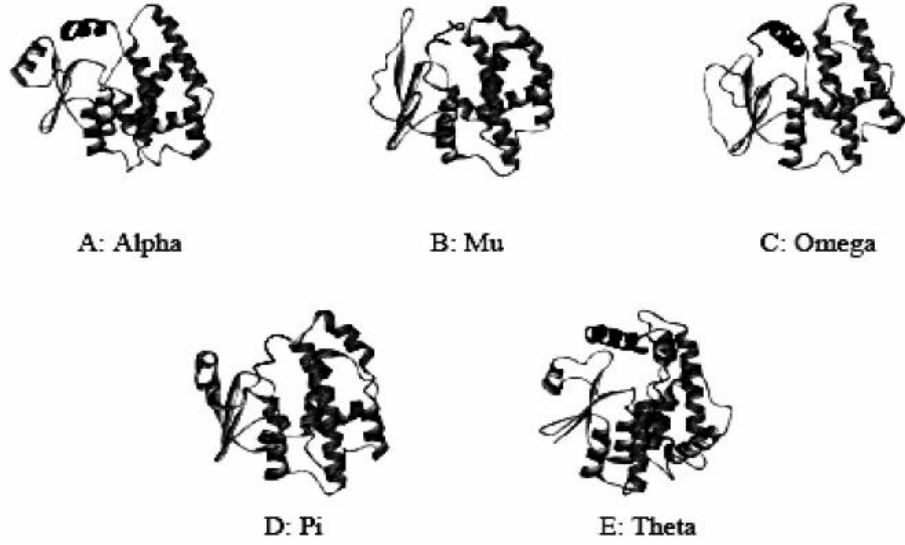
GST izoenzimleri ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve dokuların oksidatif zarardan korunması için önemlidir. Bu enzimler, kemoterapik ilaçlar, çevresel karsinojenler, endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş bir spektrumunu detoksifiye ederler. Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu 3 farklı fazda gerçekleşmektedir. Faz I ve II lipofilik değişimi içerir. Faz III'de daha fazla suda eriyebilen nonpolar ksenobiyotikler ve dolayısıyla daha az toksik olan metabolitler hücreler tarafından daha kolay elemine edilirler. Genel olarak Faz I, sitokrom P450 sistemi tarafından katalizlenir. Faz II enzimleri, aktif hale getirilen ksenobiyotiklerin indirgenmiş glutatyon, UDP-glukuronik asit veya glisin gibi endojen olarak suda eriyebilir substrata konjugasyonunu katalizler. Ayrıca transport ve organik anyonların yükseltgenmesi gibi biyosentetik role sahiptirler (Autrup 2000; Sheehan *et al.* 2001).

Mikrozomal GST, başta karaciğer olmak üzere, birçok dokuda membrana bağlı olarak ve yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Sıçan karaciğer endoplazmik retikulum ve dış mitokondri membranının toplam protein içeriğinin %3-5'ini oluşturmaktadır (Morgenstern *et al.* 1987).

Mikrozomal GST enziminin membranda yerleşmesinin başlıca 3 nedeni olabilir:

1. Çoğu ksenobiyotik, oldukça hidrofobiktir ve hücrenin belirli çözünebilir proteinlerin bağlanma yanları ve membranlarını içeren hidrofobik kısımlarda yerleşmişlerdir. Sıçan hepatositindeki endoplazmik retikulum, hücre membranını %50'sini oluşturmaktadır.
2. Sitokrom P450 sistemi tarafından ksenobiyotik metabolizması esnasında oluşan, halen hidrofobik olabilen reaktif ara ürünlerin birçoğu, endoplazmik retikulum gibi hidrofobik kısımda yerleşmektedir. Mikrozomal GST, böyle elektrofilleri, sitosolik GST'den daha kolay etkileyebilmektedir.
3. Membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri arasındaki çift bağlar, oksidasyona çok duyarlıdır. (Morgenstern *et al.* 1987)

Sitosolik GST'ler pek çok endojen ve eksojen elektrofilik bileşenin glutatyon ile konjugasyonunu katalizleyen çok fonksiyonlu dimerik proteinleri içine alan bir ailedir. GST'ler ayrıca hidrofobik moleküller, demir, safra asitleri, bilirubin, polisiklik hidrokarbonların hücre içine bağlanması ve transportunda görev alırlar. Prostaglandin ve leukotriene biyosentezine katılırlar ve toksik hidroperoksitlerin eliminasyonunda anahtar rol oynarlar. Ayrıca GST hücrenin antikanser ilaçlara, herbisitlere ve pestisitlere karşı direncini sağlamaktadır. GST pek çok prokaryot ve bütün ökaryot hücrelerde bulunmaktadır. Sitosolik formları çok fazla olan GST'nin, şimdiye kadar 6 sınıfı karakterize edilmiştir. Alfa, pi, mü, teta, beta, sigma. Bütün sitosolik GST'lerin homodimer ya da heterodimer alt ünitelerinin moleküler ağırlıkları 23-27 kDa arasındadır. X-ışını kristolografisi analizlerine göre α , μ , π , β , θ GST monomerleri yapısal olarak benzer organizasyondadır İki domaini birbirine bağlayan kısa aminoasit artıklarından oluşur. Domain I (GSH bağlanma bölgesi=G bölgesi) proteinin N terminal bölgesinde bulunur ve α/β yapısındadır. Domain II ise (H bölgesi), pek çok hidrofobik yapının bağlandığı bölgedir (Bucciarelli *et al.* 1999).



Şekil 1.2. Sitosolik GST enzimleri (Nilsson 2001)

Inoue *et al.* 1999 yılında erkek farelerde günlük 24 saatlik periyotta GST aktivitesini incelemişlerdir. CDNB'ye karşı en yüksek GST aktivitesi saat 13.00 ve 21.00'de tespit edilmiştir.

Enzimlerin yapısına katılan aminoasitlerin kompozisyonu oldukça önemlidir. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde, en fazla bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit ve lözindir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise, sıçanda çok düşük miktarlarda bulunurken, insanda hiç bulunmamaktadır.

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

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

Her enzimin yapısında, özgül olduğu substratının bağlanabildiği bir veya birkaç katalitik bölge bulunmaktadır. GST enzimi birden fazla substratı tanıyabilme özelliğinden dolayı, kısmi özgüllük gösteren bir enzimdir. GST enzimi iki substrat bağlama bölgesine sahiptir.

1. G Bölgesi: GSH kosubstratına özel olan ve GSH'ın bağlandığı ceptir. GST'nin G bölgesi ile GSH interaksiyonunun öne sürülen modeline göre; GSH'ın yapısına katılan glutamat aminoasidinin amino (NH₃) ve karboksil (COOH) grupları ve glisin aminoasidinin karboksil grubu ile GST enziminin G bölgesindeki aminoasitler arasında meydana gelen hidrojen bağları ile bu bölgeye bağlanma gerçekleşmektedir. GSH'un tiyol grubu (SH), cebin açık olan kısmına dönük olarak yerleşmiştir. Çünkü diğer substratlara bağlanan grup, bu tiyol grubudur. GST enziminin GSH ile konjugasyonu için tiyol grubunun pozisyonu çok önemlidir. Dolayısıyla L-sistein'in, D-sistein, Lhomosistein ve L-penisilamin ile substitusyonu sonucu oluşan GSH analogları, GST için kosubstrat olarak GSH ile yer değiştirme kapasitesine sahip değildir. Bu analoglar GST tarafından kullanılmamaktadır. Çünkü GST'nin bağlayacağı substratın seçilmesinde tiyol grubu önemli rol oynamaktadır. Aktivitenin tam kaybına neden olan, GSH molekülünün tek grubu; tiyol grubudur (Anton *et al.* 1990).

2. H Bölgesi: Hidrofobik elektrofilik substratların, GST enziminin katalitik merkezinde bağladığı hidrofobik bölgedir. Nishihira *et al.* (1995b), GSH ve CDNB substratına karşı olan katalitik aktiviteyi kompetatif şekilde inhibe eden bir GSH analogu olan S-[2- (2-floro-4-nitrofenoksi)etil]glutasyonu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, sıçan karaciğer GST π enziminin elektrofilik substrat bağlanma bölgesini ortaya konmuştur. Çalışmalar GSH analogunun, G ve H bölgelerini içeren aktif bölgeye spesifik olarak bağlandığını göstermiştir. Analogun GST π ile tepkimesinden sonra aminoasit dizi analizi yapıldığında, aktif bölgenin 122-128. aminoasitleri (Ala-Leu-Pro-Gly-Xaa-Leu- Lys) içerdiği gözlenmiştir. Yine GST π 'nin H bölgesinde His 126 kalıntısının bulunduğu düşünülmektedir. Sıçan GST π izoenziminin C terminal bölgesinin rolünü araştırmak için karboksipeptidaz A ve B ile delesyona uğratarak yapılan başka bir çalışmada, bu bölgenin 201. ve 209. aminoasit kalıntıları arasında olduğu ortaya konmuştur (Arg-Pro- Ile-Asn-Gly-Lys-Gln). Karboksipeptidaz aktivitesi ile bu yedi aminoasit çıkarıldığında, katalitik aktivite %5 oranında azalmıştır. Bu bölgedeki 9 aminoasit çıkarıldığında ise aktivite tamamen kaybolmuştur. Veriler C terminalinin, aktif bölge konformasyonunun stabilizasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bir başka çalışmada Tyr 108'in Phe ile yer değiştirmesinin k_{cat} değerini 14 kat azalttığı gözlenmiştir. Fakat H bölgesinin substrat affinitesi değişmemiştir. Tyr 108'in OH grubunun rolü, GSH'un elektrofilik substrat ile konjugasyonu gibi kimyasal bir basamak için transisyon durumunu korumak olabilir (Lo Bello 1997). Orozco *et al.* (1997), serbest enerji perturbasyon tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, Tyr 7'nin rolünün su molekülleri ile hidrojen bağı aracılığı ile hidratlaşarak, tiyolat anyonunu stabilize etmek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Böceklerdeki GST enzim ailesi, insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma sistemi olarak bilinir. Örneğin *Musca domestica*'da organofosfat grubu insektisitlere dirençli mutantların GST'nin yüksek seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Zhou and Syvanen 1997). Plapp tarafından 1984'te *Musca domestica*'nın 2. kromozomunda lokalize olmuş olan genlerin organofosfatlı insektisitlere karşı direnç gösteren, GST'nin ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Kence 1998).

Sandermann (1992), bitkilerin yabancı kimyasalları transformasyon, başlıca oksidasyon ve hidroliz (faz I), bunu takiben konjugasyon (faz II) olmak üzere 3 basamakta metabolize ettiğini ileri sürmüştür.

Suzuki *et al.* (1993) yaptıkları çalışmada, çeşitli insan GST genleri ve pseudogenleri kodlayan genomik DNA'yı izole etmişlerdir. Buna göre bütün genler, sıçanlardaki α sınıfı genlere benzer olarak eşit uzunluktaki 7 eksonun bağlanmasından oluşmuştur. GST A1 geni, yaklaşık 12 kb. uzunlukta ve diğer α gen dizisine yakındır. Pseudogenin ekson 7'si ve GST A1 geninin ekson 1'i arasındaki 17 kb.'lık intergenik bölgenin tüm dizisi belirlenmiştir. Karakterize edilmemiş bir GST α 'yı kodlayan ilave bir gen belirlendi. Bu genden oluşan protein, GST A1 izoenzimine kıyasla 19 aminoasit substitusyonuna sahiptir. Ayrıca tek bazlı veya tüm ekzon delesyonlu pseudogenler belirlenmiştir.

Menegon *et al.* (1998), GST polimorfizmi ve Parkinson hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma yapmışlardır. Parkinson hastalığı, nörotoksin ve pestisitlerin neden olduğu bir hastalıktır. Pestisitleri de içine alan ksenobiyotikleri metabolize eden GST'nin Parkinson hastalığı patojenezisinde önemli rolü olabilir.

1.2.1. GST enziminin görevleri

GST enzimi, ksenobiyotikler ve belirli endojen bileşikler içeren elektrofillerin, GSH ile kovalent bağlanmasını sağlayarak detoksifikasyonuna yardımcı olur. Ayrıca besinlerle alınan toksik maddelerin, metabolik işlemleri sırasında, alınan besinlerin, besinsel değerlerini kaybettirmeksizin eliminasyonunu sağlamaktır. En önemli görevi; GSH'ın tiyol (-SH) gruplarına bağlanma şeklinde, ksenobiyotiklerdeki reaktif elektrofilik merkezlerin detoksifiye edildiği tepkimeleri katalizlemektir (Habig *et al.* 1974).

GST enziminin diğer önemli görevi; prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak, taşınmasına yardımcı olmaktır. GST, nonspesifik bir hidrofobik bir bağlanma bölgesine (H bölgesi)

sahip olduğu için, nonpolar moleküller için intrasellüler bağlanma proteini olarakta rol oynamaktadır (Boyer 1989). GST'nin birçok formuna nonsubstrat ligandın bağlanması, genelde enzimatik aktivitenin kaybı ile sonuçlanmaktadır.

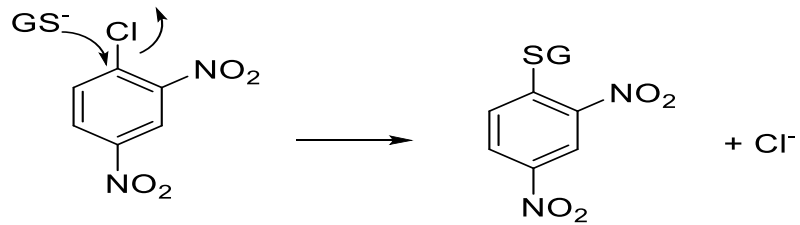
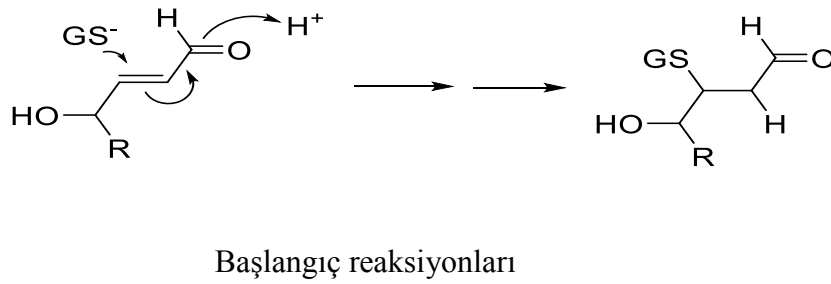
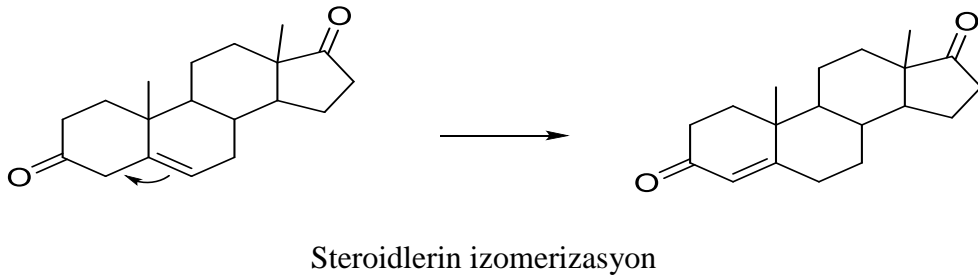
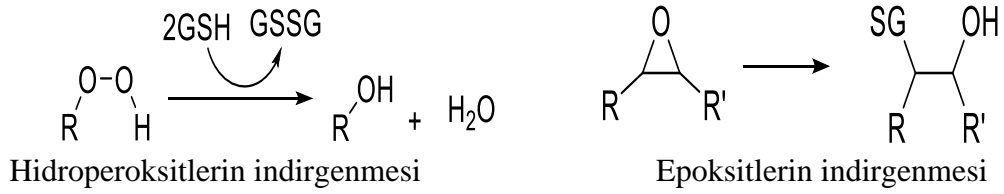
GST enzimi; klorambusil, melphalan, siklofosamid ve mitoksantren gibi çeşitli antikanser ilaçlar, hormonlar, hidrokarbonlar ve diüretik ilaç olan etakrinik asit gibi endojen metabolitleri GSH ile bağlayarak, suda daha kolay çözünür hale getirmekte, idrar ve safra yoluyla atılımını kolaylaştırmaktadır (Arias and Jacoby 1976) .

Aynı zamanda reaktif elektrofilik bileşiklerin vücuda zarar vermesini, aynı tür bileşikleri birbirine kovalent bağlayarak da önleyebilmektedir. Ligandların birçoğu, karaciğerde GST enzimine bağlı olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla GST varlığında, bazı ligandların serbest halde bulunuşu engellenerek, steroid gibi toksik bileşiklerin karaciğere vereceği zararlar ortadan kaldırılmış olur (Puchalski and Fahl 1990). GST, çok sayıda reseptör molekülüne, sülfür grubunu aktarabilir. Bu ksenobiyotik akseptörler içerisinde, nitrojenli, halojenli bileşikler, organofosfatlar (pestisitler dahil), polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bileşikler yer almaktadır. Ayrıca GST, oksijen varlığında lipid ve DNA'da meydana gelen zararlı uçları, DNA hidroperoksitlerin son metabolik ürünlerini, alkenol ve endojen elektrofil bileşikleri detoksifiye etmektedir (Arias and Jakoby 1976).

Di Ilio *et al.* (1995), florodifen, fenarimol, asiflorfen, 2,4-D, metilparation, paraquat ve pyrazophos'un α , μ ve π sınıfı GST enzimleri tarafından bağlanmasını 2-p-toluidinilnaftalen-6-sülfonat (TNS) floresans inhibisyon tekniğini kullanarak, belirlemişlerdir. Her 3 enzim de pestisitleri bağlayabildiği halde, μ sınıfı daha yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

GST enziminin etki seviyesi; organların toksik ajanlara karşı korunmasında oldukça önemlidir. Pek çok GST uyarıcısı fenoller, N-heterosiklik bileşikler, oltipraz gibi dithiothiones bileşikler birçok antikanser ilacında kullanılmaktadır. Bunların yol açtığı

etki, hücreleri önemli ölçüde oksidatif strese maruz bırakabilir ve GST enzimi, hücreleri bu oksidatif strese karşı koruyor olabilir (Cho and Kim 2000) .



Şekil 1.3. GST enziminin görevleri (Nilson 2001)

Aniya and Daido (1993), sıçanda t-butil hidroperoksit, cumene hidroperoksit ve linoleik asit hidroperoksitin, karaciğer mikrozomal GST enzimi üzerine etkisini çalışmışlardır. Veriler, mikrozomal GST'in GSH'un varlığında veya yokluğunda, daha organik hidroperoksitler tarafından aktive edildiğini göstermiştir.

1.2.2. GST enziminin substrat özgüllüğü

GST enzimi, oldukça geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir. Bir enzimin özgüllüğü, aktif bölgesinin, stereospesifik konfigürasyonundan ziyade, lipofilik bir bariyer veya bir uyarılma bariyeri tarafından korunmasına bağlıdır. Bu durum geniş substrat özgüllüğünü açıklar.

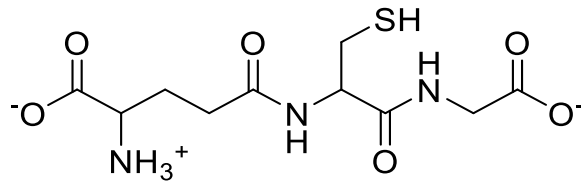
1-kloro 2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve p-nitrobenzilklorid, GST enzimi için iyi substrattır. GST enzimi bu 2 substrata karşı oldukça yüksek spesifik aktiviteye sahiptir.

GST enzimlerinin substratlarına, alifatik ve aromatik halojen nitrobileşiklerine karaciğer ekstratı düzeyinde rastlanır. GST enzimleri, bu bileşiklere karşı kalitatif ve kantitatif farklılıklar gösterirler.

GST enzimi, substratın yapısındaki moleküllerin yer değiştirmelerine de (substitusyon) duyarlıdır. Buna örnek olarak; GST'nin substitue Stirenoksit'lere karşı özgüllüğü verilebilir. Stirenoksit molekülünün değişimi, substrat aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bir nitro grubu veya halojen tarafından fenil halkasının monosubstitusyonu, aktivitede %40–70 kayba neden olmuştur. Bu gruptaki en zayıf substrat, 4-fenil stirenoksit'tir. Oksiran halkasının 7. karbon atomundaki metil veya fenil substitusyonu, aktivitede tamamen azalmaya neden olmuştur. Cis durumu düşük aktiviteye sahipken, trans durumu yüksek aktiviteye sahiptir.

Wareing *et al.* (1993), yaptıkları çalışmalarda α ve π sınıfı GST enzimlerinin 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'e (CDNB) karşı dirençli olduğunu, CDNB uygulaması ile GST aktivitesinin yaklaşık 1.5 kat arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, CDNB'ye dirençliliğin α ve π sınıfı GST seviyelerindeki bir artış ile ilgili olduğunu, α ve π sınıfı GST seviyesindeki artışın, gen amfilikasyonu veya artmış mRNA seviyelerinden değil, mRNA kullanımı veya protein stabilizasyonundaki değişimden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Sluis-Cremer *et al.* (1996), GST π üzerinde yaptıkları çalışmada, oksidatif inaktivasyondan sonra bu enzimin doğal konformasyonunu geri kazanabilme yeteneğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. GST π 'nin hidrojen peroksit aracılı oksidasyonun, disülfid bağlarının oluşumu ile sonuçlandığını, okside enzimin ditiyotreitol veya GSH ile muamelesiyle, enzimatik yeteneğin tekrar geri kazanıldığını görmüşlerdir. Ditiyotreitol uygulamasının, enzimin hidrodinamik hacmini geri kazandırdığını, protein molekülündeki sekonder ve tersiyer yapısal değişikliklerin ise halen mevcut olduğunu görmüşlerdir. Bu yüzden okside GST ve ditiyotreitol uygulanmış okside GST'nin, doğal enzimden daha az termostabil olduğunu ileri sürmüşlerdir.



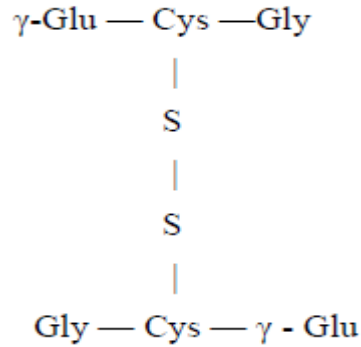
Şekil 1.4. Glutatyon molekülünün yapısı

Kimyasal formülü	: C ₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S
Fiziksel formu	: Beyaz, kristal katı
Molekül ağırlığı	: 307,33
Erime noktası	: 192-195°C
Suda çözünürlük	: Su, etanol, sıvı amonyak, dimetilformamid de kolayçözünür
pH (10 g/L; H ₂ O; 20°C)	: 3

Glutasyon, GSH şeklinde sembolize edilen ve kokoid içeren γ -Glu-Cys-Gly dizili bir trieptiddir. İlk defa 1921 yılında Hopkins tarafından bulunmuştur. 1935 yılında ise Harington ve Mead adlı bilim adamları tarafından γ -Glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir. GSH birçok hücrenin önemli bir tiyol bileşiğidir. Hücrelerdeki derişimi, 0,1-10 mM arasındadır. GSH molekülündeki en önemli kimyasal aktif grup, tiyol (-SH) grubudur. GSH molekülü, 2 peptid bağı, 2 karboksilik asit grubu, 1 amino grubu ve 1 tiyol grubuna sahiptir. Yapıdaki sistein aminoasidi düşük çözünürlüğe sahiptir. γ -Glutamil bağlantısı, proteazların yıkımına dayanıklı molekül oluşturduğu için, GSH molekülü, birçok proteolitik aminoasidi yapıdan ayırabilir. GSH molekülünün fizikokimyasal özelliklerinden birisi, Pirie ve Pinhey adlı araştırmacılar tarafından belirlenen proton ayrılma sabitleridir. Yapıdaki önemli grupların pK değerleri şöyledir (Pirie and Pinhey 1929).

SH: 9,2 NH₃: 8,6 COOH: 3,53 COOH: 2,12

GSH'ın katıldığı tepkimelerde, 2 GSH molekülü aralarında 1 disülfid bağı oluşturarak birleşmekte ve okside glutasyon (GS-SG) meydana gelmektedir. GSH'un uzunluğu 15 Å iken, GS-SG'un uzunluğu 23 Å'dur. GS-SG, normalde bir hidrat olarak bulunan, beyaz kristal bir katıdır. Molekül ağırlığı 612,63 Da, erime noktası 178-182°C'dir.



Şekil 1.5. Okside glutasyon (Nishino and Ito 1989)

Oluşan GS-SG molekülü, pentozfosfat yolunda sentezlenen NADPH⁺ + H⁺ ile redüklenerek, tekrar GSH molekülüne dönüştürülmektedir. Hücre toksik bir bileşik ile

karşılaştığı zaman meydana gelen GSH'un, GS-SG'a dönüşümü olayı, toksik bileşiğin suda daha çözünür hale gelmesi ve son ürün olarak merkapturik asit türevlerinin oluşum tepkimeleri, GSH bağımlı enzimler tarafından katalizlenmektedir (Aniya and Anders 1989).

Nishihira *et al.* (1995a), bir GSH analogu kullanarak, GST π 'nin elektrofilik substrat bağlama bölgesini incelemiştir. Bu GSH analogu, GSH ve CDNB'ye karşı kompetatif bir inhibisyonla katalitik aktiviteyi inhibe etmiştir. Bu analog, muhtemelen 122-128. aminoasitleri içeren G ve H bölgesinin yer aldığı aktif bölgeye kovalent olarak bağlanmıştır.

Zhang *et al.* (1998) göre; detoksifikasyon sisteminin önemli komponentleri GSH, GSH bağımlı enzim ve GSH konjugatı pompasıdır. Bu sistemde bir GSH; antikanser ilaç ile daha az toksik ve suda daha kolay çözünen GSH konjugatları oluşturmak için birleşmektedir. GSH konjugatları, GSH konjugatı pompası (GS-X pump) veya multidrug resistance proteini (MRP) tarafından hücre dışına atılmaktadır. Bu sistem ile antikanser ilaçların artmış detoksifikasyonu, ilaç dirençliliğini doğrulamaktadır.

GST, GSH'ın aktivitesiyle daha reaktif tiyolat anyonu (GS-) oluşturur. Herhangi bir nedenle çalışan bu mekanizma, organizmayı yüksek oranda korumaktadır. GSH bağlanma bölgesinde Tirozin artıkları bulunur. (Tyr8, Tyr6 ve Tyr 7 α -, μ -, π -sınıflarında) (Patrick *et al.* 2001)

Inoue *et al.* (1999) göre; GSH seviyesi beslenmeden etkilenmektedir. Ayrıca besinlerdeki aminoasit içeriği de GSH seviyesini etkilemektedir.

Sheweita and Mostafa (1996); N-nitrozaminlerin farklı kimyasal formlarının GSH, GSH redüktaz ve GST enzimi üzerine in vitro etkisini incelemiştir. GSH seviyesinin metilpropilnitrozamin ile %81 azalmış, dietilnitrozamin ile %50 artmış, etilmetilnitrozaminden etkilenmemiş olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlar, nitrozo grubunun

substitusyonu şeklinde kimyasal yapı değişikliklerinin GSH metabolizleme enzim seviyelerini değiştirdiğini göstermiştir.

Ploemen *et al.* (1996) tarafından alkol bağımlıların tedavisinde kullanılan bir ilaç olan, disülfiram (DSF) ve onun redükte formu olan dietilditiyokarbomatın (DDTC), sıçan ve insan karaciğer GST ile etkileşiminin reversibl inhibisyonu ve zamana bağlı inaktivasyonu çalışılmıştır. En fazla duyarlılık, sistein içermeyen, insan GST α 2-2 izoenzimindedir. Sonuçlar 1 tiyol kalıntısının bu inaktivasyona katıldığını ve inaktif GST'nin GSH veya ditiyotreitöl uygulaması ile geri çevrilebileceğini göstermiştir.

Aniya and Daido (1993) sıçanda t-butil hidroperoksit, cumene hidroperoksit ve linoleik asit hidroperoksitin karaciğer mikrozomal GST enzimi üzerine etkisini çalışmışlardır. Veriler, mikrozomal GST'in GSH'un varlığında veya yokluğunda, daha organik hidroperoksitler tarafından aktive edildiğini gösterdi.

1.2.3. GST enzim metabolizması

1875 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda, bazı ksenobiyotiklerin L-asetilsistein bileşikleri (merkapturik asitler) halinde safra ile atıldıkları kanıtlanmıştır. Bu bağlamda ilk tepkime, GST ile katalizlenmektedir. Oluşan GSH bileşiklerinden önce glutamat ve glisin aminoasidi ayrılmakta, sonra sistein kalıntısının serbest amino grubunun asetilasyonu ile merkapturik asitlere metabolize edilmektedir. Merkapturik asitler, suda çözünebilen, idrar ve safra yoluyla vücuttan atılmaya uygun son ürünlerdir. Mekanizmada tepkimeye katılan element, nükleofil olarak glutatyon tiyolattır (GS⁻). GS⁻, birçok substrat için nükleofil olabilir. Tepkime, uygun bir tiyoeter oluşturmak üzere, yeteri kadar elektrofilik karbon atomuna GS⁻'in atağı ile sonuçlanmakta, bu şekilde aktifleşen substrat (kimyasal madde-SG), GST katalizörlüğünde meydana gelmektedir. Oluşan GSH türevleri, enzimatik olarak sistein türevlerine dönüştürülmektedir. Bu türevler asetillenerek, N-asetilsistein türevlerini meydana getirmektedir (Pabst *et al.* 1974).

Bir merkapturik asit türevi oluşturmayan organik tiyosiyanatlar durumunda, GS-; $-C\equiv N$ ve RS- kısımlarının bağıl polariteleri tarafından belirlenen bir tarafa atak yapar. R gruplarının elektronik karakteristiği, atak bölgesine karar vermede rol oynar. Alkiltiyosiyanatlar ve benziltiyosiyanatlar için atak, ayrılan grup olarak siyanidli sülfür atomunadır. Nitrat esterleri durumunda ise, Glutasyon S-nitrat ile sonuçlanan GS-‘in hedefi elektrofilik nitrojendir. Gözlenen ürünleri oluşturmak için GS- ‘in ara ürüne 2. atağı söz konusudur. Nitrogliserinin β pozisyonundaki nitrat yer değiştirir. Nitrit meydana gelir (Habig *et al.* 1974).

Sıçan ve insan homojen enzim preparatları ile yapılan çalışmalarda, onların her birinin benzer büyüklükte bir bağlanma proteini olduğu bulunmuştur. Bu enzimler, çok yapışkan, bağlayıcı karakterdedir. Bağlanmayı etkileyen faktörler ligandın hidrofobik bölgelerine veya moleküllerin benzer veya farklı olmalarına bağlıdır.

GST enziminin bağladığı ligandlar, 3 gruba ayrılır:

1. Proteinlerle reversibl bağlıdır ve substrat değildir. (Bilirubin gibi)
2. Uygun bir reaktif merkezi taşıyan ve sıkı bağlı GS- tarafından atak yapılan bileşikler (Substratlar)
3. Uygun reaktifler. Enzime bir kere bağlanırlar ve protein ile kovalent bağ oluşumu ile tepkimeyi yürütürler. Örneğin; CDNB ile muameleden sonra oluşan ürün.

Enzimin ligandlar ile etkileşiminde, pasif rol oynadığı tartışılmaktadır. Bir görüşe göre, elektrofilik substratların bağlanma noktasına yakın GSH'ların aktivasyonu, diğer görüşe göre ise; GSH ve elektrofilik substratların yaklaşması olarak önerilmiştir.

1.2.4. GST enzim aktivitesini etkileyen faktörler

a) Yaş: Doğum sonrası GST seviyesindeki artış hızlı bir şekilde başlar ve 7 hafta sonra erişkin seviyesine ulaşır. Peters *et al.* (1995b), insan lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada, GST-GSH sisteminin yaşlanma ile azaldığını tespit etmişlerdir. GST'nin

farklı izoenzimlerinin yaş artışı ile artış hızı ve artış dönemleri birbirlerinden farklıdır. Temellini vd (1995), yaptıkları bir çalışmada, karaciğer GST aktivitesi ve yaş arasında zayıf fakat negatif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak buna benzer bir durum kalınbağırsak, renal korteks ve akciğerde gözlenmemiştir.

b) Cinsiyet: GST aktivitesi erkek bireylerde daha yüksektir. Karaciğer ve böbrekteki GST'nin erkek/dişi oranları farklıdır. Kadında renal korteks ve akciğerde GSH ve CDNB konjugasyon hızı zayıf fakat önemli derecede erkekten daha yüksek oranda gözlenmiştir (Temellini vd 1995).

c) Doku Çeşidi: GST enzim aktivitesi ksenobiyotik bileşiklere en fazla maruz kalan karaciğer, bağırsak, böbrek gibi dokularda oldukça yüksektir.

d) Hormonlar: Cinsiyet farklılığına bağlı olarak, hormon çeşidi ve miktarındaki farklılık GST aktivitesini etkiler. Carillo *et al.* (1995), insülin ve glukagonun sıçan hepatosit GST enzimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Sıçanda insülin+glukozun intravenöz uygulaması sonucu hepatik sitosolik GST aktivitesi 30 dakikada %56 artarken, mikrozomal GST aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Glukagon enjeksiyonu, hepatik sitosolik GST aktivitesinde %43 azalmaya sebep olurken, mikrozomal GST'yi etkilememiştir.

e) Beslenme: Açlık durumunda ve proteinden yoksun beslenme sonucu GST aktivitesi azalmaktadır. İnsanda glikosinolat içeren Crucifera tipi bitkilerin (Brüksel lahanası gibi) yüksek miktarda tüketiminin kanser riskini azalttığı öne sürülmektedir. Brüksel lahanası tüketiminin duodenal, rektal ve lenfotik GST ve GSH seviyelerine etkisi araştırılmış, sonuçta GST α ve π seviyelerinin arttığı saptanmıştır.

f) Patolojik Durum: Özellikle karaciğer dokusu hastalıklarında, GST aktivitesi değişmektedir. Kronik hepatit C'li hastalar üzerinde GST α izoenziminin klinik önemini belirtmek için, serum GST α seviyeleri incelenmiş ve hastaların %93'ünde GST α indüklenmiştir. Enzimin artış seviyeleri, bu lezyonlarda oluşan ilaç dirençlilik

fenotipine katıldığını göstermektedir. Nelson *et al.* (1995) GST α ile lobüler ve safra kanalı lezyonları arasında ilişki olduğunu ve GST α 'nın serum aminotransferaz kadar diagnostik bir öneme sahip olduğunu göstermişlerdir.

g) Tür Farklılıkları: Ksenobiyotiklerin yarılanma süreleri, organizmanın türüne göre değişmektedir. Bu durum detoksifikasyon enzimlerinin farklı türlerde değişen miktarlarda bulunması ile açıklanabilir.

h) Kimyasal Faktörler: GST enziminin etkilediği substrat, nonsubstrat ligandlar, enzimi aktive veya inhibe edebilir. Bunun dışında detoksifikasyon metabolik yolu son ürünlerinin ortamda birikmesi, ortamın pH'sı, ısı, radyasyon vb. faktörlerde etkilidir.

1.3. Karayemiş



Şekil 1.6. Karayemiş meyvesi, karayemiş tohumu, karayemiş yaprağı

Karadeniz Bölgesinin gözde meyvelerinden olan karayemiş bitkisinin tabii yayılma alanı Karadeniz'in doğu bölgeleri, Kafkaslar, Toroslar, Kuzey ve Doğu Marmara'dır.

Genel olarak ılıman iklim bölgelerinin meyvesidir. Bu bakımdan en iyi karayemişler Karadeniz bölgesinin sahil kuşağında yetiştirilmektedir (İslam 2002).

İnsanoğlu, gerek yiyecek, gerek tedavi amaçlı, gerekte araç gereç yapımı amaçlanarak her zaman bitkilerle iç içe yaşamaktadır. Karayemiş meyvesinin, yaprağının ve odun kısmının da birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Meyvesi taze olarak tüketilebilir veya reçeli, pekmezi, tuzlaması, turşusu yapılabilir, kurutulularak değerlendirilebilir. Tokluk hissi verdiğiinden dolayı diyet yiyeceği olarak kullanılabilir. Pasta, kek ve özellikle hoşaf ve kompostolara koku ve tat kazandırmak için ilave edilebilir. Derine giden kök yapısı nedeniyle çay ve fındık bahçelerinin veya evlerin karayel yönüne dikilerek rüzgâr kıran olarak kullanılır. 3-4 yaşlı dalları Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sepet yapımında kullanılmaktadır. Sık budanmaya uygun olduğu için çit bitkisi olarak kullanılır (İslam 2005).

Karayemişin sağlık açısından birçok faydası bulunmaktadır. Bu açıdan halk hekimliğinde birçok alanda kullanılmaktadır. Hemoroite iyi gelir, idrar söktürür, sigaraya karşı isteksizlik doğurur, özsuğu egzamaya yarar, meyveler çekirdekleriyle toz edildikten sonra balla karıştırılır, bronşite iyi gelir. Gelişmesini tamamlayan taze yaprakları elle toplanıp destile edilerek eczacılıkta kullanılan Laura Cerasin maddesi elde edilir. Bazı ilaçlara tat ve koku verici olarak kullanılır. Taş düşürücüdür, spazm çözücüdür (sindirim sistemi). Karayemişin taze ve genç yapraklarından elde edilen karayemiş suyu halk hekimliğinde yatıştırıcı, öksürük kesici, bulantı ve karın ağrılarını dindirici olarak kullanılır. Uyku vericidir, kalp çarpıntısını gidermek ve kan şekerini düşürmek için kullanılır. Kemik yapısını geliştirir, kasların düzenli çalışmasını sağlar. Karayemiştten elde edilen antioksidan, zararlı olan oksidanlara karşı vücudu korur. Karayemişteki antioksidanlar alzheimer, diyabet, doku ve cilt hastalıklarına karşı ve vücuttaki hücre yenilenmesi ile kansere karşı etkilidir. Karayemiş antioksidan özelliğiyle yaşın ilerlemesiyle vücutta meydana gelen oksitatif zararı azaltarak yaşlanmayı geciktirir (Karadeniz 2004).

Karayemiş meyvelerinin diğer birçok meyveden ayırt edilen karakteristik özelliği yenilen kısımlarının tat ve lezzetidir. Meyve eti değişik oranda tanen, flavonol gibi maddeler ihtiva ettiğinden burukluk, acılık tadı vermektedir. Burukluk tiplere göre buruktan buruk olmayana değişen oranda bulunmaktadır. Tadın acı olması ise tüketimi doğrudan olumsuz etkileyen bir faktördür. Bu nedenle meyve etinde veya tohumunda bulunan amigdalin miktarı önem arz etmektedir. Ayrıca amigdalinin, hidrojen siyanür (HCN) içermesi önemini daha da artırmaktadır.

Halk arasında tıbbi bitki olarak bilinen ve kullanılan bitkilerin büyük çoğunluğu doğal bitki toksinlerini de içermektedir ve bu bitkilerin fazla miktarda veya uzun süreli kullanılmaları zehirlenmelere yol açabildiği gibi kanser gibi bazı hastalıkların tedavisinde de kullanılabilir. Bu nedenle bu bitkilerin içeriğinin bilinmesi insan sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada karayemişin meyve etinde bulunan Glutatyon S-transferaz enzimi afinite ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve enzim aktivitesi üzerine diklorvos, cypermethrin, imidacloprid, fenoxaprop-p-ethyl, Glifosat-izopropilamin tuzu (N-(fosfonik asit) glisin) pestisitleri; Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} metal iyonları; askorbik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve benzoik asit gibi organik bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

1.4. Metal İyonları

Metaller doğada bol miktarda bulunan ve doğal bozulmaya dirençli elementlerdir. Metaller jeolojik ve biyolojik yollarla doğada hareket ederler. Yağmur suları ile kayalar ve maden yataklarından çözülerek akıntılar ile toprağa, nehirlere, denizlere ve sedimente ulaşır. Biyolojik döngü ise bitki ve hayvanlar tarafından metallerin biriktirilip besin zincirine katılmalarını kapsar. Ölü canlıların çürümesi ile tekrar çevreye katılırlar (Donkin *et al.* 2000; Goyer and Clarkson 2001).

Canlılar için hayati öneme sahip olan metallerin aşırı düzeyleri oldukça zararlıdır. İnsan metabolizması için gerekli olmayan metaller başta besinler olmak üzere su veya hava gibi yollarla vücuda alınarak bir "metal yükü" oluşumuna sebep olmaktadır. Bu metallerden bazıları (alüminyum, titanyum, krom, kalay, kurşun ve kadmiyum gibi) yaşam süresince vücutta birikerek önemli sorunlara oluşturabilmektedirler (Denizli 2008).

Metallerin toksik özellikleri üzerine araştırmalar son 20-25 yıldır aktif bir şekilde devam etmektedir. Hemen hemen tüm metaller belirli bir miktarın üzerinde alındıklarında toksik etki yaparlar. Hatta metallerin büyük bir kısmı, çok düşük derişimlerde bile toksik etki yaptıkları için sağlık ve çevre açısından çok önemlidirler. Bu adı geçen metaller As, Pb, Hg, Fe, **Cd**, Cr, Co, **Ni**, Be, **Cu** ve Mn'dır. Ağır metallerin zararsız hale getirilmesinde şelatlaştırıcılar kullanılır. Şelatlaştırıcının istenen faydayı sağlaması; uygun metal bağının oluşmasındaki ligand sayısıyla belirlenir (Denizli 2008).

Ağır metallerin toksisitesi; pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, meyvenin büyüklüğüne oranla çözeltilinin hacmi, çözeltide bulunan tanecikler ve sinerjik etki gibi parametrelere bağlı olarak değişir. Suyun pH'sı en önemli faktör olabilir. Tatlı sular deniz suyuna göre daha az tamponlanmıştır. Ağır metallerin destile ve yumuşak sularda, sert ve bazik sulara göre daha toksik olduğu sanılmaktadır (Mutluay ve Demirak 1996).

Fe, Ni, Cu, Zn, Co, gibi metaller iz metaller olarak bilinir ve akuatik organizmaların yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmeleri için düşük miktarlarda mutlaka alınmaları gerekir. Hg, Cd, Pb, Ag gibi metaller ise akuatik organizmaların yaşamında veya metabolizmalarında önemli bir rol oynamayan ve çok düşük düzeylerde bile toksik etki gösteren metallerdir. Bu yüzden günümüzde özellikle enzim aktivitelerini etkileyen bu maddeler kullanılarak yapılan çalışmalar popüleritesini korumaktadır (Şah 2007).

1.5. Pestisitler

Pestisitler insan ve hayvan vücudu ile tarımda besinlerin üretimi, tüketimi, depolanması sırasında onları bozan ve yok eden haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik savaş maddeleri olarak tanımlanmaktadır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA) pestisitleri zararlı, yıkıcı veya sorun teşkil eden hayvan, bitki veya mikroorganizmaları uzaklaştırmak, parçalamak, veya azaltmak için kullanılan herhangi bir madde veya madde karışımı olarak tanımlamaktadır (Marrs and Balantyne 2002).

Pestisitler etkiledikleri organizma grubuna göre kendi aralarında insektisitler (böcek öldürücüler), fungusitler (mantar öldürücüler), akarisitler (akar öldürücüler), bakterisitler (bakteri öldürücüler), herbisitler (yabani ot öldürücüler) gibi farklı isimlerle, birbirlerinden oldukça farklı kimyasal yapı ve özelliklere sahip yüzlerce bileşikten meydana gelmiştir (Karakaya 1992).

Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplarına ayrılabilir:

1-İnorganik maddeler

2-Doğal organik maddeler

- Bitkisel maddeler
- Petrol yağları vb.

3- Sentetik organik maddeler

- Klorlu hidrokarbonlar
- Organik fosforlular
- Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Türkiye’de tarım ilaçları kullanımına, pestisit gruplarına göre bakıldığında; en önemli grubun %47 ile insektisit olduğu, bunu %24 ile herbisitlerin izlediği, fungusitlerin ise %16 payı olduğu görülmektedir. Pestisit satışlarında organik fosforlular en büyük

pazara sahiptir. Başlıca organik fosforlu aktif maddeler klorprifos, diazinon, diklorvos, dimetoat, malation, metamidofos, metidatyon, metil paratyon ve karbamatlardır. Bunların sadece %3'ü insan sağlığı üzerine etkisi açısından test edilmiştir (Delen vd 1995).

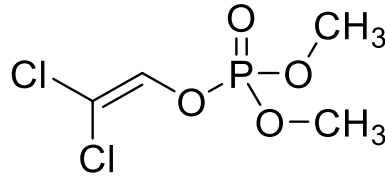
1.5.1. GST enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitler ve özellikleri

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitlerin bazı özellikleri aşağıda anlatılmaktadır.

1.5.1.a. Diklorvos

Diklorvos (2,2 diklorovinil dimetil fosfat, DDVP), renksiz amber renkte, aromatik kokulu bir organofosfattır. Toprakta parçalanma yarı ömrü 1 günden azdır. Suda az çözünür. Organik çözücülerin çoğuyla karışabilir. Isıya dayanıklıdır; ancak su, kuvvetli asit ve alkalilerde parçalanır. Diklorvos toprakta kalıcılığı az olan bir maddedir. Alkali toprak ve sularda parçalanması hızlıdır (Kaya 2002).

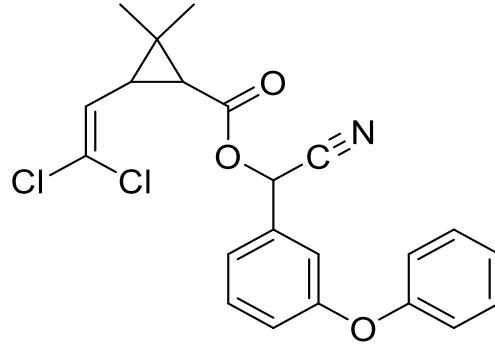
Diklorvos, ambarlanmış hububat ve mamullerinde buğday biti, pirinç biti vb. gibi zararlılar için kullanılır (Aydınoglu vd 2002).



Şekil 1.7. Diklorvos molekülünün yapısal formülü

1.5.1.b. Cypermethrin

Cypermethrin sentetik piretroitlerdendir. Sentetik piretroitler kontakt ve mide zehiri etkilidirler. İnsektisit etkileri yüksek, sıcak kanlılara etkileri ise düşüktür. Böcekler bir hızlı etkili nörotoksin gibi davranır. Kullanımı kolaydır, hedef dışı canlılarda etkisi yoktur. Güçlü öldürücü ve düşürücüdür. Mikrobiyal parçalanmaya uğrayarak çevrede birikim yapmaz.



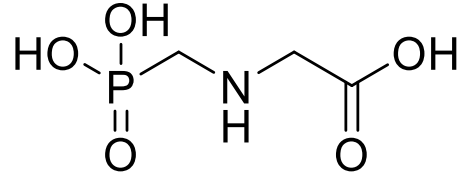
Şekil 1.8. Cypermethrin molekülünün yapısal formülü

1.5.1.c. Glifosat-izopropilamin tuzu (N-(fosfonik asit) glisin)

Kimyasal adı (N-(fosfonik asit) glisin)'dir. Geniş spektrumlu bir sistemik herbisittir. Aromatik amino asitlerin sentezinde görev yapan enzimlerin inhibisyonuna sebep olur. Sucul organizmalar için çok toksik, sucul ortamda uzun süreli ters etkilere neden olabilir.

İngilizce kimyasal adı: N-(fosfometil) glycine

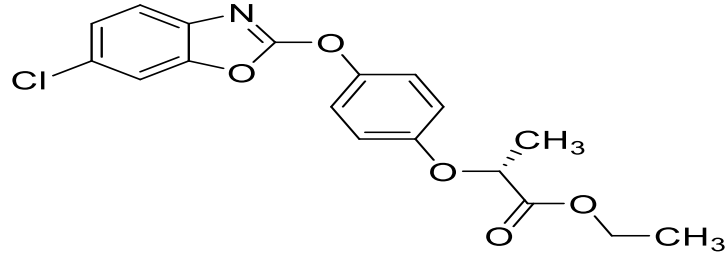
İngilizce adı: Glyphosate



Şekil 1.9. Glifosat-izopropilamin molekülünün yapısal formülü

1.5.1.d. Fenoxaprop- p-ethyl

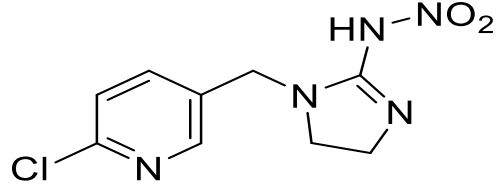
Fenoksaprop-p-etil, patates, fasulye, soya fasulyesi, pancar, sebzeler, yer fıstığı, keten, yağlı tohumlu kolza ve pamuk yıllık ve çok yıllık yabancı çim ve filizlenme sonrası kontrol etmek; (herbisit sağlamlaştırıcı mefenpir-dietil ile uygulandığında) yıllık ve çok yıllık çim, yabancı ot, buğday, çavdar, tritikale yabancı yulaf ve bazı arpa çeşitlerini korumak için kullanılır.



Şekil 1.10. Fenoxaprop- p-ethyl molekülünün yapısal formülü

1.5.1.e. Imidacloprid

Şu anda dünyada en yaygın olarak kullanılan bir insektisittir. bir böcek nörotoksin olarak hareket eder ve memeliler için çok daha düşük bir toksisite ile böceklerin merkezi sinir sistemi üzerinde etkili neonikotinoidler diye adlandırılan kimyasal sınıfa ait bir sistemik insektisittir. Böcek sinir sistemindeki uyarıların iletimi engeller.



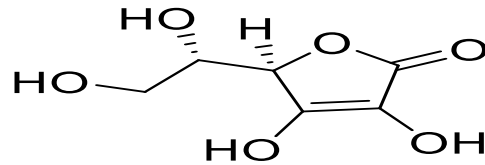
Şekil 1.11. Imidacloprid molekülünün yapısal formülü

1.6. Organik Bileşikler

Kimyasal bileşiklerin insan, bitki ve hayvan dokuları üzerinde önemli etkileri vardır. Bu çalışmada askorbik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve benzoik asidin karayemişten izole edilen glutatyon s-transferaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir.

1.6.1. Askorbik asit (C Vitamini)

Askorbik asit, suda eritilebilen ve birçok görevi olan bir vitamindir. Çoğu hayvanlar ve bitkiler, kendi C vitaminlerini glikozdan üretebilirler. İnsanlar, bazı meyve yarasaları ve insan benzeri primatlar C vitamini üretemediklerinden bunu besinlerden almak zorundadırlar. Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar C vitamini içerir. Ancak C vitamini ısıya hassas olduğundan pişirme esnasında hızla bozulur.

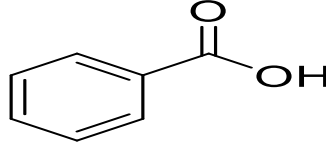


Şekil 1.12. Askorbik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.2. Benzoik asit

Renksiz, kristal veya toz yapıda katı bir maddedir. Gıdalarda mikrobik bozunmayı önlemek için kullanılır. En çok kullanıldığı alanlar meyve suyu, marmelat, reçel, gazlı

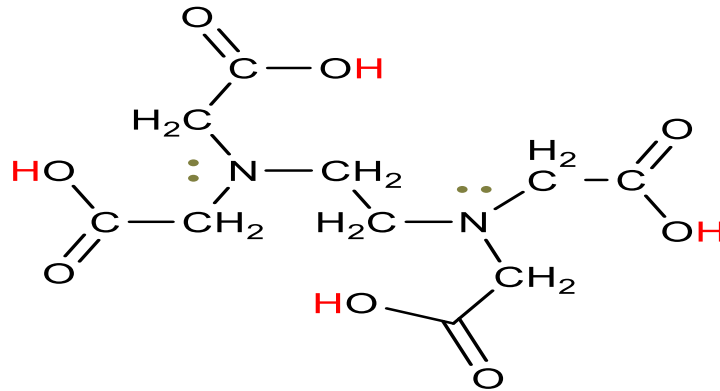
içecekler, turşular, ketçap vb ürünlerdir. Tütün ilaçlamada ve diğerk böcek öldürücü ilaç içeriklerinde yer alır.



Şekil 1.13. Benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.3. Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)

EDTA laboratuvarında metal iyonlarını tutmak için kullanılır. Biyokimya ve moleküler biyolojide iyon tüketici olarak enzimlere karşı kullanılır. Analitik Kimyada kompleksmetrik titrasyon, su sertliğı maskeleyici ajanlar analizlerinde kullanılır.



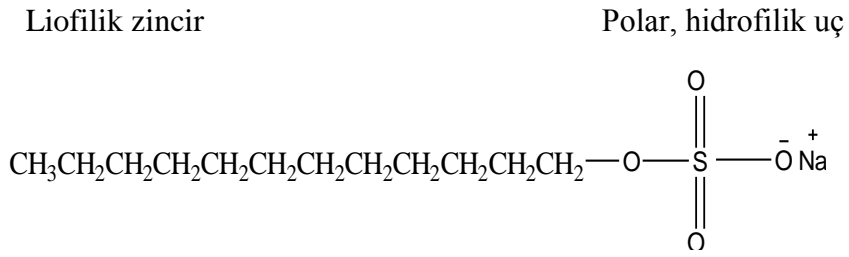
Şekil 1.14. EDTA molekülünün yapısal formülü

1.6.4. Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Hücre zarında protein-protein, protein-lipit etkileşimlerini parçaladığı için zar proteinlerinin çözülmesinde kullanılan bir biyolojik deterjandır. Poliakrilamid jel elektroforezinde sıklıkla kullanılan, polianyonik ve denatüre edici bir deterjandır.

Proteinlerin taşıdığı net yükü maskeler, proteinlerin etrafını kaplayarak onları negatif yüklerle yükler.

Kapalı formülü: $C_{12}H_{25}Na_2SO_4$

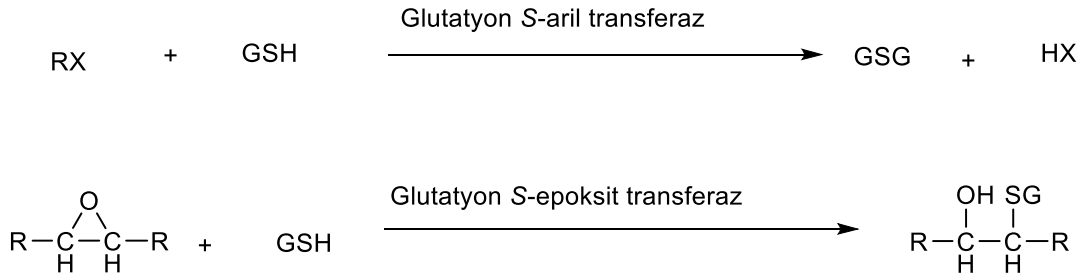


Şekil 1.15. SDS molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Şimdiye kadar birçok canlı türünde ve bitki dokularında farklı enzimlerin aktivitesine bakılmış ve bazı enzimler için de saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilmiştir. Glutasyon S-transferaz enzimi de üzerinde en çok çalışma yapılan önemli enzimlerden bir tanesidir.

Elektrofiller ile glutasyonu bağlayabilen enzimlerin var olduğu bağımsız olarak ilk kez Combes ve Stakelum ile Booth ve ekibi tarafından açıklandı (Combes and Stakelum 1961; Booth *et al.* 1961). Glutasyon S-transferazlar olarak bilinen bu enzim ailesi genelde sitozolde bulunan temel faz II detoksifikasyon enzimleridir (Sheehan *et al.* 2001) ve bu enzimler son zamanlara kadar katalizledikleri reaksiyona göre adlandırılmıştır (Peter *et al.* 1977).



Şekil 2.1. GST enziminin ilk zamanlar adlandırılması

Glutatyona elektrofilik substratların bağlanmasını katalizlemenin yanı sıra bu enzimlerin aynı aktivitesine de sahip olan bu enzimler hücre ölümlerine neden olan H₂O₂ ye karşı hücreleri korurlar (Sheehan *et al.* 2001).

Enzimin pestisit, ilaçlar ve kanserojen gibi yabancı maddelere karşı hücreleri koruduğu düşünülür (Huston 1976). Bugüne kadar insan, fare, sığır ve tavşan gibi memelilerden çok iyi bir şekilde saflaştırılmış olan glutasyon S-transferazların özellikleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir (Iizuka *et al.* 1989).

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 enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST karsinojenik bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. GST, her biri, elektrofilik substrat için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahiptir (Cnubben *et al.* 2001).

GST'ler ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmış ve daha sonra GST'nin farklı substrat spesifitelerine göre sınıflandırılması yapılmıştır. GST'leri epoksit transferaz, aril transferaz, alkil transferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz şeklinde beş grup altında sınıflandırmışlardır (Both *et al.* 1961; Boyland and Chasseaud 1969). 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). Bu sonuçlar ışığında enzimin sınıflandırılmasında proteinin enzimatik özellikleri yerine fiziksel ve yapısal özellikleri esas alınmıştır.

GST alt birimleri birbirinden bağımsız alfa, mü, pi, teta, sigma olarak beş alt sınıfa ayrılmıştır (Ketterer *et al.* 1993; Neufiend 1997). Ancak daha sonra yapılan araştırmalar bu enzim ailesinin delta, beta, tau, zeta formlarının da olduğunu göstermiştir (Dixon *et al.* 2002). GST'nin alfa, pi ve mü formları ilaç

metabolizmasında, sigma alt birimi ise prostoglandin sentezinde önemli rol oynar (Rowsey *et al.* 2001). Zeta ve teta formları hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunurken tau ve pi formları bitkiye spesifiktir (Dixon *et al.* 2002).

Yapılan çeşitli çalışmalarda GST'nin izoenzimlerinin farklı şekilde sınıflandırılmasına rastlanmaktadır. Bu izoenzimler izoelektrik noktalarına göre asidik, bazik ve nötral olmalarına göre 3 sınıfa ayrılmışlardır. Her bir izoenzim dimerik yapıda olup mol kütleleri sırasıyla 24,8, 26 ve 26,7 kDa olan alt birimlerden oluşmuştur. Ayrıca karaciğerde dördüncü bir izoenzim olan mikrozomal GST izoenzimi bulunmuştur (Tüken 1993).

Sonraki yapılan çalışmalarda GST enzimi, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid, mollusk 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).

GST karaciğer, böbrek, ince ve kalın bağırsak, akciğer ve meme gibi birçok organın sitozolündeki proteinlerin %5 ini oluşturmaktadır (Smith *et al.* 1981; Hayes *et al.* 1989). Böbrek; ksenobiyotiklerin ekstrasyonu ve detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar ve insan böbreğinde GST'lerin anyonik izoenzimlerinin yanısıra katyonik izoenzimleri de belirlenmiştir (Sherman *et al.* 1983).

Glutatyon S-transferaz enzimi daha çok hücrelerin sitozol kısmında bulunmaktadır. Ancak, son zamanlarda yapılan araştırmalarda, karaciğer hücrelerinin mikrozomal kısmında da glutatyon S-transferaz aktivitesine rastlanmıştır. Bu kısımdaki enzim mikrozomal membrana sıkı bir şekilde bağlı ve sitozolik formundan farklı özelliklere sahiptir (Boyer *et al.* 1985; Morgenstern *et al.* 1988).

Yapılan literatür araştırmalarında GST enzimi birçok organizmada saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Örneğin, Gadagbui *et al.* (2000) kedi balığının bağırsak

mukozasından GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, glutatyon- agaroz afinite kolonuyla 107 μ mol/ mg spesifik aktiviteye sahip %87 verimle 100 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile moleköl kütlesi 26,7 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu (homodimer) belirlemişlerdir. Yaptıkları kinetik çalışmalarda ise enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M değerleri sırasıyla 0,19 mM ve 0,43 mM olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Tümörlü ve tümörlü olmayan insan midesinde GST aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin inhibisyon etkileri çalışılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde ağır metallerin enzim aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Demirdağ *et al.* 2013).

Hindi karaciğerinden GST enzimi afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmış ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Enzimin moleköl kütlesi SDS-PAGE ile 26 kDa , 24 kDa olarak belirlenmiş ve enzimin doğal halinin moleköl kütlesi sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle yaklaşık 53 kDa bulunmuştur. Enzim için karakterizasyon çalışmaları da yapılmış ve sonuçlar rapor edilmiştir (Akkemik *et al.* 2012).

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden GST enzimi afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin izoformları SDS-PAGE ve HPLC ile belirlenmiştir. HPLC sonuçlarına göre enzimin farklı izofomlarının moleköl kütleleri yaklaşık olarak 25,5 ve 23,0 kDa olduğunu bildirmişlerdir (Riol *et al.* 2001).

Glutatyon S-transferaz enzimi E.coli ekstraktlarından %7,5 verimle yaklaşık olarak 2.300 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleköl kütlesi 45 kDa ve iki eş alt birimden oluştuğu görülmüştür. Enzimin substratları olan CDNB ve GSH için K_M sabitleri sırasıyla 1,43 mM- 0,33 mM olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri 7,0, optimum sıcaklık değeri 50°C ve stabil olduğu pH değeri 5 ten 11 e kadar olan geniş bir pH aralığı olarak belirlenmiştir (Iizuka *et al.* 1989).

Huang *et al.* (2008) bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, glutatyon- sepharoz 6B afinite kolonuyla 13,07 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktiviteye sahip %14 verimle 300 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS - PAGE ile molekül kütlesi 26 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu (homodimer) belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH' sını 7,0-7,5 arasında, optimum sıcaklığını 45°C olarak bulmuşlardır. Yaptıkları kinetik çalışmalarda ise enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ olarak belirlemişlerdir.

Hamed *et al.* (2004) yaptığı bir çalışma da glutatyon s- transferaz enzimi Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden glutatyon-sepharoz afinite kolonuyla saflaştırılmıştır. SDS- PAGE yardımıyla enzimin molekül kütlesini 25,460 kDa ve enzimin optimum pH'sını 8 olarak belirlemişlerdir. Michaelis-Menten grafiği yardımıyla enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerini yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM bulduklarını rapor etmişlerdir.

Kefal balığı karaciğerinden anyon değişim kromatografisi yardımıyla GST'nin 14 izoformu saflaştırılmıştır. Dimerik yapıda bulunan her bir GST izoformunun alt birimlerinin molekül kütleleri 23 ile 28 kDa olarak belirlenmiştir (Barcena *et al.* 1997).

Çift kanatlı sinek türü olan *bactrocera*'nın 3 farklı gelişim evrelerinde GST enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim aktivitesi üzerine bazı ksenobiyotiklerin inhibisyon etkileri incelenmiş ve sonuçlar rapor edilmiştir (Chen Er-Hu *et al.* 2012).

Pirinç GST enzimi üzerine önemli bir ağır metal olan Cadmiyum (Cd^{+2})' un inhibisyon etkileri çalışılmıştır. GST enzimi pirinç kökünden afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografileriyle saflaştırılmış Cd'suz ve Cd'lu olmak üzere çalışmalar yapılmıştır. Cd'lu çalışmada enzimin inhibe olduğu sonucuna ulaşılmış olup sonuçlar rapor olarak sunulmuştur (Chun-hua Zhang *et al.* 2013).

Antiinflamatuvar ilaç grubundan olan indometazinin sıçan karaciğer GST ve insan eritrosit GST izozimleri üzerine in vitro etkilerini incelemek için yapılan çalışmalarda bu ilacın sıçan karaciğer GST üzerine inhisyon etkisi yaptığı (Wu and Mathews 1983; Nicholls and Ahokas 1984), ancak insan eritrosit izozimi olan pi aktivitesinde ise artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Orhan 1994).

İnsan kan serumdan GST saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada GST enziminin optimum iyonik şiddeti 2 mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH sı 5,5, optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca aktivite ölçümünde kullanılan substratları CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/min.mg; 4,11 mM ve 0,23 nmol/min.mg protein olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007).

Sığır eritrositlerinden GST enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiş ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada GST enziminin %97 verimle 6800 kat saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise optimum sıcaklık 20°C, optimum pH :7, optimum iyonik şiddet 0,1 M, stabil pH: 6,5, CDNB için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,186 mM, 116 EU/ml; GSH için 0,423 mM, 192 EU/ml olarak bulunmuştur. Enzimin molekül kütlesi ise 27 kDa olarak belirlenmiştir (Güvercin 2008).

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden glutatyon s-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi, bazı metal iyonları ve antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, detoksifikasyon sisteminde çok önemli rolü olan GST enziminin, metal toksisitesi ile aktivitesinde azalma meydana geldiği görülmüştür. Tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin düşük dozlarda bile enzimi inhibe etmelerine dair bulgulara ulaşılmıştır (Çomaklı 2011).

GST enzimi *Lactuca sativa*'dan DEAE- sephacel ve glutatyon-sepharose kolon kromatografisi ile %9,6 verimle yaklaşık olarak 403 kat saflaştırılmıştır. Enzimin

molekül kütlesi SDS-PAGE ile 23 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık olarak 48 kDa olarak belirlenmiştir (Hee-Joong *et al.* 2005).

Ağır metaller, 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 balıkların kan parametrelerine de etki eder ve fizyolojik bozukluklara neden olur (Sehgal and Saxena 1986).

Plasental glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi zamanında doğum yapmış hastanın plasentasından alınarak glutatyon-agaroz affinite kolonu yardımıyla saflaştırılmıştır. GST- π 2.628 $\mu\text{mol/mg dk}$ 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 0,55 mM, 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 in vitro olarak %50-55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Çelik *et al.* 2003).

Doğada biriken ve canlılarda ağır metal zehirlenmelerini oluşturan Cd^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının sıçan karaciğer GST enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. CdCl_2 (2,5 mgkg^{-1}) ya da MnCl_2 (2,0 mgkg^{-1}) miktarları tek doz olarak verildiğinde, enzim aktivitesi bir gün sonra %36 oranında arttığı rapor edilmiştir (Casalino *et al.* 2004).

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

Orhan vd (1994) eritrosit GST aktivitesine üzerine alüminyum, kurşun ve kadmiyum metallere in vitro etkilerini incelemek için yaptıkları bir çalışmada bu metallere yüksek konsantrasyonlarının enzimde inhibisyona neden olduğunu saptamışlardır.

İnsan kan serumdan izole edilen GST enzim aktivitesi üzerine Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonlarının etkilerini incelemek için yapılan bir çalışmada, bu metal iyonlarının GST enzimini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Türkanoglu 2007).

Detoksifikasyon enzim gen polimorfizmlerinin akut lösemi etiyolojisindeki rollerini araştırmak amacıyla düzenlenmiş bir çalışmada GSTM1 "null" allelinin akut lösemi gelişiminde risk faktörü oluşturduğu tespit edilmiştir (Sayitoğlu vd. 2003; Altınpınar 2005). Türk toplumunda akciğer kanserli hastalar üzerinde yapılan bir araştırmada ise yine Gstm1 "null" allel frekansı incelenmiş ve buna bağlı olarak GSTM1 enzim aktivitesinin olmadığı bireylerde akciğer kanseri riskinin fazla olduğu tespit edilmiştir (Aras 2001; Altınpınar 2005).

Menegon *et al.* (1998), GST polimorfizmi ve Parkinson hastalığı arasındaki ilişkiyi incelemek için yaptıkları çalışmada, GST'in Parkinson hastalığı patojenezinde önemli rolünün olabileceğini bildirmişlerdir.

Prostat kanserli hastalarda polimorfik GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 enzimleri ile hastalık arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulgulara ulaşılamamıştır (La Creis *et al.* 2003). Ayrıca GSTT1 enzim aktivitesi olmayan bireylerde akciğer kanseri gelişme riskinin üç kat fazla olduğu rapor edilmiştir (Hou *et al.* 2001).

Bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri GST aktivitesini artırabilir ya da azaltabilir. Yapılan bir araştırmada Brombenzen ve karbontetraklorür ratlara uygulanarak GST aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Uygulama sonrası karaciğer GST aktivitesinin azaldığı, serum GST aktivitesinin ise arttığı belirtilmiştir (Çetinkaya vd 1993). Başka bir çalışmada, şifalı bir bitki olan Thonningia sanguinea'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA), in vitro olarak karaciğer sitozolik

GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir (Gyamfi *et al.* 2004).

Carillo *et al.* (1995) hormonların GST enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sıçana insülin uygulaması sonucu karaciğer sitozolik GST aktivitesinde 30 dakika gibi kısa bir sürede %56 artışa, mikrozomal GST aktivitesinde ise herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Glukagon hormonu enjeksiyonu, karaciğer sitozolik GST aktivitesinde %43 azalmaya sebep olurken, mikrozomal GST'yi etkilememiştir.

Peters *et al.* (1995) GST enzimiyle yaşlılık arasındaki ilişkiyi incelemek için insan lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada, GST-GSH miktarının yaşlanma ile azaldığını rapor etmişlerdir (Baş 2006). Buna benzer başka bir çalışmada, karaciğer GST aktivitesi ve yaş arasında çok azda olsa negatif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Temellini *et al.* 1995).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Laboratuvar çalışmaları süresince kullanılan indirgenmiş glutatyon (GSH), 1-kloro 2,4-dinitro benzen (CDNB), Dithiothreitol (DTT), etilen daimin tetra asetik asit (EDTA), standart serum albümin, N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin (TEMED), fenil metil sülfonil florid (PMSF), Glutatyon agaroz afinite jeli, borik asit ve diyaliz torbaları Sigma Chemical Company' den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, gümüş nitrat, formaldehit, amonyum sülfat, hidroklorik asit, amonyum persülfat (PER), Trikarboksilik asit (TCA), sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bifosfat, potasyum klorür, metanol, etanol, n-bütanol, izopropanol, asetik asit, sodyum asetat, E. Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G- 100, amonyum persülfat, β -merkaptto etanol Pharmacia'dan temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıda belirtilen alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Santrifüj	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K
Spektrofotometre	: Beckman Coulter UV-VIS 1208
pH metre	: Mettler Toledo
Elektroforez tankı	: BIO-RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025

Karıştırıcı (Vortex)	: GENIE K-55
Hassas terazi	: Gec Avery (USA)
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), Sigma (USA)
Kronometre	: Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr (Germany)
Otomatik pipetler	: Eppendorf ve Finnipipette
Çalkalayıcı	: Mıdı Dual 14
Manyetik karıştırıcı	: Chiltren Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: LWD-3008
Su banyosu	: Clifton
Su banyosu	: Polyscience, Elektronik ıstmal-ısoğutmalı
Kar makinesi	: Angelantoni Industrie
Liyofilizatör	: Sinijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Arçelik ve Bosh
Derin dondurucu(-20°C'ye kadar)	: White-Westinghouse (USA)
Derin dondurucu(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low
Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	: Bio Rad Gel Doc 2000

3.1.3. GST Enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M KH_2PO_4 (pH:7,0): 0,348 g KH_2PO_4 ve 1 mM EDTA 0,0074 g tartılarak 15 ml saf su içerisinde çözülerek pH:7,0'ye ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

2. 20 mM GSH Çözeltisi: 0,061g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim su ile 10 ml'ye tamamlandı.

3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,05 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.4. Homojenat hazırlama çözeltisi

0,2 mol/L Tris-HCl Çözeltisi (pH: 7,8): 12,114 g Tris-HCl içerisinde (5 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA ve 1 mmol/L PMSF) içeren karışım yaklaşık 450 ml saf suda çözüldü pH'sı 7,8'e ayarlandı ve son hacmi saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

3.1.5. Diyaliz çözeltisi ve hazırlanması

10 mM KH_2PO_4 Çözeltisi (pH=7,0): 2,721 g KH_2PO_4 (0,02 mol) alınarak 1,950 L saf suda çözüldü. pH=7,0'ye ayarlandı ve son hacim su ile 2 L'ye tamamlandı.

3.1.6. GST enziminin afinite kolonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, pH:7,4 (Kolonun dengelenmesi ve paketlenmesi için kullanılan tampon): 0,4 g KH_2PO_4 (3 mmol) ve 2,61 g NaCl (45 mmol) alınarak 250 ml suda çözüldü pH:7,4'e getirildikten sonra destile su ile 300 ml'ye tamamlandı.

2. 10 mM KH_2PO_4 /0,1 M KCl, pH:8,0 (Numune kolona uygulandıktan sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 1,36 g KH_2PO_4 (0,01 mol) ve 7,45 g KCl (0,1 mol) karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlanıp ve pH:8,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

3. 10 mM KH_2PO_4 /0,1 M KCl, pH:5,0 (Numune kolona uygulandıktan sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 1,36 g KH_2PO_4 (0,1 mol) ve 7,45 g KCl (0,1 mol) karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlanıp ve pH:5,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4. 50 mM Tris-HCl Çözeltisi, pH:9,5: 9,082 g Tris (74 mmol) alınarak 1,450 L saf suda çözülüp ve pH:9,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1,5 L'ye tamamlandı.

5. 5 mM GSH Çözeltisi: 0,01229 g GSH'ın 20 ml, 50 mM Tris-HCl içerisinde çözünmesiyle hazırlandı.

6. 50 mM Tris-HCl ve 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM ve 10 mM GSH çözeltisi, pH:9,0 (Afinite jeline tutunan glutasyon S-transferaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon) 50 mM Tris- HCl çözeltisi içerisinde katı olarak GSH çözülerek 10 mM' lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 6 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulanıp elüatlar alındı.

Çizelge 3.1. Gradientli elüsyon için hazırlanan tüpler ve içerikleri

	1.Tüp (ml)	2.Tüp (ml)	3.Tüp (ml)	4.Tüp (ml)	5.Tüp (ml)	6.Tüp (ml)
10 mM GSH (Tris HCl'de çözülmüş)	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Saf su	4,5	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
Toplam Hacim	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

7. Borat Tamponu: 0,1 M H_3BO_3 (Borik Asit) ve 0,5 M NaCl, pH:8,5 (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 0,31 g H_3BO_3 (5 mmol) ve 1,46 g NaCl (25mmol) alınarak 40 ml saf su da çözülüp, pH:8,5'e ayarlandıktan sonra hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

8. Asetat Tamponu: 0,1 M $NaCH_3COO$ ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 0,41 g $NaCH_3COO$ (5 mmol) ve 1,46 g NaCl (25 mmol) alınarak 40 ml saf su da çözülüp pH:4,5'e ayarlandıktan sonra hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.7. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) alınarak 80 ml suda çözüldü pH=8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) alınarak 80 ml suda çözüldü pH=6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid, 34,6 ml saf su içerisinde çözülerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.
4. %10'luk SDS çözeltisi: 1 g sodyum dodesil sülfat 9 ml saf su içerisinde çözülerek 10 ml hazırlandı.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1g amonyum persülfat alınarak, 9 ml saf suda çözülerek hazırlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edilerek pH=8,3'e ayarlandı ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 0,65 ml, %10'luk SDS'den 1 ml %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numuneye karşılık 50 µl β-merkapto etanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi: Jelde yürütülen proteinleri sabitleştirmek amacıyla %50 izopropanol, %40 su ve %10 TCA içeren bir karışım hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit içerisinde 0,1 g coomassie brillant blue R-250 çözülerek hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

3.1.8. Gümüş boyama çözeltileri

1. Tespit Çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lık etanol, 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

2. Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 80 ml saf su ve 45 ml etanol karışımının pH'sı asetik asitle 6,0'a ayarlandı. 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 ml glutaraldehit ilave edilerek son hacim saf suyla 150 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3. Boyama çözeltisi: 100 ml saf su, 20 µl formaldehit ve 0,1 g AgNO₃ (Gümüş nitrat) karıştırılarak hazırlandı.

4. Yıkama 1 çözeltisi: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf su ve 120 µl formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

5. Yıkama 2 çözeltisi: 1 ml gliserin, 1,25 ml asetik asit (%5'lik 250 ml asetik asit çözeltisi) saf suyla 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.9. Diğer çözeltiler

1. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,36 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g NaH₂PO₄H₂O (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve hacmi 1 L olacak şekilde saf su ilave edildi.

2. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözülerek içerisine %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L'ye tamamlandı.

3. %0,04'lük bromtimol mavisi çözeltisi: 0,1 ml indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve son hacim 250 ml olacak şekilde su ilave edildi.

4. %0,02 NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.10. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler

1000 mM'lık $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnezyum sülfat hepta hidrat): 1,23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

1000 mM'lık CaCl_2 (Kalsiyum klorür): 0,55 g CaCl_2 saf su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

1000 mM'lık $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bakır II sülfat penta hidrat): 0,93 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

1000 mM'lık NiSO_4 (Nikel sülfat): 0,77 g NiSO_4 su ile 5 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1000 mM'lık $\text{CdSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Kadmiyum sülfat penta hidrat): 1.49 g $\text{CdSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ su ile 5 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1000 mM'lık Askorbik Asit: 0,88 g Askorbik Asit saf su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

1000 mM'lık EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit): 1,86 g EDTA tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

1000 mM'lık SDS (Sodyum dodesil sülfat): 1,44 g SDS tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

1000 mM'lık Benzoik asit: 0,61 g Benzoik asit tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan fenil alanin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Homojenat ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları Bradford yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem boya olarak kullanılan ve negatif bir yüke sahip olan Coomassie brilliant blue G-250'nin protein üzerindeki pozitif

yüke bağlanması esasına dayanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlandığı zaman, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Proteinlerin çoğunun hemen hemen aynı sonuç eğrilerini vermesinden dolayı bu yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bradford yöntemi bozucu etkilere karşı daha az hassastır. Yöntemin hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve iki dakika gibi çok kısa sürede gerçekleşir. Renk stabilitesi iki saatin üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

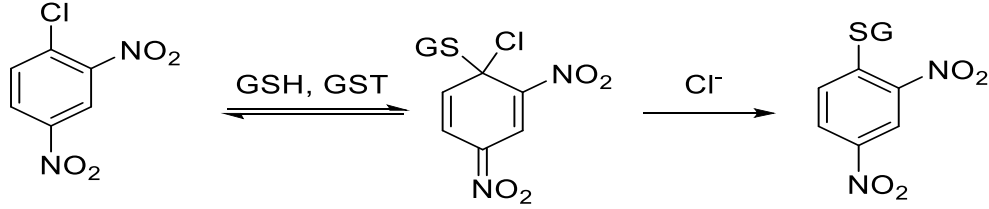
Protein tayininde bu yöntemi kullanıldığında standart bir grafik hazırlanması gerekmektedir. Bunun için 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi (Coomassie brilliant blue G-250) ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak kullanılan küvet içerisine 0,1 ml numunenin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışımdan konuldu. Son olarak absorbands değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil 4.1).

Karayemiş meyvesi homojenatı ve afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim numunelerinden 0,1 ml tüplere konularak üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra ise 595 nm'de absorbands değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tesbit edildi. Elde edilen bu değer standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbands gösterir (Şekil 3.1). Böylece bu

dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Biz de bu ölçüm metoduna göre çalışmalarımızda aktivite ölçümünü gerçekleştirdik.



Şekil 3.1. GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması

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

Aktivite ölçümü için Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi toplam hacim 1ml olacak şekilde karışım hazırlandı. Bunun için kör olarak hazırlanan küvete 0,1 M 200 µl fosfat tamponu (K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH:7,0) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde), 20 mM 50 µl GSH ve 730 µl saf su ilave edildi. Aktivite ölçümü yapılan küvetlere ise 0,1 M 200 µl (K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH:7,0) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde), ve 20 mM 50 µl GSH katılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 20 µl 'lik enzim numunesi hızlı bir şekilde ilave edildikten sonra küvet spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı ve üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig *et al.* 1974).

Çizelge 3.2. Karayemiş GST enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok Aktivite Çözeltisi	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim	Konsantrasyon	Hacim	Konsantrasyon
K- fosfat tamp. (100 mM pH: 7)	200	0.1 M	200	0.1 M
CDNB (25 mM)	20	0.5 mM	20	0.5 mM
H ₂ O	730		710	-
GSH (20 mM)	50	1 mM	50	1mM
Enzim numunesi	-	-	20	-

Bir Enzim Ünitesi: Bir dakikada, 25°C’de ve pH 7,4’de 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak tanımlanır.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

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

EÜ: 1 ml’deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

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

VT: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

VE: Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.2.3. GST enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması

Büyükçe bir beherde saf su veya tampon içine alınarak, oda sıcaklığında 1 gece veya 90°C’de su banyosunda 4-5 saat bekletilerek polimer materyal sisirilir. Sisirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırılır. Sisirilmiş ve

havası uzaklaştırılmış polimer materyali, dengeleme tamponuyla (10 mM K-fosfat pH:7,4, 150 mM NaCl) dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarılır. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapılır. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH'sı ve 280 nm'de absorpsiyon değerleri aralıklarla ölçülür, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edilir ve kolonun akış hızı yaklaşık 15- 20 ml/saat olarak ayarlanır (Uyanık 2008).

3.2.4. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan ve bizim de kullandığımız yöntem afinite kromatografisi yöntemidir. Bu amaçla 10 ml'lik yatak hacmi için 1 g kuru glutatyon agarose tozu tartılarak, 200 ml saf su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiştir oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (10 mM K-fosfat pH:7,4, 150 mM NaCl) ilave edilerek jel süspansiyonu edildi. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun absorpsiyonlarının ve pH'larının eşitlenmesinden veya 280 nm'deki absorpsiyon değerinin 0,05 oluşundan anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmıştır oldu (Toribio *et al.* 1996; Güvercin *et al.* 2008).

3.2.5. Karayemiş meyvesinden GST'nin saflaştırılması

3.2.5.a. Karayemiş temini ve homojenat hazırlanması

Bu tez kapsamında glutatyon S-transferaz enzimi, karayemiş meyvesinden saflaştırıldı. Karayemiş (*Prunus Laurocerasus L.*) Karadeniz Bölgesinin Tokat ilinden toplanmıştır. Karayemiş meyvesi çekirdeğinden ayrıştırılmış olup etli kısmıyla çalışılmıştır.

30 g karayemiş alınarak ilk önce sıvı azot kullanılarak mekanik olarak birkaç basamakta parçalandı. Daha sonra 45 ml tampon üzerine ilave edilerek homojenatör yardımıyla

yaklaşık 5 dakika homojenize edildi. Karışım çift katlı tülbentle süzüldü. Homojenat 13500 rpm, +4°C'de 30 dakika santrifüjlendi. Daha sonra karışım ince bantlı süzgeç kağıdıyla tekrar süzüldü ve böylece katı parçacıkların protein çözeltisinden uzaklaştırılması sağlandı. Süpernatant kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere alınarak soğukta saklandı, çökelek ise uzaklaştırıldı.

3.2.5.b. Homojenattaki enzimin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması

Örneğin uygulanmasından önce dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel düzeyine indirildi. Örneğin uygulanması için protein çözeltisinden küçük hacimde (%10'luk gliserinli yaklaşık 4 ml) kolona tatbik edildi. Bu protein çözeltisi jele iyice emdirildi ve üzerine birkaç ml elüsyon tamponu dikkatlice ilave edilerek tekrar jele iyice girişi sağlandı. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak elüsyona devam edildi; elüatlar yaklaşık 3'er ml olacak şekilde tüplerde toplandı. Elüsyon tamponunun kör olarak kullanılmasıyla, toplanan elüatların tek tek herbir tüpün 280 nm de absorbansları ölçüldü. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorbans değerleri 0,05 oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde yine aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif protein tayini için alınan absorbans değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Kromatografi işlemi sonunda enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve afinite kolonuna yüklendi.

3.2.5.c. Homojenattaki enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Önceden hazırlanmış olan homojenat doğrudan glutatyon-agaroz afinite kolonuna uygulandı. Bunu takiben kolondan 10 mM KH₂PO₄ ve 0,1 M KCl, pH:8 geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon dengelendikten sonra gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Elüsyon çözeltisi 50 mM Tris-HCl ve (1,25-10 mM GSH, pH:9,0) içeren çözeltinin gradientinden oluşturuldu. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5 ml

halinde tüplere alındı ve 340 nm'deki absorbanslarına bakıldı (Şekil 4.2). Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı (Toribio *et al.* 1996).

3.2.6. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kurumaması önlenildi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra gerilim 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve gümüş boyama işlemine tabi tutuldu. Jel ilk olarak tespit çözeltisine kondu yaklaşık 30 dak çalkalama cihazında bekletildi. Ardından redüksiyon çözeltisine kondu ve aynı

şekilde 30 dak. Çalkalama cihazında çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra jel gümüş nitrat çözeltisinde boyamaya boyama çözeltisine konuldu ve bantların oluşumu gözlemlendi.. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak önce yıkama 1 çözeltisine ardından yıkama 2 çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.4).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 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, $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$] eklendi.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 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. Karayemiş Meyvesinden Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5,0, 5,5 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 0,1M fosfat tamponları ve pH'sı 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponları hazırlandı. Her bir tampon ile enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuç çizelgede ve % aktivite-pH grafiği halinde gösterildi (Çizelge 4.2, Şekil 4.5).

3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için 0,0625 M, 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M, 1,25 M, 1,5 M fosfat tamponları

hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri optimal pH olan 7,0'e ayarlanarak her bir çözelti için aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuç çizelge ve aktivite-konsantrasyon grafiği halinde gösterildi (Çizelge 4.3, Şekil 4.6).

3.3.3. Optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (Ea), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q₁₀ değerlerinin belirlenmesi

Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığı, Ea, ΔH ve Q₁₀ değerlerini belirlemek için elektronik ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklık belirlenirken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda bekletildi. Çıkarıldığında enzim pipetlenerek hemen okuma yapıldı ve su banyosuna tekrar konuldu. 0°C ile 75°C arasında ve her 10°C'de bir bu şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte 1/T x 1000⁻¹ olarak ifade edildi (Çizelge 4.4-4.5 ve Şekil 4.7). (Danişan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aktivasyon enerjisi (Ea) hesaplandı.

$$\text{Eğim} = \frac{-E_a}{2,303 \times R}$$

Aktivasyon entalpisinin (ΔH)'nin hesabında ise ΔH=E-RxT formülünden faydalanıldı (Wilson 1971; Segel 1975) (Çizelge 4.6). Daha sonra bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q₁₀ değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Çizelge 4.5). (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi

Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil olduğu pH'nın belirlenmesi için 100 mM'lık fosfat tamponunun pH değerleri 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 7,0 ve 7,5 olan K-fosfat tamponu çözeltileri ile 100 mM'lık Tris-HCl tamponundan pH değerlerinden 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 olan çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 500 µl alınarak üzerine yine 500 µl enzim çözeltisi ilave edilerek ependorf tüplerine konulup ilk okuma yapıldıktan sonra +4°C'de korunarak her 12 saatte bir okuma yapıldı ve stabil pH belirlenmiş oldu. Aktivite ölçümlerinde optimum pH ve iyonik şiddete sahip tamponlar kullanıldı. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Çizelge 4.6-4.8, Şekil 4.8-4.9).

3.3.5. Karayemiş GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar

Karayemiş meyvesi glutatyon S-transferaz enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerini tespit etmek için (1mM) sabit GSH konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonu (0,05 mM, 0,1 0,2 Mm 0,4 mM, 0,8 mM ve 1,6 mM) ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre $1/V - 1/[CDNB]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik yardımı ile CDNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Yine aynı şekilde (0,5 mM) sabit CDNB konsantrasyonunda GSH'nın 5 farklı konsantrasyonu (0,05 mM, 0,1 0,2 Mm 0,4 mM, 0,8 mM ve 1,6 mM) ile aktivite ölçümleri yapılarak ve $1/[GSH]-1/V$ grafiği çizildi. Bu grafikten de GSH için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Tüm aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (ET) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri aşağıda gösterilen formülden faydalanılarak hesaplandı.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Özgülük sabiti aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

Elde edilen grafikler Şekil 4.10-4.11 ve Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.

3.4. Karayemiş GST Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisit, Organik Bileşik ve Metal İyonlarının İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren pestisit, kimyasal bileşik ve metal iyonları belirlendi. Bu maddelerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu maddelerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren pestisit, kimyasal bileşik ve metal iyonu konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Çizelge 4.10-4.25, Şekil 4.12-4.25).

3.5. Karayemiş Meyvesinden Elde Edilen GST Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Pestisit, Metal İyonları ve Organik Bileşiklerin K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için, karayemiş meyvesinden elde edilen GST enzimini inhibe eden $NiSO_4$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdSO_4 \cdot 5H_2O$ ve $CaCl_2 \cdot H_2O$ metal iyonu çözeltileri; Askorbik Asit, Benzoik Asit, Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), Sodyumdodesil sülfat (SDS) organik bileşikleri ile diclorvos, cypermethrin,

imidacloprid, fenoxaprop-p-ethyl, glyphosate isopropilamin tuzu pestisitleri kullanıldı. Tüm çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin stok konsantrasyonları bölüm 3.1.10'de verilmiştir.

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi.

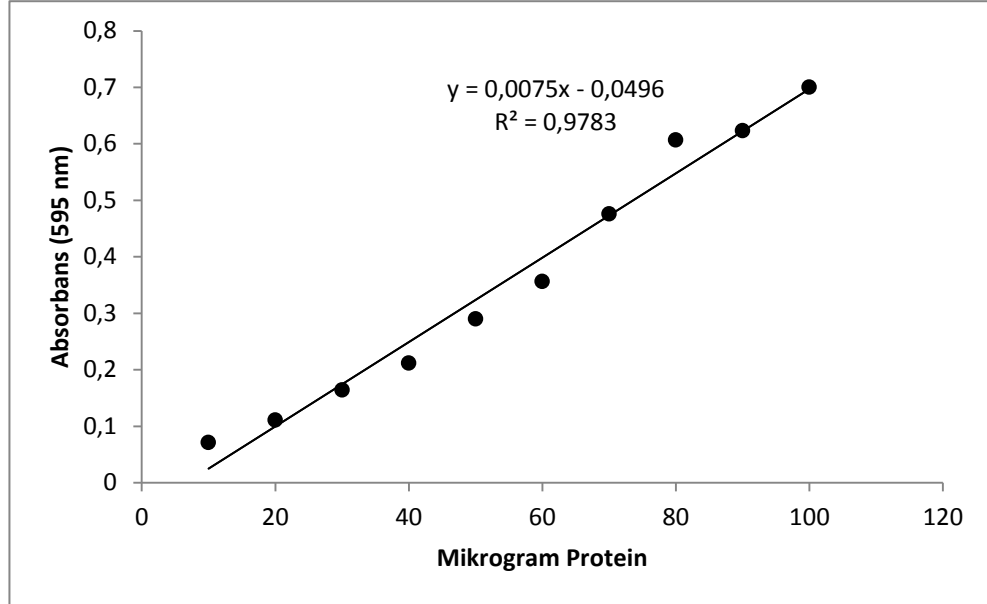
Spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneylerde de kullanıldı. İnhibitör çalışmaları için kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.27- 4.43'de verildi.

Daha sonra karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $V-[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Şekil 4.26-4.39). (Lineweaver and Burk 1934).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı (Şekil 4.1). Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



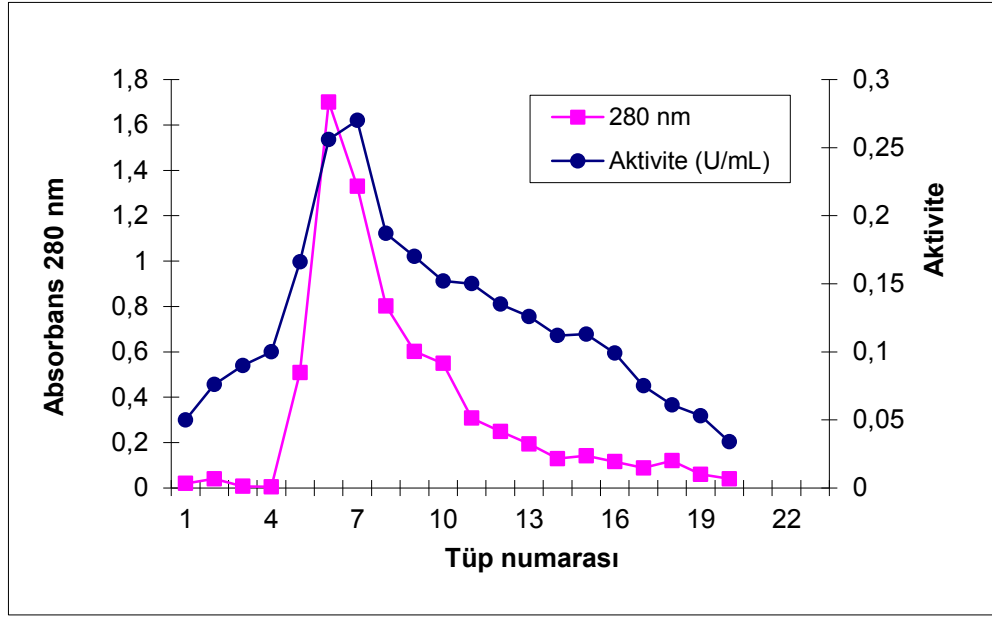
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Karayemiş Bitkisi GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar

4.2.1. Afinitite kromatografisi sonuçları

Karayemiş meyvesi homojenatı hazırlanarak doğrudan afinitite kolonuna tatbik edildi. Önceden hazırlanmış olan elusyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri Şekil 4.2’de gösterildi.

Karayemiş homojenatı, afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterildi

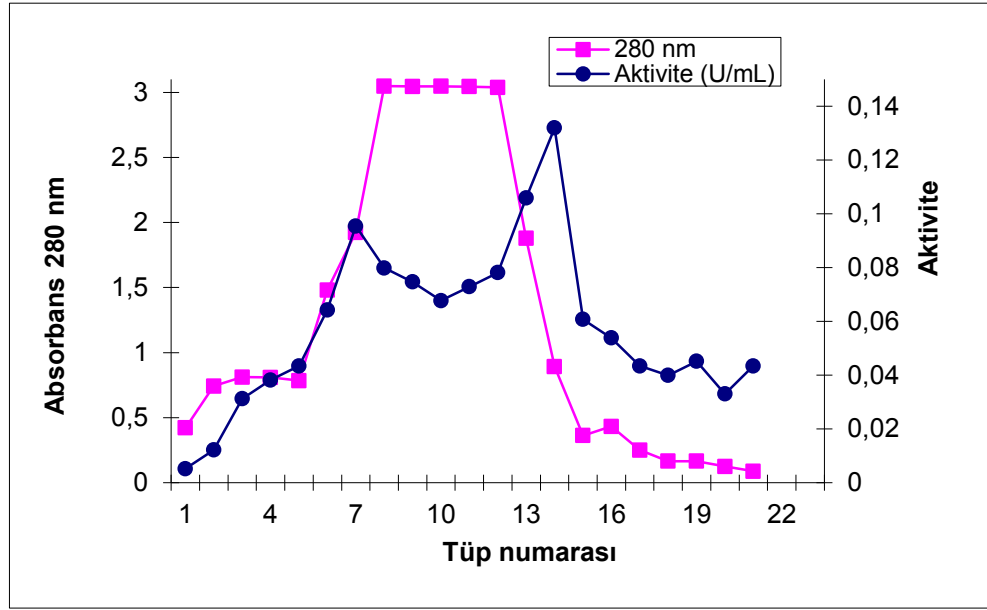


Şekil 4.2. Karayemiş meyvesi GST enziminin glutatyon agaroz afinite kolonundan GSH ile elüsyon grafiği

4.2.2. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografi sonuçları

Karayemiş meyvesi homojenatı hazırlanarak jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Önceden hazırlanmış olan elüsyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri Şekil 4.3’de gösterildi.

Karayemiş homojenatı, jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen yüksek aktiviteli tüpler birleştirilerek afinite kolonuna yüklendi. Elüsyonlar 2 ml’lik tüplere alındı ve yüksek aktiviteli tüpler birleştirildi. Enzim için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterildi



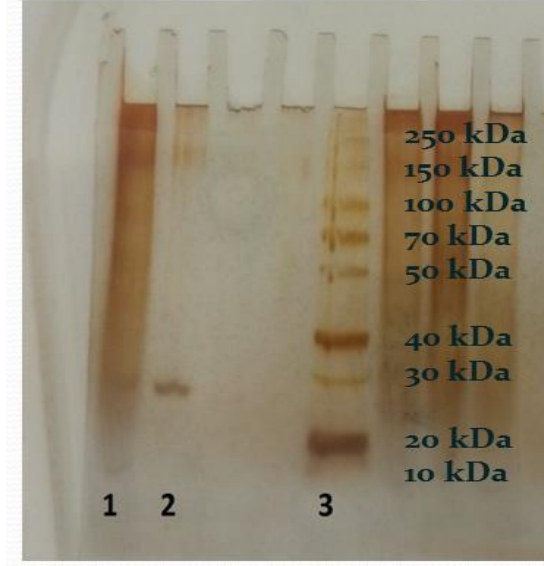
Şekil 4.3. Karayemiş meyvesi GST enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği

Çizelge 4.1. Karayemiş meyvesi jel filtrasyon ve afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg prot.)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	15	0,088	0,980	1,320	14,700	0,090	100	1,000
Jel filtrasyon Kromatografisi	10	0,098	0,069	0,980	0,690	1,420	74,24	15,770
Afinite Kromatografisi	4	0,110	0,050	0,440	0,200	2,200	33,30	24,460

4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile GST Enzim Saflığının Kontrolü

Karayemiş bitkisi afinite sonrası elde edilen elüatlardaki GST enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.6'da izah edilen elektrofrez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.4'de verildi



Şekil 4.4. Glutatyon-agaroz afinite kolonuyla saflaştırılan karayemiş meyvesi GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

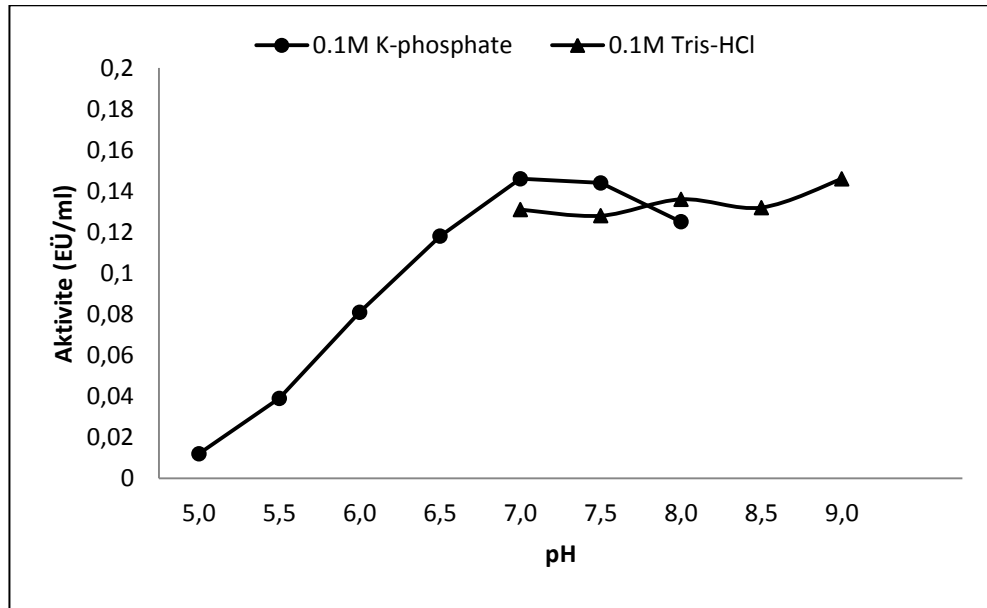
4.4. Karayemiş Meyvesi GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sını tespit etmek için bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi pH değeri 5,5 ile 8,0 arasında değişen 0,1 M'lık K-fosfat tamponu ile pH'sı 7-9 arası değişen 0,1 M'lık Tris-HCl tamponlarından oluşan çözeltiler kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı. Karayemiş GST enziminin optimum pH değeri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5'de gösterildiği gibi K-fosfat tamponunda pH 7,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi ile 0,1 M Tris-HCl çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	0,1 M KH_2PO_4 Aktivite (EÜ/ml)	0.1 M Tris-HCl Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,012	
5,5	0,039	
6,0	0,081	
6,5	0,118	
7,0	0,146	0,131
7,5	0,144	0,128
8,0	0,125	0,136
8,5		0,132
9,0		0,146



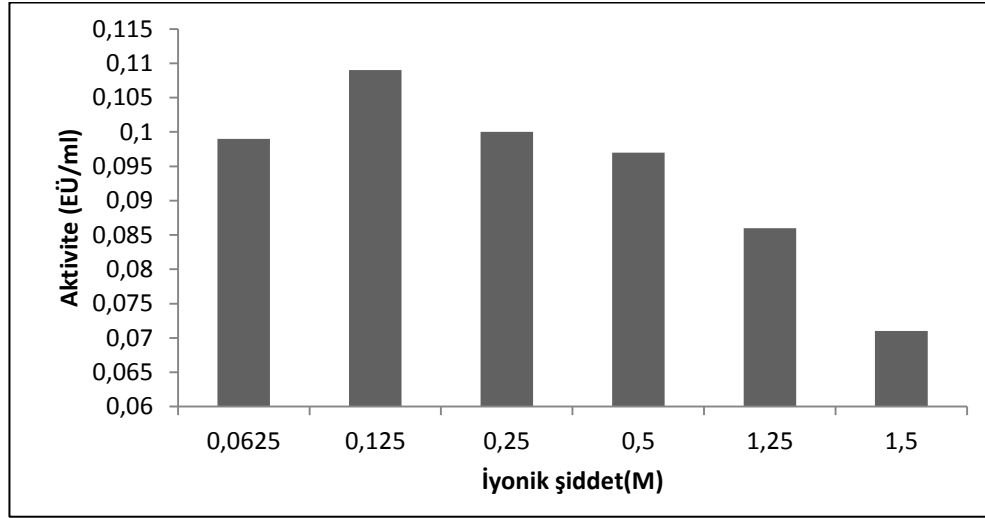
Şekil 4.5. Karayemiş meyvesi GST enziminin K-fosfat tamponu ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği

4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Karayemiş meyvesi 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 bölüm 3.3.2'de bahsedildiği gibi hazırlandı ve farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları kullanılarak enzimin gösterdiği absorban değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra her bir tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. Karayemiş meyvesi GST enziminin iyonik şiddet değeri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'de gösterildiği gibi 0,125 M olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddeti için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi ile kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

KH_2PO_4	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,0625	0,099
0,125	0,109
0,25	0,100
0,5	0,097
1,25	0,086
1,5	0,051



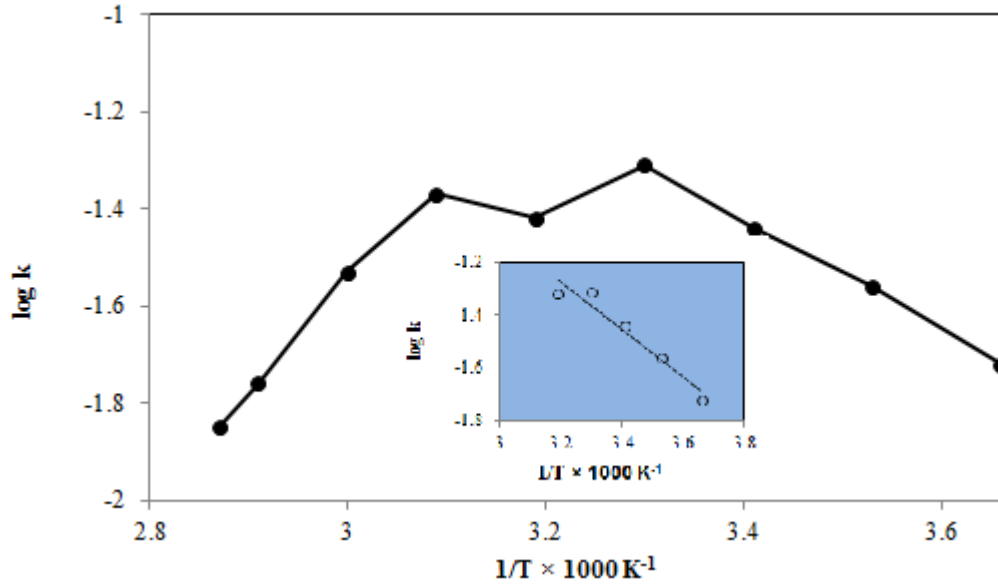
Şekil 4.6. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için yapılan aktivite-K-fosfat (M) grafiği

4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tampon çözelti kullanıldı. 0°C ile 75°C arasında bölüm 3.3.3’de belirtildiği gibi her 10°C de bir enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra enzim aktiviteleri hesaplandı. GST enziminin optimum sıcaklık değeri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7’da gösterildiği gibi 30°C olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. Karayemiş meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,019
10	0,027
20	0,036
30	0,048
40	0,038
50	0,042
60	0,029
70	0,017
75	0,014



Şekil 4.7. Karayemiş meyvesi GST enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.5. Karayemiş meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları

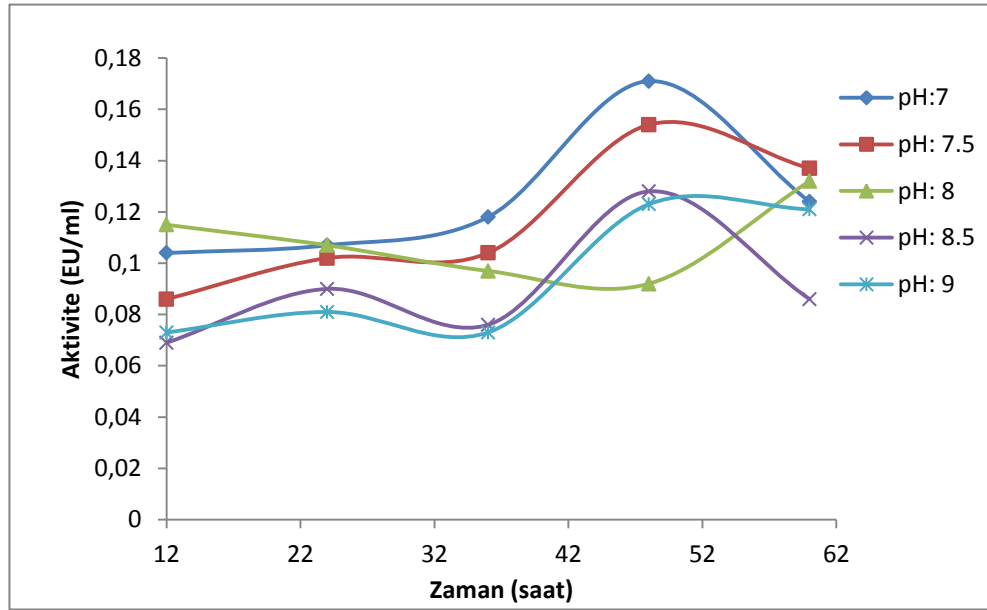
Enzim	Optimum Sıcaklık (°C)	Aktivasyon Enerjisi (E_a) (kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	Q_{10}
GST	30	4,136	3,534	1,450

4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için uygun iyonik şiddete sahip değişik pH değerlerinde tampon çözeltileri bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi hazırlandı. 1/1 oranında saf enzim ile tampon karıştırılarak 12 saatte bir aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH değeri Çizelge 4.6-4.7 ve Şekil 4.8-4,9'da gösterildiği gibi fosfat tamponu ile pH 6,5 olarak belirlendi

Çizelge 4.6. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

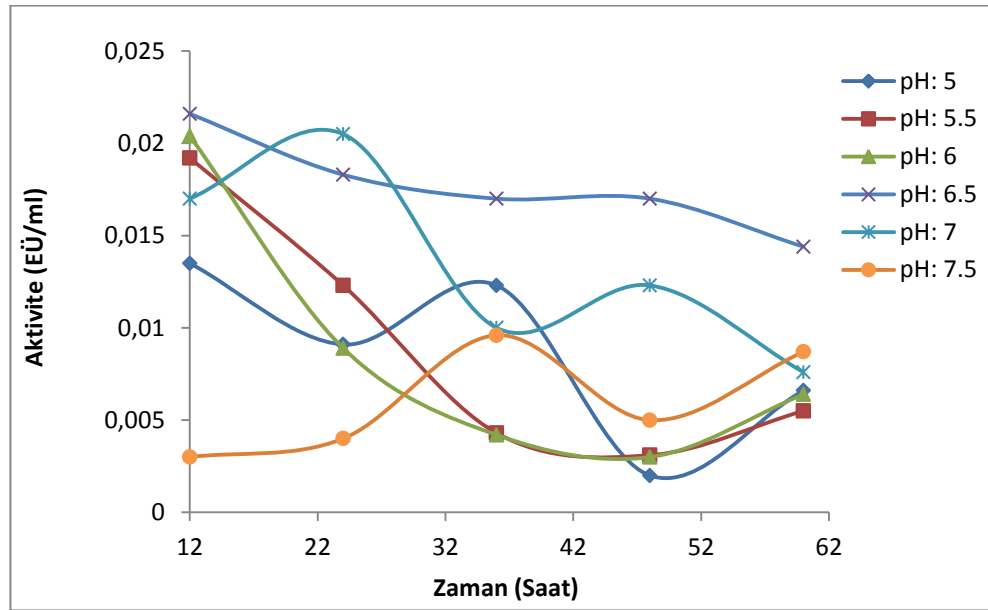
pH	7	7.5	8	8,5	9
Zaman (saat)	Aktivite (EÜ/ml)				
12	0,104	0,086	0,115	0,069	0,073
24	0,107	0,102	0,107	0,09	0,081
36	0,118	0,104	0,097	0,076	0,073
48	0,171	0,154	0,092	0,128	0,123
60	0,124	0,137	0,132	0,086	0,121



Şekil 4.8. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik

Çizelge 4.7. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için K-fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5	5,5	6	6,5	7	7,5
Zaman (saat)	Aktivite (EÜ/ml)					
12	00135	0,0192	0,0204	0,0216	0,017	0,003
24	0,0091	0,0123	0,0089	0,0183	0,0205	0,004
36	0,0123	0,0043	0,0042	0,017	0,01	0,0096
48	0,002	0,0031	0,003	0,017	0,0123	0,005
60	0,0066	0,0055	0,0064	0,0144	0,0076	0,0087



Şekil 4.9. Karayemiş meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için K-fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafi

Çizelge 4.8. Karayemiş bitkisi GST enzimi için belirlenen optimal aktivite şartları ve stabil pH değeri

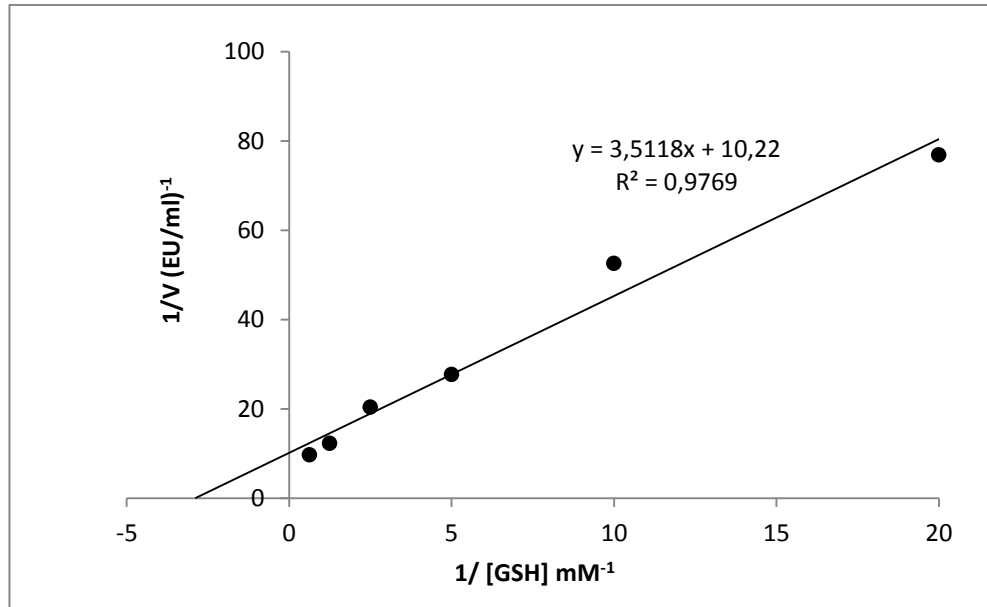
Enzim	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Optimum iyonik şiddet	Stabil pH
GST	7 (K-Fosfat tamponunda)	30°C	0,125 M	6,5

4.4.5. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_o) değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

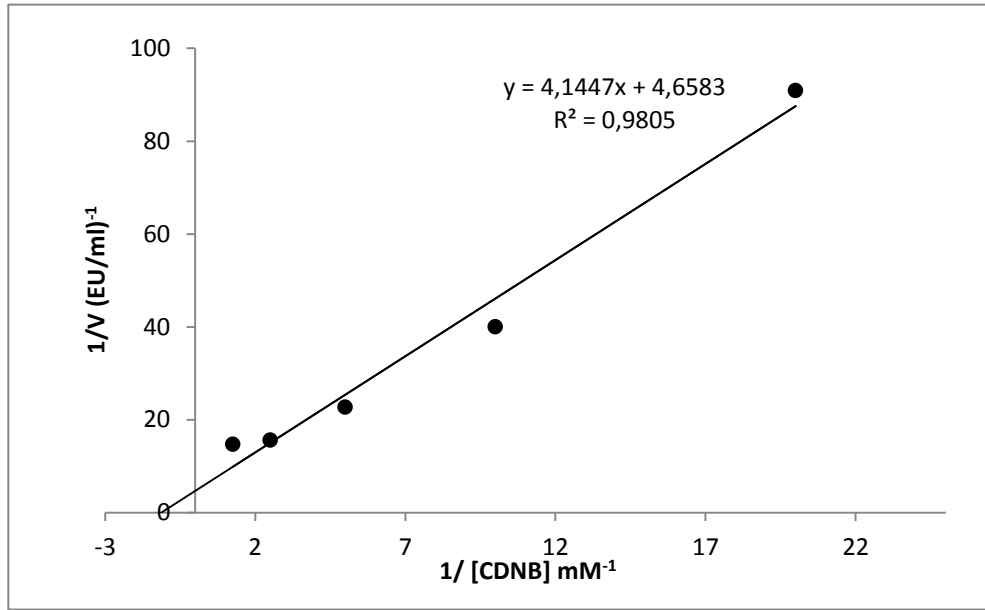
Karayemiş meyvesi GST enziminin substratı olan GSH için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi CDNB'nin 0,5 mM'lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı GSH konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Sonuçta elde edilen değerler ile $1/[GSH]-1/V$ grafiği çizilerek reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.9). Enzimin bir diğer substratı olan CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini hesaplamak için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi GSH'ın 1mM'lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonuyla aktivite

ölçümleri yapılarak $1/[CDNB]-1/V$ grafiği çizildi ve reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.9).

Daha sonra buluna K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin GSH ve CDNB substratları için turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri bölüm 3.3.5’de anlatıldığı gibi hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri V_0 tespit edildi. Bu değerler Çizelge 4.9’da gösterildi.



Şekil 4.10. Karayemiş meyvesi GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği



Şekil 4.11. Karayemiş meyvesi GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Çizelge 4.9. Karayemiş bitkisi GST enzimi için GSH ve CDNB substratları için K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat} (s) ⁻¹	V_0 (M ⁻¹ .s ⁻¹)
GST	GSH	0,344	0,098	490	1,56x10 ⁶
	CDNB	0,89	0,214	1070	1,202x10 ⁶

4.5. Karayemiş Meyvesi GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Organik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

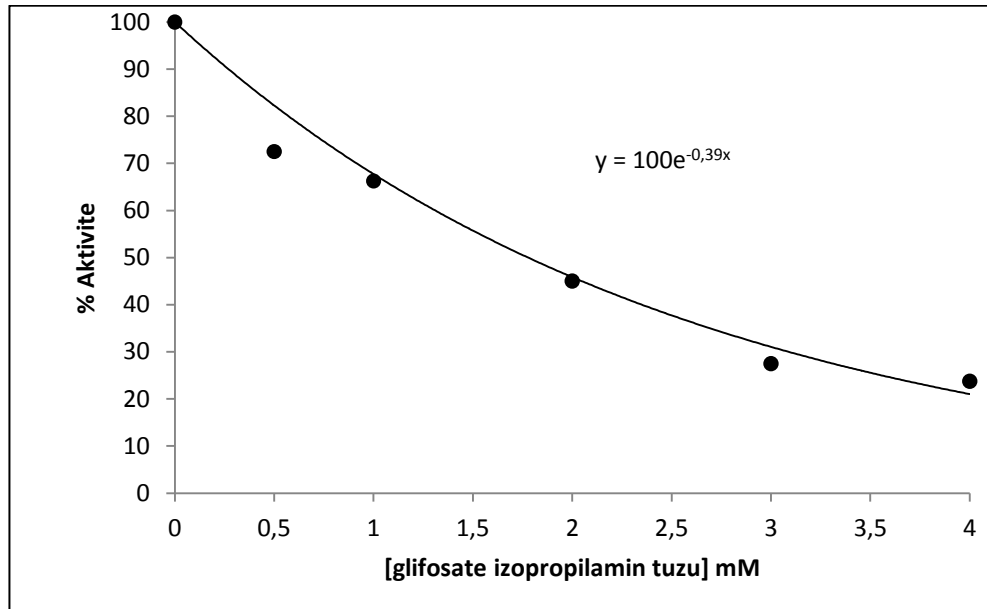
4.5.1. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Karayemiş bitkisinden afinite kromatografisiyle saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden diclorvos, cypermethrin, imidacloprid, fenoxaprop-p-ethyl, glyphosate isopropilamin tuzu pestisitleri ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu

kullanılarak IC₅₀ değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Çizelge 4.10-4.14 ve Şekil 4.12-4.16’de verildi.

Çizelge 4.10. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu’nun (N-(fosfonik asit) glisin) IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

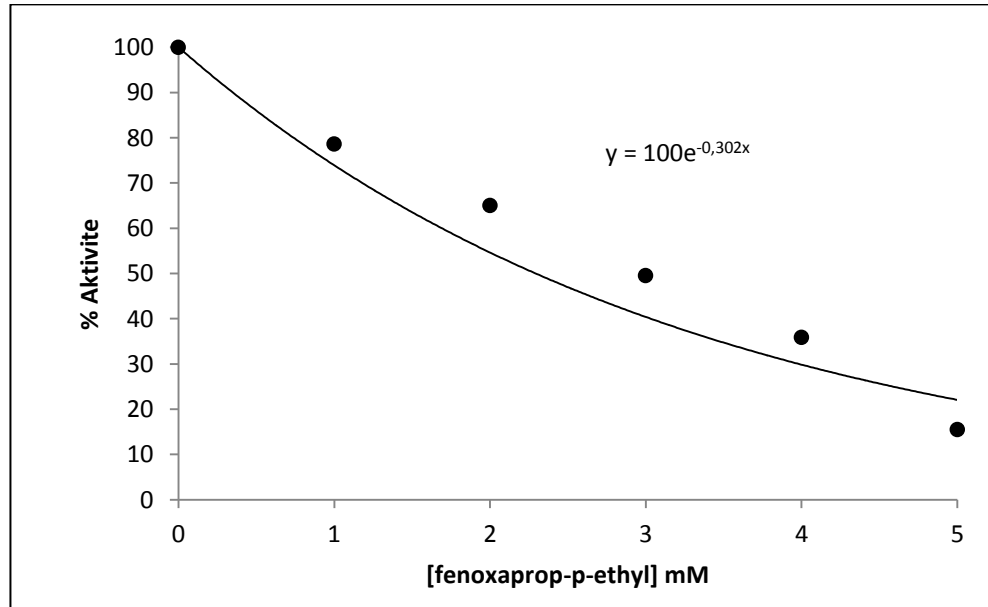
K ₂ HPO ₄ (100mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Toplam hacim (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	670	50	1000	0.5	1	0.5	72.5
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	1	66.25
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	2	45
200	20	50	10	470	300	1000	0.5	1	3	27.5
200	20	50	10	420	400	1000	0.5	1	4	23.75



Şekil 4.12. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu’nun (N-(fosfonik asit) glisin) farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Glifosat izopropilamin tuzu] grafiği

Çizelge 4.11. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Fenoxaprop- p-ethyl'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

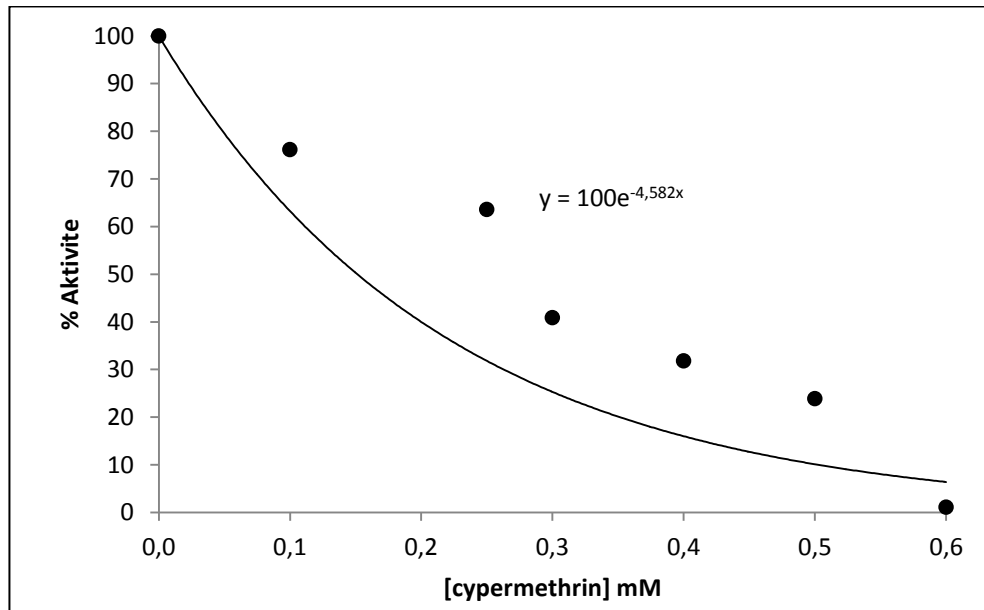
K ₂ HPO ₄ (100 mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	1	78.6
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	2	65.04
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	3	49.5
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	4	35.9
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	5	15.5



Şekil 4.13. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine fenoxaprop-p-ethyl'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [fenoxaprop-p-ethyl] grafiği

Çizelge 4.12. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cypermethrin'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

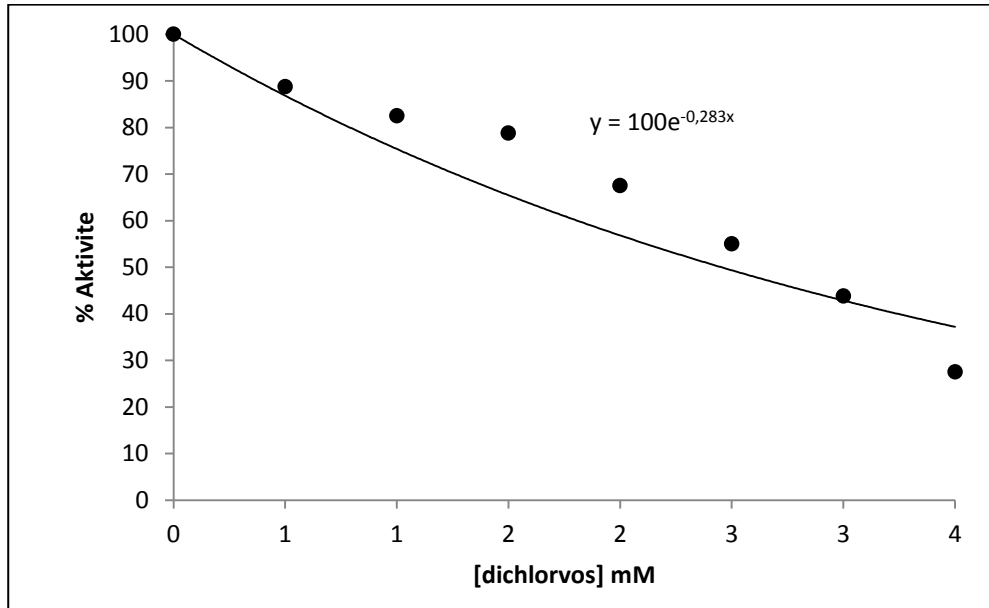
K ₂ HPO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.1	76.13
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	0.2	70.45
200	20	50	10	470	250	1000	0.5	1	0.25	63.6
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	0.3	40.9
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	0.4	31.8
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	0.5	23.86
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	0.6	1.13



Şekil 4.14. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine cypermethrin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [cypermethrin] grafiği

Çizelge 4.13. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine dichlorvos'un IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

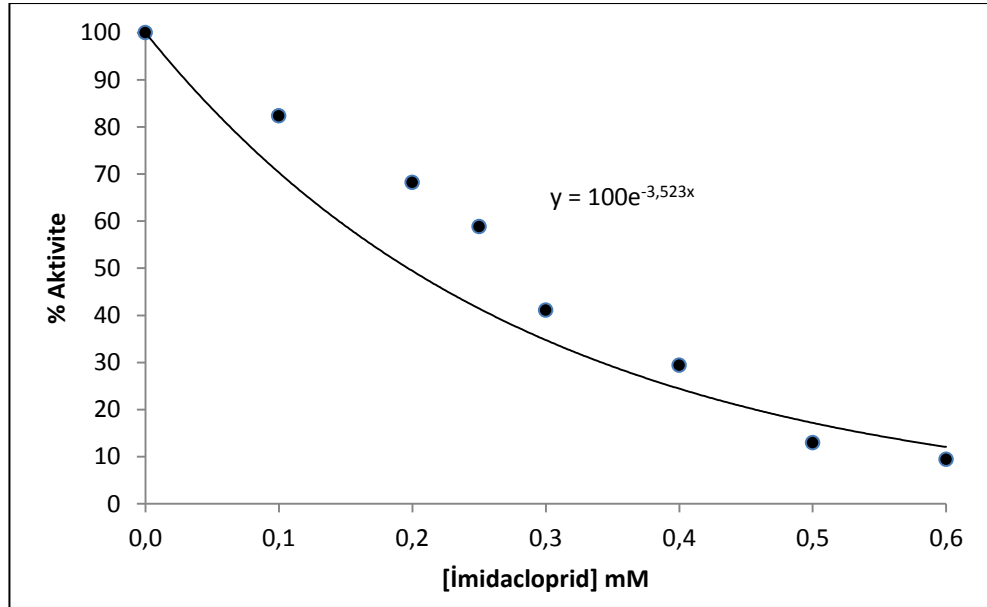
K ₂ HPO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.5	88.75
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	1	82.5
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	1.5	78.75
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	2	67.5
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	2.5	55
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	3	43.75
200	20	50	10	20	700	1000	0.5	1	3.5	27.5



Şekil 4.15. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine dichlorvos'un farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [dichlorvos] grafiği

Çizelge 4.14. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine İmidacloprid'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

K ₂ HPO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.1	82.3
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	0.2	68.2
200	20	50	10	470	250	1000	0.5	1	0.25	58.8
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	0.3	41.1
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	0.4	29.4
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	0.5	12.94
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	0.6	9.4



Şekil 4.16. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine İmidacloprid'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [İmidacloprid] grafiği

Çizelge 4.15. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin IC₅₀ değerleri

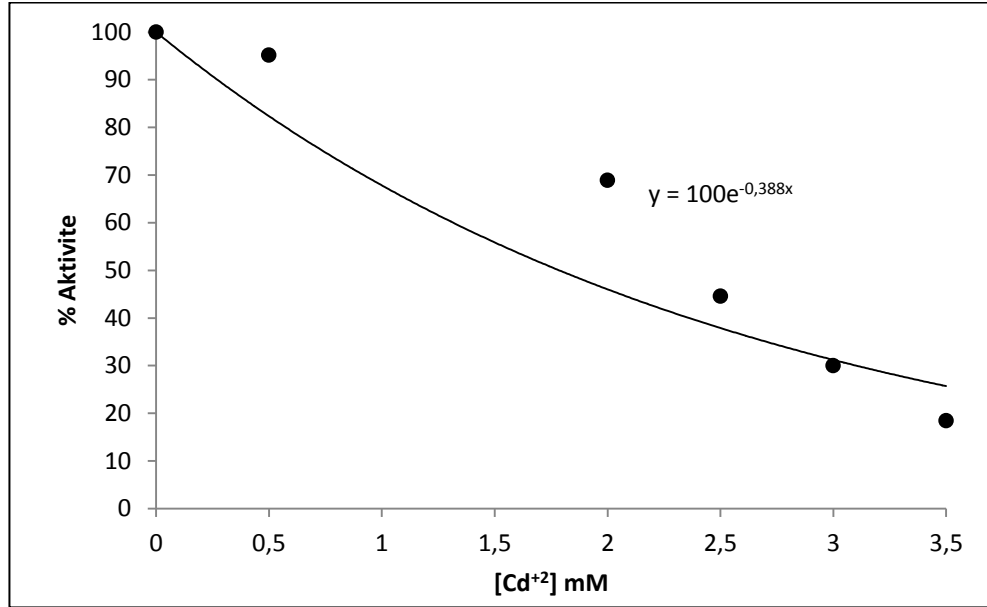
Kullanılan Pestisit	IC ₅₀ (mM)
Glifosat- izopropilamin tuzu	1,78
Fenoxaprop- p-ethylh	2,29
Cypermethrin	0,15
Dichlorvos	2,45
Imidacloprid	0.20

4.5.2. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Karayemiş bitkisinden afinite kromatografisiyle saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonların inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden Cadmiyum (Cd⁺²), Nikel (Ni⁺²), Bakır (Cu⁺²), Magnezyum (Mg⁺²), Kalsiyum (Ca⁺²) ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC₅₀ değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Çizelge 4.16-4.20 ve Şekil 4.17-4.21’de verildi.

Çizelge 4.16. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cd⁺²’un IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

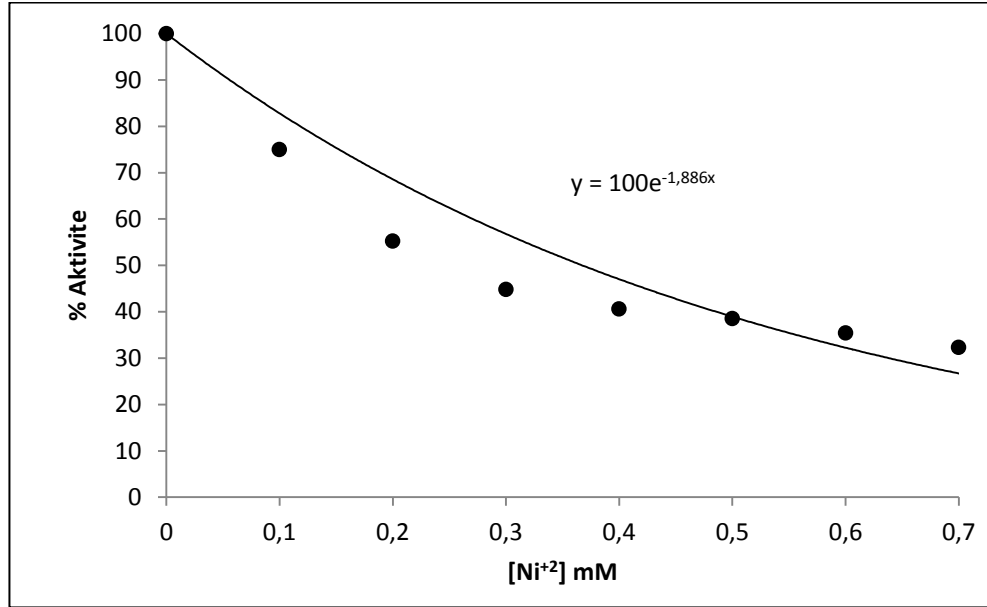
K ₂ HPO ₄ (100mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Toplam hacim (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.5	95.14
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	1	94.17
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	2	68.9
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	2.5	44.6
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	3	30
200	20	50	10	20	700	1000	0.5	1	3.5	18.4



Şekil 4.17. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Cd⁺²'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Cd⁺²] grafiği

Çizelge 4.17. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ni⁺²'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

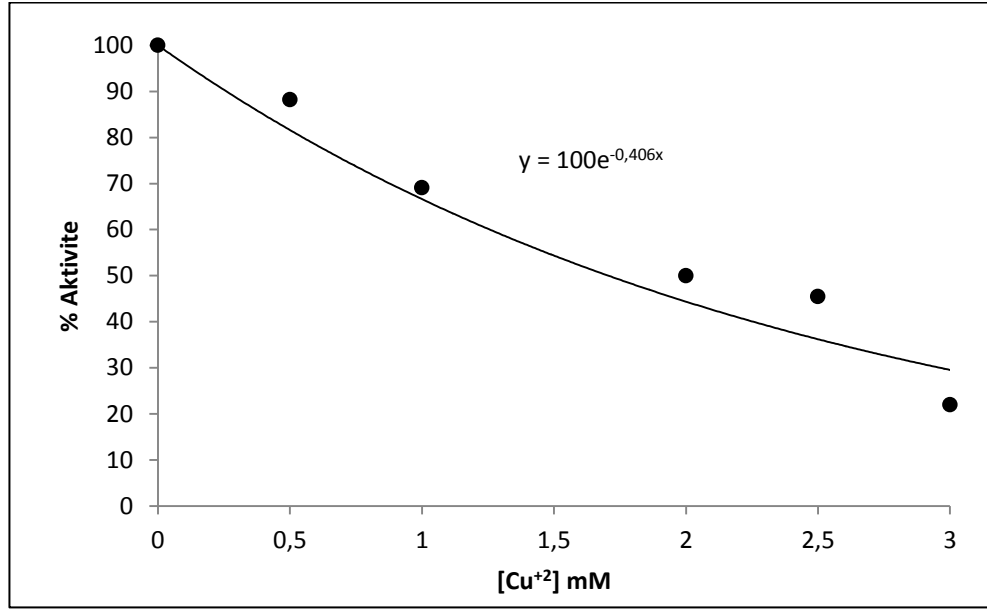
K ₂ HPO ₄ (100mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Toplam hacim (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.1	75
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	0.2	55.2
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	0.3	44.8
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	0.4	40.6
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	0.5	38.5
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	0.6	35.4
200	20	50	10	20	700	1000	0.5	1	0.7	32.3



Şekil 4.18. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Ni²⁺'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Ni²⁺] grafiği

Çizelge 4.18. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cu²⁺'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

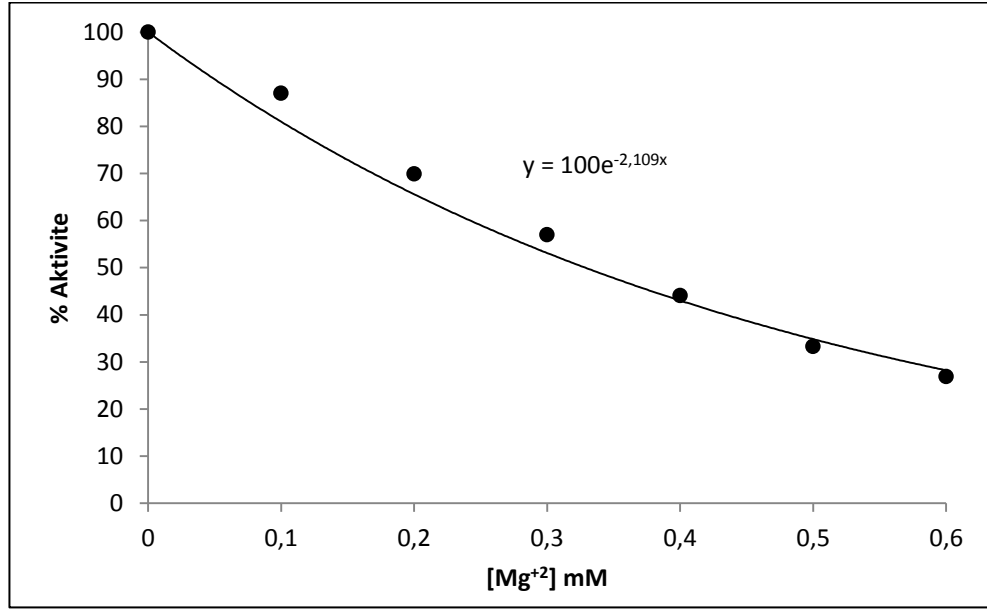
K ₂ HPO ₄ (100 mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Toplam hacim (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.5	88.2
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	1	69.1
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	1.5	64.7
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	2	50
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	2.5	45.6
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	3	22.06



Şekil 4.19. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.19. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Mg^{+2} 'un IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

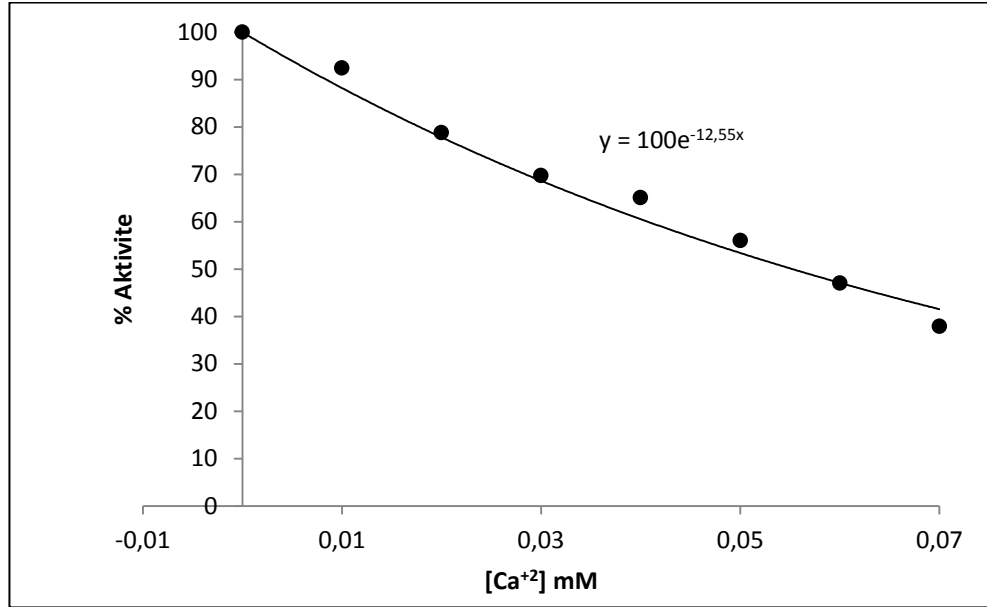
K_2HPO_4 (100 mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	0.1	87.1
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	0.2	693.9
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	0.3	57
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	0.4	44.1
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	0.5	33.3
200	20	50	10	120	600	1000	0.5	1	0.6	26.9



Şekil 4.20. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Mg^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.20. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ca^{+2} 'un IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonlar

K_2HPO_4 (100 mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Toplam hacim (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	710	10	1000	0.5	1	0.01	92.4
200	20	50	10	700	20	1000	0.5	1	0.02	78.8
200	20	50	10	690	30	1000	0.5	1	0.03	69.7
200	20	50	10	680	40	1000	0.5	1	0.04	65.1
200	20	50	10	670	50	1000	0.5	1	0.05	56
200	20	50	10	660	60	1000	0.5	1	0.06	47
200	20	50	10	650	70	1000	0.5	1	0.07	37.9



Şekil 4.21. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Ca}^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.21. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların IC_{50} değerleri

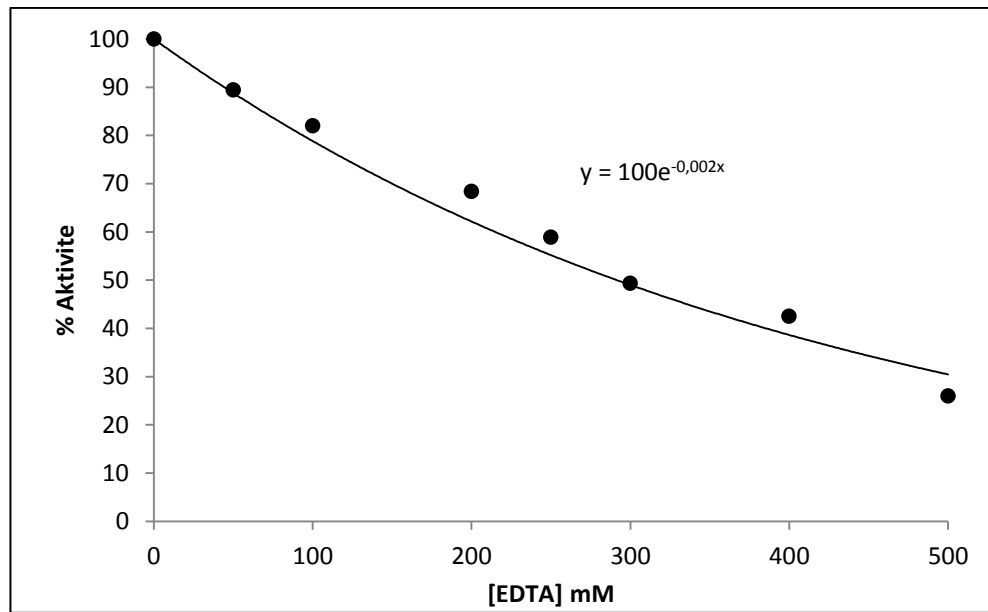
Kullanılan Metal İyonu	IC_{50} (mM)
Cd^{+2}	1,79
Ni^{+2}	0,37
Cu^{+2}	1,71
Mg^{+2}	0,33
Ca^{+2}	0,05

4.5.3. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren organik bileşikler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Karayemiş bitkisinden afinite kromatografisiyle saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden EDTA, Askorbik Asit ve Benzoik Asit ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC_{50} değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Çizelge 4.22-4.25 ve Şekil 4.22-4.25'de verildi.

Çizelge 4.22. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine EDTA'nın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

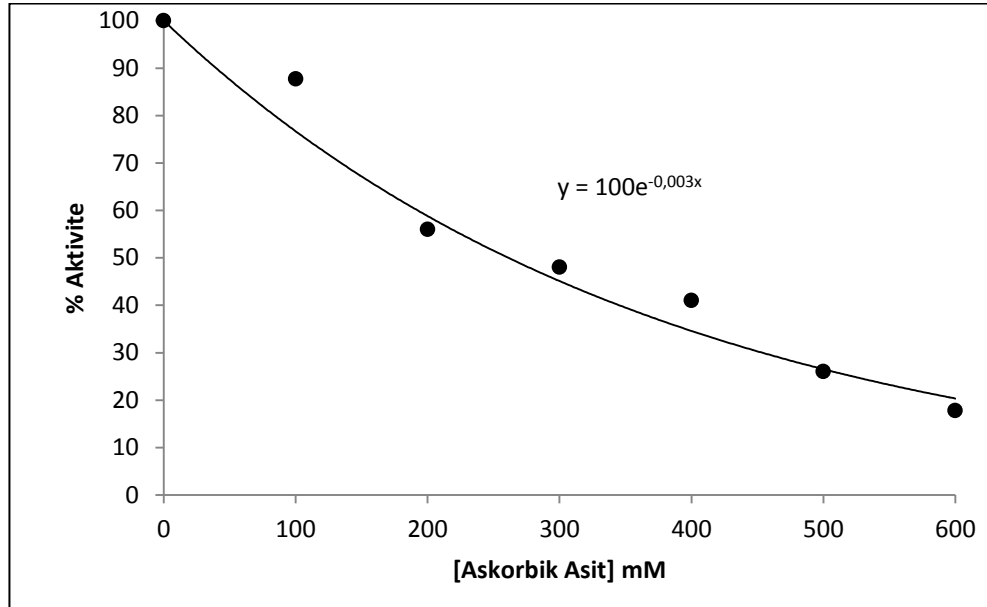
K ₂ HPO ₄ (100 mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	1000	0.5	1	-	100
200	20	50	10	670	50	1000	0.5	1	50	89.04
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	100	82
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	200	68.4
200	20	50	10	470	250	1000	0.5	1	250	58.9
200	20	50	10	420	300	1000	0.5	1	300	49.3
200	20	50	10	320	400	1000	0.5	1	400	42.5
200	20	50	10	220	500	1000	0.5	1	500	26



Şekil 4.22. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine EDTA'nın farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [EDTA] grafiği

Çizelge 4.23. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Askorbik Asit'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

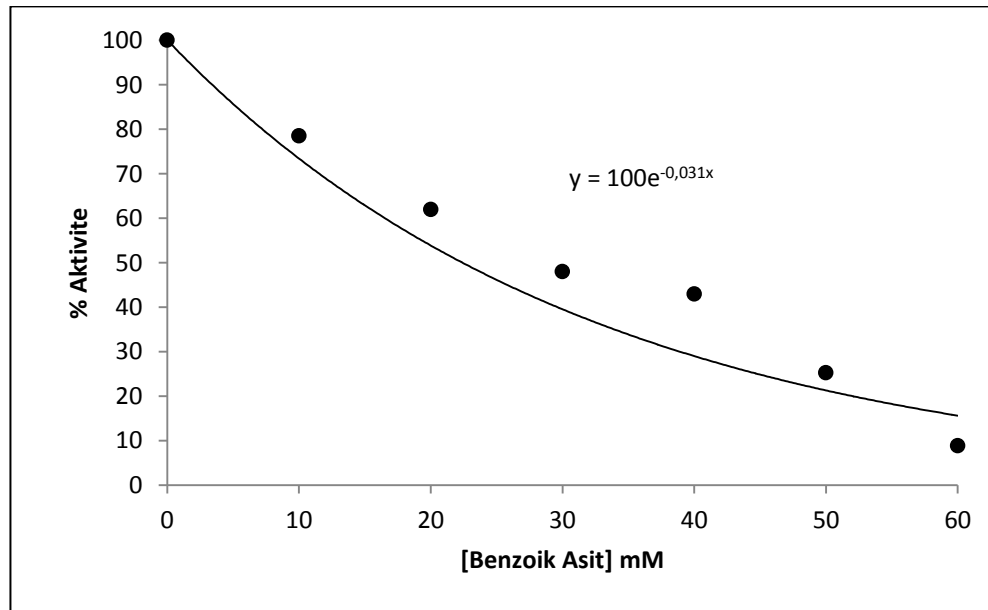
K ₂ HPO ₄ (100 mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	670	100	1000	0.5	1	100	87.7
200	20	50	10	620	200	1000	0.5	1	200	56
200	20	50	10	520	300	1000	0.5	1	300	48
200	20	50	10	470	400	1000	0.5	1	400	41
200	20	50	10	420	500	1000	0.5	1	500	26
200	20	50	10	320	600	1000	0.5	1	600	17.8



Şekil 4.23. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Askorbik Asit'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Askorbik Asit] grafiği

Çizelge 4.24. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Benzoik Asit'in IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

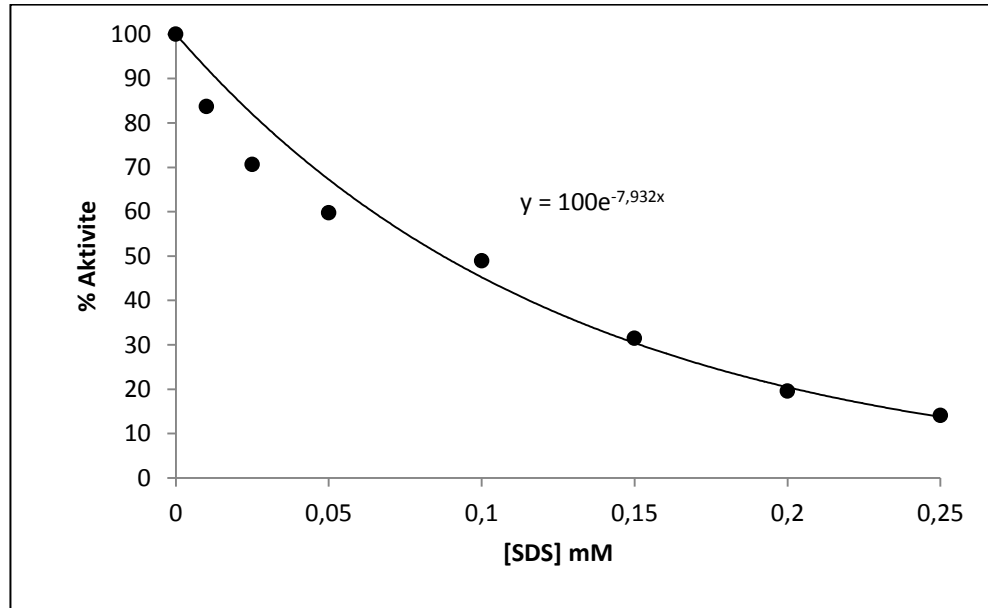
K ₂ HPO ₄ (100 mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	670	100	1000	0.5	1	10	78.5
200	20	50	10	620	200	1000	0.5	1	20	62
200	20	50	10	520	300	1000	0.5	1	30	48
200	20	50	10	470	400	1000	0.5	1	40	43
200	20	50	10	420	500	1000	0.5	1	50	25.3
200	20	50	10	320	600	1000	0.5	1	60	8.9



Şekil 4.24. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine Benzoik Asit'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Benzoik Asit] grafiği

Çizelge 4.25. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine SDS'nin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

K ₂ HPO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	% Aktivite
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)					CDNB	GSH		
200	20	50	10	695	25	1000	0.5	1	10	83,69
200	20	50	10	670	50	1000	0.5	1	20	70,65
200	20	50	10	620	100	1000	0.5	1	30	59,78
200	20	50	10	570	150	1000	0.5	1	40	48,91
200	20	50	10	520	200	1000	0.5	1	50	31,52
200	20	50	10	470	250	1000	0.5	1	60	19,56



Şekil 4.25. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine SDS'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [SDS] grafiği

Çizelge 4.26. Karayemiş meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Kullanılan Pestisit	IC ₅₀ (mM)
EDTA	346,5
Askorbik Asit	231
Benzoik Asit	22,35
SDS	0,087

4.5.4. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

İnhibitör çalışmasında karayemiş bitkisi GST enzimi üzerinde diclorvos, cypermethrin, imidacloprid, fenoxaprop-p-ethyl, glifosat izopropilamin tuzu pestisitleri kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan pestisit için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları Çizelge 4.27-4.32’de verildi. Daha sonra Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edilerek Şekil 4.26-4.30’da verildi (Lineweaver and Burk 1934).

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için inhibitör olarak kullanılan tüm maddeler için inhibisyon tipleri (yarışmalı inhibitör, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Yarışmasız için:

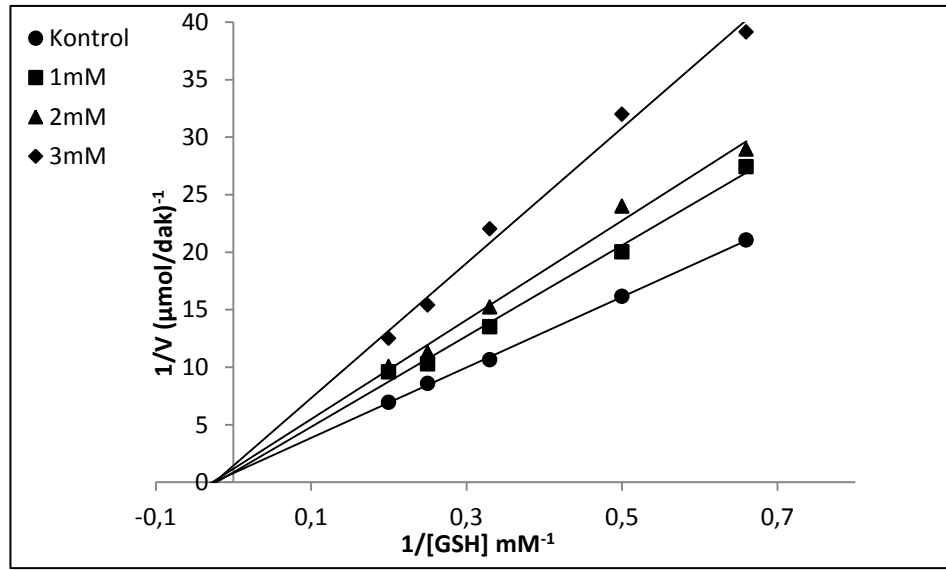
$$V_{\max}I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Yarışmalı için:

$$K_M I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Çizelge 4.27. Karayemiş GST enzimi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

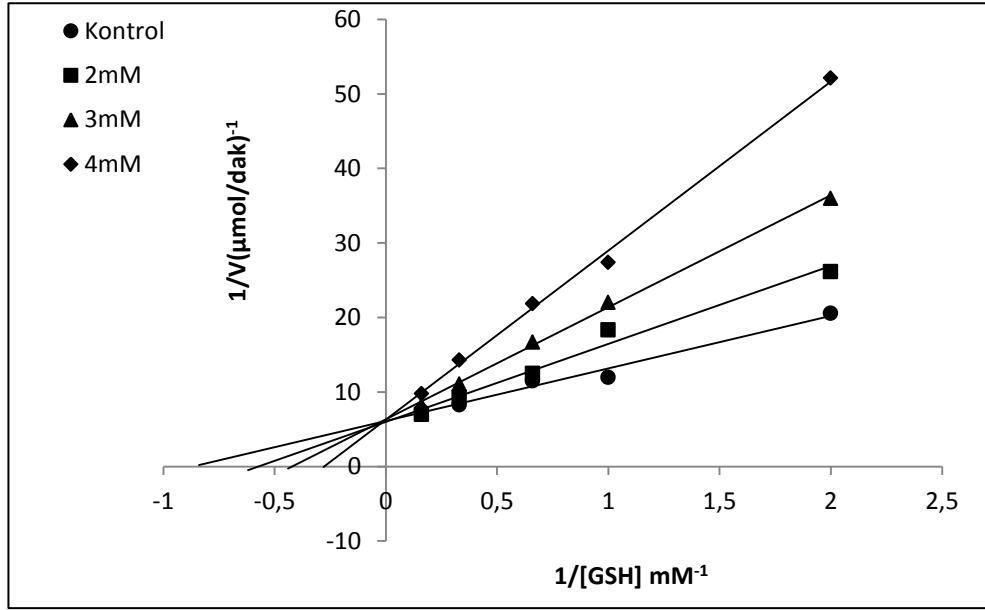
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	25	10	745	-	0.5	0.5	-	1000
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	25	10	645	100	0.5	0.5	1	1000
200	20	50	10	620	100	0.5	1	1	1000
200	20	100	10	570	100	0.5	2	1	1000
200	20	150	10	520	100	0.5	3	1	1000
200	20	200	10	470	100	0.5	4	1	1000
200	20	25	10	545	200	0.5	0.5	2	1000
200	20	50	10	520	200	0.5	1	2	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	2	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	2	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	2	1000
200	20	25	10	445	300	0.5	0.5	3	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	3	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	3	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	3	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	3	1000



Şeil 4.26. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosat- izopropilamin tuzu'nun (N-(fosfonik asit) glisin) etkisi

Çizelge 4.28. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Fenoxaprop- p-ethylh'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

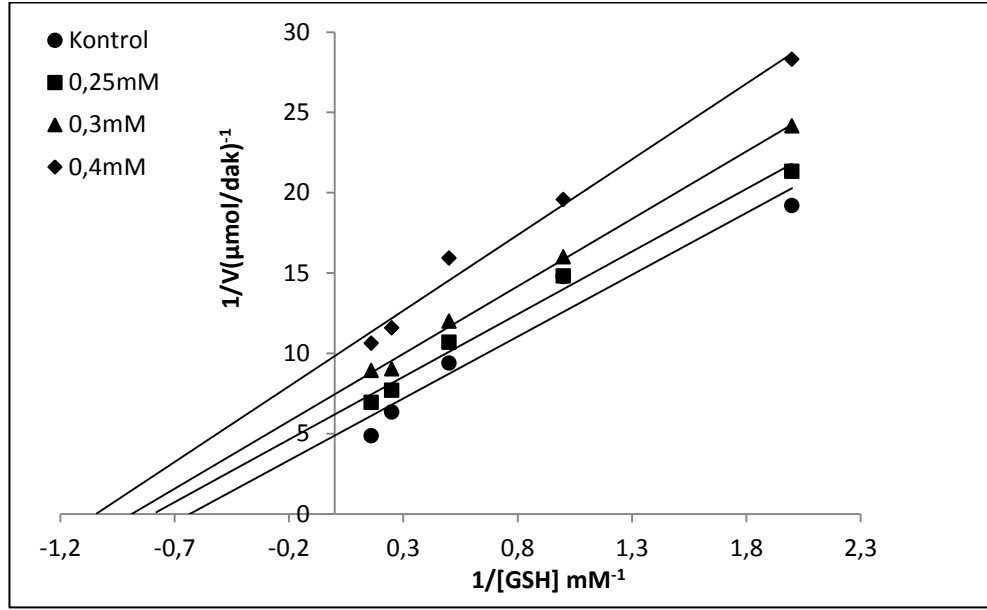
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	25	10	745	-	0.5	0.5	-	1000
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	75	10	695	-	0.5	1.5	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	25	10	545	200	0.5	0.5	2	1000
200	20	50	10	520	200	0.5	1	2	1000
200	20	75	10	495	200	0.5	1.5	2	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	2	1000
200	20	300	10	270	200	0.5	6	2	1000
200	20	25	10	445	300	0.5	0.5	3	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	3	1000
200	20	75	10	395	300	0.5	1.5	3	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	3	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	3	1000
200	20	25	10	345	400	0.5	0.5	4	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	4	1000
200	20	75	10	295	400	0.5	1.5	4	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	4	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	4	1000



Şekil 4.27. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Fenoxaprop- p-ethylh'in etkisi

Çizelge 4.29. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cypermethrin'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

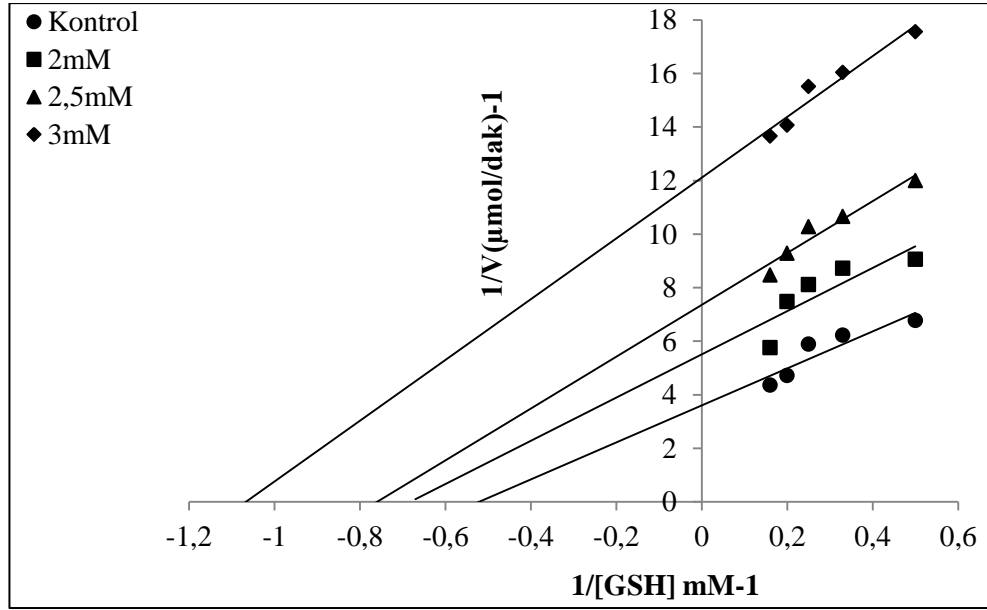
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	25	10	745	-	0.5	0.5	-	1000
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	25	10	495	250	0.5	0.5	0.25	1000
200	20	50	10	470	250	0.5	1	0.25	1000
200	20	100	10	420	250	0.5	2	0.25	1000
200	20	200	10	320	250	0.5	4	0.25	1000
200	20	300	10	220	250	0.5	6	0.25	1000
200	20	25	10	445	300	0.5	0.5	0.3	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	0.3	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	0.3	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	0.3	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	0.3	1000
200	20	25	10	345	400	0.5	0.5	0.4	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	0.4	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	0.4	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	0.4	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	0.4	1000



Şekil 4.28. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cypermethrin'in etkisi

Çizelge 4.30. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine dichlorvos'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

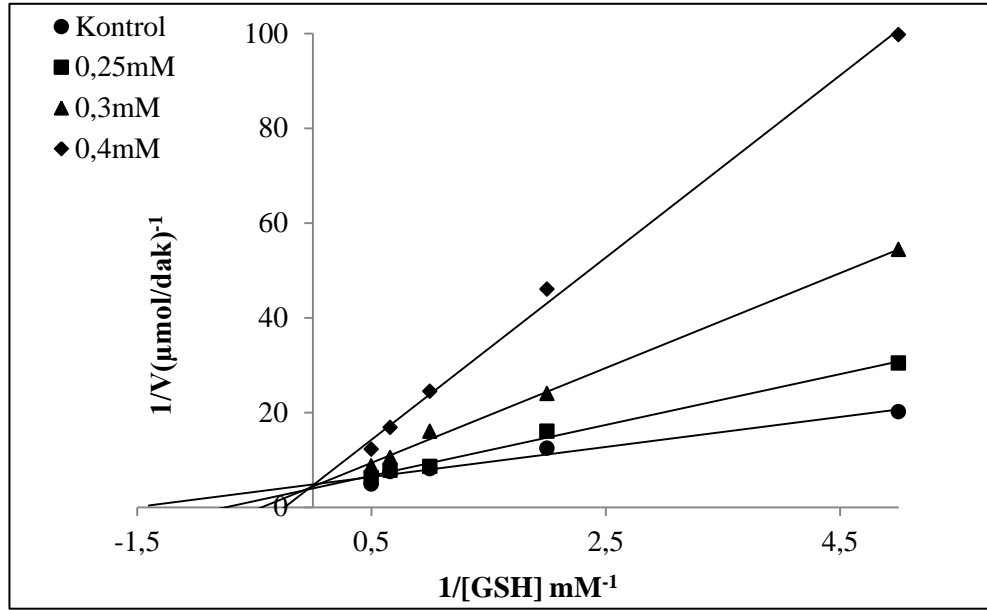
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	2	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	2	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	2	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	2	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	2	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	2.5	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	2.5	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	2.5	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	2.5	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	2.5	1000
200	20	100	10	220	450	0.5	2	3	1000
200	20	150	10	170	450	0.5	3	3	1000
200	20	200	10	120	450	0.5	4	3	1000
200	20	250	10	70	450	0.5	5	3	1000
200	20	300	10	20	450	0.5	6	3	1000



Şekil 4.29. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Dichlorvos'un etkisi

Çizelge 4.31. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Imidacloprid'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	10	10	760	-	0.5	0.2	-	1000
200	20	25	10	745	-	0.5	0.5	-	1000
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	75	10	695	-	0.5	1.5	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	10	10	510	250	0.5	0.2	0.25	1000
200	20	25	10	495	250	0.5	0.5	0.25	1000
200	20	50	10	470	250	0.5	1	0.25	1000
200	20	75	10	445	250	0.5	1.5	0.25	1000
200	20	100	10	420	250	0.5	2	0.25	1000
200	20	10	10	460	300	0.5	0.2	0.3	1000
200	20	25	10	445	300	0.5	0.5	0.3	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	0.3	1000
200	20	75	10	395	300	0.5	1.5	0.3	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	0.3	1000
200	20	10	10	360	400	0.5	0.2	0.4	1000
200	20	25	10	345	400	0.5	0.5	0.4	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	0.4	1000
200	20	75	10	295	400	0.5	1.5	0.4	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	0.4	1000



Şekil 4.30. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine İmidacloprid'in etkisi

Çizelge 4.32. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan pestisitler

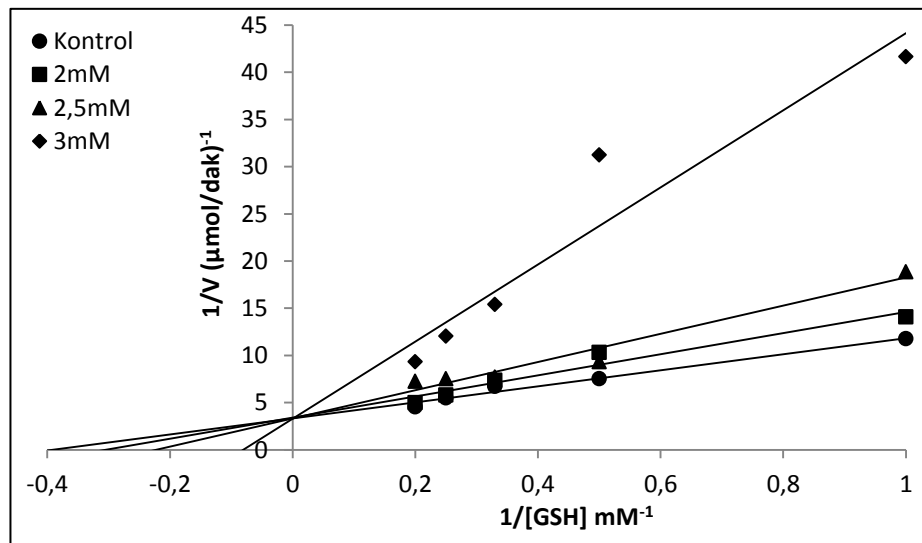
İnhibitör Cinsi	[I] mM	K _i (mM)	Ortalama K _i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
Glifosat-izopropilamin tuzu	1	10,63	6,073±3,957	Yarışmasız
	2	4,09		
	3	3,5		
Fenoxaprop-p-ethyl	1	3,80	2,8±1	Yarışmalı
	2	2,80		
	3	1,80		
Cypermethrin	0,25	0,94	0,63±0,282	Yarı Yarışmalı
	0,30	0,56		
	0,40	0,39		
Dichlorvos	2,0	4,14	2,66±1,419	Yarı Yarışmalı
	2,5	2,54		
	3,0	1,31		
İmidacloprid	0,25	0,232	0,097±0,032	Yarışmalı
	0,30	0,12		
	0,40	0,074		

4.5.5. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

İnhibitör çalışmasında karayemiş bitkisi GST enzimi üzerinde Cadmiyum (Cd^{+2}), Nikel (Ni^{+2}), Bakır (Cu^{+2}), Magnezyum (Mg^{+2}), Kalsiyum (Ca^{+2}) metalleri kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan metal iyonları için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen metal iyonu konsantrasyonları Çizelge 4.33-4.38'de verildi. Daha sonra Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edilerek Şekil 4.31-4.35'de verildi (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.33. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cd^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

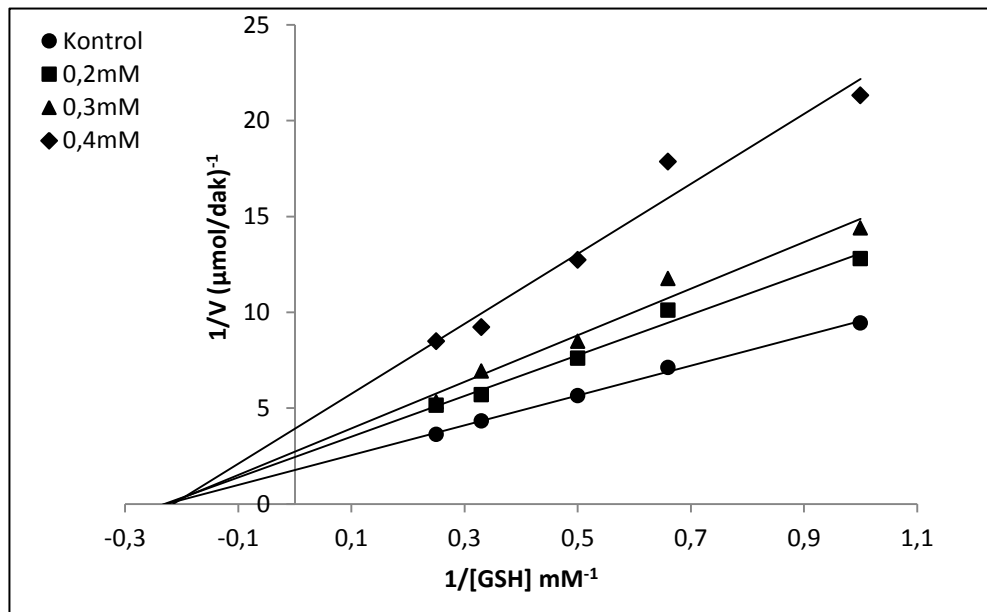
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	2	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	2	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	2	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	2	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	2	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	2.5	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	2.5	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	2.5	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	2.5	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	2.5	1000
200	20	50	10	220	500	0.5	1	3	1000
200	20	100	10	170	500	0.5	2	3	1000
200	20	150	10	120	500	0.5	3	3	1000
200	20	200	10	70	500	0.5	4	3	1000
200	20	250	10	20	500	0.5	5	3	1000



Şekil 4.31. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cd^{+2} 'un etkisi

Çizelge 4.34. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ni^{+2} 'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

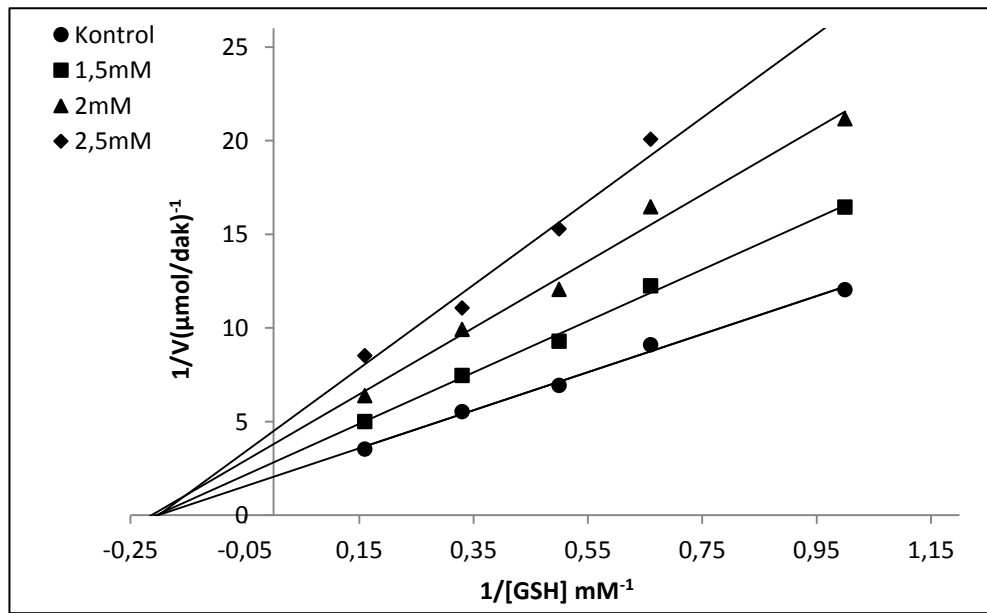
KH_2PO_4 (100mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	75	10	695	-	0.5	1.5	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	50	10	520	200	0.5	1	0.2	1000
200	20	75	10	495	200	0.5	1.5	0.2	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	0.2	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	0.2	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	0.2	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	0.3	1000
200	20	75	10	395	300	0.5	1.5	0.3	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	0.3	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	0.3	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	0.3	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	0.4	1000
200	20	75	10	295	400	0.5	1.5	0.4	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	0.4	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	0.4	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	0.4	1000



Şekil 4.32. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Ni^{+2} 'nin etkisi

Çizelge 4.35. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Cu^{+2} 'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

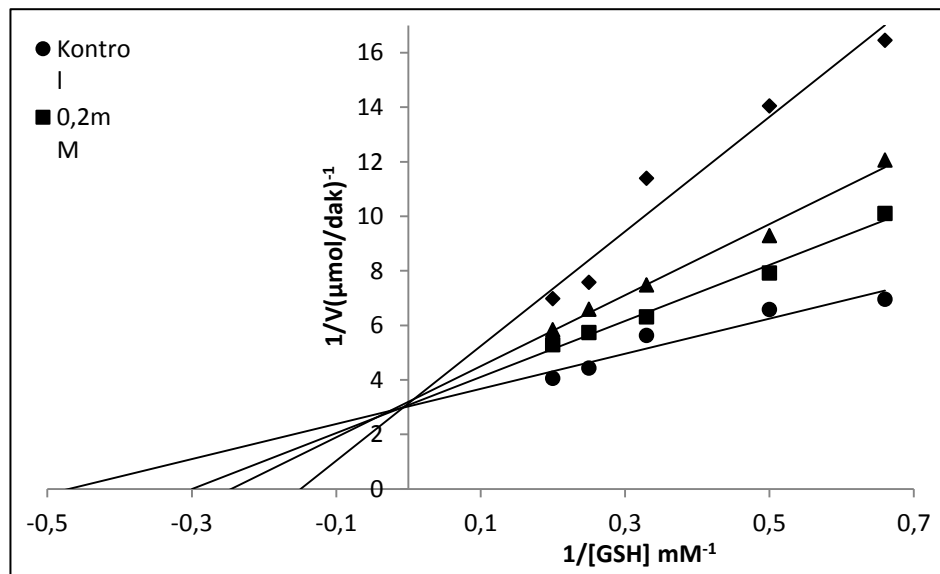
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	75	10	695	-	0.5	1.5	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	50	10	520	200	0.5	1	1.5	1000
200	20	75	10	495	200	0.5	1.5	1.5	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	1.5	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	1.5	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	1.5	1000
200	20	50	10	420	300	0.5	1	2	1000
200	20	75	10	395	300	0.5	1.5	2	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	2	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	2	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	2	1000
200	20	50	10	320	400	0.5	1	2.5	1000
200	20	75	10	295	400	0.5	1.5	2.5	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	2.5	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	2.5	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	2.5	1000



Şekil 4.33. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Cu^{+2} 'in etkisi

Çizelge 4.36. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Mg^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

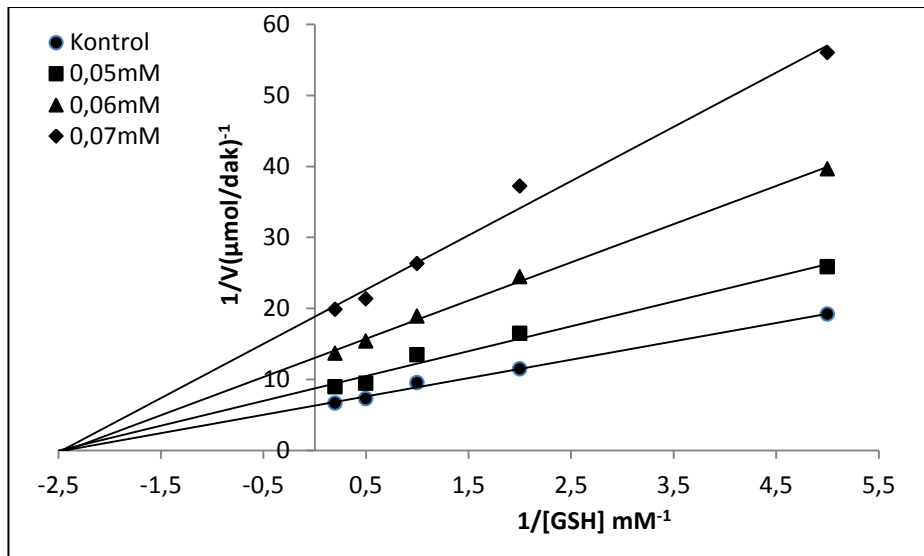
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	75	10	495	200	0.5	1.5	0.2	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	0.2	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	0.2	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	0.2	1000
200	20	250	10	320	200	0.5	5	0.2	1000
200	20	75	10	395	300	0.5	1.5	0.3	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	0.3	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	0.3	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	0.3	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	0.3	1000
200	20	75	10	295	400	0.5	1.5	0.4	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	0.4	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	0.4	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	0.4	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	0.4	1000



Şekil 4.34. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'un etkisi

Çizelge 4.37. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Ca^{+2} 'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	25	10	745	-	0.5	0.5	-	1000
200	20	50	10	720	-	0.5	1	-	1000
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	10	10	710	50	0.5	0.2	0.05	1000
200	20	25	10	695	50	0.5	0.5	0.05	1000
200	20	50	10	670	50	0.5	1	0.05	1000
200	20	100	10	620	50	0.5	2	0.05	1000
200	20	250	10	470	50	0.5	5	0.05	1000
200	20	10	10	700	60	0.5	0.2	0.06	1000
200	20	25	10	685	60	0.5	0.5	0.06	1000
200	20	50	10	660	60	0.5	1	0.06	1000
200	20	100	10	610	60	0.5	2	0.06	1000
200	20	250	10	460	60	0.5	5	0.06	1000
200	20	10	10	690	70	0.5	0.2	0.07	1000
200	20	25	10	675	70	0.5	0.5	0.07	1000
200	20	50	10	650	70	0.5	1	0.07	1000
200	20	100	10	600	70	0.5	2	0.07	1000
200	20	250	10	450	70	0.5	5	0.07	1000



Şekil 4.35. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi

Çizelge 4.38. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan metal iyonları

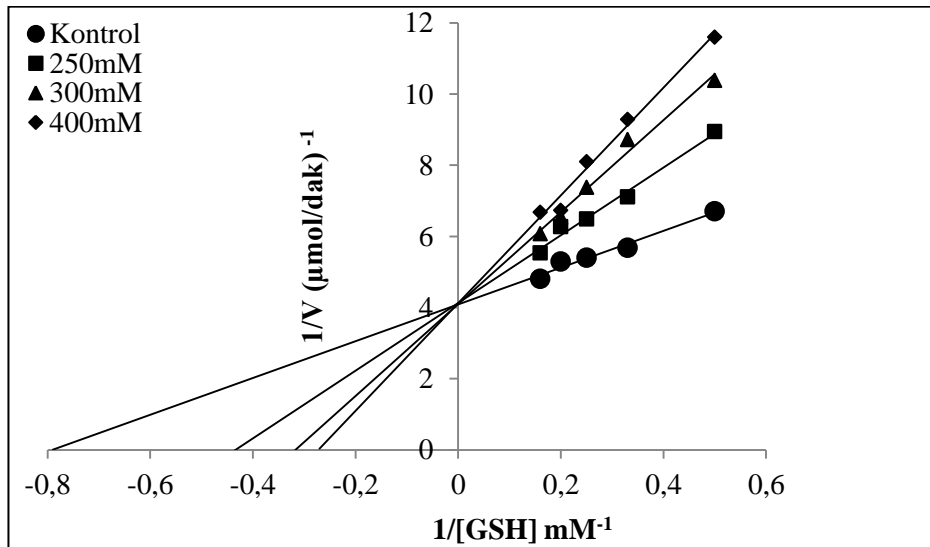
İnhibitör Cinsi	[I] mM	K _i (mM)	Ortalama K _i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
Cd ⁺²	2	6,65	3,55±2,953	Yarışmalı
	2,5	3,23		
	3	0,77		
Ni ⁺²	0,2	0,55	0,47±0,13	Yarışmasız
	0,3	0,54		
	0,4	0,32		
Cu ⁺²	1,5	3,75	2,626±0,992	Yarışmasız
	2,0	2,26		
	2,5	1,87		
Mg ⁺²	0,2	0,355	0,286±0,087	Yarışmalı
	0,3	0,315		
	0,4	0,188		
Ca ⁺²	0,05	0,11	0,06±0,04	Yarışmasız
	0,06	0,06		
	0,07	0,03		

4.5.6. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren organik bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

İnhibitör çalışmasında karayemiş bitkisi GST enzimi üzerinde EDTA, Askorbik Asit, Sodyumdodesil sülfat (SDS) ve Benzoik Asit kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal bileşikler için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen kimyasal bileşik konsantrasyonları Çizelge 4.39-4.43’de verildi. Daha sonra Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edilerek Şekil 4.36-4.39’da verildi (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.39. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine EDTA'nın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

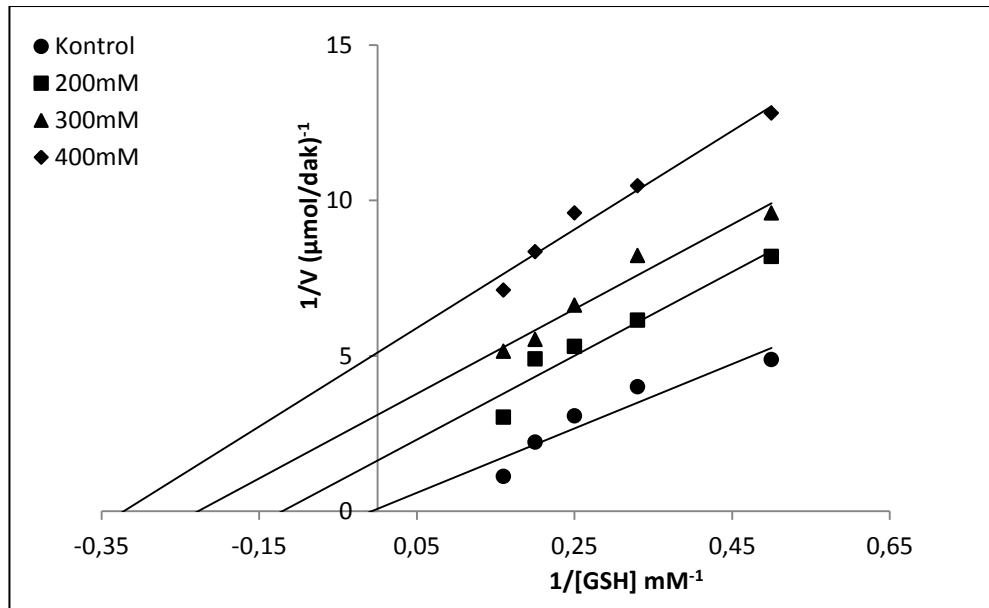
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	100	10	420	250	0.5	2	250	1000
200	20	150	10	370	250	0.5	3	250	1000
200	20	200	10	320	250	0.5	4	250	1000
200	20	250	10	270	250	0.5	5	250	1000
200	20	300	10	220	250	0.5	6	250	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	300	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	300	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	300	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	300	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	300	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	400	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	400	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	400	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	400	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	400	1000



Şekil 4.36. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

Çizelge 4.40. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Askorbik Asit'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

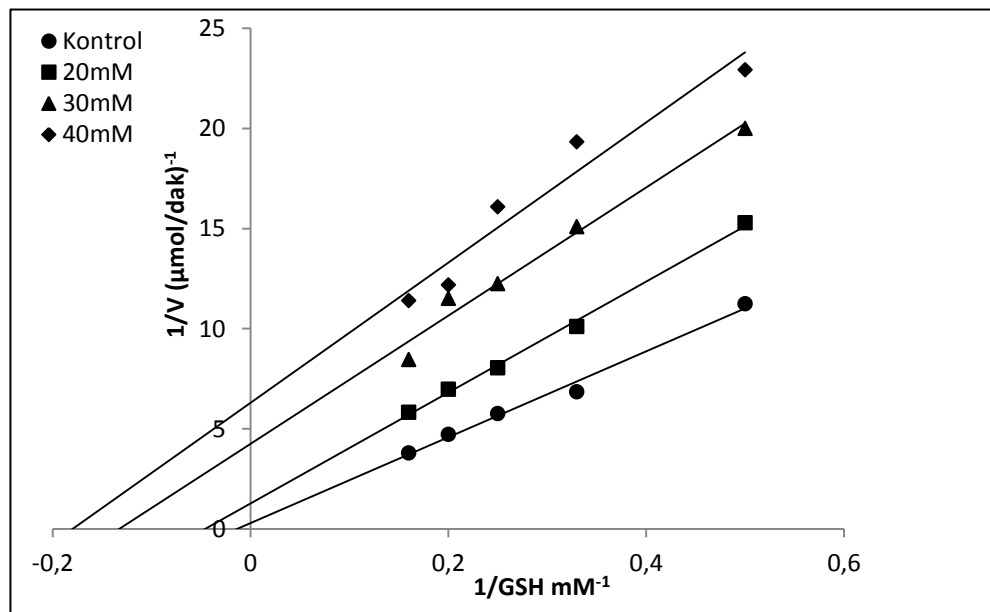
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	200	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	200	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	200	1000
200	20	250	10	320	200	0.5	5	200	1000
200	20	300	10	270	200	0.5	6	200	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	300	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	300	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	300	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	300	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	300	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	400	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	400	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	400	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	400	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	400	1000



Şekil 4.37. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Askorbik Asit'in etkisi

Çizelge 4.41. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine Benzoik Asit'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

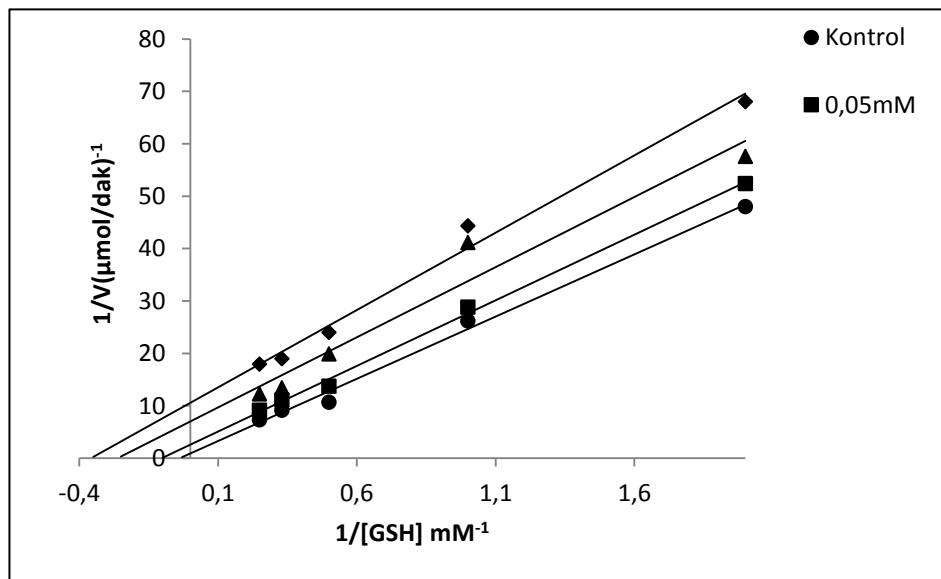
KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	100	10	470	200	0.5	2	20	1000
200	20	150	10	420	200	0.5	3	20	1000
200	20	200	10	370	200	0.5	4	20	1000
200	20	250	10	320	200	0.5	5	20	1000
200	20	300	10	270	200	0.5	6	20	1000
200	20	100	10	370	300	0.5	2	30	1000
200	20	150	10	320	300	0.5	3	30	1000
200	20	200	10	270	300	0.5	4	30	1000
200	20	250	10	220	300	0.5	5	30	1000
200	20	300	10	170	300	0.5	6	30	1000
200	20	100	10	270	400	0.5	2	40	1000
200	20	150	10	220	400	0.5	3	40	1000
200	20	200	10	170	400	0.5	4	40	1000
200	20	250	10	120	400	0.5	5	40	1000
200	20	300	10	70	400	0.5	6	40	1000



Şekil 4.38. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine Benzoik Asit'in etkisi

Çizelge 4.42. Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine SDS'nin K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (100mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	100	10	670	-	0.5	2	-	1000
200	20	150	10	620	-	0.5	3	-	1000
200	20	200	10	570	-	0.5	4	-	1000
200	20	250	10	520	-	0.5	5	-	1000
200	20	300	10	470	-	0.5	6	-	1000
200	20	100	10	470	50	0.5	2	0,05	1000
200	20	150	10	420	50	0.5	3	0,05	1000
200	20	200	10	370	50	0.5	4	0,05	1000
200	20	250	10	320	50	0.5	5	0,05	1000
200	20	300	10	270	50	0.5	6	0,05	1000
200	20	100	10	370	100	0.5	2	0,1	1000
200	20	150	10	320	100	0.5	3	0,1	1000
200	20	200	10	270	100	0.5	4	0,1	1000
200	20	250	10	220	100	0.5	5	0,1	1000
200	20	300	10	170	100	0.5	6	0,1	1000
200	20	100	10	270	150	0.5	2	0,15	1000
200	20	150	10	220	150	0.5	3	0,15	1000
200	20	200	10	170	150	0.5	4	0,15	1000
200	20	250	10	120	150	0.5	5	0,15	1000
200	20	300	10	70	150	0.5	6	0,15	1000



Şekil 4.39. Karayemiş GST enzimi aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi

Çizelge 4.43. Karayemiş meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan organik bileşikler

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K _i (mM)	Ortalama K _i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
EDTA	250	297,2	235,65±53,34	Yarışmalı
	300	203,2		
	400	206,5		
Askorbik Asit	200	10,35	8,173±2,074	Yarı Yarışmalı
	300	7,95		
	400	6,22		
Benzoik Asit	20	5,93	3,356±2,230	Yarı Yarışmalı
	30	2,17		
	40	1,97		
SDS	0,05	0,51	0,203±0,266	Yarı Yarışmalı
	0,1	0,07		
	0,15	0,03		

4.6. Karayemiş Meyvesi GST Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi İncelenen Diğer Kimyasallar

Karayemiş meyvesi üzerine inhibisyon etkisi çalışılan bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi göstermediği görülmüş olup çalışılan kimyasal moleküller Çizelge 4.55’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.44. Karayemiş meyvesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan diğer kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	İnhibisyon Etkisi
2,4 dichlorophenoxya asetikasit dimetilamin tuzu	Etki etmedi
Haloxifop-p-methyl	Etki etmedi
Lambda-cyhalothrin	Etki etmedi
Etanol	Etki etmedi
Tokoferol (E vitamini)	Etki etmedi
Pb ⁺²	Etki etmedi
Co ⁺²	Etki etmedi
Fe ⁺²	Etki etmedi
Zn ⁺²	Etki etmedi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde sağlıklı ve kaliteli bir ömür sürdürmenin gerekliliği oldukça büyüktür. Özellikle son yıllarda ülkemizde aşırı nüfus artışı, hızlı kentleşme ve sanayinin gelişmesine bağlı olarak çevre kirliliği artmaktadır. Bu durum doğadaki tüm canlıların sağlığını tehdit etmektedir. Bu tehditlere karşı vücudun direncini artırıcı besinlerin kullanımı gerekmektedir. Bununla birlikte canlı organizmalarda görev alan enzimlerin işlevleri sağlıklı ve sürdürülebilir bir yaşam için çok önem kazanmaktadır. Bu enzimlerin en önemlilerinden biri detoksifikasyondan sorumlu olan glutatyon S-transferaz enzimidir.

Glutatyon S-transferaz enzimi ksenobiyotik maddelerin detoksifikasyonunda iyi bilinen bir enzimdir (Wagner *et al.* 2002). GST'ler indirgenmiş glutatyonun (GSH) ksenobiyotiklere konjugasyonunu sağlayan dimerik yapıda geniş bir enzim ailesidir. İndirgenmiş glutatyon elektrofilik karbon, sülfür veya azot atomları taşıyan nonpolar bileşiklere bağlanır. Bu şekilde GST'ler oksidatif stres sonucu oluşan ikincil endojen bileşiklerin ve antitümör ilaçlar, çevresel karsinojenler gibi ksenobiyotiklerin faz II yoluyla transformasyonunu sağlayarak yapısı değişmiş ksenobiyotikleri hücre içi ve hücre dışı sıvıda daha çözünür hale getirir ve vücut dışına atılımını kolaylaştırır. GST'ler, canlıları sitotoksik elektrofilik kimyasallara karşı koruyan ve oksidatif strese karşı uyumu sağlayan dinamik, interaktif bir savunma mekanizmasının önemli parçalarıdır ve ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli işlevlere sahiptirler.

Toksik ekzojen bileşikleri metabolize etme kabiliyetlerinden dolayı ayrıntılı biçimde memelilerde araştırılmış olan GST'ler, böcekleri, bakterileri, bitkileri de içeren birçok kaynaktan saflaştırılmış ve incelenmiştir. GST'ler organizmanın savunma sisteminde çok önemli bir enzim olmasından dolayı çeşitli türlerden saflaştırılması yapısal ve kinetik özelliklerinin saptanması ve karakterizasyonu günümüzde de devam etmektedir.

Canlı organizmalar için oldukça önemli yeri olan glutatyon S-transferaz enzimiyle ilgili ilk çalışmalar sıçan karaciğerinde yapılmıştır (Boylard and Chasseaud 1969). Daha sonra GST'ler insan, fare, sığır ve sıçanların değişik dokularından saflaştırılarak yapıları, fonksiyonları ve metabolik özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Hee-Joong *et al.* 2005).

Çalışmamızda karayemişin meyve etinden glutatyon S-transferaz enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon ve afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitler, metal iyonları ve organik bileşiklerin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Karadeniz Bölgesi Tokat ili civarında toplanan meyveler küçük buzdolabı poşetlerine konarak laboratuvarımızda derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Saflaştırma işlemi, Güvercin *et al.* (2008), Çomaklı (2011) ile Chun-hua Z. *et al.* (2013) uyguladığı prosedüre göre yapıldı. Öncelikle homojenatın hazırlanması ve glutatyon-agaroz afinite jel kromatografisi olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi. Saflaştırma tablosu yapıldı. Daha sonra, sephadex G-100 jel filtrasyon ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi Chun-hua Z. *et al.* (2013). Glutatyon-agaroz afinite kolonu GST'lerin saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanıldığından saflaştırma sırasında bu afinite kolonu da kullanıldı. Bu yöntem, saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlara sahiptir. Bu saflaştırma prosedürü sayesinde öncelikle GST enzimi sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile 1,42 EÜ/ mg protein spesifik aktiviteye sahip %74,24 verimle 15,77 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1). Daha sonra saflaştırma işlemi sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisini takiben glutatyon agaroz afinite kolonu yardımıyla yapıldı ve spesifik aktivite 2,2 EÜ/ mg protein, % 33,3 lik verim ve 24,46 katlık saflaştırmaya ulaşıldı (Çizelge 4.1).

Değerler incelendiğinde sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisini takiben glutasyon agaroz afinite kolonuna homojenat uygulandığında spesifik aktivitede yaklaşık olarak 1,55 katlık bir artış gözlemlendi.

Enzimi saflaştırmak için homojenata önce nötral tuz (Amonyum sülfat) çöktürmesi uygulandı. Ancak her bir aralıktaki tuz konsantrasyonunda hem çökelekteki hem de süpernatanttaki enzim aktivitelerinin tutarsızlığı ve bu işlem sırasında enzim aktivitesinin çok büyük bir kısmını kaybetmesi nedeniyle saflaştırma işleminde bu aşama uygulanmadı.

Literatürde de bizim karşılaştığımız bu duruma benzer sorunla karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Tamaki *et al.* 1989; Güvercin *et al.* 2008). Chun-hua *et al.* (2013) pirinç üzerine Cd⁺²'un etkisini araştırmış olup; sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma sonuçlarını şu şekilde bulmuştur: saflaştırma katsayısı 2,15, verim %25 ve spesifik aktivite 564,6 EÜ/mg protein. Afinite kromatografisi sonrası sonuçlar ise; saflaştırma katsayısı 11,68, verim %4 ve spesifik aktivite 3068. Sonuçlara dikkat edildiğinde spesifik aktivitenin yaklaşık 6 kat arttığı görülmektedir. Huang *et al.* (2008) bir balık türünün olan (*monopterus albus*) karaciğerinden GST enzimini glutasyon-sepharose 6B afinite kolonuyla ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, 13,07 µmol/ mg spesifik aktiviteye sahip %14 verimle 300 kat saflaştırmışlardır. Yine benzer bir çalışmada, kedi balığının bağırsak mukozasından GST enzimini glutasyon-agaroz afinite kolonuyla 107 µmol/ mg spesifik aktiviteye sahip %87 verimle 100 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Saflaştırmadan sonra enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant elde edildi (Şekil 4.4). Elde edilen tek bant, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısına bakılarak, uygulanan metodun araştırmacılar için uygun bir metot olduğu görüldü.

Glutasyon S-transferaz enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sı 0,1 M potasyum fosfat tamponuyla 7,0 olarak belirlendi (Şekil 4.5). Optimum pH belirleme çalışmalarında artan pH'nın (7,5-9,0) GSH ile CDNB'nin enzimatik olmayan konjugasyonlarını artırdığı düşündüğümüz için yüksek pH daki

ölçümlerin faydalı olmayacağı kanaatine vardık. Akkemik *et al.* (2012) hindi karaciğerinden elde ettikleri GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH'yı K-fosfat tamponunda 7,3 olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada Güvercin *et al.* (2008) sığır eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi için optimum pH değerini 7,0 olarak gözlemlemişlerdir. Huang *et al.* (2008) bir balık türü olan (*monopterus albus*) karaciğerinden elde ettikleri GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH'yı 7,0-7,5 olarak gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Hamed *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada glutatyon S-transferaz enzimini Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden saflaştırılıp enzimin optimum pH'sını 8 olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. Çomaklı (2011) gökkuşacağı eritrositlerinden elde ettiği GST enzimi için optimum pH'yı 7,3 olarak bulmuştur. Görüldüğü gibi farklı kaynaklardan saflaştırılan glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH' sı 7,0-8,0 arasında olabilmektedir.

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine optimum iyonik şiddetin etkisi 0,125 M olarak belirlendi. Bu değer enzim aktivitesinin optimum olduğu potasyum fosfat tamponundaki 0,100 M'a yakındır (Şekil 4.6).

GST enzimi için yaptığımız stabil pH çalışmaları sonucu elde ettiğimiz değer K-fosfat tamponu içerisinde 6,5 olarak gözlemlendi. Sonuçlar spektrofotometrik olarak 12 saatte bir yapılmak üzere 3 gün tekrarlandı (Şekil 4.8).

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık aralığı vardır. Çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklarda enzimin üç boyutlu yapısı bozulur ve enzim aktivitesi kaybolur. Çalışmamızda karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için 0°C ile 75°C arasında her 10°C'de bir enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve optimum sıcaklığı Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 30°C olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda Akkemik *et al.* (2012) hindi karaciğerinden elde ettikleri GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklığı 50°C, Çomaklı (2011) gökkuşacağı alabalık eritrositlerinden elde ettikleri GST enzimi optimum sıcaklığını yine 30°C, Türkanoglu (2007) insan kan serumdan saflaştırdığı enzimin optimum sıcaklığını 65°C olarak rapor etmişlerdir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi enzim 70°C gibi yüksek bir

sıcaklıkta bile aktivitesini kaybetmemesi enzimin bazı canlı dokularında sıcaklığa karşı stabil olduğunu göstermektedir ki bu görüşü önceki çalışmalarda destekler niteliktedir.

Enzim kinetiğinde K_M değerinin iki anlamı vardır. Birincisi K_M , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir. Araştırmamızda karayemiş meyvesinden saflaştırdığımız GST enzimi için kullandığımız GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit CDNB konsantrasyonunda, 5 farklı GSH konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10, Çizelge 4.9). Enzimin diğer substratı olan CDNB için ise sabit GSH konsantrasyonunda, 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.11, Çizelge 4.9). GSH için K_M sabiti 0,344 mM, V_{max} değeri ise 0,098 EÜ/ml olarak hesaplandı (Çizelge 4.9). CDNB için K_M sabiti 0,89 mM, V_{max} değeri ise 0,214 EÜ/ml olarak belirlendi (Çizelge 4.9). Elde edilen sonuçlara göre karayemiş meyvesi GST enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu görüldü. Çünkü düşük K_M yüksek bağlanmayı; yüksek K_M düşük bağlanmayı ifade eder.

Hindi karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda sırasıyla GSH ve CDNB substratları için K_M değerleri 0,154 mM ve 0,380 mM (Akkemik *et al.* 2012), yine benzer şekilde sığır eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi kinetik çalışmalarında ise GSH ve CDNB substratları için K_M değerleri 0,325 mM ve 0,744 mM olarak bulunmuştur (Güvercin *et al.*). Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden elde edilen GST enzimi substratları olan GSH ve CDNB için K_M değerleri sırasıyla 0,0395 mM, 0,2590 mM olarak bulunmuştur. Literatürde, yukarıdaki çalışmalara ek olarak birçok çalışmada GST enziminin GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Izuka *et al.* 1989; Gadagbui *et al.* 2000; Hamed *et al.* 2004; Huang *et al.* 2008).

Proteinlerin yapısını oluşturan amino asitler, R gruplarında ihtiva ettikleri fonksiyonel gruplar üzerinden reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Örneğin sistein -SH ve tirozin -OH grupları üzerinden tepkime verirler. Sistein eser miktarda da olsa ağır metal iyonlarına maruz bırakıldığı zaman merkaptanlar teşekkül eder. Sistein birçok enzimin aktif ve katalitik bölgelerinin çok önemli bir bileşenidir. Bu tip enzimler Ag^+ ve Hg^{+2} gibi ağır metal iyonlarıyla etkileşirse -SH üzerinden merkaptanlar meydana gelir ve enzimin katalitik fonksiyonunda azalma olur hatta bu özelliğini kaybedebilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Çeşitli yollarla sucul ortamlara katılan kirleticiler (Ağır metaller, tarım ilaçları, böcek ilaçları, vs.) ya doğrudan ya da besin zinciri yoluyla canlıları olumsuz olarak etkilemektedir. Ağır metaller enzim olarak görev yapan proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanarak enzim aktivitelerinde inhibisyona sebep olmaktadır (Kakkar and Jaffery 2005). Ağır metallerin çok az miktarı bile canlı organizmaya zarar veren maddelerin başında gelmektedir. Ağır metaller maruz kalmak çevresel toksikolojinin önemli bir problemidir. Bazı metaller ise canlılar için çok hayati öneme sahiptir, örneğin kurşun ve demir gibi metaller metabolizma için kritik görevi olan enzimlerin biyolojik fonksiyonlarını yerine getirmeleri için gereklidir (Tekman *et al.* 2008).

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine kadmiyum, nikel, magnezyum, kalsiyum, bakır, kurşun, kobalt, demir, çinko tuzlarının inhibitör etkileri incelendi. Sonuçlar incelendiğinde Cd^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edildi.

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC_{50} değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.16-4.20). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplandı. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında $Ca^{+2} < Mg^{+2} < Ni^{+2} < Cu^{+2} < Cd^{+2}$ şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.21).

Metal iyonların enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırmacılar tarafından sürekli incelenmektedir. omaklı *et al.* (2011) bazı metal iyonlarının gökkuşağı alabalık eritrositleri üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmış ve sonuçları şöyle rapor etmişlerdir: Metal iyonlarının IC₅₀ değerleri kekten byge doğru sıralandığında $Ag^+ < Cd^{+2} < Cr^{+2} < Mg^{+2}$ şeklinde olduğu görülmektedir. Örneğin Ekinci ve arkadaşları (2007) kurşun, bakır, kobalt ağır metallerinin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II enzim, aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinden bahsetmişlerdir. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+3} ve Al^{+3} metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda metal iyonlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,011; 0,020; 0,0252; 0,0373; 0,209 ve 0,229 mM olarak belirlenmiştir (oban *et al.* 2007).

Yetiştirilen bitkisel ürünlerin kalitesini ve miktarını artırmak amaçlı kullanılan pestisitler, son yıllarda canlılar için bir tehdit haline gelmiştir. Ekosistemdeki her canlı direkt ya da indirekt olarak pestisitlerden etkilenmektedir. Özellikle, bilinçsizce yapılan aşırı pestisit kullanımları yüzünden, hayvanlarda ve insanlarda ölümlere varan ciddi sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Canlılarda pestisitlerin etkilerini, dokularda neden oldukları tahribatlar ve bu dokulardaki enzim aktivitelerinde gözlenen değişikliklerden anlayabiliriz. Bu tez çalışmasında, glifosat izopropilamin tuzu, fenoxaprop-p-etil, cypermethrin, dichlorvos, imidacloprid, 2,4 dichlorophenoxya asetikasit dimetilamin tuzu, haloxyfop-p-methyl, lambda-cyhalothrin pestisitlerinin uygulaması sonrasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonun da suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki birinci basamağı katalizleyen GST aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Çalışma sonucunda glifosat izopropilamin tuzu, fenoxaprop-p-etil, cypermethrin, dichlorvos, imidacloprid pestisitlerinin inhibisyon etkisi yaptđı gözlendi.

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC₅₀ değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (şekil 4.12-4.16). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC₅₀ değerleri

hesaplandı. Pestisitlerin IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında Cypermethrin < Imidacloprid < Glifosat- izopropilamin tuzu < Fenoxaprop- p-ethyl < dichlorvos şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.15).

Metal iyonları ve pestisitlerde olduğu gibi organik bileşiklerinde enzim aktivitesini azaltıcı etkileri vardır. Çalışmamızda etilendiamintetra asetik asit (EDTA), Sodyumdodesil sülfat (SDS), Benzoik asit, Askorbik asit, Etanol, Tokoferol (E vitamini) inhibisyon etkileri incelendi. Bu bileşiklerden etilendiamintetra asetik asit (EDTA), Sodyumdodesil sülfat (SDS), Benzoik asit ve Askorbik asitin inhibisyon özelliği gözlemlendi.

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC_{50} değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.22-4.25). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplandı. Organik bileşiklerin IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında SDS < Benzoik asit < Askorbik asit < EDTA şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.26).

Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları, pestisitler ve organik bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanıldı. Sonuçların hassas bulunabilmesi amacıyla her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.26-4.39). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisinin fazla olduğu düşünüldüğünde bu tür inhibitörlerin enzimi çok daha fazla inhibe edeceği açıktır. Karayemiş meyvesi, GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları, pestisitler ve organik bileşiklerin (K_i)_{ort} sabitleri hesaplandı. En düşük K_i değerleri pestisitler içinde İmidacloprid (0,097); metal iyonları içinde Ca^{+2} (0,06); organik moleküller içinde, SDS (0,203) olarak gözlemlendi. Görüldüğü gibi enzim için bu maddeler oldukça küçük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi göstermişlerdir ve böylece bu moleküllerin

GST enzimi için potansiyel inhibitör oldukları görülmektedir. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlendi.

Yaptığımız çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, detoksifikasyon sisteminde çok önemli rolü olan GST enziminin, pestisit, metal iyonları ve organik bileşik toksisitesi ile aktivitesinde azalma meydana geldiği görülmektedir. Bunun sonucunda ise canlı savunma sisteminin büyük ölçüde zarar göreceği açıktır.

Glutayon S- transferaz enzimi metabolizma için önem arzeden bir detoksifikasyon enzimidir. Bunun için pek çok kinetik ve karakterizasyon çalışması yapılmış ayrıca enzimin üç boyutlu yapısı belirlenmiştir (Mannervik and Danielson 1988; Bucciarelli *et al.* 1999). Ancak yapılan araştırma sonucu enzimin karayemiş meyvesinden (*Prunus Laurocerasus L.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarına rastlanmadı. Gerek enzimin önemi gerekse karayemişin antioksidan özelliği, halk hekimliğinde sıklıkla kullanılıyor olması gözönüne alındığında çalışmanın önemi artmaktadır. İnsan sağlığı için oldukça faydalı olan karayemişin daha yaygın olarak tüketilmesine çalışmamızın önemli katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışma sonuçlarına bakıldığında detoksifikasyon sisteminde önemli bir rolü olan GST enziminin çok az miktarda pestisit, metal iyonları ve organik bileşik kullanımı sonucunda aktivitesini önemli ölçüde kaybettiği, bunun sonucunda canlı savunma sisteminin önemli derecede zarar göreceği açıktır. Dolayısıyla kinetik çalışmalarda elde edilen bulgulara dikkat edilmesi metabolizmadaki savunma sistemleri için çok önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H., Ciftci M., 2012. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 34, 888-894.
- 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.
- Altınpınar, Ş.E., 2005. N-Nitrozopirolidin İle İn Vivo Etkileştirilen Sıçanların Karaciğer ve Böbrek Sitoplazmik Glutatyon S-Transferaz Özgül Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Sivas.
- Anıya, Y., Anders M.W., 1989. Regulation of Rat Liver Microsomal Glutathione Stransferase Activity by Thiol/Disulfide Exchange. *Archives of Biochem. And Biophysics*, 270(1), 330-34.
- Anıya, Y., Daido, A., 1993. Organic Hydroperoxide-Induced Activation of Liver Microsomal Glutathione S-Transferase of rats in Vitro. *J Pharmacol.*62(1),9-14.
- Anton, E.P., Johannes, B., Arne Vander G., Gerard J.M., 1990. The Glutathione-binding Site in Glutathione S-transferases. *Biochem*, 265,47-54.
- Aras, S., 2001. GSTM1 geninin normal bireylerde ve akciğer kanserli hastalarda RFLP analizi ile incelenmesi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi Kesin Raporu, Ankara.
- Arias, I. M., Jakoby, W.B., 1976. Glutathione: Metabolism and Function. *Kroc. Found. Series*, 6,335.
- Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., ve 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.
- Aydinoğlu, H., Dursun, H.Y., ve Bayraktar L., 2002. Bitki Koruma Ürünler, TİSİT(Tarım ilaçları Sanayi, İhaleatçı ve Temsilciler Derneği), 11, İstanbul.
- Barcena, J. A. E., Martinez-Lara, S. G., George, J. Lopez-Barea., 1997. Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver. *CMLS, Cell. mol. life sci.*, 53, 759-768.
- Baş, O., 2006. Dinitrocresol'ün (Rat Rattus Norvegicus) Sıçan Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi Yüksek Lisans Tezi, Bursa.
- Bingöl, G., 1983. *Biyokimya*. Güven matbaası, Ankara,s. 169-174.
- Booth, J., Boyland, E., and Sims, P., 1961. *Biochem. J.*, 79, 516-524.
- Boyer, T.D., Kenney, W.C., 1985. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes*. New York, John Wiley&Sons Inc., 297-363.
- Boyer, T.D., 1989. The Glutathione S-transferases: An Update *Hepatology*, 9(3), 486-96.

- Boylard, E. and Chasseaud, L.F., 1969. The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol.*, 32,173-219.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.
- Bucciarelli, T., Sacchetta P., Pennelli A., Cornelio L., Romagnoli R., Melino S., Petruzzelli R., Di Ilio C., 1999. Characterization of Toad liver Glutathione Transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1431, 189-198.
- Carrillo, M. C., Monti J.A., Favre C., Carnovale C. E., 1995. Acute Regulation of Hepatic Glutathione S-transferase by Insulin and Glukagon. *Toxicol. Lett.* 76(2),105-11.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina. C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200, 29-38.
- Chen, E.-H., Dou, W., Hu, F., Tang, S., Zhao, .-M., Wang, J.-J., 2012. Purification and Biochemical Characterization of Glutathione S-Transferases in *Bactrocera minax* (Diptera:Tephritidae). *Florida Entomologist*,95(3),593-601.
- Cho, M. K., Kim S.G., 2000. Induction of Class Alfa GST by 4-methylthiozale in rat Liver: Role of Oxidative Stres. *Toxicol Lett.* 115,107-115.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, .J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Chun-hua Z., W. Ze-ying, J., Ting, G., 2013. Purification and Identification of Glutathione S-transferase in Rice Root under Cadmium Stress. *Ying, Rice Science*, 20(3), 173-178.
- Combes, B. and Stakelum, G.S., 1961. *J. Clin. Invest.*, 40, 981-988.
- Çelik , V.K., Armutcu, F., Aker, A., 2003. Human Placental Glutathione-S-Transferase : Isolation, Kinetic Properties and in vitro Interactions with Several Drugs. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 25(4), 187-192.
- Çetinkaya, S., Pınarbaşı, H., Pınarbaşı, E., Çetinkaya, Ö., Atalay, A., 1993. Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon S-transferaz aktiviteleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 15(2).
- Çoban, T. A., Senturk, M., Ciftci, M., 2007. Effects of some metal ions on human *erythrocyte* glutathione reductase: an in vitro study. *Protein Pept Lett*, 14, 1027- 1030.
- Çomaklı, V., 2011. Glutatyon S-transferaz Enziminin Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. (Doktora Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Öğüs, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Delen N., N.Tosun, S.Toros., S.Öztürk., A.Yücel., S.Çalı.,1995. Tarım İlaçları Kullanımı ve Üretimi.Türkiye Ziraat Mühendisliği.
- Demirdag, R., Yerlikaya, E., Kufrevioglu, O.I., Gundogdu, C., 2013. Purification of glutathione S-transferase isoenzymes from tumour and nontumour human

- stomach and inhibitory effects of some heavy metals on enzymes activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(5): 911-915.
- Denizli, A., 2008. Ağır metal toksikolojisi; su ürünleride uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri.
- Di, I., Sacchetta, P. C., Iannarelli, V., Aceto, A., 1995. Binding of Pesticides to Alpha, Mu, Pi Class Glutathione Transferase. *Toxicol. Lett.* 76(2), 173-7.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione S-transferases. *Genome Biology*, 3(3) reviews 3004.1-3004.10.
- Donkin, S. G., Ohlson, D. L., Teaf, C. M., 2000. *Principle of Toxicology, Environmental and Industrial Applications. Second Edition.* (P. L. Williams, Ph.D. R. C. James, S. M. Roberts, Edts.). John Wiley & Sons, Inc, New York, 325.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu Ö. İ., 2007. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 22, 745-750.
- Fleisch, G., Kamisaka K., Arias I.M., 1976. Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function.* 229.
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione Stransferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49, 27- 7.
- Garrett R.H., Grisham C.M., 1999. *Biochemistry, Second Edition* Saunders College Publishing. 426-427. ISBN 0-03-022318-0.
- Goyer, R. A., Clarkson, T.W., 2001. *Toxic Effects of Metals.* (Klaassen, C. D., Edts.) Casarette & Doull's *Toxicology-the Basic Science of Poisons*; 6th Edition. New York: McGraw-Hill. s. 827-844.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler. *Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti*, 572-576 s, Ankara.
- Gözükara, M.E., 1997. Enzimler, 13. *Biyokimya Z 3. Nobel tıp Kitabevleri*, İstanbul. 1225s.
- Gürdöl, F., Ademoğlu ,E., 2010. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri 2.Baskı*, İstanbul.
- Güvercin, S., 2008. Glutatyon S-transferaz Enziminin Sığır Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin İncelenmesi. (Yükseklisans Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination of Some Kinetic and Characteristic Properties of Glutathione S-transferase from Bovine Erythrocytes. *Protein & Peptide Letters*, 15, 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), 1401-1418.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S- transferases. The first enzymmatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 246, 7130-7139.
- Hamed, R.R., Maharem, T. M. and .Guinidi, R.A.M., 2004. Glutathione and its Related Enzymes in the Nile Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol.30, No.3-4, 189-199.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.

- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600.
- Hee-Joong, P., Hyun-Young, C. and Kwang-Hoon, K., 2005. Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 2, 232-237.
- Huston, D.H., 1976. In D.D. Kaufman, G.G. Stil, G.D. Paulson and S.K. Bandal (ed.), Bound and conjugated pesticide residues. American Chemical Society, Washington, D.C. 103-131.
- Hou, S.M., Falt, S., Nyberg, F., 2001. Glutathione-s-transferase T1-null genotype interacts synergistically with heavy smoking on lung cancer risk. *Environ Mol. Mutagen*, 38(1), 83-86.
- 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.
- Izuka, M., Inoue, Y., Murata, K., And Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, Nov., 6039-6042.
- Inoue N., Imai K., Aimoto T., 1999. Circadian Variation of Hepatic Glutathione S-transferase Activities in the Mouse. *Xenobiotica*, 29(1),43-51.
- 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.
- İslam, A., 2002. Kiraz cherry laurel (*Prunus laurocerasus*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(4), 301-302.
- İslam, A., 2005. Karayemiş Yetiştiriciliği ve Önemi. *Ege Karadeniz Dergisi*, 4,53-57.
- Kakkar, P., Jaffery, F. N., 2005. Biological Markers for Metal Toxicity. 137 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 335-349.
- Karadeniz, T., 2004. Şifalı meyveler (Meyvelerle beslenme ve tedavi şekilleri). ISBN: 975288867-4, Burcan offset, Ordu.
- Karakaya, M. ve Boyraz, N., 1992. Gıda Kirlenmesinde Pestisitler ve Korunma Yolları, *Ekoloji Çevre Dergisi*, Sayı 4, 11-15.
- Kaya, S., 2002. Pestisidler, Gıda kirliliği, Kimyasal ve biyolojik silahlar. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*; Baskı 2, Medisan Yayınevi, Ankara. Ed. S. Kaya, Pirinççi, A. Bilgili, s,385-536, 777-842, 869-902.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Sirkeci/İstanbul.
- Kence M., 1998. The Ecological Genetics of Malathion Resistance in Housefly *Musca Domestica*. PhD Thesis METU.
- Ketterer, B.,1986. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16, 957-973.
- Ketterer, B., Haris, J.M., Talaksa, G., Meyer, D.J., Pemble, S.E., Taylor, J.B., Lang, N.P, Kadlubar F.F., 1993. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Hlth. Perspect* 98, 87-94.
- Koolman, Jan., Röhm, K.-H., 2003, *Renkli Biyokimya Atlası*. Tavaslı matbacılık savaş ciltevi. İstanbul.

- La Creis, R., Woodson, K., Taylor, P.R., Albanes, D., Virtamo, J., Tangrea, J.A., 2003. Polimorphisms in Glutathione-s-transferase genes (GST-M1, GST-T1 and GSTP1) and susceptibility to prostate cancer among male smokers of the ATBC cancer prevention study. *European Journal of Cancer Prevention* 12, 317-320.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lehninger, A.L., 1982. *Principle of Biochem.* Worth Publishers Inc., New York, 207-244.
- Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 2005. Worth Publishers Inc., New York, 1152 p.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 658-666.
- Lo Bello, M., Oakley, A. J., Battisotoni A., Mazzetti A.P., Nuccetelli M., Mazzaresse G., Rossjohn J., Parker M. W., Ricci G., 1997. Multifunctional Role of Tyr 108 in the Catalytic Mechanism of Human Glutathione Transferase P1-1. Crystallographic and Kinetic Studies on the Y108F Mutant Enzyme. *Biochem. (U.S.)*, 36 (20), 6207-17.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases- structure and catalytic activity. *Dep. of Biochemistry*. 23(3), 283.
- Marrs T.C., Balantyne B., 2002. *Pesticide toxicology*, New York: Wiley.
- Menegon, A., Board, P.G., Blackburn, A.C., Mellick, G.D., Lecourter, D.G., 1998. Parkinson's Disease, Pesticides, And Glutathione S-Transferase Polymorphisms. *Lancet*, 352 (9137), 1344-1346.
- Morgenstren, R., Lundqvist, G., Hancock, V., De Pierre, J.W., 1988. Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem*, 263, 6671-75.
- Mutluay, H., Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım AŞ, s: 83-84, İstanbul.
- Nelson, D.R., Lim, L.H., D. Oliver, Qian K.P., Davis, G.L., Lau J. Y., 1995. Alpha-Glutathione S-Transferase as a Marker of Hepatocellular Damage in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 104(2), 193-8.
- Neuefiend, T., Reinemer, P., Bieseler, B., 1997. Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification. *Biological Chemistry*, 378, 199-205.
- Nilsson, O. L., 2001. Redesign of Alpha Class Glutathione Transferases to Study Their Catalytic Properties. *Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Sci. and Techn.* 672. 30.
- Nicholls, F.A. and Ahokas, J.T., 1984., Inhibition of purified glutathione S-transferases by indomethacin. *Biochem Biophys Res Commun*, 119, 1034-8.
- Nishihira, J., Sakai, S. M., Nishi, Hatanaka, Y., 1995. Identification of the Electrophilic Substrate-Binding Site of Glutathione S-Transferase P by Photoaffinity Labelling. *Eur. J. Biochem.* 232(1), 106-10.
- Nishino, H. and Ito A., 1989. Increase in Glutathione Disulfide Level Regulates the Activity of microsomal Glutathione S-transferase in Rta Liver. *Biochem. Int.* 19(4), 731-5.
- Orhan, H. and Şahin, G., 1995. Clinical and Toxicological Importance Of Glutathione S-Transferases. *T Klin J Med Sci*, 15, 303-315.

- Orhan, H., 1994. Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi. Ankara Bilim Uzmanlığı Tezi. Ankara.
- Orozco, M., Vega C., Parraga, A., Garcia-Saez, I., Coll, M., Walsh, S., Mantle, T.J., Javier Luque, F., 1997. On the Reaction Mechanism of Class Pi Glutathione S-transferase. *Proteins*. 28 (4), 530-42.
- Pabst, M., Habig, W. H. and Jakoby, W. B., 1974. Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 52, 1123.
- Patrick, S., Wong, Y., 2001. Glutathione Inactivation by Reactive Nitrogen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 394(2), 216-228.
- Peter, C.S. and David L.V., 1977. Purification of Glutathione S-Transferase from Human Liver by Glutathione-Affinity Chromatography., 82, 334-341.
- Peters, M. M., Jones, T.W., Monks, T. J., Lau, S.S., 1995. Cytotoxicity and Cell-Proliferation Induced by the Nephrocarcinogen Hydroquinone and Its Nephrotoxic Metabolite 2,3,5-(tris-glutathione-S-yl)hydroquinone. *Carcinogenesis* 18(12), 2393-401.
- Pirie, N.W., Pinhey, K.G., 1929. The Titration Curve Of Glutathione. *J. Biol. Chem.* 84, 321-23.
- Plapp, F. W., 1984. The Genetic Basis Of insecticide Resistance in the Housefly: Evidence that a single Locus Plays a Major Role in Metabolic Resistance to Insecticides. *Pesticides Biochem. and Physiology* 22, 194.
- Ploemen, J. P., Vaniersel, M. L., Wormhout, L. W., Commandeur, J.N., Vermeulen, N. P., Van Bladeren, P. J., 1996. In vitro Inhibition of Rat and Human Glutathione S-transferase Isoenzymes by Disulfiram and Diethylthiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 52(2), 197-204.
- Puchalski, R.P., Fahl E.E., 1990. Expression of Recombinant Glutathione S-Transferases: II. Ya, or Yb1 Confers Resistance to Alkylating Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 2443-47.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G. and López, M.P., 2001. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128, (2) p, 227-235.
- Rowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B.T., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D., 2001. Mammalian class sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem J.*, 359, 507- 516.
- Sandermann, H.Jr., 1992. Plant Metabolism of Xenobiotics. *Trends in Biochem. Sci.* 17 (2), 82-84.
- Sayıtoğlu, M.A., Hatırnaz, Ö., Özbek, U., 2003. Detoksifikasyon enzim gen polimorfizmlerinin akut lösemi etiyolojisindeki rolleri. *Turkish Journal of Haematology* 20(3).
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical calculations*. Inc., New York, 403.
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sehgal, R. and Saxena, A.B., 1986. Toxicity of zinc to a viviparous fish *Lebistes reticulatus* (Peters). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 36, 888-894.

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.*,360,1-6.
- Sherman, L., Dafni, N., Lieman-Hurwitz, J., Groner, Y., 1983. Nucleotide sequence and expression of human chromosome 21-encoded superoxide dismutase mRNA, 80(18) 5465-5469.
- Sheweita, S.A., Mostafa, M. H., 1996. N-Nitrosamines and Their effects on the Level of glutathione, Glutathione Reductase and Glutathione S-Transferase activities in the Liver of Male Mice. *Cancer Lett.* 99(1),29-34
- Sluis-Cremer, N., Naidoo, N., Dirrh., 1996. Class-Pi Glutathione S-Transferase is Unable to Region Its Native Conformation after Oxidative Inactivation by Hydrogen Peroxide. *Eur. J. Biochem.* 242(2),301-7.
- Smith, G.J., Ohl, V.S, Litwack, G., 1997. Ligandin, the glutathione Stransferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 37, 8-14.
- Smith, G.J., Ohl, V.S, Litwack, G., 1981. Ligandin, the glutathione Stransferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 37, 8-14.
- Suzuki, T., Johnston, P. N., Board P.G., 1993. Structure and Organization of the Human Alfa Class Glutathione S-trasferase Genes and Related Pseudogenes.*Genomics* 18(3),680-6.
- Şah, D., 2007. *Oreochromis niloticus*'un doku ve organlarında kadminyum birikimi üzerine çinkonun etkisi. Yüksek lisans tezi .
- Tamaki, H., Kumagai, H. and Tochikura, T., 1989. Purification and Properties of Glutathione Transferase from *Issatchenkia orientalis*. *Journal of Bacteriology.* 171 (2), 1173-1177.
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comp Biochem Physiol C*, 148, 117-121.
- Temellini. A., Castiglioni, M., Giuliani, L., Mussi, A., Giulianotti, P.C., Pietrabissa, A., Angeletti, C.A., Mosca, F., Pacifici, G.M., 1995. Glutathione Conjugation with 1- chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB):Interindividual Variability in Human Liver, Lung,Kidney and Intestine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 33(9), 495-503.
- Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroksidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97.
- Tüken, F., 1993. Bazı nitrozaminlerin glutatyon s- transferaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. Doktora tezi.
- Türkanoglu, Aysun., 2007. Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University. Ankara.
- Uyanık, A., 2008. Beta Galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizaasyonu (Yükseklisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Voet, D., Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, (second edition), New York, p. 346-350.
- Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., Lee, S-J.,2002.Loss of Myostatin Attenuate 836.

- Wareing, C.J., Blavk, S.M., HAYES, J.D., WOLF C.R.,1993. Increased Levels of Alpha-class and Pi-class Glutathione S-Transferases in Cell Lines resistance to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Eur. J. Biochem.*, 217(2), 671-676.
- Wilson, J. E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. *Arch. Biochem. Biophys*, 147, 471–474.
- Wu, C., Mathews, K.P., 1983. Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun*, 112, 980-985.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.,2010. Moleküler Biyoloji. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.
- Zhang, K., Mack, P., Wong, K.P., 1998. Glutathione-related Mechanisms in Cellular Resistance to anticancer Drugs. *Int. J. Oncol.* 12(4), 871-82.
- Zhou H. A., Syvanen M., 1997. A Complex Glutathione Transferase Gene Family in the Housefly *Musca Domestica*. *Mol Gen. Genet.* 256,187.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Iğdır ili Tuzluca ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tuzluca'da tamamladıktan sonra 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünde başladığı lisans eğitimini 2004 yılında başarıyla tamamladı. 2007 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2009 yılında tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 28 Ekim 2009 tarihinden itibaren Iğdır Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'nda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.