

**YABAN MERSİNİ MEYVESİNDEN (*Vaccinium  
arctostaphylos* L.) GLUTATYON S-TRANSFERAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU ve KİNETİK  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Neslihan BALCI**

**Doktora Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU**

**2015**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

YABAN MERSİNİ MEYVESİNDEN (*Vaccinium arctostaphylos* L.)  
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU ve KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ

Neslihan BALCI

KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM  
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEZ ONAY FORMU



**YABAN MERSİNİ (*Vaccinium arctostaphylos* L.) MEYVESİNDEN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU danışmanlığında, Neslihan BALCI tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya anabilim dalı- Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 03.../09./2015 tarih ve 35.../1221... 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

### **YABAN MERSİNİ MEYVESİNDEN (*Vaccinium arctostaphylos* L.) GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Neslihan BALCI

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

Yaban mersini meyvesi (*Vaccinium arctostaphylos* L.) antioksidan özelliğiyle bilinen ve özellikle halk hekimliğinde oldukça kullanılan bir meyvedir. Bu tezde yaban mersini meyvesinden Glutatyon S-transferaz enzimi (E.C. 2.5.1.18) saflaştırıldı. Saflaştırılma işlemi afinite ve jel filtrasyon kromatografileriyle ayrı ayrı yapıldı. Enziminin saflığı SDS-PAGE elektroforezi ile belirlendi. Enzim için karakterizasyon çalışmaları kapsamında  $K_2HPO_4$  tamponunda optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, stabil pH ile GSH ve 1-Klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) için  $K_M$  ve  $V_{max}$  çalışmaları yapıldı. Enzimin optimum pH'sı  $K_2HPO_4$  tamponunda 7,2; optimum sıcaklığı 50°C, optimum iyonik şiddeti 1,0 M, stabil pH'sı  $K_2HPO_4$  tamponunda 7,0; GSH ve CDNB için sırasıyla  $K_M$  değeri 1,57 mM; 0,17 mM,  $V_{max}$  değeri 0,048 EÜ/mL, 0,0159 EÜ/mL olarak bulundu. Buna ilaveten, enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonları;  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , bazı pestisitler; diklorvos, asetamiprit, siyalotrin, haloksifop-p-metil, 2,4 diklorofenoksi asetik asit, sipermetrin, imidakloprit, fenoksiaprop-p-etil, glifosfat izopropilamin tuzu ve kimyasal bileşik olarak; kumarin, askorbik asit, sodyum sülfid, sodyum azid ve sitrik asit inhibisyon etkileri çalışıldı. Bu etken maddelerin  $IC_{50}$  değerleri belirlenip, Lineweaver Burk grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi.

**2015, 142 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Yaban mersini, Glutatyon S-transferaz, Enzim Saflaştırma, Karakterizasyon İnhibisyon

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### PRUFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM BLUEBERRY FRUIT (*Vaccinium arctostapylous* L.) AND INVESTIGATION OF THE KINETIC PROPERTIES

Neslihan BALCI

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

Caucasian whortleberry (*Vaccinium arctostapylous* L.) is a plant, widely used in folk medicine and is well known for its antioxidant properties. In this thesis, Glutathione S-transferase (GST), was purified from the caucasian whortleberry. 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,  $K_M$  ve  $V_{max}$  values for GSH and CDNB were also determined for the enzyme as 7.2 in  $K_2HPO_4$  buffer, 50°C, 1,0 M, 7,0 in  $K_2HPO_4$  buffer, 1,57 mM; 0,17 mM and 0,048 EÜ/mL, 0,0159 EÜ/mL, respectively. Additionally, inhibitory effects of some metal ions;  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , pesticides; dichlorvos, acetamiprid, cyhalothrin, haloxyfop-p-Methyl, 2,4 dichlorophenoxy acetic acid, cypermethrin, imidacloprid, fenoxaprop-p-ethyl, glyphosate isopropilamine salt and chemical compounds; coumarin, ascorbic acid, sodium sülphit, sodium azide and citric acid were examined. For these active substances  $IC_{50}$  values were calculating,  $K_i$  constants and inhibition types of these substances were determined from the Lineweaver-Burk graphs.

**2015, 142 pages**

**Keywords:** Caucasian whortleberry, 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 fedakârca 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 KÜFREVİOĞLU olmak üzere, tez izleme komitemde bulunan Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Prof. Dr. Mustafa ERAT'a, ayrıca bölümümüz öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR ve Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e;

Akademik hayatıma başladığım andan itibaren her daim yanımda olan benim canım anneciğime, babacığıma, varlıklarından gurur duyduğum güzel insan olma vasıflarının en zirve özelliklerini taşıyan, mutluluk kaynağım kardeşlerime, hayatımıza sonradan katılan beşinci kardeşim değerli damadımıza,

Çalışmalarım esnasında ekip ruhunu tam anlamıyla bilen ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Laboratuvarındaki tüm araştırmacı arkadaşlarıma, yürekteň teşekkürlerimi sunarım.

**Neslihan BALCI**

**Temmuz, 2015**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enzimler .....	1
1.2. Antioksidan Enzim Sistemleri.....	8
1.2.1. Katalaz ve peroksidaz.....	8
1.2.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD).....	9
1.2.3. Glutasyon (GSH) ve glutasyon peroksidaz (GSHPx) .....	9
1.2.4. Glutasyon reduktaz (GR) enzimi .....	15
1.2.5. Glutasyon S-transferaz.....	16
1.2.5.a. Glutasyon S-transferaz enziminin yapısı .....	17
1.2.5.b. Bitki GST enzimlerinin sınıflandırılması .....	19
1.2.5.c. GST enziminin fonksiyonları .....	22
1.2.5.d. Stres durumunda bitki GST enzimlerinin fonksiyonları .....	31
1.3. Yaban Mersini .....	36
1.4. Metal İyonları .....	40
1.5. Pestisitler .....	41
1.5.1. GST enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenen pestisitler.....	42
1.5.1.a. Diklorvos .....	42
1.5.1.b. Asetamiprit .....	43
1.5.1.c. İmidakloprit .....	44
1.5.1.d. Sipermetrin .....	44
1.5.1.e. Siyalotrin .....	45
1.5.1.f. Fenoksiaprop-p-etil .....	46
1.5.1.g. Haloksifop-p-metil .....	47

1.5.1.h. 2,4 Diklorofenoksi asetik asit (2,4 D) .....	47
1.5.1.k. Glifosfat .....	48
1.5.2. Kimyasal bileşikler .....	48
1.5.2.a. Askorbik asit (C Vitamini) .....	48
1.5.2.b. Kumarin .....	49
1.5.2.c. Sodyum sülfid .....	50
1.5.2.d. Sodyum azid .....	50
1.5.2.e. Sitrik asit .....	51
1.6. Çalışmanın Amacı .....	51
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>52</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>59</b>
3.1. Materyal.....	59
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	59
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....	59
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	60
3.1.4. Homojenat hazırlama çözeltisi .....	60
3.1.5. Diyaliz çözeltisi ve hazırlanması.....	60
3.1.6. GST Enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler .....	61
3.1.7. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler .....	61
3.1.8. Elektroforez için kullanılan çözeltiler .....	62
3.1.9. Gümüş boyama çözeltileri.....	63
3.1.10. Diğer çözeltiler .....	64
3.1.11. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler .....	64
3.2. Yöntemler .....	65
3.2.1. Protein tayini .....	65
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini .....	65
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini.....	65
3.2.2. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi tayini .....	66
3.2.3. GST enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması .....	68
3.2.4. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması.....	68



3.2.5. Yaban mersini meyvesinden GST enziminin saflaştırılması için yapılan çalışmalar .....	69
3.2.5.a. Yaban mersini temini ve homojenat hazırlanması .....	69
3.2.5.b. Homojenattaki enzimin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması .....	70
3.2.6. Enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması .....	70
3.2.7. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü .....	71
3.3. Yaban Mersini Meyvesinden Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları .....	72
3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	72
3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi .....	72
3.3.3. Optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesi .....	73
3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi.....	73
3.3.5. Yaban mersini GST enziminin GSH ve CDNB substratları için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve özgülük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasına yönelik çalışmalar.....	74
3.4. Yaban Mersini GST Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisit, Kimyasal Bileşik ve Metal İyonlarının $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması.....	75
3.5. Yaban Mersini Meyvesinden Elde Edilen GST Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Kimyasal Bileşiklerin $K_i$ Sabitlerinin Bulunması .....	75
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>77</b>
4.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik .....	77
4.2. Yaban Mersini Meyvesi GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar .....	77
4.2.1. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografi sonuçları .....	77
4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları .....	78
4.3. SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi ile GST Enzim Saflığının Kontrolü .....	79
4.4. Yaban Mersini Meyvesi GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları .....	80
4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	80
4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları .....	82

4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları.....	83
4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları .....	85
4.4.5. Yaban mersini 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 .....	87
4.5. Yaban Mersini Meyvesi GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları..	89
4.5.1. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	89
4.5.2. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	95
4.5.3. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı kimyasal bileşikler için $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	98
4.5.4. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için $K_i$ sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları.....	101
4.5.5. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için $K_i$ sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	108
4.5.6. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenen diğer kimyasallar .....	111
4.5.7. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için $K_i$ sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	112
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>116</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>125</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>143</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><math>\Delta H</math></b>	Aktivasyon entalpisi
<b><math>\Delta OD</math></b>	1 dakikadaki absorbans değişimi
<b><math>^{\circ}C</math></b>	Santigrat derece
<b><math>\mu</math></b>	Mikro
<b>2,4 D</b>	Diklorofenoksi asetik asit
<b>AChE</b>	Asetilkolinesteraz
<b>AOS</b>	Aktif oksijen turleri
<b>Arg</b>	Arginin
<b>ASH-GSH</b>	Askorbik asit-glutasyon
<b>ATP</b>	Adozintrifosfat
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CDNB</b>	1-Klor- 2,4- dinitrobenzen
<b>cGST</b>	Sitoplazmik glutasyon S-transferaz
<b>CuZn-SOD</b>	Bakır inko bağlı siperoksit dismutaz
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCNB</b>	1-Nitro 3,4 dikloro benzen
<b>DHAR</b>	Dehidrokikarbat reduktaz
<b>DNA</b>	Deoksiribonukleik asit
<b>DTT</b>	Ditioeritrol
<b>E</b>	Enzim
<b>E300</b>	Emulęator
<b>E<sub>a</sub></b>	Aktivasyon enerjisi
<b>EC</b>	Enzim kodu
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetikasit
<b>ES</b>	Enzim Substrat Kompleksi
<b>ESI</b>	Enzim-substrat-inhibitör Kompleksi
<b>ET</b>	Toplam enzim miktarı
<b>EÜ</b>	Enzim ünitesi

<b>Fe-SOD</b>	Demir bağlı süperoksit dismutaz
<b>GCST</b>	Glutasyon S-sinamoil transferaz
<b>Glu</b>	Glutamin
<b>GPx</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSSG</b>	Yükseltgenmiş glutasyon
<b>GST</b>	Glutasyon S- transferaz enzimi
<b>HOCl</b>	Hipoklorik asit
<b>I</b>	İnhibitör
<b>IC<sub>50</sub></b>	Enzimin maksimum hızını yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>K<sub>i</sub></b>	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
<b>Leu</b>	Lösin
<b>LOOH</b>	Lipit hidroperoksit
<b>MA</b>	Molekül kütlesi
<b>Mn-SOD</b>	Mangan bağlı süperoksit dismutaz
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nikotinamid adenin nükleotit (yükseltgenmiş form)
<b>NADH</b>	Nikotinamid adenin nükleotit (indirgenmiş form)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nikotinamid adenin nükleotit fosfat (yükseltgenmiş form)
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin nükleotit fosfat (indirgenmiş form)
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>OP</b>	Organofosfor
<b>PAGE</b>	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PER</b>	Amonyum persülfat
<b>PMSF</b>	Fenil metil sülfonil florid
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>RNS</b>	Reaktif azot türleri
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri

<b>S</b>	Substrat
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>Ser</b>	Serin
<b>SF</b>	Seyreltme faktörü
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TCA</b>	Triklor asetik asit
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamin
<b>Trp</b>	Triptofan
<b>UDP</b>	Üridin difosfat
<b>VE</b>	Enzim numune hacmi
<b>V<sub>max</sub></b>	Maksimum hız
<b>V<sub>o</sub></b>	Özgüllük sabiti
<b>VT</b>	Küvet toplam hacmi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enerji transferinde ROS oluşumu.....	6
Şekil 1.2. Serbest radikallerin hücreye etkisi.....	6
Şekil 1.3. Glutasyonun yapısı.....	11
Şekil 1.4. Hayvanlarda glutasyonun sentezi ve dağılımı.....	12
Şekil 1.5. GST izozimlerinin aktif bölgeleri.....	18
Şekil 1.6. Tip I, II ve III GST'lerinin filogenetik sınıflandırılması.....	20
Şekil 1.7. Bitkilerde antosiyanin sentez reaksiyonu.....	23
Şekil 1.8. Glutasyon S-konjugasyonu ile bitkilerde dedoksifikasyon mekanizması.....	23
Şekil 1.9. Benzopren halkasının enzimatik detoksifikasyonu.....	24
Şekil 1.10. Elektrofilik bir ksenobiyotiğin glutasyon ile konjugasyonu ve merkaptürik asit oluşum mekanizması.....	26
Şekil 1.11. GST katalize reaksiyonlar.....	27
Şekil 1.12. Stereoid izomerizasyon reaksiyonu.....	28
Şekil 1.13. Retionik asit izomerizasyon reaksiyonu.....	28
Şekil 1.14. Maleilasetoasetikasit izomerizasyon reaksiyonları.....	29
Şekil 1.15. Resveratrol yapısı.....	29
Şekil 1.16. Prostaglandin sentezi.....	30
Şekil 1.17. GSH ve CDNB'nin baz katalize nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonu.....	31
Şekil 1.18. Bitkilerde O <sub>2</sub> 'nin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'ye dönüşüm mekanizması.....	33
Şekil 1.19. Serbest radikallerin lipit peroksidasyonuna etkileri.....	34
Şekil 1.20. Reaktif oksijen türlerinin DNA üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 1.21. Yaban mersini bitkisinin görünümü.....	37
Şekil 1.22. Antosiyanidin ve Flavanollerin moleküler yapıları.....	38
Şekil 1.23. Tanen'in moleküler yapısı.....	39
Şekil 1.24. Diklorvos molekülünün yapısal formül.....	43
Şekil 1.25. Asetamiprit molekülünün yapısal formülü.....	44
Şekil 1.26. Imidakloprit molekülünün yapısal formülü.....	44
Şekil 1.27. Sipermetrin molekülünün yapısal formülü.....	45

<b>Şekil 1.28.</b> Siyalotrin molekülünün yapısal formülü .....	46
<b>Şekil 1.29.</b> Fenoksiaprop-p-etil molekülünün yapısal formülü .....	46
<b>Şekil 1.30.</b> Haloksifop-p-metil molekülünün yapısal formülü .....	47
<b>Şekil 1.31.</b> 2,4 Diklorofenoksi asetik asit molekülünün yapısal formülü.....	48
<b>Şekil 1.32.</b> Glifosfat molekülünün yapısal formülü.....	48
<b>Şekil 1.33.</b> Askorbik asit molekülünün yapısal formülü .....	49
<b>Şekil 1.34.</b> Kumarin molekülünün yapısal formülü.....	50
<b>Şekil 1.35.</b> Sodyum bisülfid molekülünün yapısal formülü .....	50
<b>Şekil 1.36.</b> Sitrik asit molekülünün yapısal formülü.....	51
<b>Şekil 2.1.</b> GSTP-1 enzim aktivitesini inhibe eden bitkisel polifenolik bileşikler.....	57
<b>Şekil 2.2.</b> İnsan rekombinant GST'lerini inhibe eden bazı polifenolik bileşikler .....	58
<b>Şekil 3.1.</b> Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması.....	66
<b>Şekil 3.2.</b> Glutasyon-agaroz immobilizasyonu .....	69
<b>Şekil 4.1.</b> Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	77
<b>Şekil 4.2.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği.....	78
<b>Şekil 4.3.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin glutasyon agaroz afinite kolonundan GSH ile elüsyon grafiği.....	79
<b>Şekil 4.4.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi SDS-PAGE fotoğrafı .....	80
<b>Şekil 4.5.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin $K_2HPO_4$ tamponu ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği .....	81
<b>Şekil 4.6.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek.....	83
<b>Şekil 4.7.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği .....	84
<b>Şekil 4.8.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık, $E_a$ , $\Delta H$ ve $Q_{10}$ değerlerine ait grafik.....	85
<b>Şekil 4.9.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği .....	86

<b>Şekil 4.10.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik .....	87
<b>Şekil 4.11.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	88
<b>Şekil 4.12.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği .....	89
<b>Şekil 4.13.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi fenoksiaprop-p-etil'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Fenoksiaprop-p-etil] grafiği .....	90
<b>Şekil 4.14.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Glifosfat izopropilamin tuzu'nun farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Glifosfat izopropilamin tuzu] grafiği .....	91
<b>Şekil 4.15.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Lamda-siyalotrin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Lamda-siyalotrin] grafiği .....	91
<b>Şekil 4.16.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine 2,4-diklorofenoksi asetik asit dimetil amin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [2,4-Diklorofenoksi asetik asit dimetil amin] grafiği .....	92
<b>Şekil 4.17.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Sipermetrin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sipermetrin] grafiği ...	92
<b>Şekil 4.18.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine İmidakloprit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [İmidaklopid] grafiği .	93
<b>Şekil 4.19.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Diklorvos] grafiği .....	93
<b>Şekil 4.20.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine haloksifop-p-metil'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Haloksifop-p-metil] grafiği .....	94
<b>Şekil 4.21.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Asetamiprit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Asetamiprit] grafiği ...	94
<b>Şekil 4.22.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine $Cd^{2+}$ nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [ $Cd^{2+}$ ] grafiği .....	96



<b>Şekil 4.23.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine $Ca^{2+}$ nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- $[Ca^{2+}]$ grafiği .....	96
<b>Şekil 4.24.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- $[Cu^{2+}]$ grafiği .....	97
<b>Şekil 4.25.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine $Mg^{2+}$ nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- $[Mg^{2+}]$ grafiği .....	97
<b>Şekil 4.26.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine $Ni^{2+}$ nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- $[Ni^{2+}]$ grafiği.....	98
<b>Şekil 4.27.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine askorbik asit in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [askorbik asit] grafiği .....	99
<b>Şekil 4.28.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine kumarin in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Kumarin] grafiği .....	99
<b>Şekil 4.29.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sitrikasit in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sitrik asit] grafiği .....	100
<b>Şekil 4.30.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfid farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sodyum sülfid] grafiği .....	100
<b>Şekil 4.31.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sodyum azid farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sodyum azid] grafiği .....	101
<b>Şekil 4.32.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Fenoksiaprop-p-etil'in inhibisyon etkisi .....	102
<b>Şekil 4.33.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosfat izopropilamin tuzu'nun inhibisyon etkisi .....	103
<b>Şekil 4.34.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Lamda-siyalotrin'nin inhibisyon etkisi .....	103
<b>Şekil 4.35.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine 2,4-Diklorofenoksi asetik asit'in inhibisyon etkisi .....	104
<b>Şekil 4.36.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Sipermetrin'in inhibisyon etkisi .....	104

<b>Şekil 4.37.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine İmidakloprit'in inhibisyon etkisi .....	105
<b>Şekil 4.38.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un inhibisyon etkisi .....	105
<b>Şekil 4.39.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivites üzerine Haloksifop-P-metil'in inhibisyon etkisi .....	106
<b>Şekil 4.40.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Asetamiprit'in inhibisyon etkisi .....	106
<b>Şekil 4.41.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Cd <sup>2+</sup> 'un inhibisyon etkisi....	108
<b>Şekil 4.42.</b> Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Mg <sup>2+</sup> 'nin inhibisyon etkisi .....	109
<b>Şekil 4.43.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Ca <sup>2+</sup> 'nin inhibisyon etkisi...	109
<b>Şekil 4.44.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Cu <sup>2+</sup> 'in inhibisyon etkisi.....	110
<b>Şekil 4.45.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Ni <sup>2+</sup> 'nin inhibisyon etkisi ...	110
<b>Şekil 4.46.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Askorbik asit'in inhibisyon etkisi .....	113
<b>Şekil 4.47.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Kumarin'nin inhibisyon etkisi .....	113
<b>Şekil 4.48.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sodyum sülfid'in inhibisyon etkisi .....	114
<b>Şekil 4.49.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sodyum azid'in inhibisyon etkisi .....	114
<b>Şekil 4.50.</b> Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sitrikasit'in etkisi.....	115

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Gradientli elüsyon için hazırlanan tüpler ve içerikleri .....	62
<b>Çizelge 3.2.</b> Yaban mersini GST enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği .....	67
<b>Çizelge 4.1.</b> Yaban mersini meyvesi jel filtrasyon ve afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları .....	79
<b>Çizelge 4.2.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M $K_2HPO_4$ tampon çözeltisi ile 0,1 M Tris-HCl çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	81
<b>Çizelge 4.3.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddeti için 0,1 M $K_2HPO_4$ tampon çözeltisi ile kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	82
<b>Çizelge 4.4.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	83
<b>Çizelge 4.5.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık, $E_a$ , $\Delta H$ ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesi çalışmaları .....	84
<b>Çizelge 4.6.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	85
<b>Çizelge 4.7.</b> Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	86
<b>Çizelge 4.8.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi için belirlenen optimal aktivite şartları ve stabil pH değeri .....	87
<b>Çizelge 4.9.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi için GSH ve CDNB substratları için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları .....	89
<b>Çizelge 4.10.</b> Yaban mersini meyvesi meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin $IC_{50}$ değerleri .....	95
<b>Çizelge 4.11.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların $IC_{50}$ değerleri .....	98
<b>Çizelge 4.12.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin $IC_{50}$ değerleri .....	101

<b>Çizelge 4.13.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan pestisitler .....	107
<b>Çizelge 4.14.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan metal iyonları.....	111
<b>Çizelge 4.15.</b> Yaban mersini meyvesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan diğer kimyasal maddeler.....	112
<b>Çizelge 4.16.</b> Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan kimyasal bileşikler.....	115

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşumuna neden olmadan %100 verim sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücrelerde organik maddelerin yapımı, yıkımı, sindirim olayı, kas kasılması ve hücresel solunum gibi önemli fizyolojik faaliyetler ile çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sistemli bir şekilde yürümesini sağlarlar. Bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Enzim, gereken enerji miktarını azaltarak reaksiyona giren maddelerin geçiş durumuna daha kolay gelmesini sağlayan bir mikro çevre oluşturur. Sonuç olarak, tepkimenin gerçekleşme yatkınlığı, dolayısıyla tepkime hızı artar (Garrett and Grisham 1999).

Enzimlerin, kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Diğer katalizörler gibi katalizledikleri tepkime sonunda tükenmez ve reaksiyonun dengesini değiştirmezler. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını  $10^{20}$ 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler  $10^2$ - $10^4$  kat artırabilmektedir (Lehninger 2005). Enzim ve substratların hidrofilik/ hidrofobik, yük ve şekil gibi birbirlerini tamamlayıcı özellikleri onların özgülüğünü ifade eder. Birbirine kimyasal olarak çok benzeyen maddeleri hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik, en basit hücrelerde dahi aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyonun meydana gelmesini sağlamaktadır (Jaeger and Eggert 2004).

Biyolojik kataliz midenin salgılarıyla, etin sindirimi üzerine ilk olarak yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedildi. Daha sonraki araştırmalara ise 1800'lü yıllarda tükürük ve çeşitli bitki özleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam edildi. İlk defa Louis Pasteur şekerin mayayla alkole dönüşümünün "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Pasteur ise bu fermentlerin canlı

maya hücrelerinin yapılarından ayrılmaz olduğunu ileri sürdü. Daha sonra; Eduard Buchner 1897'de maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bununda fermantasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir (Buchner 1897). Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırdı (Lehninger 2005).

James Sumner tarafından 1926'da üreazın kristallendirilmesi ve izolasyonu ilk enzim çalışmalarında yeni bir açılım sağladı. Sumner üreaz kristallerinin tamamen proteinden olduğunu buldu ve bütün enzimlerin protein yapısında olduğunu öne sürdü. 1930'larda pepsin, tripsin ve diğer sindirim enzimlerinin kristallendirilmesi sonucunda Sumner'in fikri geniş bir kabul gördü. Bu periyotta J.B.S Haldane "Enzimler" başlığında bir bilimsel makale yayınladı (Lehninger 2005).

Yirminci yüzyılın son yarısında hücrenel metabolizmanın tepkimesini katalizleyen enzimlerdeki araştırmalar yoğunlaşmış, bu durum ise binlerce enzimin saflaştırılmasına, yapılarının aydınlatılmasına ve bunların çoğunun kimyasal mekanizmasının nasıl çalıştığının anlaşılmasına yol açmıştır (Lehninger 2005).

Kinetik çalışmalar, enzim mekanizmaları açısından oldukça önemlidir. Birçok enzim ortak bazı kinetik özelliklere sahiptir. Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı, enzim konsantrasyonu sabit olması koşuluyla, substrat konsantrasyonu ile artar ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerine varıncaya kadar artış devam eder. Ancak  $V_{max}$ 'ta substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın kataliz hızı artmaz. Enzimlerin çoğu Michaelis Menten kinetiği gösterirler. Belli sıcaklıkta ve enzim konsantrasyonunda bu kinetiğe uyan enzimler değişen substrat konsantrasyonu ile başlangıç hızı arasında ( $V_0$ ) arasında hiperbolik bir eğri çizerler. 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, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Yıldırım 2010). Enzimatik tepkimeleri yavaşlatan veya durduran molekül ajanları 'inhibitör' olarak bilinmektedir. Enzimler hemen hemen bütün hücrel reaksiyonları katalizlediği için enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasında olması şüphesiz sürpriz değildir. Örneğin; aspirin (asetilsalisilat) enflamasyona sebep olan ve ağrı üreten prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder (Smith and Willis 1971).

İnhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır,  $K_M$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır (Segel 1975).

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 (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Yarışmalı inhibitör, yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece enzimin substrata bağlanması engellenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken  $K_M$  değeri artar (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

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 (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon çeşidinde ise inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim substrat (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 ortamdan sürekli çekildiğinden enzim substratta ES kompleksinin oluşum dengesini daha fazla sağa kaydırır ve  $K_M$  değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

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 “feedback” 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 2005). Bu gibi modülatörler inhibe edici ya da uyarıcı olabilirler (Nelson and Cox 2005).

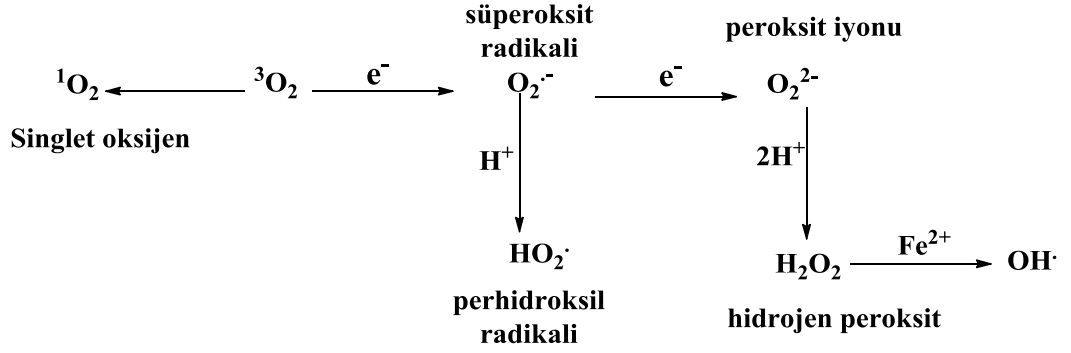


Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler, bu nedenle hücrelerdeki tüm kimyasal reaksiyonlar enzimler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu doğurmaktadır. Hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen gerçekleşmez, reaksiyonlar kendiliğinden meydana gelmez. Buda şunu ifade eder ki; enzimler protein yapısındadır ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA tarafından düzenlenip kontrol edilmektedir. Enzimler, aynı zamanda bir hücreyi diğerinden ayıran özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli ajanlarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Bir hücrede tüm kimyasal olaylardan sorumlu olan enzimler şüphesiz bitkiler içinde oldukça önemlidir. Ekosistemimizin bir bileşeni olan bitkiler aynı zamanda kendi enzim dizileriyle donatılmışlardır. Bitki enzimleri insanların metabolik enzimlerinden farklıdır ancak hücre savunma sistemlerindeki görevleri hemen hemen aynıdır (Karg and Kallio 2009).

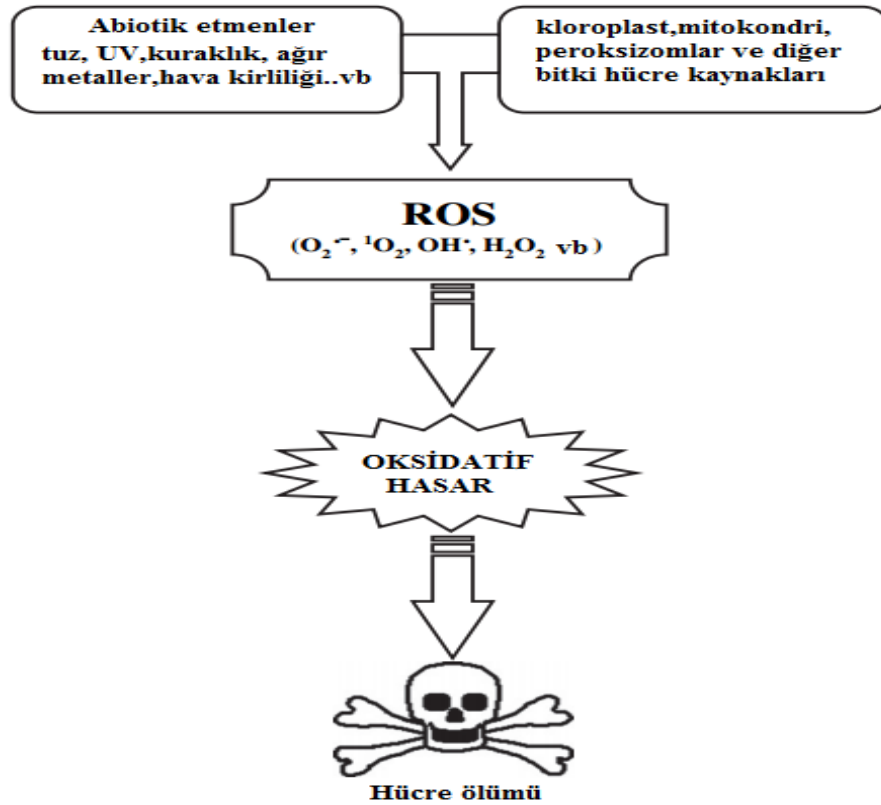
Oksidasyon, canlı organizmalar için oldukça önemli bir süreçtir. Oksijen, insan yaşamı için gerekli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri (ROS) vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock 1998).

Oksijenin eksik indirgenmesi sonucu meydana gelen ve çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu ROS normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formları olduğu görülmektedir (Nawar 1996). Oksidatif stres antioksidan mekanizmasındaki azalma ve ROS'un artması olarak açıklanmaktadır. Oksidatif stresin yükselmesi hücreleri ve dokuları zarar uğratmaktadır bu durum ise kanserinde içinde bulunduğu yaşlanma, kalp rahatsızlıkları, enflamasyon, immun sistem zayıflaması gibi önemli hastalıklara neden olmaktadır (Finkel and Holbrook 2000; Cai *et al.* 2004; Kaefer and Milner 2008; Huang *et al.* 2008; Govindarajan *et al.* 2005; Valko *et al.* 2006, 2007). Buda bize şunu açık olarak ifade etmektedir ki, rahatsızlıkların altında yatan temel sebeplerden birisi de oksidatif stres etmenleri serbest radikallerdir.



**Şekil 1.1.** Enerji transferinde ROS oluşumu

Dış orbitallerinde bir veya birden çok ortaklaşmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi olan atom ya da moleküllere serbest radikaller denir (Akyol 2004). Serbest radikaller aynı zamanda oksidatif hasarı tetikleyen ROS ve reaktif azot türleri (RNS) olarak tanımlanmaktadır.



**Şekil 1.2.** Serbest radikallerin hücreye etkisi (Sarvajeet and Narendra 2010)

ROS ve RNS, nitrikoksit sentaz (NOS) ve NAD(P)H oksidaz izoformları olan regüle enzimler aracılığı ile üretilirken süperoksit anyonu ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), tekli oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), peroksi ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoksi ( $\text{RO}\cdot$ ), hidroksi ( $\cdot\text{OH}$ ) ROS ve azot radikali gibi RNS kaynaklı serbest radikaller metabolizmada iç ve dış kaynaklar vasıtası ile üretilmektedir. Hidroksi radikali cereyan eden reaksiyonlar sonucunda doğrudan oluşabilir. Peroksi radikalleri lipid peroksidasyonu sırasında üretilirler (Reaven *et al.* 1998). Lipid peroksidasyonunda aldehit oluşumuna neden olan organik hidroperoksitler ve diğer alkoksi radikalleri oluşur. Aldehitler lipoproteinlerin bir parçası olan proteinlerin modifikasyonuna yol açmaktadır (Diplock 1998). Oldukça sitoksik bir etkiye sahip olan NO radikali lipoproteinlerin lipid peroksidasyonunu tetikleyen peroksinitrit formlarının oluşmasına neden olmaktadır (Packer and Cadenas 1996).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999).

Antioksidanlar, endojen ve eksojenler olmak üzere iki kısma ayrılır. Enzimatik endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; non-enzimatik antioksidanlar; melatonin, seruloplazmin, miyogloblin, bilirubin, glutatyon ve ferritindir (Diplock 1998). Eksojen antioksidanlara ise vitamin E, vitamin A, vitamin C, gıda ile alınan antioksidanlar ve bazı ilaçlar örnek verilebilir. Antioksidanlar sıklıkla intrasellüler bazen de ekstrasellüler olabilirler. Antioksidan savunma sistemleri bütün aerobik organizmalarda lipid peroksidasyonu ve diğer radikalik reaksiyonları inhibe ederek hücreleri oksidatif strese karşı korurlar (Ou *et al.* 2002).

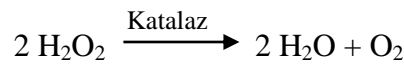
Antioksidanların birçoğu lipid perkronik hastalığın ilerlemesine engel teşkil ederler (Gülçin vd 2010). Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998).

Hayvansal organizmalarda olduğu gibi bitkiler de yaşamlarını devam ettirmek için serbest radikallere ve aktif oksijen türlerine (AOS) karşı çeşitli antioksidan sistemlere sahiptirler. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki kısma ayrılırlar. Enzimatik olanların başlıcaları direkt olarak AOS'ları temizleyen SOD, CAT, GPx ve peroksidazlar; antioksidanların aktif formlarının rejenarasyonunu sağlayan GR, dehidroaskorbat redüktaz ve monodehidroaskorbat redüktaz; lipit peroksit ürünlerini etkisiz hale getiren glutatyon S-transferazlar (GST), fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz ve askorbat peroksidaz ile antioksidan moleküller olan tokoferoller, askorbat, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Bowler *et al.* 1992; Noctor and Foyer 1998).

## 1.2. Antioksidan Enzim Sistemleri

### 1.2.1. Katalaz ve peroksidaz

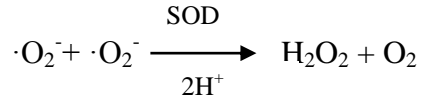
Bir metaloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir (Larson 1988). SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), “katalaz” enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (Duthie *et al.* 1989).



Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte  $\cdot OH$  radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Peroksidazlar da katalaz enzimiyle aynı özelliklere sahiptir (Larson 1988). Katalaz enzimi pürin ve fotorespiraton katabolizması, yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunu da içeren oksidasyon aracılı oluşan  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında oldukça önemlidir. Katalaz izoformları bitkilerden yaygın olarak çalışılmaktadır (Polidoras and Scandalios 1999).

### 1.2.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1), süperoksit anyonunun ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidrojen perokside ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltan metalloenzim ailesinin bir üyesi olup, bitkilerin farklı kısımlarında üretilen radikallerin hücrelere zarar vermesini önlemektedir (Fridovich 1986; Elstner 1991; Halliwell and Gutteridge 2000). Bu olayda SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan Zn önemli bir mineraldir. Hayvansal organizmalara benzer olarak  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dismutasyonunu gerçekleştirir. Fe-SOD kloroplast stromasında, Mn-SOD mitokondrilerde ve CuZn-SOD ise sitoplazma ve kloroplastlarda yer almaktadır (Alscher and Hess 1993).



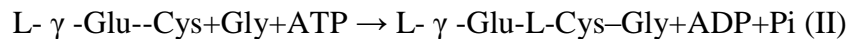
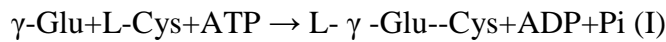
Bu reaksiyon, süperoksit anyonunun pH:11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir. Süperoksit anyonu ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) da,  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi bir oksidan olarak çoğu organik bileşikle direkt olarak reaktif değildir, ancak daha reaktif ve yüksek toksisiteye sahip oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Tütün bitkisinin yaşlı yapraklarında membran bozulmasının belirtisi olarak SOD ve katalaz enzim aktiviteleri azalma göstermektedir. Bu iki enzimin aktivitesi ve yapraklardaki lipid peroksidasyonunun derecesi arasında çok açık bir korelasyon belirlenmiştir. Bu enzimlerin, yaprağı lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korumada önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir (Larson 1988).

### 1.2.3. Glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır (Dale *et al.* 2002). Tiyol grubu taşıyan

bir tripeptid olan glutatyon (L-glutamil- $\gamma$ -L-cysteinil-glisin), serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır (Sies 1999; Vivancos *et al.* 2010). Canlı yapısında sentezlenebilir ve parçalanabilir. Bu bileşik vasıtasıyla gerçekleşen, çok sayıda enzim tarafından katalizlenen reaksiyon mevcuttur. Bunların oluşturduğu sisteme glutatyon metabolizması adı verilmiştir. Bu sistem vücutta bir antioksidan savunma sistemidir. Oksidatif hasarı önleyerek reaktif oksijen türlerine karşı hücreleri korumada görev alan glutatyon bitki metabolizmasında da oldukça önemli bir bileşiktir. Bitki dokularında indirgenmiş halde bulunan GSH peroksizom, kloroplast, mitokondri, vakuol, endoplazmik retikulum ve sitozol gibi organellerin yanısıra apoplast adı verilen kanallarda (Mittler and Zilinskas 1992; Jimenez *et al.* 1998), sülfat transportunun düzenlenmesi, metabolitlerin konjugasyonu, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi çeşitli proseslerde görev almaktadır (Xiang *et al.* 2001). GSH aynı zamanda bitkilerde büyüme ve gelişme ile ilgili durumlarda, hücrelerin olgunlaşması, ölümü ve ayrılması, patojenlere karşı bitkiyi koruma ve enzimatik düzenlenmede rol almaktadır (Rausch and Wachter 2005).

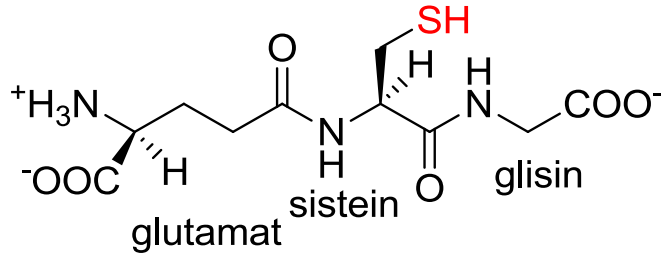
GSH'nin sentezi bütün biyolojik sistemlerde iki adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda; L-glutamat ve L-sisteinden oluşan  $\gamma$ -glutamil sistein,  $\gamma$ -glutamil sistein sentetaz ( $\gamma$ -ECS, EC 6.3.2.2) tarafından sentezlenir. İkinci adımda ise;  $\gamma$ -glutamil sisteinin C-bölgesinden glutatyon sentetaz (GSH: EC 6.3.2.3) enzimi aracılığı ile bağlanan glisininin reaksiyonundan GSH sentezi gerçekleşmektedir (Hell and Bergmann 1988, 1990).



Her iki enzimde mitokondride çok belirgin olmamakla bitkilerin yaprak ve gövdelerinin her ikisinde plastit ve sitozollerinde bulunmaktadır (Hell and Bergmann 1988, 1990; Ruegsegger and Brunold 1993).

Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Di Mascio *et al.* 1991).

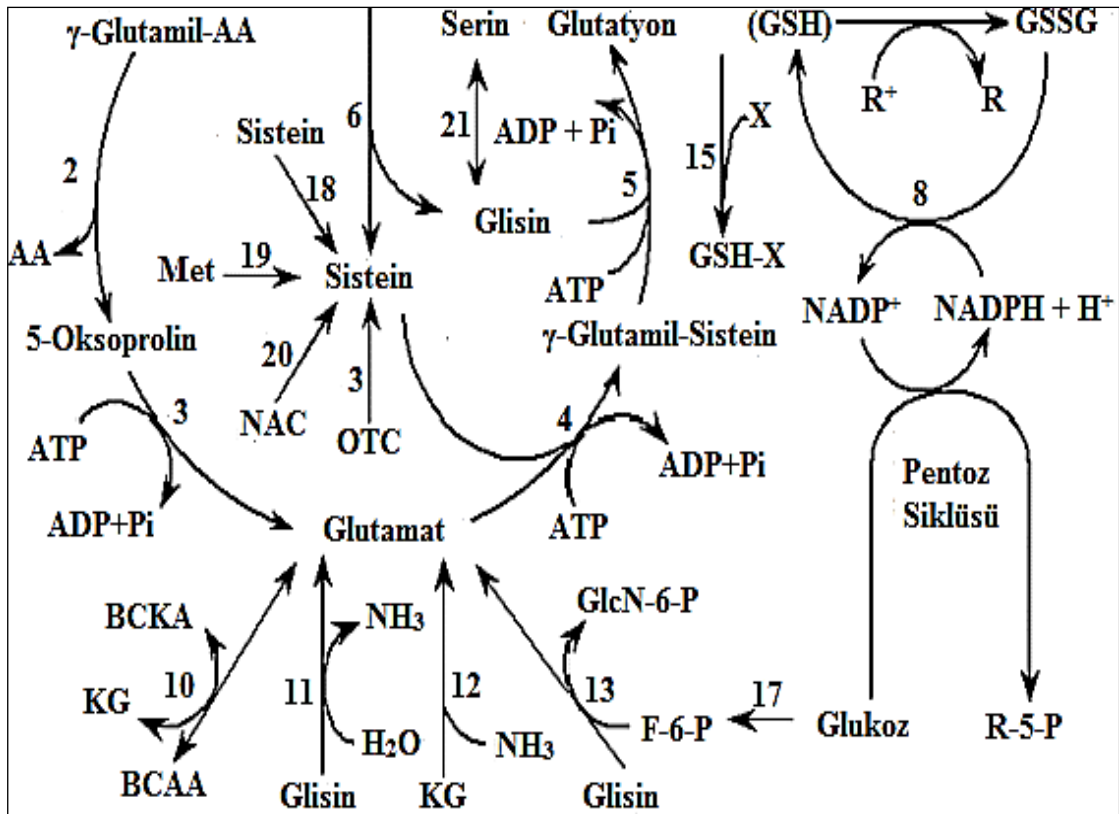
Glutatyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), süperoksit anyonu ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksi ( $\cdot\text{OH}$ ) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Şekil 1.3) (Larson 1988).



**Şekil 1.3.** Glutatyonun yapısı

Günümüzde çok sayıda oksidan ajana maruz kalan canlıların düzenli ve güçlü bir detoksifikasyon sistemine sahip olmaları gerekmektedir. Bu bakımdan bu alanda yapılan araştırmalar her geçen gün önem kazanmaktadır. Glutatyon, biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve  $\gamma$ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki sisteinin tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı (0.1-10 mM) hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutatyon'un %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (Meister 1983, 1995). Bu formda tutulabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH, glutatyon disülfür redüktaz (GR)'ın katalize ettiği reaksiyonda koenzim olarak görev alır (Thorburn and Kuchel 1985). Önemli bir indirgeyici güç olan GSH, hücre içi proteinlerin, sistein, dihidrolipoat ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, askorbat,  $\alpha$ -tokoferol gibi antioksidan moleküllerin korunmasında, ayrıca DNA'nın deoksiribonüklozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH ayrıca hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere, radyasyona karşı korunmasında, bazı ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostaglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde yer alır (Meister 1983, 1991, 1998). GSH homeostazı hücresel düzeyde,

biyosentez, oksidasyon, import ve eksport arasındaki dengeyle sağlanırken, doku düzeyinde GSH metabolizması ile ilgili işlemlere ve dokular arasındaki GSH akışına bağlı olarak düzenlenmektedir (Şekil 1.4) (Dass *et al.* 1992; Kaplowitz *et al.* 1996). Eritrosit hariç tüm hücrelerde gözlenen GSH salınımı, homeostatik mekanizmalar için önemli bir faktördür. GSH biyosentezinden sorumlu olan  $\gamma$ -glutamil döngüsü, koruyucu, metabolik, katalitik ve taşıma işlemlerinin bir kısmında, ayrıca GSH sentezi ve kullanımının düzenlenmesinde ve sistein amino asidinin taşınması ve depolanmasında oldukça önemlidir (Meister 1995)



**Şekil 1.4.** Hayvanlarda glutatyonun sentezi ve dağılımı.

Reaksiyonları katalizleyen enzimler şunlardır: 1)  $\gamma$ -Glutamil transpeptidaz, 2)  $\gamma$ -Glutamil siklotransferaz, 3) 5-oksoprolinaz, 4)  $\gamma$ -Glutamil-sistein sentetaz, 5) glutatyon sentetaz, 6) dipeptidaz, 7) glutatyon peroksidaz, 8) Glutatyon redüktaz, 9) süperoksid dismutaz, 10) BCCA transaminaz (sitosolik ve mitokondriyal), 11) glutaminaz, 12) glutamat dehidrojenaz, 13) glutamin: fruktoz-6-fosfat transaminaz (sitosolik), 14) nitrik oksid sentaz, 15) glutatyon S-transferaz, 16) NAD(P)Hoksidaz ve mitokondriyal solunum kompleksleri, 17) glikolizis, 18) glutatyonla bağımlı tiyosülfid, tiyoltransferaz ya da enzimatik olmayan reaksiyon, 19) transsülfürasyon yolu, 20) deaçilaz, 21) serin hidroksimetiltransferaz. Kısaltmalar: AA, amino asit; BCCA, dallanmış zincir içeren  $\alpha$ -keto asitler; GlcN-6-P, glukozamin-6-fosfat; GS-NO, Glutatyon-nitrik oksid bileşiği; KG,  $\alpha$ -ketoglutarat; LOO, lipid peroksil radikali; LOOH, lipid hidroperoksid; NAC, N-asetilsistein; OTC, L-2-oksetiazolidin-4-karboksilat; R., radikaller; R, radikal olmayanlar; R-5-P, ribulaz-5-fosfat; X, elektrofilik ksenobiyotikler (Wu *et al.* 2004).



GSH'lar toksik bileşikleri inaktif hale getirmede anahtar bir rol oynamaktadırlar. Yapılan araştırmalarda toksik savunma sistemine karşı yarışmalı olarak inanılmaz bir dzenlenmenin izlendiği bildirilmektedir (Swain 1977). Örneğin, bitkilerin patojen ve herbivorlara karşı bir savunma fonksiyonu olan flavanoller, opiyatlar ve fitoaleksinler gibi birçok kompleks sekonder metabolitler sentezlemektedir. Bitkiler, böcek, kuş ve diğer hayvanların bitkilerle beslenmesini engellemek için acı tadımsı alkaloid salgırlar. Modern kimya endüstrisi çevremizdeki pestisitleri kontrol etmek için, çok sayıda herbisit, insektisit ve sentetik ilaç geliştirmektedir. Zararlı bileşiklerin detoksifikasyon etkisi hücre ve organizmaların yaşamı için oldukça önemlidir. Birçok organizma, dokulardan elde edilen çeşitli bileşiklerin kataliz, dönüşüm ve eliminasyon sistemlerinin detoksifikasyonu ile toksik kimyasalların açığa çıkmasını engellemektedir. Elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonu için gerekli olan üç grup enzimin canlılarda bulunduğu bilinmektedir (Sandermann 1992).

Faz I Enzimleri (dönüşüm) : Öncelikli olarak oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Bu işlemlerle yabancı maddeler (bunlar ksenobiotik olarak bilinir) metabolizma yolunda faz II'ye hazırlanmış olur. Faz I metabolizması büyük ölçüde P450 enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar "heme" içeren proteinlerdir ve birincil olarak karaciğerde bulunurlar. "450" rakamı; "heme" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği enzime ait dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder. Birçok organizma, her biri kendi substrat özgülüğünde olan faz I ve faz II enzimlerinin çoklu izomerleri ile kodlanmıştır (Lee 2003).

Faz II Enzimleri (konjugasyon, UDP: glukoz transferaz) Glukronat veya sulfat ile konjugasyon ve asetilasyon işlemlerini yaparlar (Gupta and Waldhauser 1997).

Faz III Enzimleri (ayırma, bölme) ATP'ye bağlı membran pompaları, tanıma ve boşaltım veya ayırma için membranlar arası konjugasyon transferi yaparlar. Bitki ve hayvanların her ikisinde de glutatyon pompaları membranlar arası transfer için glutatyon S-konjugatlarını (bağlayıcı) tanırlar bu durum hayvanlarda vücuttan atılma ile

olurken bitkiler de ise vakuoller veya apoplastlar ile olmaktadır (Lamoureux and Rusness 1989, 1993; Sandermann 1992, 1994; Martinoia *et al.* 1993; Mannervik and Danielson 1988). Detoksifikasyon enzimlerinin substratları tanımda oldukça önemli olduğunu vurgulamalıyız. Bitkilerde bu enzim ailesinin üyeleri, doğal ve ksenobiyotik substratların tanınması ve taşınmasında belirleyici bir rol oynamaktadırlar (Sandermann 1992).

GSH konjugasyonu hayvanlardaki lökotrien benzeri bileşiklerin biyosentezi için gerekli olup aynı zamanda bu bileşiklerin hücre dışı biyolojik aktiviteleri için glutatyon pompalarından transferleri gerekmektedir (Samuelsson 1983; Soderstrom *et al.* 1985; Ishikawa 1992). Bitkilerde bazı sekonder metabolitler hücreler tarafından üretilse bile fitotoksiktir ve bu yüzden vakuollerdeki hücre lokalizasyonu önemlidir (Matern *et al.* 1986). Antosiyanin bileşiklerinin vakuollere transferinde GSH konjugasyonu gerekmektedir. Pigmentlerin uygun olmayan stoplazmik dağılımlarda yalnızca antosiyanin bileşikleri değil aynı zamanda toksik hücrelerde geçiş yapabilmektedir (Sandermann 1992, 1994).

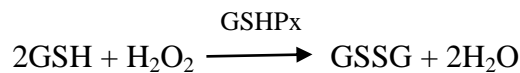
Glutatyon, peroksidaz enzim ailesinin bir kofaktörü olmasının yanı sıra, askorbik asit metabolizmasını, hücreler arası iletişimin sürdürülmesini sağlayan ve genel olarak proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının okside olmasını ve çapraz bağlanmasını engelleyen diğer birçok metabolik süreçte yer almaktadır. Ayrıca hücre içi bakır transportunda da işlev görür, GSH bakır iyonları ile şelatlar oluşturur ve bunların serbest radikal oluşturma kapasitelerini azaltır. GSH koruyucu bir ajan olarak lökoeritrin sentezinde yer alan enzimler ve glioksilazları da içeren farklı metabolik yollarda çalışan bazı enzimler için de kofaktör olarak rol oynar. GSH protein katlanmasında ve insülin gibi disülfid bağları taşıyan proteinlerin yıkılmasında da rol alır (Halliwell and Gutteridge 1999).

Redoks sistemi tarafından düzenlenen sinyal iletimi, sisteinin depolanması ve transportu, hücre bölünmesinin düzenlenmesi, immun sisteminin düzenlenmesinde de rol almaktadır. GSH'ın bütün bu metabolik ve hücrenel düzenleyici fonksiyonlarındaki

anahtar mekanizma tiyol-disülfid değişimi dengesidir. Enzimleri ve sinyal moleküllerini de içeren birtakım fizyolojik proteinlerin fonksiyonu protein tiyoller ve düşük moleköl ağırlıklı disülfidler arasındaki tiyol-disülfür değişimi tarafından düzenlenmektedir. Bu şekilde GSH'ın sistein rezidüsündeki –SH yan zinciri onun fizyolojik özelliklerinin bir kısmını yerine getirir. Disülfid oluşumu iki elektron oksidasyonunu içeren geri dönüşümlü bir süreçtir. Bu süreçte yer alan elektron donör ve akseptörleri O<sub>2</sub>, nikotinamid ve flavin kofaktörler ile diğer tiyoller ve disülfürlerdir. Reversibl tiyol-disülfid değişim reaksiyonları bir disülfidin (S=S) iki sülfür atomundan birine bir tiyölün nükleofilik saldırısı ile meydana gelir (Sen 1997).

Oksidatif stres koşulları altında ROS, GSH tarafından indirgenirken, GSH, GSSG'ye yükseltgenir. Spontane oksidasyona karşı nispeten dirençli olmasına karşın, GSH, HO• radikali ile çok hızlı ve non-enzimatik olarak reaksiyon vermektedir. Aynı zamanda azot trioksit (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) ile de reaksiyona girmektedir. Bir kimyasal antioksidant olmasıyla beraber GSH, peroksitlerin GPx aracılığıyla enzimatik olarak indirgenmesini sağlar ve böylece GSSG meydana gelir (Griffith 1999).

Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GSHPx enzimi, glutatyon'un indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir. Glutatyon peroksidaz membran lipid peroksidasyonu onarımı yapabilen ve membranı oksidatif hasardan koruyan bir enzimdir (Ursini *et al.* 1995; Kühn and Borchert 2002). Bu enzim aynı zamanda çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin indirgenmesini gerçekteştirip hidroperoksitlerin rejenerasyonunu sağlayan enzim ailesinin bir bileşenidir (Ursini *et al.* 1995; Kühn and Borchert 2002).



#### 1.2.4. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi

Glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7.) ökaryot ve prokaryot hücrelerin her ikisinde de bulunan flavo protein okside redüktaz ailesinin bir üyesidir (Romero-Puertas *et al.*

2006). GR katalizlediği ürün olan GSH ile savunma sisteminde reaktif oksijen türlerine karşı önemli bir rolü olan ve ASH-GSH döngüsünün potansiyel bir enzimidir. Glutasyon redüktaz yoğun olarak kloroplastlarda bulunurken, az bir kısmı da sitozol ve mitokondride bulunmaktadır (Edwards *et al.* 1990; Creissen *et al.* 1994). GSSG disülfid bağlarının NADPH'a bağımlı reaksiyonu (GR enzimi GSSG'yi GSH'a çevirmek için NADPH'ı kofaktör olarak kullanır) katalizleyen GR, bitkilerin antioksidatif proseslerinde ve birçok metabolik düzenlenmede görev alan GSH'ın redükte formunun oluşumunu ve glutasyon havuzundaki GSH'ın devamlılığını sağlamaktadır (Reddy and Raghavendra 2006; Chalapathi *et al.* 2008). GR aynı zamanda GST enziminin bir substratıdır (Singh *et al.* 2008). Canlı hücrelerde GSH/GSSG oranının belirli düzeylerde korunması hayatidir.

#### **1.2.5. Glutasyon S-transferaz**

Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18), çok sayıda elektrofilik ksenobiyotiği tripeptid glutasyon (GSH;  $\gamma$ -glu-cys-gly) ile bağlayarak biyolojik sistemlerden uzaklaştırılmasını sağlayan ve değişik mekanizmalarla detoksifikasyon sistemine katılan geniş ve kapsamlı bir enzimdir. GST enzimi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundaki Faz II reaksiyonlarına katılmasının yanı sıra, kovalent veya kovalent olmayan bağlanmalarla dolaşımdaki bazı toksik maddeleri uzaklaştırır ve peroksidaz aktivitesiyle organik hidroperoksitlerin sebep olduğu strese karşı da antioksidan aktivite oluşturur (Hayes and Pulford 1995; Güvercin *et al.* 2008).

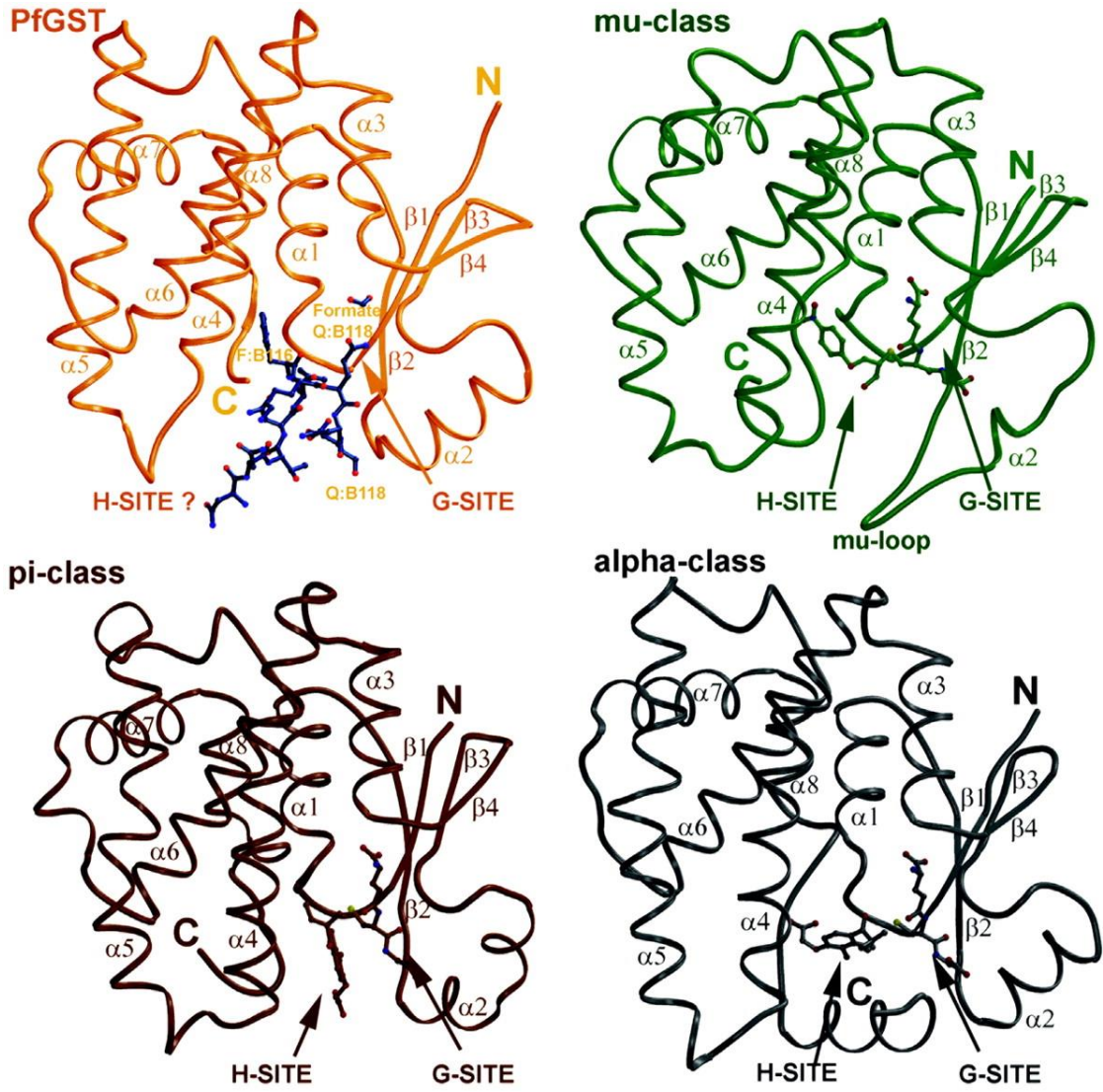
Rastgele dağılıma sahip olan GST, aerobik organizmalarda GSH ile birlikte çalışarak hücreleri elektrofilik atak ve oksidatif hasardan korumaktadır. Aynı zamanda GST'ler, mutagenler (mutasyona neden olan) karsinojenler ve diğer toksik bileşenlerin hücre içerisindeki detoksifikasyonundan sorumludurlar (Sandermann 1992).

### 1.2.5.a. Glutasyon S-transferaz enziminin yapısı

GST'ler (sitoplazmik) iki aynı alt üiteden homodimerler veya farklı alt üiteden heterodimerlerden oluşmuşlardır. Her bir alt üite, iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif konuma sahiptir. GST'nin üç boyutlu yapısı domuz akciğerinden pi sınıf enzimi için ilk kez 1991'de belirlenmiştir. İnsandaki GSTP1-1'in yapısı 1992'de plasentadan saflaştırılmıştır. Daha sonra da insan GSTA1-1 ve GSTM2-2 enzimlerinin yapıları tanımlanmıştır. GST'ler herbir altbirim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23.000- 29.000 dalton moleküler ağırlığındadır. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur.

Herbir GST altbiriminin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşur. N-terminal domain bir  $\beta$ -sheet ve üç  $\alpha$ -heliks yapısında düzenlenmiş aşağı yukarı 80 aminoasitten oluşan GSH'ın bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanmaları için ihtiyaç duyulan H bölgesinden oluşmaktadır. C-terminal domain kalan 5 veya 6  $\alpha$ -heliks yapısındaki amino asidi içerir (Whalen and Bayer 1998).

Sıçanlar, fareler ve insanlardan izole edilen tüm sınıf a genleri 11-12 kb uzunluğunda ve 7 ekzon içerir. Sınıf  $\mu$  genleri populasyonda polimorfiktir, aşağı yukarı 5 kb uzunluğunda ve 8 ekzon içerir. Hamster 9 ekzona sahiptir. Beş alt ünitesi vardır ve aminoasit seviyesinde birbirlerine %80 benzerdir. Sınıf  $\pi$  genleri aşağı yukarı 3kb uzunluğunda ve 7 ekzon içerir. Birçok ekstrahepatik organdan purifiye edilmiştir. Sınıf  $\theta$  genleri insanda polimorfiktir ve 5 ekzona sahiptir. Enzimin alt birimi, farklı iki mekansal etki göstermesi ile GST'nin modüler yapısından aydınlatılmıştır (Sheehan *et al.* 2001). GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir (Abu-Hijleh 1999; Edwards and Dixon 2000).



**Şekil 1.5.** GST izozimlerinin aktif bölgeleri (Fritz-Wolf 2003).

Enzimin G bölgesi yüksek olarak GSH molekülüne ilgi duyarkan, GSH'nin türevleri olan homoglutasyon ve  $\gamma$ -glutamilsisteini de bağlayabilmektedir. GSH'nin bağlanması tiyol grupları üzerinden gerçekleşen iyonik bir bağlanmadır (Mannervik and Danielson 1988).

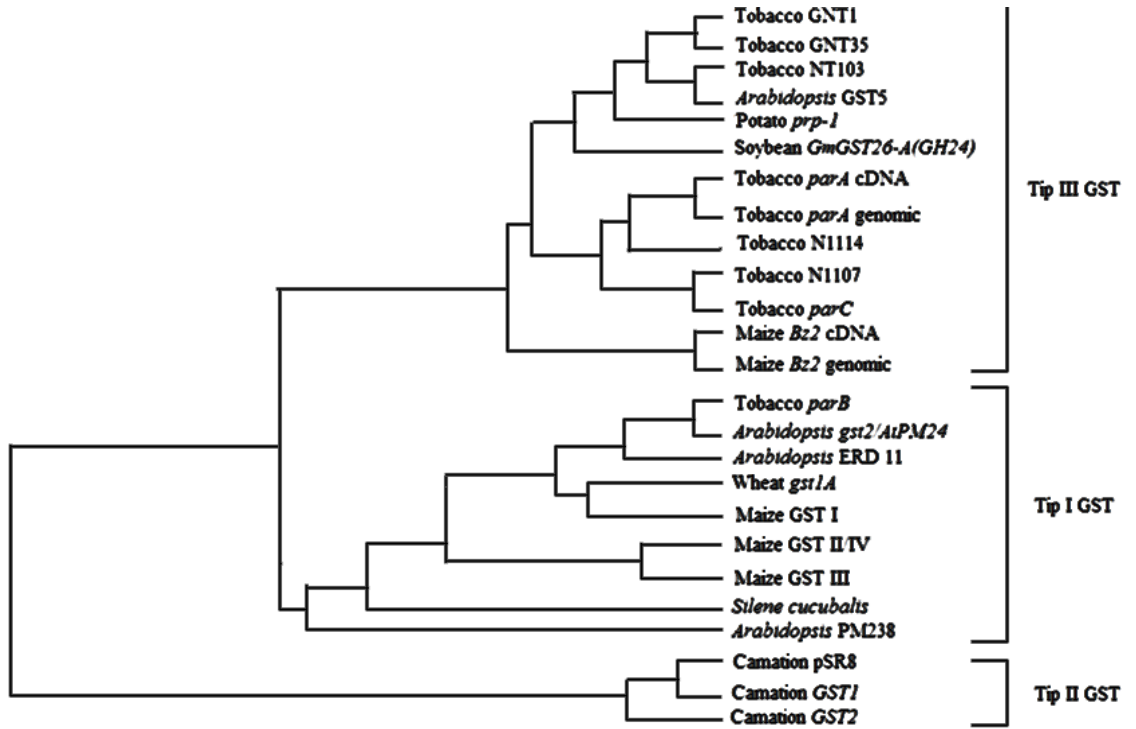
Enzimin aktif bölgesine yerleşen tirozin kalıntısı katalitik fonksiyonlar açısından oldukça önemlidir (Amstrong 1997).

Glu- Ser-Arg üçlü grubunu içeren G-bölgesi Tip I ve III GST'lerde belirgin bir farklılık içermektedir. Tip I'de birinci pozisyonda bulunan glutatyon Aspartat ile konservatif (dışarı ile etkileşimi olmayan) süstitüsyon olabilirken Ser-Arg bütün Tip I'lerde aynı şekilde bulunmaktadır. Tip III'de ise Glu-Ser ikili rezidüsü hep aynı kalırken üçüncü pozisyonda bulunan Arg, Leu ile yer değiştirebilmektedir (McGonigle *et al.* 2000). Trp rezidüsü bütün tip I ve tipIII GST'lerde gözlemlenirken Tip II de rastlanmamaktadır.

#### **1.2.5.b. Bitki GST enzimlerinin sınıflandırılması**

Memelilerde sitozolik GST'ler özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve amino asit diziliş benzerliklerine göre alfa ( $\alpha$ ), pi ( $\pi$ ), mü ( $\mu$ ), teta ( $\theta$ ), sigma ( $\sigma$ ), zeta ( $\zeta$ ) ve omega ( $\omega$ ) olarak 7 gruba ayrılırlar (Board *et al.* 2000).

Bitki GST enzimlerinin sınıflandırılması aminoasit sekanslarının aydınlatılması ve intron-ekzonların yerleşimine bağlıdır (Droog *et al.* 1995; Marrs 1996). Bitki GST'leri, dizi koruma kombinasyonu, çapraz immünolojik reaktiviteleri ve genlerin intron-ekson yapılarına göre; Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç sınıf altında toplanmaktadırlar. Tip I GST'leri iki introna sahiptir. Birçoğu; reaktif oksijen türleri, dehidrasyon, çeşitli çevresel etmenler, oksin (bitki büyümesini düzenleyici maddeler) ve etilen (bitkilerde meyvelerin olgunlaşması sırasında üretilir) hormonları aracılığı ile dönüşümlü ya da transkripsiyonel olarak uyarılırlar. Tip II GST'leri dokuz intronlu olup şimdiye kadar sadece karanfil bitkisinde çalışılmıştır. Tip III GST'leri ise tek intronlu olup ağır metaller, çeşitli fitohormonlar ve patojen ataklarla uyarılmaktadırlar. (Marrs 1996; Droog *et al.* 1995; Alfenito *et al.* 1998).



**Şekil 1.6.** Tip I, II ve III GST'lerinin filogenetik sınıflandırılması (Marris 1996)

Droog ve arkadaşları bitki GST genlerini, Tip I, Tip II, and Tip III olmak üzere üç başlık altında toplamıştır, akabinde Marris (1996) Tip IV sınıflandırılmayan bir alt grup daha eklemiştir. Bu yeni terimlendirilmiş sınıflandırma bitkiler için benimsenmiştir. Bu yüzden bitki GST'lerinin yeni sınıflandırılması;

Pi (F) → bitki – (yenilenmiş) Tip I

Zeta (Z) → (yenilenmiş) Tipe II

Tau (U) → bitki→ (yenilenmiş) Tip III

Theta(T) → (yenilenmiş) Tip IV

şeklinde yeniden düzenlenmiştir.



## **TİP I**

Gen yapıları Şekil 1.6'da belirtilen GST'ler üç ekzon ve iki intron içermektedir (Marrs 1996; Karam 1998). Bu enzimlerin hepsi 1- Klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve herbisit alaklor ((2-chloro-N-(2,6- diethylphenyl)-N-(methoxy-methyl) asetamid'e karşı aktivite göstermektedir. Bazı tip I GST'ler savunma sisteminde, patojen atak, yaşlanma ve lipid peroksidasyonunda görev alırken (Alfenito *et al.* 1998), diğer bir kısmı ise oksin hormonunun indirgenmesini sağlamaktadır (Marrs 1996).

Tip I GST enzimleri mısır, arabidopsis, brokoli, buğday, gıvışgan otu, şeker kamışı ve tobacco'dan elde edilmiştir. En iyi karakterizasyon mısırdaki gözlenmiştir. Bu grup GST I, GST II, GST III, and GST IV mısır GST enzimlerini içermektedir (Karam 1998).

GST mısır izomerleri I, III ve IV homodimer olarak molekül ağırlıkları sırasıyla 29, 26 ve 27 olarak bulunmuştur, GST II ise 29 kDa GST I ve 27 kDa GST IV altbirimlerini içeren heterodimer karışımı olarak belirlenmiştir (Reinemer *et al.* 1996).

## **TİP II**

Bu GST'ler on ekzon ve dokuz nitron içermektedir (Marrs 1996; Karam 1998) ve GST I ve GST II karanfilin çiçeklerinden çalışılmıştır. Karanfilin substrat spesifikliğinin lipid peroksidasyonuna katkı sağladığı spekülasyonları olsada tam olarak bilinmemektedir (Karam 1998).

## **TİP III**

Gen yapısı bilinen bu GST enzimleri iki ekzon, bir intron içermektedir. Bu alt sınıfın genleri orijinal olarak birçok türden ayınlatılmıştır. Örneğin; bezelyede GST III GmHsp26A veya GST2, patateste GST1 parA/Nt114, parC/Nt107 genlerinden oluşmaktadır (Karam 1998).

#### **TİP IV (Sınıflandırılmayan GST'ler)**

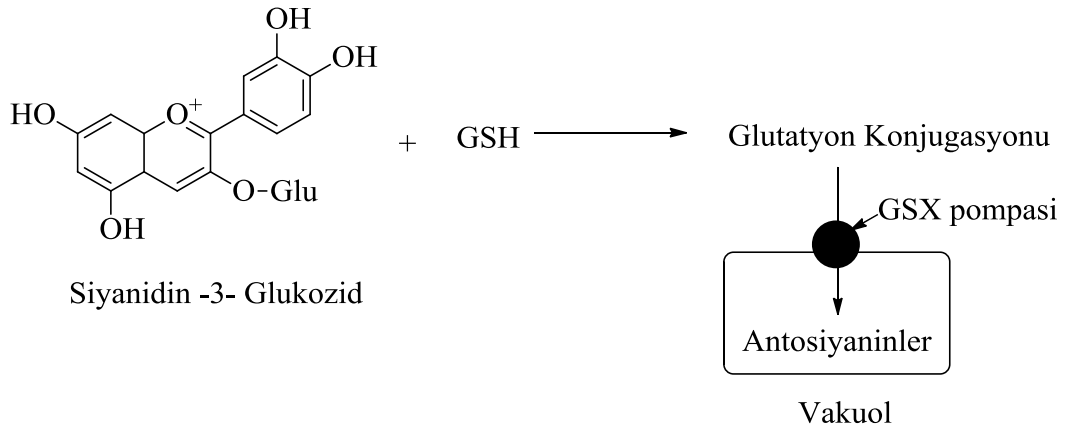
Birçok bitki GST enzimi henüz karakterize edilememiştir, bu enzimlerin aminoasit sekansları bilinmediği için sınıflandırılmayan GST olarak adlandırılırlar ve süpürge darısı GST 1-6, GST I, II, III, IV, nohut (37-47 kDa) örnek verilebilir (Marrs 1996).

##### **1.2.5.c. GST enziminin fonksiyonları**

Glutatyon S-transferazlar E.coli'den memelilere kadar çok geniş bir çalışma alanına yayılmıştır (Mannervik and Danielson 1988). Glutatyon S-transferazlarla bu kadar yaygın araştırma yapılmasının nedeni onların laktonlar, alkiller, aril halidler, kinonlar, epoksitler, esterler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir kısmını katalizleme özelliğine sahip olmalarıdır. GST'lerin tanıdığı substratların sayısı fazla olmasına rağmen, substratların ortak özellikleri çoğunun elektrofilik bir merkez taşımaları ve hidrofilik oluşlarıdır (Çoşkun 2007).

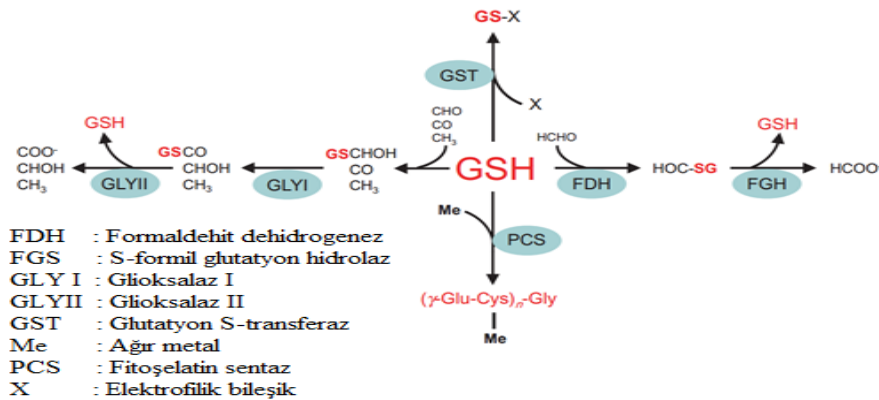
Glutatyon S-transferaz enzimi normal hücre metabolizmadaki rolünün yanı sıra, ksenobiyotik bileşiklerin büyük bir bölümünün toksiksizleştirilmesinde ve bitkilerdeki herbisit detoksifikasyonu, hormon dengesi, hidroperoksit detoksifikasyonu, apoplastların işleyişi, biyotik ve abiyotik strese karşı savunma oluşturması gibi bir çok proseste görev almaktadır (Dixon and Edwards 2009). Yakın zamanda keşfedilen GST alt sınıfları, ağır metal zehirlenmesi, ve oksidatif stres gibi patojen etkilerden kaynaklanan strese bağlı birçok tepkimeyi kapsamaktadır. Buna ilaveten; bitki GST enzimi, antosiyanin sentezi (Şekil 1.7) ve sinnamik asit gibi ikincil bitki metabolitlerin ve bitkilerin normal gelişiminde önemli rol oynar.

Antosiyanin Sentezi ( Pi ve Tau sinifi [Mars *et al.* 1995; Alfenito *et al.* 1998])



**Şekil 1.7.** Bitkilerde antosiyanin sentez reaksiyonu

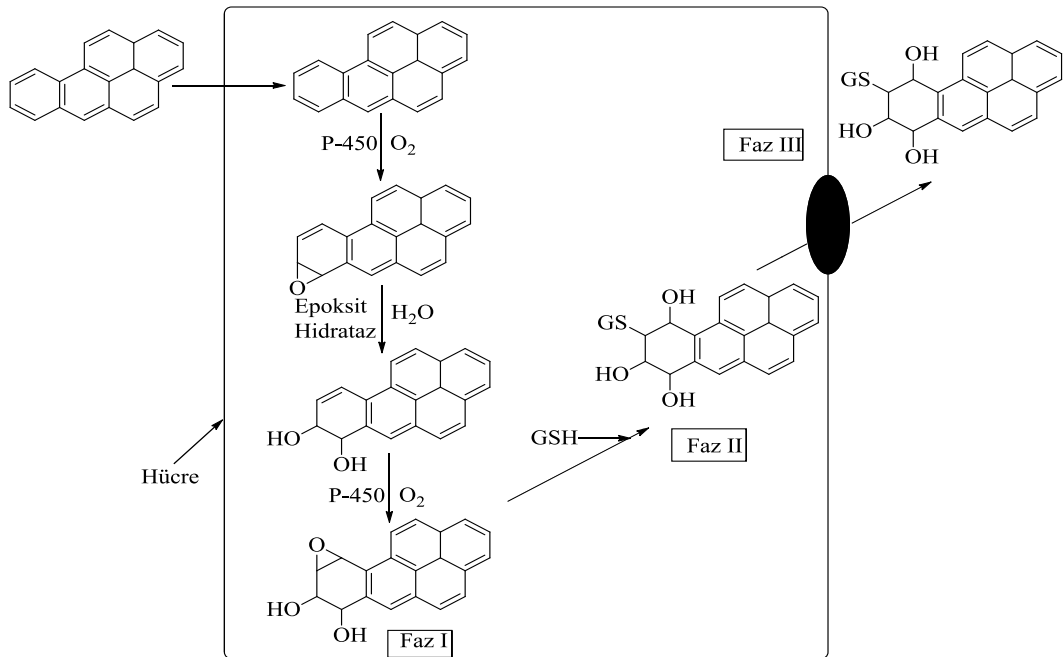
Hücrenin çekirdek, peroksizom, ve kloroplast gibi kısımlarında az olarak bulunan GST'ler uzun bir süre, sitozolik enzimler olarak düşünülmüştür (Thatcher *et al.* 2007; Dixon and Edwards 2009). Bitkilerdeki GST ailesi fonksiyonel ve biyokimyasal çeşitlilikleri yanısıra geriye kalan spesifik türlerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarının aydınlatılması açısından dikkat çekicidir. Buna ilaveten konjugasyon reaksiyonlarının katalizlenmesi yanında bazı GST'ler antioksidatif fonksiyona sahiptir (Şekil 1.8). DHAR bu tip GST enzimine bir örnektir (Wagner *et al.* 2002; Dixon and Edwards 2009).



**Şekil 1.8.** Glutasyon S-konjugasyonu ile bitkilerde dedoksifikasyon mekanizması (Noctor *et al.* 2012)

GST'ler, iki farklı peroksit arasında açığa çıkan bazı spesifik organik peroksitleri de indirgeyebilirler (Wagner *et al.* 2002; Dixon and Edwards 2009; Dixon *et al.* 2010). Bazı GST'ler  $H_2O_2$  tarafından güçlüce indirgenebilirler (Levine *et al.* 1994; Willekens *et al.* 1997; Wagner *et al.* 2002). Örneğin, Belirli GST kopyaları  $H_2O_2$  nin hücre içinde kullanılabilirliğinin yükseltilmesi açısından yararlı elemanlar olarak değerlendirilebilirler (Vanderauwera *et al.* 2005; Queval *et al.* 2007, 2009; Chaouch and Noctor 2010). Bunların yanında birçoğu salisilikasit ile indirgenbilir (Sappl *et al.* 2009).

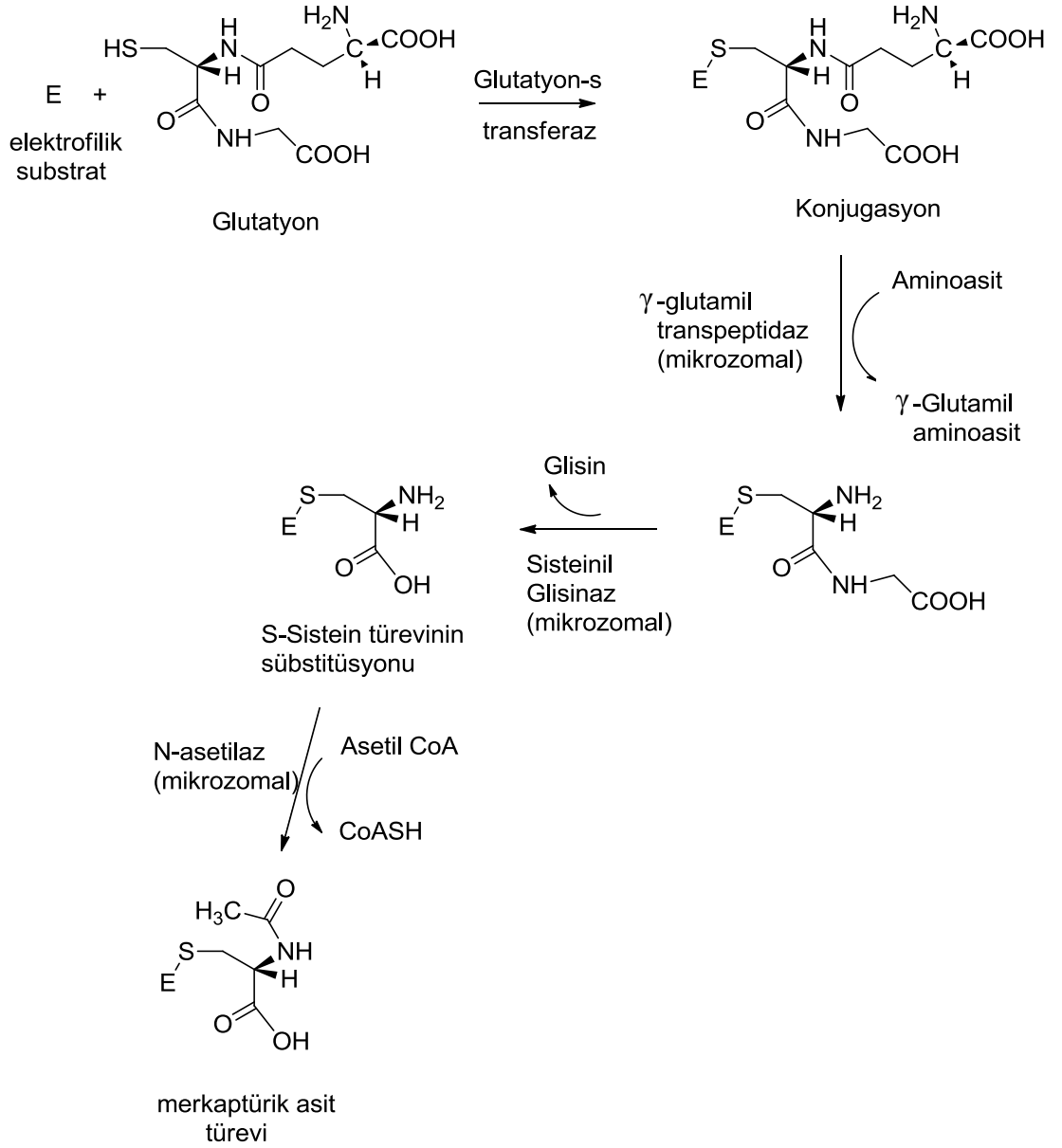
Ksenobiyotikler vücutta bulunan yabancı bileşiklerdir. Ksenobiyotiklerin mekanizması Faz I ve Faz II reaksiyonları üzerinden yürümektedir. Faz I de gerçekleşen reaksiyon sitokrom P450 (monooksijenaz) olarak bilinen enzimlerin katalizlediği bir hidroksilasyondur. Faz I de yer alan diğer reaksiyonlar ise redüksiyon ve hidrolizdir. Faz II de ise Faz I de oluşan bileşiklerin çeşitli polar metabolitlere dönüştürülmesi sağlanmaktadır. Her iki faz sayesinde ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüğü artar ve vücuttan uzaklaştırılması kolaylaşır (Sinnat and Krajinovic 2000). Glutasyon S-transferazlar elektrofilik kabiliyetteki ksenobiyotiklerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan dimerik yapıdaki enzimlerdir (Ketterer *et al.* 1992).



Şekil 1.9. Benzopren halkasının enzimatik detoksifikasyonu

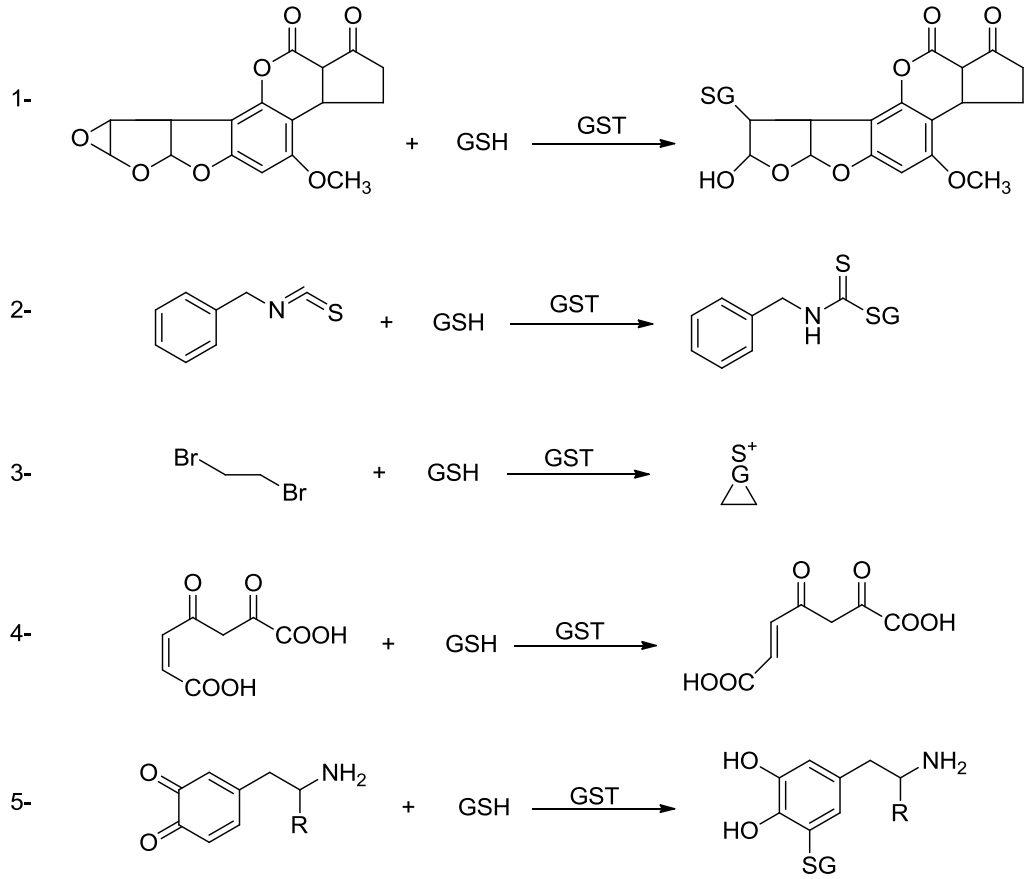
Plazma membrandan kolayca difüze olan ksenobiyotikler, sitokrom P450 sistemi içinde substrat olarak davranmakta ve bir epoksit bileşiği oluşturmaktadır. Bu epoksit bileşiği, epoksit hidrataz enzimi için bir substrat niteliğindedir. Elde edilen diol, sitokrom P450 sistemi enzimleri ile tekrar aktifleştirilerek mevcut ksenobiyotiğin, kanserojen ve mutajenik olan bir diol-epoksit türevini oluşturmaktadır. Bu reaksiyonların her ikisinde mikrozomal olup Faz I de gerçekleşmektedir. GST'ler daha çok GSH'ın konjugasyonunu katalizleyen sitozolik Faz II enzimleridir. GSH-ksenobiyotik konjugasyonu hücreden kolayca difüze olması için oldukça hidrofildir ve GS-X pompası gibi bir trans membran ile aktive edilerek pompalanmalıdır (Ishikawa 1992). Buda gösteriyor ki; GSH kalıntılarının plazma membrandaki geri difüzyonu engellemesinden dolayı hücredeki ksenobiyotik salınımı tek yönlü gerçekleşmektedir (Şekil 1.9). Memelilerde ise bu durum merkaptirik asit türevlerine dönüştürülen ksenobiyotiklerin idrar ile dışarı atılması şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Elektrofiller vasıtasıyla glutasyonu bağlayabilen enzimler olan GST'lerin merkaptirik asit biyosentezindeki rolleri ilk kez 1961 yılında Booth ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (Şekil 1.10) (Booth *et al.* 1961).



**Şekil 1.10.** Elektrofilik bir ksenobiyotiğin glutatyon ile konjugasyonu ve merkaptürük asit oluşum mekanizması (Habig *et al.* 1974).

Glutatyon S-transferaz enzimleri nükleofilik aromatik süstitüsyon, izomerizasyon, peroksidaz reaksiyonları, epoksit halkası açılımı, alkil ve aril halojenürler, izotiyosiyanatlar,  $\alpha$ ,  $\beta$  doymamış karbonil sistemleri ve kinonların reaksiyonlarını ve Michael tipi katılma gibi birçok reaksiyonu katalizlemektedir (Hayes and Pulford 1995).



### Şekil 1.11. GST katalize reaksiyonlar

1-Aflatoxin B<sub>1</sub>-8,9 epoksit, 2- benzilzotiyosiyanat, 3- dibrommetan, 4- maleilasetoasetat, 5- o-quinon türevi

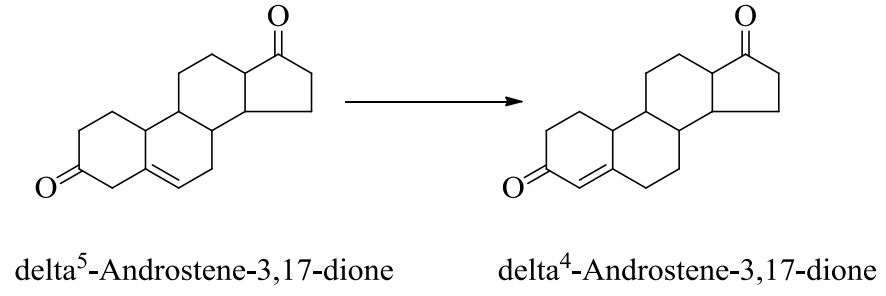
Glutatyon S- transferaz enzimlerinin organik tiyosiyanatlar ile reaksiyonu durumunda, GS-; -C≡N ve RS- kısımlarının bağlı polariteleri tarafından belirlenen bir tarafa atak yapar. R gruplarının elektronik karakteristiği, atak bölgesine karar vermede rol oynar. Alkiltiyosiyanatlar ve benziltiyosiyanatlar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

GST, elektrofilik merkez içeren bileşiklerle GSH'ı bağlama kabiliyetindedir. Konjugasyon reaksiyonu için gerekli elektrofilik fonksiyonel grupta bir C, bir N veya

bir S atomu yer almalıdır. GST işlevini yerine getirebilmek için GSH'a mutlak ihtiyaç duymaktadır (Whalen and Bayer 1998).

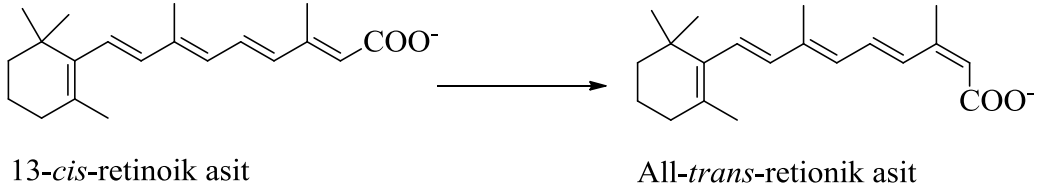
Yukarıdaki reaksiyonlara ilaveten bitkilerde gerçekleşen Glutatyon S-transferaz katalize tepkimelere aşağıdaki reaksiyonlar örnek verilebilir.

Steroid izomerizasyonu (Pi sınıfı; [Chen and Juchau 1998])



**Şekil 1.12.** Stereoid izomerizasyon reaksiyonu

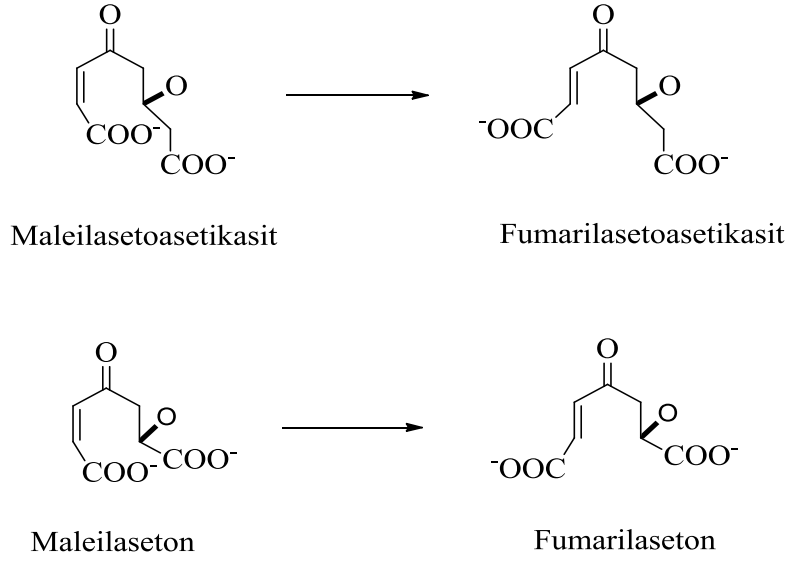
Retionik asit izomerizasyonu (Pi sınıfı: [Chen and Juchau 1998])



**Şekil 1.13.** Retionik asit izomerizasyon reaksiyonu

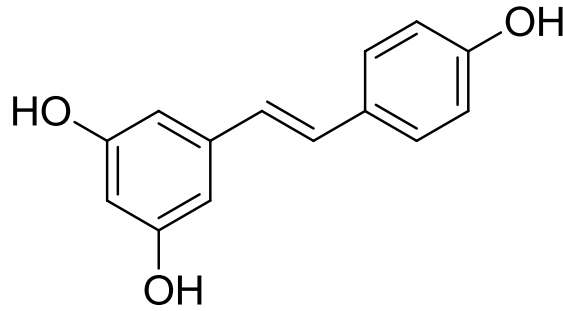


Maleilasetoasetikasit izomerizasyonu (Zeta sinifi; [Blackburn *et al.* 1998])



**Şekil 1.14.** Maleilasetoasetikasit izomerizasyon reaksiyonları

Bitkiler tarafından mikrobik, fungal, fiziksel, uyaranlara karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bileşiklere fitoleksin denir. Buna örnek olarak asma yapraklarındaki resveratrol (Şekil 1.15) verilebilir. Fitoleksin sentezi fungal ajanlara karşılık verme durumunda sinamik asit tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. Bu durumda Glutathione S-sinamoil transferaz (GCST) sinamik asit konjugasyonunu GSH ile katalizleyerek sinamik asit inhibisyonunu ve stres durumunda diğer toksik fenolik bileşikleri indirgeyerek toksik etkileri ortadan kaldırmaktadır (Dean *et al.* 1995; Marrs 1996; Edwards and Dixon 2000).

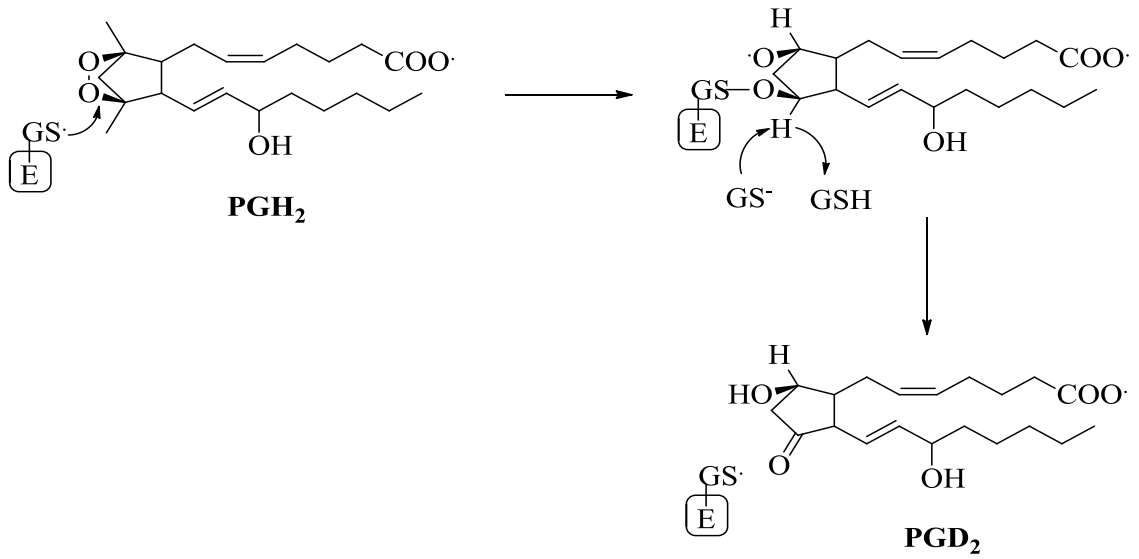


**Şekil 1.15.** Resveratrol yapısı

Bütün GST enzimleri steroid ve tiroid hormonları, billirubin, hem, yağ asitleri ve penisilin gibi substratı olmayan kimyasallara kovalent olmayan bağlarla bağlanabilir (Abu-Hijleh 1999).

GST'ler aynı zamanda tersinir bir ligand gibi davranarak hormonal düzenlenmede rol alabilirler (Şekil 1.16) (McGonigle *et al.* 2000).

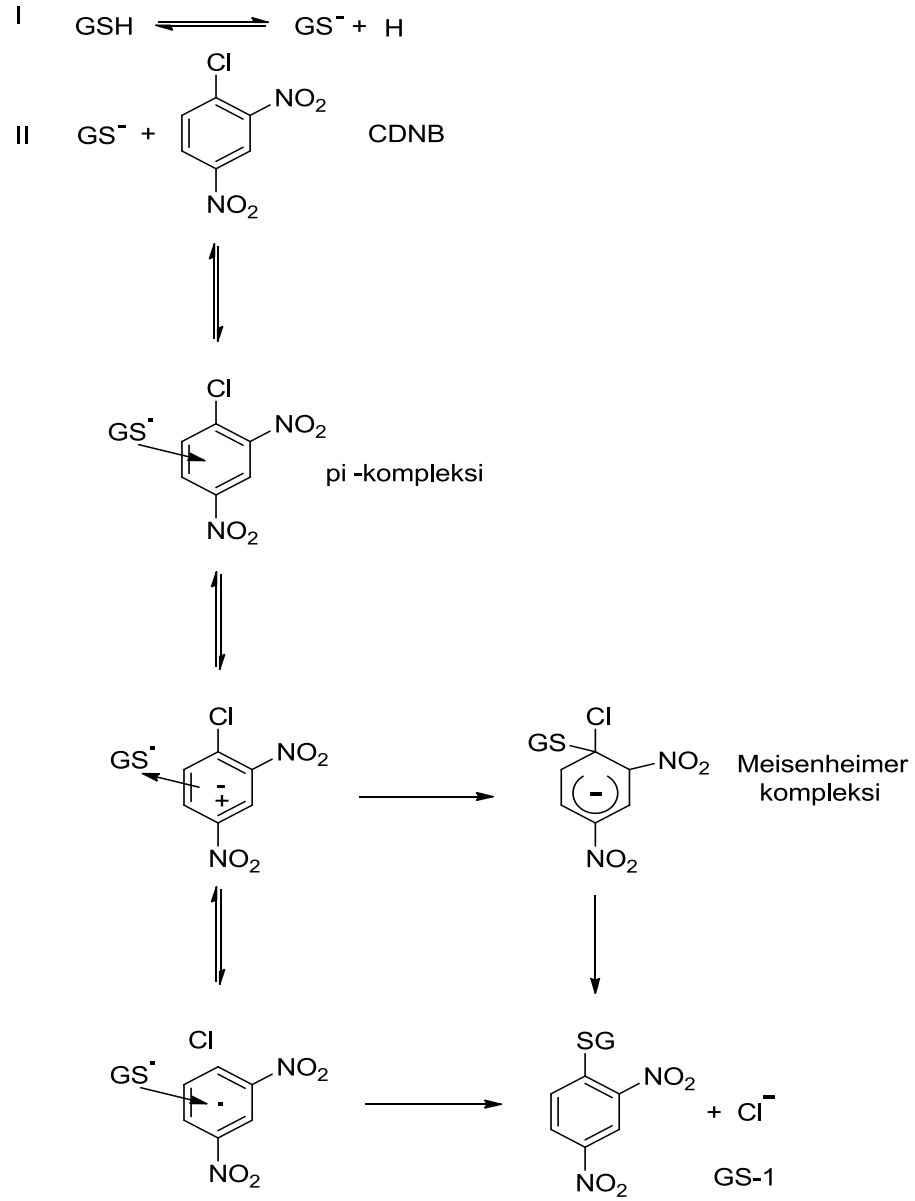
Prostaglandin sentezi (Sigma sınıfı: [Kanaoka *et al.* 1997])



**Şekil 1.16.** Prostaglandin sentezi

Bitki GST'lerinin ikincil bir aktivitesi glutatyon peroksidaz gibi davranarak (GPOX) organik peroksitleri indirgeyip sitotoksik etkiden hücreleri korumaktır (Marrs 1996; Cummins *et al.* 1999; Roxas *et al.* 2000; Edwards and Dixon 2000).

Bilinen en iyi GST substratı ksenobiyotiklerin kloro grubu olan 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)'dir (Şekil 1.17) (Habig *et al.* 1974).



**Şekil 1.17.** GSH ve CDNB'nin baz katalize nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonu

I- GSH'n GS<sup>-</sup> tiyolat anyonuna iyonizasyonu

II- GS<sup>-</sup> 'nin C-1 atomu üzerine atağı ile  $\pi$ -kompleksi, Meisenheimer ve radikal-radikal anyon elektron transfer kompleksleri üzerinden GS-1 molekölünün oluşumu

#### 1.2.5.d. Stres durumunda bitki GST enzimlerinin fonksiyonları

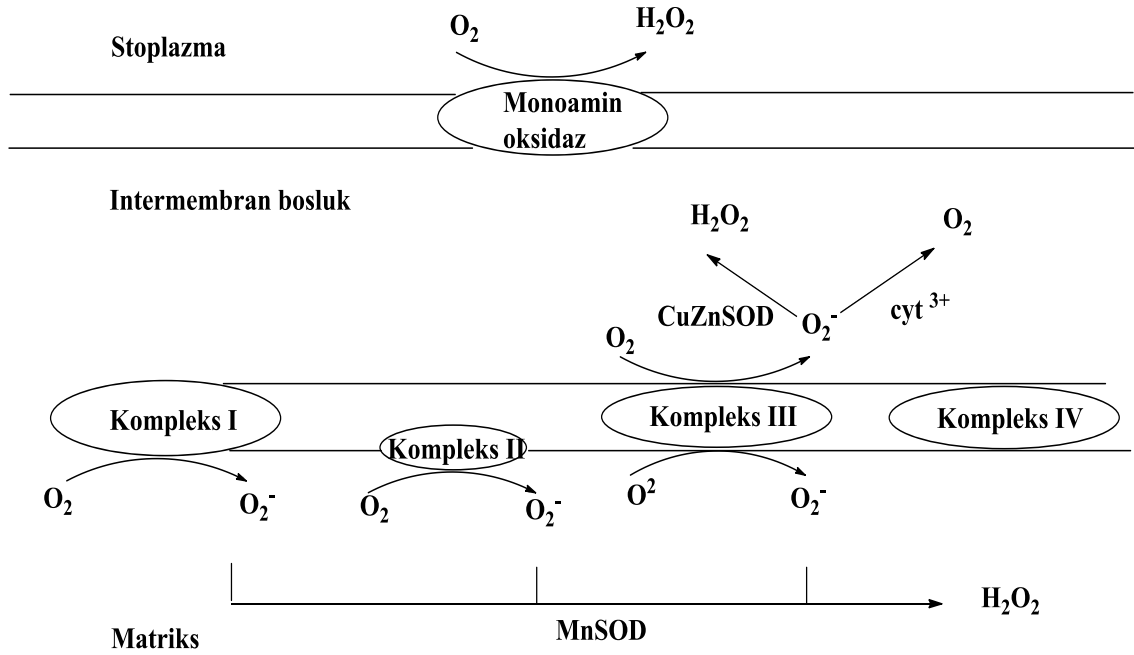
Bitkiler nerede büyürlerse orada yaşamak ve bu durumda kendilerini koruyabilmek için bir savunma sistemi geliştirmek zorundadırlar. Bitkilerin genel olarak savunma

reaksiyonları pekitme duvarı, fitolaksin ürünleri ve antimikrobiyal proteinleri biriktirme şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bitki hücre duvarında açığa çıkan veya zararlı organizmalar tarafından sentezlenen sinyal moleküllerinin algılanması bir direnç tepkimesinin başlamasına neden olmaktadır.

Bitki savunma mekanizmalarının herhangi birini uyararak, antimikrobiyal bileşiklerin sentezi ve birikimini indükleyen bütün uyarıcı molekülleri ifade etmek için 'elisitör' terimi kullanılmaktadır. Karakterize edilen elisitörlere örnek olarak kitin, kitosan, oligogalakturonid, glukanlar, harpin ve cryptogeinler örnek verilebilir. Bitkiler, kaçınılmaz olan patojen saldırılarını algılamak ve karşı koymak için uygun savunma stratejileri geliştirmişlerdir. Bitkiler patojen istilasına etkili bir biçimde durdurabilmek için yapılarında varolan fiziksel ve kimyasal engeller kadar, patojen atağı ile aktive olan, uyarılabilir savunma tepkilerini de kullanırlar. Bu savunma mekanizmaları bazı patojenler için caydırıcı bir rol oynamasına karşın bazı patojenler için etkisiz kalmaktadır. Bunun sonucunda da hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Kobalt (Co), Krom (Cr), Bakır (Cu), Demir (Fe) gibi redoks aktif metaller ve diğer reaksiyonlarına katılan metaller, biyolojik sistemlerdeki süperoksit ve nitrikoksit radikal anyonları gibi reaktiflerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Hücrelerde en çok bulunan serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Normal olarak elektron akışında son ürün sudur. Oysa elektronların elektron transport zincirinden sızan moleküllerin oksijenle direkt olarak etkileşmesi süperoksit radikalinin oluşumuna neden olmaktadır.

Hayvansal organizmalara benzer olarak bitkiler de  $O_2^{\cdot-}$ 'in  $H_2O_2$ 'ye dönüşümünü gerçekleştirir. Fe-SOD kloroplast stromasında, Mn-SOD mitokondrilerde ve CuZn-SOD ise sitoplazma ve kloroplastlarda yer almaktadır (Şekil 1.18) (Mittler 2002).



**Şekil 1.18.** Bitkilerde  $O_2$ 'nin  $H_2O_2$ 'ye dönüşüm mekanizması (Freman and Crapo 1982).

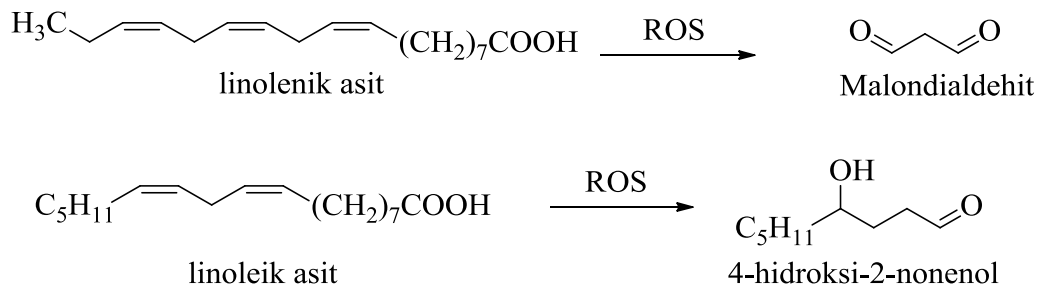
Süperoksit radikalının üretimi ve salınımı sitozolik tarafa doğru olur. Bununla beraber mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) aktivitesinin oldukça yüksek olmasına bağlı olarak mitokondrideki süperoksit düzeyi denge halinde tutulur. Solunum zincirinde  $H_2O_2$ 'de meydana gelebilmekte ayrıca  $H_2O_2$  mitokondri membranını geçerek sitoplazmaya ulaşabilmektedir (Freman and Crapo 1982).

Endoplazmik retikulum ve nükleer membrandaki serbest radikaller ise membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan meydana gelirler. Oluşan serbest radikaller hem intra organel hem de sitozolik reaksiyonları başlatabilirler. Nükleer membrandan açığa çıkmış olan radikallerin varlığında özellikle DNA serbest radikal harabiyetine maruz kalmaktadır (Ward 1997). Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar aynı elementleri, örneğin sitokrom P450 ve B5 içerdikleri için ansature yağ asitlerini, ksenobiyotikleri okside edebilir ve dioksijeni indirgeyebilir (Capdevila *et al.* 1981). Ayrıca flavoprotein içeren sitokrom redüktazlarda otoksidasyonla süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluştururlar. Mikrozoal ve nükleer membran sitokromları bir elektron transferinin direkt olarak su-peroksit radikali ya da peroksi-sitokrom

komplekslerini dissosiyeye etmesi ile hidrojen peroksit meydana getirebilirler. Rat karaciğer mikrozomlarında da hidroksil radikalının yapıldığı belirlenmiştir (Freman and Crapo 1982) .

Peroksizomlar, güçlü hücrel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapılar, D-aminoasit oksidaz, uratoksidaz, L-alfa-hidroksiasitoksidaz ve yağ açıl KoA oksidaz bileşimi açısından çok zengin olup bu enzimler hidrojen peroksit açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (Masters and Holmes 1977).

Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır olmak üzere, fizyolojik şartlarda elektron alışverişi şeklinde gerçekleşen oksido-redüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler.  $Mn^{2+}$ 'nin  $O_2$  tarafından oksidasyonu,  $Mn^{3+}$  veya Mn-Oksijen kompleksinin oluşumunu sağlar, bunlar da  $O_2$ ' den daha çok oksitleyicidir. Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipit peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az kararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Çeşitli metal iyonlarının kloroplast ve membran plazmasında lipit peroksidasyonuna sebep olduğu bilinmektedir (Şekil 1.19) (Hernandez and Cooke 1997). Bu durumun bir sonucu olarak ta reaktif oksijen türlerini sentezi yükselmektedir (Chaoui *et al.* 1997; Hartley-Whitaker *et al.* 2001).



**Şekil 1.19.** Serbest radikallerin lipit peroksidasyonuna etkileri (Sarvajeet and Narendra 2010)

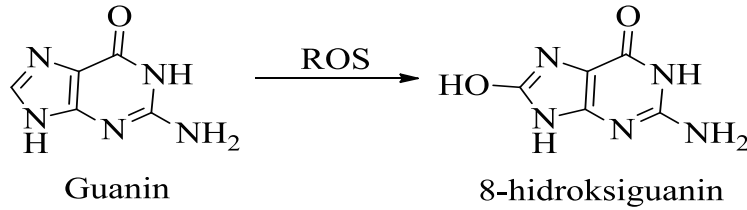
Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller fagositoz esnasında membran ve stoplazmalarında bulundurdukları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici hipoklorik asit (HOCl) gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virüs, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem radikal hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda reaktif oksijen metabolitleri oluşur. Reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosite edilmiş ajan, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da; serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır (Akyol 2004).

Kuraklık, ozon, düşük veya yüksek ısı, karbondioksit tutulumunun sınırlanması gibi çevresel faktörlerin yanısıra Kelvin siklüsü ile  $NADP^+$  oluşması ve fotosentez reaksiyonlarında oksijenin indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ile singlet oksijenin meydana gelmesi bitkilerdeki reaktif oksijen türlerinin, ekzojen ve endojen kaynaklarından (Keller *et al.* 1998).

Fotosentez esnasında peroksizomlarda  $NADP^+$  üretiminde, lipitlerin son yıkım ürünü olan yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunda  $H_2O_2$  meydana gelmektedir. Aynı zamanda yine peroksizomlardaki pürin katabolizmasında ksantin, ksantin oksidaz ile ürik aside yükseltgenmesinde  $O_2^{\cdot}$  radikali ve ürik asidin de allantoin oksidasyonunda  $CO_2$  ve  $H_2O_2$  oluşmaktadır (Somerville *et al.* 2000; Del Rio *et al.* 2002). ROS türlerinin aniden yükselmesi “oksidatif patlama” olarak tanımlanır (Alvarez *et al.* 1998). Patojenlere karşı meydana gelen oksidatif patlama memelilerde fagositlerde vuku bulurken, bitkilerde NADPH oksidazlar tarafından plazma membranlarında gerçekleştirilmektedir (Rao and Davis 1999). Yine NADPH oksidazlar, amino oksidazlar ve pH- bağımlı hücre duvarı peroksidazları apoplastlardaki  $H_2O_2$  kaynağıdır. Bitkilerde amino

oksidazların amin ve aldehit türevlerinin yıkımı ile  $\text{NH}_3$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşmaktadır. Buradan meydana gelen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ler duvara bağlı peroksidazlar tarafından normal büyüme aşamasında, ayrıca yaralama ve patojenler gibi dış etkilere cevap olarak kullanılmaktadır (Mithöfer *et al.* 2001).

Bitkilerde aktif oksijen türlerinin oluşması sonucunda enzimlerin doğrudan inhibisyonu, membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu ile zehirli moleküllerin ortaya çıkması, proteinlerin oksidasyonu, DNA ve RNA hasarı gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.20). Bunun sonucu olarakta glutatyon ve  $\alpha$ -tokoferol gibi bazı moleküller zehirsizleştirme reaksiyonlarında tükenirken, DNA ve proteinler gibi makromoleküller de hasara uğratılmaktadır (Mojovic *et al.* 2004).



**Şekil 1.20.** Reaktif oksijen türlerinin DNA üzerindeki etkisi

Glutatyon S-transferazlar oksidatif stres etmenlerini azaltıcı yönde etkiyen bir enzim ailesidir. Glutatyon döngüsü, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) arasında vuku bulmaktadır. Gerek bitki gerekse diğer canlılarda meydana gelen reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi glutatyon S-transferaz, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerin antioksidan aktiviteleri ile düzenlenmektedir (Khalil *et al.* 2006).

### 1.3. Yaban Mersini

Anavatanı Kuzey Avrupa ve Amerika olmak üzere, Türkiye’de Karadeniz bölgesinin rakımca yüksek olan fundalık ve ormanlık bölgelerinde yabancı formda bulunan bir



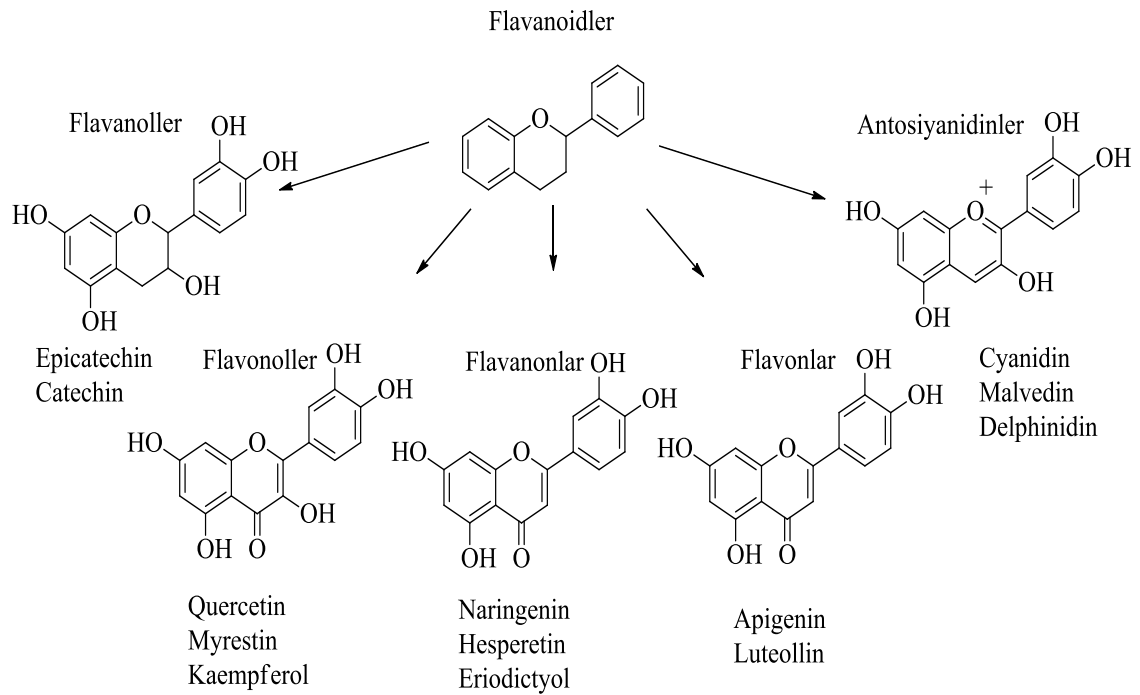
türdür (Davis 1978). Çay üzümü (*Vaccinium arctostaphylos* L.) olarak bilinen bitki yerel olarak ‘‘ avcı üzümü’’, ‘‘likaba’’, ‘‘likarba’’ gibi isimlerle adlandırılmaktadır (Ağaoğlu 1986; Çelik 2008). İngilizce’de ‘‘ Caucasian whortleberry’’ adıyla bilinen ve kültürü yapılmayan bu tür doğadan toplanarak insanların ihtiyaçları için taze meyve, reçel, marmelat, kuru meyve veya meyve suyu olarak tüketilmektedir. Çok yıllık çalılara sahip olan çay üzümünün meyvesi, yaprakları ve genç sürgünleri değerlendirilmektedir. Boyu 2-3 metre kadar uzayabilen yaban mersini, koyu kırmızı, yeşil ve lekeli veya lekesiz düz sürgünlere sahiptir. Çiçekleri ise beyaz, kırmızı, pembe çizgili ve çan şeklindedir (Şekil 1.21) (Ağaoğlu 1986; Çelik 2008, 2011, 2012).



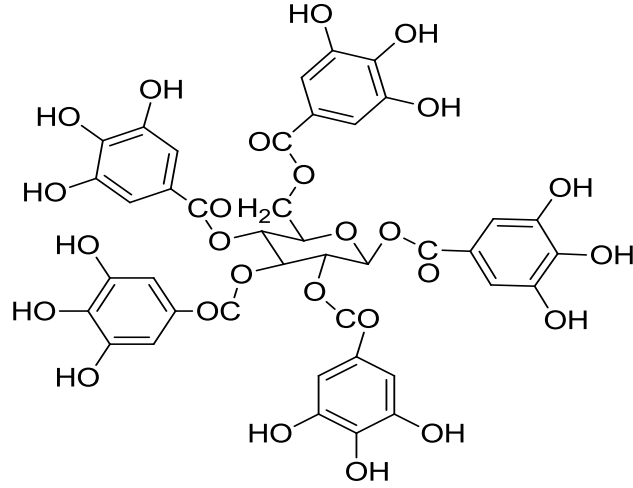
**Şekil 1.21.** Yaban mersini bitkisinin görünümü

Yaban mersini antosiyanin, flavanoller ve tanen kaynakları açısından oldukça zengin bir bitkidir. Antosiyaninler; radikalleri temizlemek için gerekli iyonları içeren güçlü

antioksidanlardır (Pool- Zobel *et al.* 2005). Flavanoller bitkide böcekleri çiçeğe çeken renkleri ve anti-mikrobiyal bileşikleri oluştururlar (Şekil 1.22) (Marcollet *et al.* 1970; Lietti 1976; Lietti and Forni 1976; Mian 1977; Havsteen 1983). Tanenler ise hayvan ve böceklerin bitkiden beslenmesine engel olurken bitkiyi fungal ve bakteriyel saldırılara karşı korurlar (Şekil 1.23). İlgili bitkide bulunan bu fenolik bileşikler, bitkinin mavi/siyah renkte olmasını hem de antioksidan özellikleri üzerinde etki göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı sağlıkta biyoaktif anahtar olarak yorumlanmaktadır. Özellikle görmenin geliştirilmesi, anti-enflamatuvar ve lipid düşürücü etkileri, antioksidan savunma sistemi ve alt oksidatif stresi güçlendirmesi ve kan şekerini düşürdüğü bilinmektedir. Bu nedenle bitki; iltihap, dislipidemi, hiperglisemi, oksidatif stres, kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, diğer demans ve yaşla ilgili hastalıklara ilişkin koşulların tedavisi ya da önlenmesi için potansiyel bir değer taşımaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu raporları da vardır (Shahidi and Nacz 1995).



**Şekil 1.22.** Antosiyanidin ve Flavanollerin moleküler yapıları



**Şekil 1.23.** Tanen'in moleküler yapısı

Kanser, hücre bölünmesi ile büyüme kontrol anahtar genlerindeki mutasyonların neden olduğu bir hastalıktır ve likapalarda kanser önleyici ajan bileşikler bulunmaktadır (Collins 1999; Duthie 2007; Halliwell 2007; Kim *et al.* 2009). Bu yönü ile kansere karşı koruma sağlayan enzimleri harekete geçirirken hızlı tümör gelişimlerini de azaltmaktadır (Zhao *et al.* 2004). Kılcal damarların tıkanmasına neden olan düşük yoğunluktaki yağlı bileşiklerin vücuttan atılmasında önemli rol oynamaktadır (Laplaud *et al.* 1997). Taze olarak tüketildiğinde kanı temizler, kalori değeri ve sodyum içeriği son derece düşüktür, bağırsak metabolizmasını düzenleyen lifli ve fazla miktarda pektin içerdiği için kan kolesterolünü düşürmektedir (Fdez *et al.* 1983; Zaragoza *et al.* 1985; Bottecchia 1987; Morrazzoni and Bombardelli 1996). Yaban mersini resveratrol içerir ve son yıllarda yapılan araştırmalara göre hafıza kayıplarını ve yaşlanmayı engellediği yani antiageing özellik gösterdiği saptanmıştır (Cluzel *et al.* 1970; Lyons *et al.* 2003). Bütün bunlara ilave olarak yaban mersini diyetlerin çok sağlıklı ve temel bir parçasıdır. Vitamin ve minerallerce zengin olan yaban mersini sodyum içermezken potasyum içeriği son derece yüksektir. Ayrıca, sakkaroz içeriği %3 iken %48 glikoz ve %49 früktoz içermektedir.

#### 1.4. Metal İyonları

Ülkemiz sanayisinin hızla gelişmesi ve her geçen gün artan trafik yoğunluğuna maruz kalması diğer birçok kirletici unsurla beraber ağır metallerin de doğadaki miktarlarını arttırmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, özellikle aktif hareket etme yeteneği olmayan bitkilerde başta ürün kaybı olmak üzere birçok olumsuzluğa neden olduğu bilinmektedir (Munzuroğlu ve Gür 2000)

Metal iyonlarında biyolojik olarak birikebilen maddelerdendir. Bitkiler; atmosferden, gübrelerden, atık su ve çamurlardan veya tarımda kullanılan inorganik pestisitlerden toprağa bulaşmış olan ağır metalleri derişimlerine bağılı olarak biriktirme eğilimindedir. Bu sebeple, topraktaki ağır metallerin tolere edilir miktarlarının saptanması bir gerekliliktir. Beslenmemizde geniş yer tutan bitkiler, özellikle kadmiyum gibi bazı elementlere çok geniş sınırlar içinde tolerans gösterebilmektedir. Bunun sonucu olarakta tarım ürünlerinde, insan ve hayvan beslenmesinde olumsuz etki oluşturacak düzeyde metal birikimi sözkonusudur (Haktanır 1992).

Ağır metaller çevresel problemlerin varlığında ortaya çıkan 'nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal' olarak tarif edilmektedirler. Ağır metal grubunun içerisinde içine kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal girmektedir (Kahvecioğlu vd 2007). Doğada yüksek konsantrasyonlardaki bazı ağır metaller, bitkileri ve bitkilerle beslenen insan ve hayvanları olumsuz yönde etkilemektedir.

Doğadaki metal kirliliği çeşitli kaynaklardan dolayı olmaktadır (Lee 1981; Goyer 1989). Birçok metal, hava, su ve besinler vasıtasıyla organizmaya alınmaktadır (Lison and Lauwerys 1993). Organizmaya alınan bu metaller, metabolizma üzerinde değişik yollarla toksik etkilerini gösterebilmektedir. Örneğin, proteinlerle etkileşip onların enzimatik ve yapısal fonksiyonlarını değiştirip inhibe edebilir, temel elementlerin yerini alarak toksik etki gösterebilir (Bremner 1974) ya da bazı toksik metaller, proteinlerle birleşerek intraselüler birikimlere neden olabilirler (Yoshikawa 1982).

Bu şekilde artan dozlarda biriken kimyasallar solunum veya başka kaynaklardan da bünyeye alındığında gıdalardaki düşük dozlar bile risk faktörü olabilmektedir. Ağır metal iyonları; gıdanın yapısında doğal olarak bulunmayan, çevreden (toprakdan, sudan, havadan), gıdaların üretimi sırasında kullanılan metalik alet ekipmanlardan, depolama ve dağıtım sırasında kullanılan ambalaj materyallerinden gıdalara bulaşmaktadır (Behles 1987).

Metallerin toksik özellikleri üzerine araştırmalar son 20-25 yıldır aktif bir şekilde devam etmektedir (Denizli 2008). 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 (Rainbow 2007).

### **1.5. Pestisitler**

Dünyadaki nüfusun hızla arttığı günümüz şartlarında açlık sorununun giderilmesi için tarımsal üretimi arttırmada ilaçlar kullanılmaktadır. Tarım mahsüllerinin üretimi sırasında, ilaçlama ile bu ürünlere kontaminasyon yoluyla bulaşan ve daha sonra mamül gıda maddelerine yansıyan, kimyasal ilaç kalıntılarına “Pestisit” adı verilmektedir. Pestisit olarak adlandırılan bu maddeler üretim artışı sağlarken, aynı zamanda gıda hammaddesi olarak kullanılan ürünlerde ve çevrede bulaşmaya neden olmaktadır. Bulaşan bu maddeler teknolojik işlemlerde belli bir düzeye kadar azaltılmakla birlikte, üretilen gıda maddelerinde de kalmaktadır. Bu durum insan sağlığını ve çevreyi çok ciddi şekilde olumsuz etkilemektedir. Pestisitlerin çok çeşitli sınıflandırmaları yapılmıştır

Bunlar;

- İnektisidler; böceklere karşı,
- Fungusidler; küflere karşı,
- Herbisidler; zararlı otlara karşı,
- Akarasidler; kenelere karşı,
- Apisidler; yaprak bitine karşı,
- Molusidler; sümüklü böcek ve salyangozlara karşı,
- Rodentisidler; fare ve diğer kemiricilere karşı,
- Nematisidler; kurtçuklara, karşı kullanılır.

Pestisitler ayrıca sistemik ve kontakt (yüzey pestisiti) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sistemik pestisitler bitki dokusuna nüfuz eder ve doku içinde çeşitli bölgelere taşınıp yerleşerek etki gösterirler. Böylece korumaları ve etkileri daha uzun sürer. Daha önceki yıllarda kullanılan pestisitler genellikle kontakt pestisitlerdir. Bu nedenle yağmur, rüzgar ve güneş ışığında uzun süre kalıcılıklarını koruyamadıkları için etki süreleri kısadır. Tarım uzmanlarına göre, pestisitler kullanılmadığı takdirde üretim miktarının düşmesi, kıtlık ve salgın hastalıklar kaçınılmazdır. Bu nedenle insana ve çevreye olumsuz etkileri en aza indirilerek kullanımları gerekmektedir. Pestisitlerin neden olduğu uzun dönemde görülen sağlık sorunları; kanser, mutasyon, doğumsal şekil bozukluklarının yanısıra klinik çalışmalar, migren, astım, ve egzamanında pestisit kalıntılarında doğan gıda alerjilerinden kaynaklandığı gözlenmiştir (Ayaz ve Yurttagül 2008).

### **1.5.1. GST enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenen pestisitler**

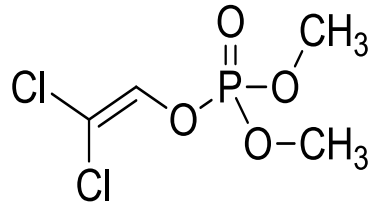
#### **1.5.1.a. Diklorvos**

Kimyasal adı 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate olup gerek tarımsal mücadele gerekse veteriner hekimlikte antihelmintik ve insektisit olarak kullanılan geniş spektrumlu organik fosforlu bir bileşiktir (Şekil 1.24). Aromatik kokulu, renksiz amber

renkli bir sıvıdır. Organofosforlu (OP) bileşikler tarım zararlılarının ve hastalık yapıcı vektörlerin kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir pestisit grubudur (Maitra and Mitra 2008).

Organofosforlu bir insektisit olan diklorvos, etkisini asetilkolini yıkan asetilkolinesterazı (AChE) inhibe ederek göstermektedir. AChE'in inhibe olması ile sinaptik asetilkolin seviyesinde ciddi bir şekilde yükselme meydana gelmektedir (Carr *et al.* 2002).

Diklorvos, zirai mahsuller, ambar ürünleri ve hayvanlarda çeşitli böceklere karşı kullanılmaktadır.



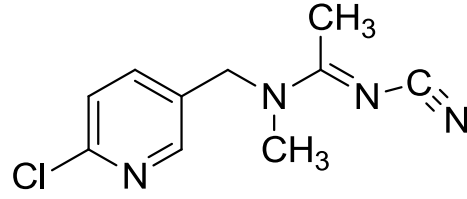
**Şekil 1.24.** Diklorvos molekülünün yapısal formül

#### 1.5.1.b. Asetamiprit

Kimyasal adı N-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N'-cyano-N-methyl-acetamide olan asetamiprit neonikotonoid pestisitler grubundandır (Şekil 1.25). İlk olarak 1990'ların başında kullanılmaya başlanan insektisit (Brunet *et al.* 2005) sistemik ve translaminar etkilidir.

Renksiz kristaller halinde olup, bir asetilkolin reseptörüdür.

Birçok kültür bitkisindeki yaprak biti, beyaz sinek gibi emici böcekler üzerinde endikedir.

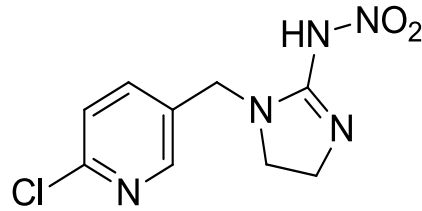


**Şekil 1.25.** Asetamiprit molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.c. İmidakloprit

Kimyasal adı N-{1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl}nitramide olan imidakloprit nörotoksin olarak etki gösteren sistemik bir insektisittir (Şekil 1.26). Memelilerdeki toksisitesinin düşük olmasının yanında böceklerin merkezi sinir sistemini etkileyen, neonikotin sınıfından bir kimyasaldır (Shadnia 2007; Tomlin 2006). Dünya çapında geniş bir kullanım alanına sahip olan insektisit olup bir asetilkolin reseptörüdür.

Emici böcekler, toprak böcekleri ve evcil hayvanlar üzerindeki pirelerde endikedir.



**Şekil 1.26.** Imidakloprit molekülünün yapısal formülü

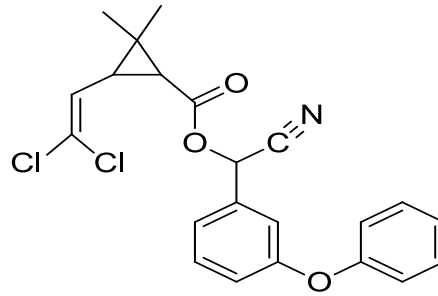
### 1.5.1.d. Sipermetrin

Kimyasal formülü [Cyano-(3-phenoxyphenyl)methyl]3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate'dir. Sipermetrin, sentetik organofosforular grubuna ait piretroitlerdendir (Şekil 1.27). İlk olarak 1974 yılında doğal insektisitlerden olan piretrin'in sentetik olarak üretilmesiyle elde edilmiştir. Sipermetrin içeren



piretroidler pretrinlerden daha etkilidirler. Sentetik piretroidler kontakt ve mide zehiri etkilidirler (Gammon 1981).

Sipermetrin kahverengi olan bir sıvıdır. Ülkemizde kullanılan en etkili insektisit sınıfındandır. Işığa dayanıklı olup toprak bakterileri tarafından hızlıca parçalanmaktadır Beslenmeyi durdurucu bir özelliğe sahiptir. Böceklerin sinir sistemi üzerinde etkili bir insektisittir (Gammon 1981).

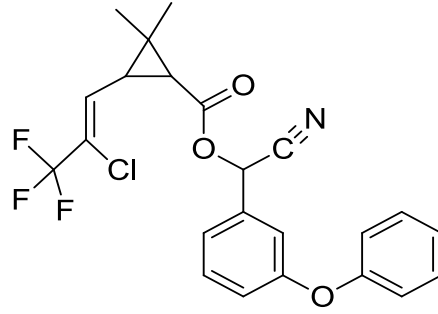


Şekil 1.27. Sipermetrin molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.e. Siyalotrin

Siyalotrin, 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2,2-dimethyl-cyano (3-phenoxyphenyl) methyl cyclopropanecarboxylate kimyasal formüle sahip bir insektisittir (Şekil 1.28). Krizantem çiçeklerinden elde edilen doğal bir bileşik olan piretrumdan sentetik olarak sentezlenen pretroit türevi kimyasaldır. Lamda-siyalotrin, siyalotrinin bir izomeridir.

Lamda-siyalotrin gibi pretroidler uzun süreli etkilerinden dolayı tercih edilen bir insektisit türüdür. Renksiz bir sıvı olup sudaki çözünürlüğü azdır. Lamda-siyalotrin organizmaların sinir sistemini tahrip ederek ölümlerine neden olmaktadır (Tomlin 1997). Zirai tarımda birçok böcek üzerinde endikedir.

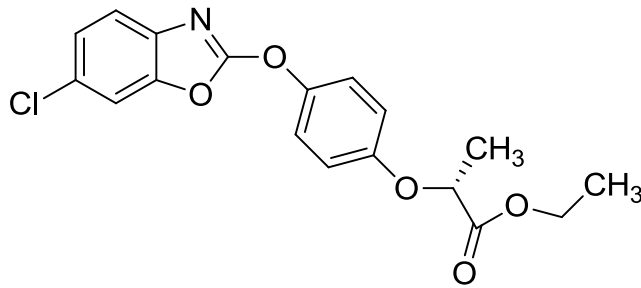


**Şekil 1.28.** Siyalotrin molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.f. Fenoksiaprop-p-etil

Kimyasal formülü (R)-2-[4-(6-chloro-1,3-benzoxazol-2-yloxy)phenoxy]propionic acid olup sistemik ve kontak etkili seçici bir herbisittir (Şekil 1.29). Ariloksifenoksipiropiyonat sınıfından bir bileşiktir.

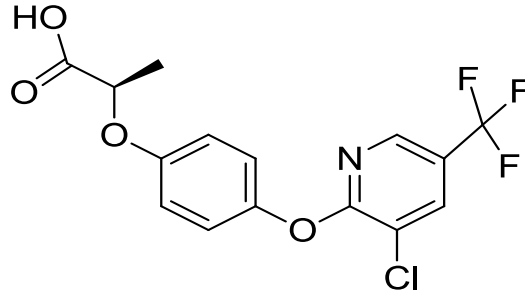
Asetil CoA karboksilazı engelleyerek yağ asitlerinin sentezlenmesini önlemektedir (Huff 1989). Beyaz ve kokusuz bir sıvıdır. Başlıca yapraklardan alınmaktadır. Patates, fasulye, soya fasulyesi, pancar, sebzeler, yer fıstığı, keten, yağlı tohumlu kolza, pamuk, yıllık ve çok yıllık yabancı çim üzerinde kullanılmaktadır.



**Şekil 1.29.** Fenoksiaprop-p-etil molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.g. Haloksifop-p-metil

Kimyasal formülü Methyl(R)-2-[4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenoxy] propionate olan pestisit arilfenoksiropiyonik asit sınıfına dahil olan bir herbisittir (Şekil 1.30). Haloksifop metil esteri beyaz berrak bir sıvı olup uçuculuğu oldukça düşüktür ve suda kolayca çözünebilmektedir. Biyokimyada asetil KoA karboksilazı inhibe ederek yağ asidi sentezini durdurmaktadır. Haloksifop-p-metil yaprak ve gövde tarafından absorbe edilen seçici bir herbisit olup bitkilerin büyüme mekanizması üzerinde etkilidir. Herbisit, patates, sebzelerin yaprakları, soğan, soya fasulyesi, ayçiçeği ve diğer ürünlerde kullanılmaktadır.



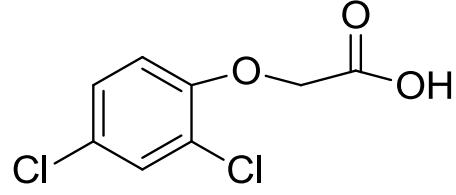
Şekil 1.30. Haloksifop-p-metil molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.h. 2,4 Diklorofenoksi asetik asit (2,4 D)

2,4 fenoksi asetik asit hormon özellikli transloke olabilen, yabancı ot türleri ve istenmeyen tahıl otlarının giderilmesinde kullanılan sistemik bir herbisit olup, sentetik bir auksin türevidir (Şelil 1.31) (Song 2014).

2,4 D bitkilerin vasküler dokularında kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır (Charles *et al.* 2001).

2,4 D çeşitli karasal ve suda yetişen geniş yapraklı yabancı otlar üzerinde kullanılmaktadır (Lawrence 2002).

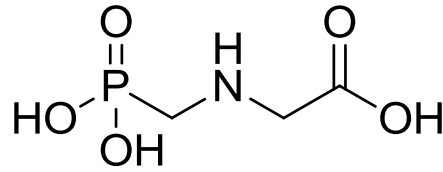


**Şekil 1.31.** 2,4 Diklorofenoksi asetik asit molekülünün yapısal formülü

### 1.5.1.k. Glifosfat

Glifosfat (N-(phosphonomethyl) glycine) ilk olarak 1974 yılında John H. Franz tarafından herbisit olarak bulunmuştur (Franz 1974).

Glifosfat doğal bir aminoasit olan glisin analogu olup bir aminofosfoniktir (Şekil 1.32). Glifosfat tirozin, triptofan ve fenilalanin aromatik aminoasitlerinin sentezini engelleyerek birçok bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Bu durumda 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate'ı sentezleyen enzimin inhibe olmasına neden olmaktadır (Steinrücken and Amrhein 1980).



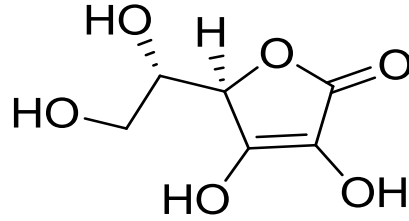
**Şekil 1.32.** Glifosfat molekülünün yapısal formülü

### 1.5.2. Kimyasal bileşikler

#### 1.5.2.a. Askorbik asit (C Vitamini)

Askorbik asit; beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz kristalimsi yapıda bir madde olup suda tamamen çözünmektedir. Askorbikasit, antioksidant özelliğe sahip bir organik asittir (Şekil 1.33). Askorbik asitin L-enantiomeri vitamin C olarak bilinmektedir. E300

gıda maddesi olarak besinlerin raf ömürlerini uzatmak amaçlı kullanılmaktadır. Askorbik asit aynı zamanda et endüstrisinde rengin sürdürülmesi ile ilgili olarak koruyucu görev yapmakta iken, fırıncılık endüstrisinde geliştirici ajan olarak, meyve pulp ve sularında ise renk solmasının önlenmesinde kullanılmaktadır (Weiss 2007). Oksijen, metaller, ışık ve ısı etkisi askorbik asit yapısını kolayca bozabilmektedir. Askorbik asitin geleneksel yolla elde edilmesi, sorbitolün yedi basamaklı kimyasal bir süreci olan Reichstein prosesi ile biyodönüşüme uğratılmasıyla olurken, yeni geliştirilmiş fermantasyon teknolojisi ile bu süreçte önemli bir bileşen olan ketogulanik asit üretim maliyetleri düşürülerek önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilme özelliğide bulunur (Yanbeyi 1999).

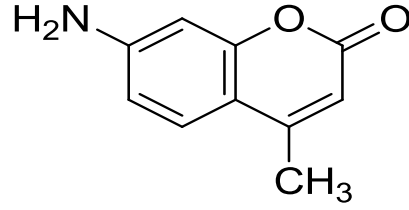


**Şekil 1.33.** Askorbik asit molekülünün yapısal formülü

### 1.5.2.b. Kumarin

Kumarin ve türevlerine bitkilerde oldukça sık rastlanmaktadır (Şekil 1.34). Bunun yanında birçok kumarin türevi sentetik olarak sentezlenebilmektedir. Biyolojik aktivitelerinin yanısıra kumarin halkasına takılan süstitüentlerin, kumarin bileşiğine güçlü floresans özellik kazandırdığı bilinmektedir (Mizukami *et al.* 2009; Lei *et al.* 2010). Kumarin türevlerinin en önemli özellikleri arasında canlılarda kanama sırasında antikoagülant olarak davranması gelmektedir (Shilling *et al.* 1969). Doğal kumarin bileşikleri güzel kokuları nedeniyle parfüm sanayiinde de kullanılmaktadır (Guenter 1975).

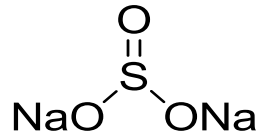
Kumarin türevi bileşiklerin aynı zamanda HIV integras enzimini yüksek oranda inhibe ettiği bilinmektedir (Zhao *et al.* 1997).



**Şekil 1.34.** Kumarin molekülünün yapısal formülü

### 1.5.2.c. Sodyum sülfid

Suda kolaylıkla çözünür. Sulu çözeltileri alkalidir ve havada bırakıldığında hızlı bir şekilde sodyum sülfat oluşur. Sodyum sülfid, indirgeme, ağartma ve sülfitleme ajanıdır ve koruyucu olarak rol oynar (Şekil 1.35). Eğer kuvvetli asitlerle muamele edilirse sülfür dioksit salınır. Element sülfür, sodyum sülfidin sulu çözeltilerinde sodyum tiyosülfat oluşumuyla çözünür. Elyaf (lif), tekstil, deri, kauçuk, fotoğraf, kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerinde, gıda koruma, boya üretimi ve deterjanlarda kullanılmaktadır.



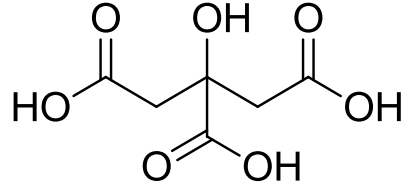
**Şekil 1.35.** Sodyum bisülfid molekülünün yapısal formülü

### 1.5.2.d. Sodyum azid

Molekül formülü  $\text{NaN}_3$  olan sodyumazid inorganik bir bileşiktir. Renksiz ve tuz halinde bulunan kimyasal bazı laboratuvarlarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hava yastığı sistemi içinde kullanılan toksik bir maddedir.

### 1.5.2.e. Sitrik asit

Modern endüstrinin birçok dalında kullanılan sitrik asit, artan dünya nüfusunun birçok ihtiyacının karşılanabilmesini sağlayan oldukça önemli bir bileşiktir (Şekil 1.36). Kristal yapılı ve renksiz bir bileşik olan asitin kimyasal formülü “ $C_6H_8O_7$ ” olarak ifade edilmektedir. Neredeyse tüm bitkilerin yapısında var olan sitrik asit, doğadaki birçok hücrel faaliyetlerde görev almaktadır. Günümüzde gıda sektöründen tarım sektörüne, metal üretiminden metal işlenmesine, ilaç sektöründen içecek sektörüne kadar milyarlarca dolarlık pazarlarda satılan ürünlerinde içinde yer alan asit, modern yaşam için önemli bileşiklerden biri haline gelmiştir.



Şekil 1.36. Sitrik asit molekülünün yapısal formülü

### 1.6. Çalışmanın Amacı

Memeli GST enzimlerine nispeten bitki GST'leri daha az bilinmektedir. Günümüzde sağlıklı ve kaliteli bir ömür sürmenin önemi oldukça büyüktür. Bu nedenle stres ve çeşitli çevresel etmenlere karşı vücut direncimizi artırıcı diyetlerin alınması gerekliliğinden yola çıkarak, insan beslenmesinde antioksidan içerik açısından oldukça önemli olduğu bilinen yaban mersini meyvesini çalışmamız için tercih ettik. Şimdiye kadar yaban mersini meyvesi GST enzimi henüz literatürlerde yerini almamıştır bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmaların benzer konulardaki diğer projelere ışık tutacağını düşünmekteyiz. Bu çalışmada yaban mersini meyvesi GST enzimi jel filtrasyon ve afinite kromatografisi teknikleri ile saflaştırılmıştır. Akabinde ise enzimin optimum şartları icelenmiş olup, bazı pestisit, metal iyonları ve organik bileşiklerin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde pek çok canlı türünde ve bitki dokusunda çeşitli enzimlerin aktivitesine bakılmış, bazıları saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen bulgular literatürde yerini almıştır. Glutasyon S-transferaz enzimi de üzerinde birçok çalışmanın yapıldığı ve canlı yaşamında oldukça önemli fonksiyonlara sahip olan bir enzimdir. Hemen hemen 100 değişik sekanslı süper bir ailenin üyesi olan Glutasyon S-transferaz (GST)'ler, çoğunlukla sitozolik kaynaklı olup hemen hemen bütün canlı sınıflarında bulunmaktadır. Etken maddeleri arasında çeşitli toksik bileşikler olduğundan GST'ler, vücuda alınan yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptirler.

GST'ler doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En çok sıçanlarda ve insanlarda çalışılmıştır. GST'ler membrana bağlı ve sitosolik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler (Hayes and Pulford 1995). Vertebralılarda yedi sınıf sitosolik GST tespit edilmiştir: alfa, mü, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Bu sınıf ayrımları yapısal farklılıklara dayanılarak yapılmaktadır. Bir sınıf içinde farklı GST'ler en az %40, sınıflar arası ise en az %30 aminoasit benzerlikleri gösterirler. Türlerle göre özel sınıflara dayandırılarak yapılan insanlar ve diğer memeliler için sınıflandırma belirtilmiştir. cGST'ler (Sitoplazmik GST) iki aynı alt üniteden homodimerler veya farklı alt üniteden heterodimerlerden oluşmuşlardır. Sınıflandırma olarak Mannervik *et al.* (1992)'nin önerdikleri sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada türlerin belirtilmesi için bir ön ek (örneğin, insan için h) kullanılırken, A, P, M, S veya T harfleri sırasıyla alfa, pi, mü, sigma ve thetayı işaret etmektedir (Ketterer *et al.* 1992).

GST'ler böcek, bakteri ve mısır (Edwards and Owen 1986; Rossini *et al.* 1996; Jablonkai and Hatzios 1991; Scarponi *et al.* 1992; Jepson *et al.* 1994; Marrs *et al.* 1995; Hotton *et al.* 1996; Marrs and Walbot 1997), buğday (Jablonkai and Hatzios 1991; Mauch and Dudler 1993; Romano *et al.* 1993; Edwards and Cole 1996; Riechers *et al.*



1996, 1997), tütün (Droog *et al.* 1995), patates (Hahn and Strittmatter 1994) gibi birçok türde çalışılmıştır.

GST aktivitesi insanda tüm dokularda bulunurken sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda GST'lerin her dokuda bulunmamasının yanında testisler ve karaciğerde en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Whalen and Bayer 1998).

İnsanda GST ailesinde bulunan stoplazmik enzimler primer yapılarına göre  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mü),  $\Pi$  (pi),  $\theta$  (theta),  $\delta$  (sigma) olarak sınıflandırılmaktadır (Webb *et al.* 1996) ve bu enzimleri kodlayan pekçok genin polimorfik olduğu bilinmektedir (Emahazion *et al.* 1999). GSTM1 geninin karsinojenlerin detoksifikasyonunda görev alan bir enzim olarak düşünülmesi bu tür üzerinde birçok araştırma yapılmasına sebep olmuştur (Figueras *et al.* 2000).

Edinsel veya içdirensel kemoterapik maddeler kanser tedavilerinin başarısız olmasının en önemli sebeplerindendir. Yapılan çalışmalar, kemoterapik ilaç direnci, metabolizmada apoptik (programlanmış hücre ölümü) mekanizmanın (Fulda 2009), proteinlerle ilişkili olarak birçok ilaca karşı direnç göstermesinin (Takahashi *et al.* 2009; Broxterman *et al.* 2009) glutatyon S-transferaz enzimlerinin bazı genlerinin daha baskın olduğu şeklinde açıklanmaktadır (Paumi *et al.* 2001; Burg and Mulder 2002).

Glutatyon S-transferaz enzimleri oksidatif stres ürünleri ve elektrofilleri zehirsizleştirerek, hücre korunmasında rol oynar ancak tümör hücrelerinde bu durum ilaçlar için hücrel dirence sebep olma şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Aslında, kimyasal maddelere dayanıklı tümör hücreleri GST izozimlerinde aşırı çoğalmaya neden olmaktadır (Hayes and Pulford 1995; Sharma *et al.* 2006). Bu aşırı çoğalma farklı kemoterapik maddelerin detoksifikasyonunda hızlanmaya neden olur ve sonuç olarak bu maddelere karşı bağışıklık kazanılmış olur. Bu çalışmaların sonucu gösteriyor ki; alfa sınıfı GST'lerin aşırı üretimi kalın bağırsak kanseri, yumurtalık kanseri ve böbrek hücreli kanser çeşitlerinin ilerlemesinde yüksek bir risk oluşturmaktadır (Tetlow *et al.* 2004; Chuang *et al.* 2005). GST'lerin spesifik substratları olan maddeler GSH

konjugasyonunu inaktive ederler, bu nedenle elektrofilik türlerle oluşturulan birçok kanser ilacı GST aracılığı ile detoksifiye edilebilir (Kauvar *et al.* 1998).

Batar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GSTM1 ve GSTT1 genotiplerinin oksidasyon redüksiyon mekanizmalarının göz için özel bir öneme sahip olduğu ve oksidatif hasar mekanizmalarının glokom katarakt ve diğer göz hastalıkları arasında yer aldığı bildirilmektedir. Oksidatif hasara neden olan reaktif oksidatif radikallerinin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan GSTM1 ve GSTT1 enzim polimorfizmleri ile primer açık açılı glokom (PAAG) arasındaki ilişki araştırılmış ve sonuç olarak GSTM1 pozitif ve GSTT1 null genotipleri PAAG gelişimi için genetik bir risk faktörü olarak rol oynadığı saptanmıştır (Batar *et al.* 2007).

Glutasyon yetersizliği alzheimer, parkinson, ciğer, HIV, AIDS, kanser, kalp krizi ve diyabet gibi birçok hastalığın yanında yaşlanmada da rol oynayan oksidatif strese neden olmaktadır. Son araştırmalar, GSH metabolizmasının besinsel düzenlenmesinin, immun sisteminin güçlendirilmesi ve rahatsızlıkların tedavisi için oldukça kritik bir öneme sahip olduğu vurgulanmaktadır (Yang *et al.* 2004)

GST enzim ailesinin, böceklerde insektisitlerin zararlı etkilerine karşı temel bir savunma mekanizması olarak bilinmektedir. Örnek olarak; karasineklerde (*Musca domestica*) organofosfat insektisitlere dirençli mutantların GST'nin yüksek miktarlarına sahip olduğu bulunmuştur. *Musca domestica*'da 6 sınıfı GST'leri önemli bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu aileden Md GST1, 2,3,4, 6A ve 6B genleri tanımlanmıştır. Bu genlerden Md GST1, 3 ve 6'nın fazlaca üretilmesi *Musca domestica*'da organofosfat insektisitlere direnç oluşturmaktadır. *Musca domestica* üzerinde 1984 yılında Plapp tarafından yapılan bir araştırmada sineğin 2. Kromozomunda lokalize olmuş genlerin organofosfatlı insektisitlere direnç gösteren GST'nin ekspresyonunu kontrol ettiği gözlemlenmiştir (Kence 1998; Çakır ve Yamanel 2005).

Böcekler üzerinde yapılan araştırmalarda insektisit direncinin metabolik detoksifikasyon (artmış MFO, esteraz ve GST aktiviteleri) ve hedef yeri duyarsızlığı mekanizmaları ile ilgili olduğu rapor edilmektedir (Martinez-Torres *et al.* 1997; Hemingway 2000; Anazawa *et al.* 2003; Yu 2003; Kasai 2004; Yu 2006; Takeyama *et al.* 2006; Huang and Han 2007).

Pamuk yaprak kurdunun, insektisitlere karşı oluşturduğu direncin biyokimyasal karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada *S.littoralis*'te görülen insektisit direncinin hedef yeri duyarsızlığından ileri gelmediği, direncin metabolik detoksifikasyon mekanizmalarının bir sonucu olduğu ve bu nedenle kullanılan sinerjistlerle insektisidin etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. Artan direnç ile birlikte karboksilesterazlar, glutatyon S-transferazlar ve sitokrom P450 monooksijenazların da aktivitelerinin arttığı biyokimyasal analizler sonucunda gözlemlenmiştir (Hadim 2008).

Lagadic ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, bir grup hassas *S.littoralis* bireyelerine lindane insektisidin sublethal dozunu topikal aplikasyon ile uygulamış, ardından canlı kalan üyelerin sitosolik GST aktivitelerini hiç ilaç verilmemiş hassas bireyeler ve dirençli bireyelerin sitosolik GST aktiviteleri ile karşılaştırmışlardır. GST aktivitesi üzerine hem CDNB hem de DCNB substratlarının etkileri incelenmiştir. Dirençli bireyelerin CDNB substratı kullanılarak llen GST aktivitesi hassas bireyelerinkinden iki kat daha yüksek çıkarken; DCNB substratı ile yapılan denemelerde belirgin bir fark gözlemlenememiştir. Araştırmacılar, elde ettikleri enzimleri %50-70 oranlarında saflaştırarak CDNB ve indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak karakterize etmişlerdir. Görünen Km ve Vmax değerlerinin hassas (lindane uyulanmış ve uygulanmamış) ve dirençli bireyeler arasında belirgin bir şekilde farklılık gösterdiğini ve lindane uygulamasının hassas bireyelerdeki glutatyon S-transferazın CDNB ve GSH'a karşı Km değerini etkilediğini bildirmişlerdir (Lagadic *et al.* 1993).

Memeli GST'leri kadar iyi karakterize edilemeyen bitki sitozolik GST'leri -GST sınıfına girer. Pirimer yapıda çok heterojen olan bu sınıf aynı zamanda böcek ve memeli GST enzimlerini de ihtiva etmektedir. Aminoasit dizilimlerine göre bitki GST'leri -

GST I,  $\theta$ -GST II,  $\theta$ -GST III olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda üç enziminde ortak özelliğinin kloroasetanilid, tiyokarbamat ve S-triazin gibi bazı herbisitlerin detoksifikasyonunda görev almaları olduğu açıklanmıştır (Irzyk and Fuerst 1993; Gronwald and Plaisance 1998).

Irzyk ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışmalarda, mısır, nohut ve darı gibi bitkilerden saflaştırılan GST'ler içerisinde en iyi şekilde çalışılanın mısır olduğu ve GST I, II, III içerdiği bildirilmiştir. Bu izoenzimler substratlara karşı davranış, moleküler kütle, alt birim içerikleri ve katalitik aktivite gibi özellikleri açısından çeşitli kısımlarda karakterize edilmiştir. Mısır ve darı gibi bazı bitkiler herbisit koruyucular tarafından korunurlar. Mısır ve darıda hem GST hem de herbisit metabolizması GSH'ın bağlanmasıyla herbisit koruyucu maddenin muamelesi sayesinde uyarılmaktadır (Irzyk and Fuerst 1993).

Nector ve arkadaşları GST'lerin DNA, RNA ve protein hasarına sebep olan sitotoksik ve genotoksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında görev aldıklarını vurgulamışlardır. Aslında GST'ler GSH'ın varlığında peroksitleri indirgeyebilir ve antitoksik bileşiler üretebilir. GST'ler hemen hemen bütün organizmalarda bulunmaktadır, ilk saflaştırma mısır bitkisinden yaklaşık 39 yıl önce yapılmıştır (Frear and Swanson 1970; Shimabukuro *et al.* 1970; Shima *et al.* 1971). Bitki GST'leri bilim adamları tarafından yoğun olarak çalışılmaktadır, sebebi bu enzimlerin bitkide herbisit toleransı göstermesidir.

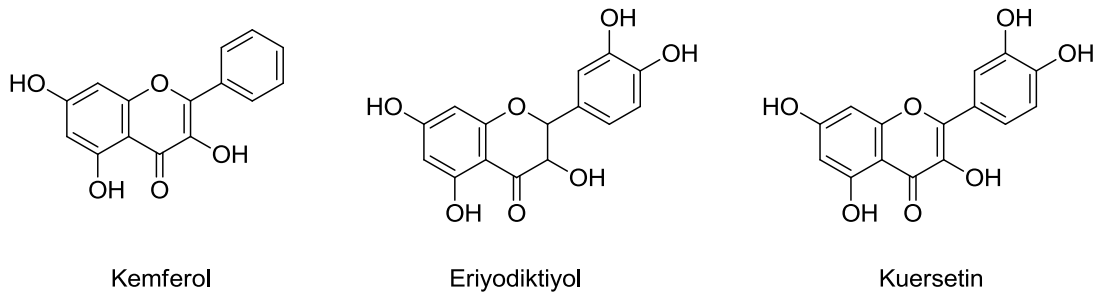
Bitki GST ailesi oldukça kalabalık ve çok çeşitlidir ki; yapılan çalışmalarda bu durum soya fasulyesinde 25, mısırdaki 42 ve turpgiller familyasından olan Arabidopsisde 54 (DNA dizilemesi tamamen yapılan üçüncü canlı ve ilk bitkidir) üyeye rastlanmıştır (Dixon *et al.* 2002; Sappl *et al.* 2004). Bu enzimlerin genellikle stoplazmik proteinler olduğu fakat mikrozomal, plastidik, nükleer (çekirdek) ve apoplastik izoformlarının da olduğu bildirilmektedir (Frova 2003).

Hayvanlar GSH konjugatlarını katabolize edip vücuttan uzaklaştırırken; bitkiler de ise bu durum suda çözülmüş olan glutasyon ürünlerinin boşaltım sistemlerinin yetersizliği nedeniyle vakuollerinde depolamak zorunda kalmaları şeklinde bildirilmiştir (Coşkun ve Zihnioğlu 2002).

Son çalışmalar gösteriyor ki; Bitki glutasyon S-transferazları endojen metabolizmada hücre ölümlerinin düzenlenmesi, flavanoidlerin bağlanması ve oksidatif stresinde içinde bulunduğu pek çok mekanizmada görev almaktadır (Marrs *et al.* 1995; Alfenito *et al.* 1998; Müller *et al.* 2000; Kilili *et al.* 2004). Memelilerin ve diğer organizmaların bitki homoloğu olan Z ve T sınıfı enzimler, oksidatif stres sırasında oluşan hidroperoksit detoksifikasyonu ve maleilasetoasetatın izomerasyonu gibi birçok primer metabolizma işlevlerinde yer aldığı bildirilmiştir (Dixon *et al.* 2000; Kampranis *et al.* 2000).

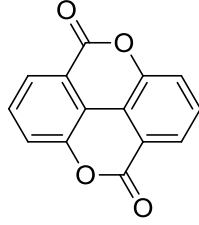
Yapılan çalışmalarda GST enzimlerinin auksin ve sitokin gibi hormonları bağladığı ve abisik asit, salisilikasit, metil jasmonat, auksin ve etilen gibi bileşikler içeren fitohormonların geniş bir çeşidi tarafından indirgenebildikleri açıklanmaktadır (Zettl *et al.* 1994; Gonneau *et al.* 1998; Wagner *et al.* 2002; Moon *et al.* 2003; Smith *et al.* 2003).

Yapılan çalışmalarda bitkisel polifenolik bileşiklerinden bazıları olan, kemferol, eriyodiktiyol ve kersetin gibi flavonoidlerin (Şekil 2.1) GSTP1 geni ilave edilerek genetiği değiştirilmiş meme kanser hücrelerinde (pMTG5) yapılan deneylerde GSTP1-1 aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Van Zanden *et al.* 2004).

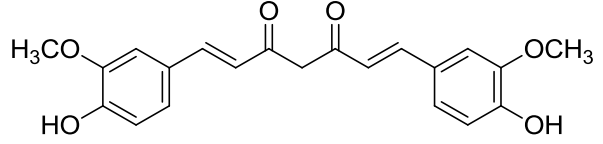


**Şekil 2.1.** GSTP-1 enzim aktivitesini inhibe eden bitkisel polifenolik bileşikler

Son zamanlarda Hayeshi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, polifenolik yapıda olan ve gıda maddelerimizin içerisinde bulunan elajik asit ve kurkuminin (Şekil 2.2), insan rekombinant GST'larını değişen konsantrasyonlarda inhibe ettiğini göstermişlerdi (Hayeshi *et al.* 2007).



Elajik asit



Kirkuminin

**Şekil 2.2.** İnsan rekombinant GST'larını inhibe eden bazı polifenolik bileşikler

Bitkilerde yeni bulunan L sınıfı GST ve dehidrosikorbat redüktazlar hücre dışı gerçekleşen olaylar karşısında hücrenin kendi metabolizmasını korumasında yani homeostazide görev almaktadırlar (Dixon *et al.* 2002; Edwards and Dixon 2005). Böylece kendisini glutasyonu kullanarak biyotik ve abiyotik strese karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda bitki GST enzimlerinin oksidatif stres fonksiyonlarında görev almasının yanında büyüme ve gelişmede de rolleri olduğu bildirilmektedir (Gong *et al.* 2005; Moon *et al.* 2005).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, indirgenmiş glutatyon (GSH), potasyum siyanür, potasyum ferrisiyanür, sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den Fluka'dan; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merc AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomessie brillant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-100, agar, amonyum persülfat,  $\beta$ -merkaptto etanol ve 2',5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan; çalışmada kullanılan metal tuzları ve pestisitler ise piyasadan temin edildi.

##### 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument

Otomatik pipetler	: Eppendorf
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

### 3.1.4. Homojenat hazırlama çözeltisi

0,2 M Tris-HCl Çözeltisi (pH: 7,8): 12,114 g Tris-HCl içerisinde (5 mM DTT, 1 mM EDTA ve 1 mM 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  $K_2HPO_4$  Çözeltisi (pH=7,0): 2,721 g  $K_2HPO_4$  (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 aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M  $K_2HPO_4$  (pH:7,0): 0,348 g  $K_2HPO_4$  ve 1 mM EDTA 0,0074 g tartılarak 15 mL saf su içerisinde çözülerek pH:7,2'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-Klor 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

### 3.1.7. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 10 mM  $K_2HPO_4$  pH:7,2 (Kolonun dengelenmesi ve paketlenmesi için kullanılan tampon): 0,4 g  $K_2HPO_4$  (3 mmol) alınarak 250 mL suda çözülüp pH:7,2'e getirildikten sonra destile su ile 300 mL'ye tamamlandı.
2. 10 mM  $K_2HPO_4$ , pH:7,2 (Numune kolona uygulandıktan sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon); 1,36 g  $K_2HPO_4$  (0,01 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. 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.
4. 5 mM GSH Çözeltisi: 0,01229 g GSH'nın, 20 mL 50 mM Tris-HCl içerisinde çözünmesiyle hazırlandı.
5. 50 mM Tris-HCl ve 1 mM, 2 mM, 4mM, 6mM, 8mM ve 10 mM GSH çözeltisi, pH:8,5 (Afinite jeline tutunan glutatyon 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	2.Tüp	3.Tüp	4.Tüp	5.Tüp	6.Tüp
10 mM GSH(tris-HCl'de çözülmüş) (mL)	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Saf su (mL)	4,5	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
Toplam Hacim (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

**7. Borat Tamponu:** 0,1 M  $H_3BO_3$  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.

### 3.1.8. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

- 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
- %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g suda çözülerek elde edildi.

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 edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 mL, %100'lük gliserinden 1 mL ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampon kullanılmadan önce 950 µl numune tamponunun üzerine 50 µl β-merkaptoetanol ilave edilerek hazırlandı.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su içerisinde 0,1 g coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su karıştırılarak elde edildi.

### 3.1.9. 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 AgNO<sub>3</sub> (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.

### 3.1.10. Diğer çözeltiler

1. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözülerek içerisinde %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. %0,04'lük bromtimol mavisi çözeltisi: 0,1 mL indikatör 16 mL 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim 250 mL olacak şekilde tamamlandı.

### 3.1.11. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler

- 1 M'lık  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ : 1,23 g  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$  saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
- 1 M'lık  $CaCl_2$ : 0,555 g  $CaCl_2$  saf su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1 M'lık  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,93 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1 M'lık  $NiSO_4$ : 0,77 g  $NiSO_4$  su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1M'lık  $CdSO_4 \cdot 5H_2O$ : 1.49 g  $CdSO_4 \cdot 5H_2O$  su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1 M'lık askorbik asit: 0,88 g askorbik asit saf su ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1 M'lık kumarin: 1,75 g kumarin etanol ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı
- 1 M'lık sodyum sülfid: 0,126 g sodyum sülfid tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
- 1 M'lık sitrik asit: 0,210 g sitrik asit tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
- 1 M'lık sodyum azid: 0,65 g sodyum azid tartıldı ve 5 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Protein tayini**

#### **3.2.1.a. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip fenilalanin, tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yol ile gerçekleştirildi (Segel and Woodin 1968). Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu.

#### **3.2.1.b. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini**

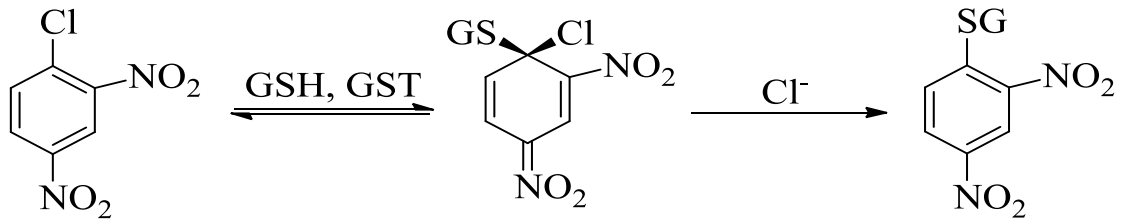
Jel filtrasyon ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{max}=465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{max}=595$  nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100  $\mu$ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanarak ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu$ g protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe 100'er µl alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9'ar mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem sonunda 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976) (Şekil 4.1).

### 3.2.2. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi tayini

GST aktivitesinin ölçümü iki yöntemle belirlenebilir. Bunlardan ilki spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntem Habig ve arkadaşları ve Howie ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu GST'ye özgül substratın, GSH konjugasyonu ile ortaya çıkan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Diğer bir yöntem immünoradiyometrik yöntemdir ve serum doku örneklerinde ki GST aktivitesini radyoimmünassay ile tayin etmek mümkündür (Howie *et al.* 1988).

Glutasyon S-transferaz enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. GST enziminin en sık kullanılan substratı aromatik elektrofilik 1-Klor-2,4- dinitrobenzen'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbans 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.** Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous *et al.* 2002)

Aktivite ölçümü için (Çizelge 3.2)'de gösterildiği gibi toplam hacim 1 mL olacak şekilde karışım hazırlandı. Bunun için kör olarak hazırlanan küvete 0,5 M 200 µl fosfat tamponu (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH:7,2) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde), 20 mM 50 µl GSH ve 730 µl saf su ilave edildi. Aktivite ölçümü yapılan küvete ise 0,5 M 200 µl (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:7,2) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde) ilave edildi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 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. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig *et al.* 1974).

**Çizelge 3.2.** Yaban mersini GST enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

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

**Bir Enzim Ünitesi:** Standart koşullarda, 25°C'de 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı 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

$\Delta$ OD: 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)

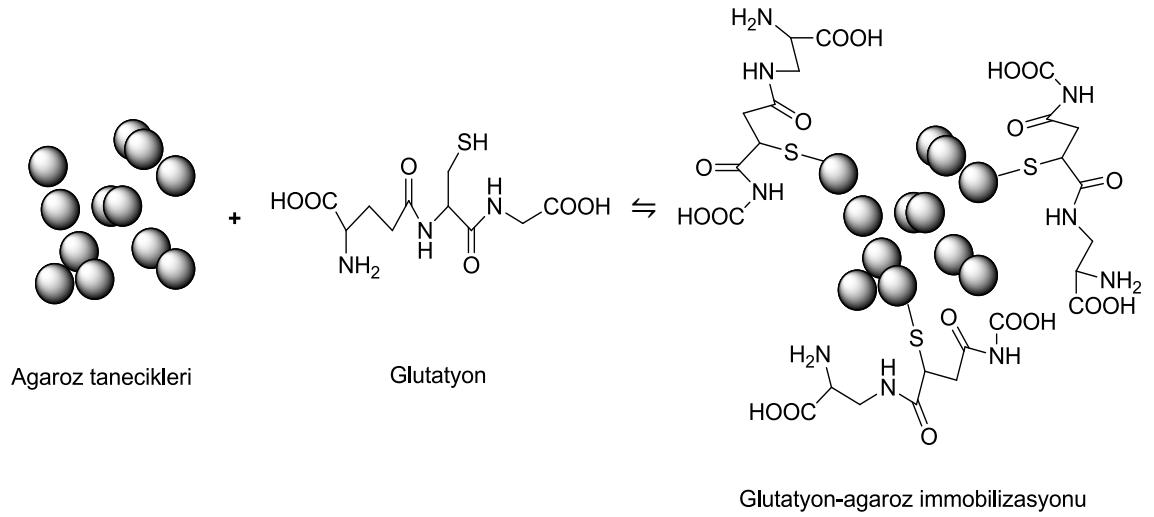
### **3.2.3. GST enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması**

Büyük hacimli bir beher içerisine alınan Sephadex G-100 materyali, saf su veya tampon kullanılarak, oda sıcaklığında 1 gece ya da 90°C'de su banyosunda 4-5 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilen materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilen ve havası alınan polimer materyal, dengeleme tamponuyla (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:7,4, 150 mM NaCl) dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğinin tespiti için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH'sı ve 280 nm'deki absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi ve kolonun akış hızı yaklaşık 15-20 mL/saat olarak ayarlandı (Uyanık 2008).

### **3.2.4. GST enzimi için afinite jelinin hazırlanması**

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan metod olan afinite kromatografisi bizim de ilgimizi çeken bir tekniktir. Bu amaçla 10 mL'lik yatak hacmi için 1 g kuru glutatyon agaroz tozu tartıldı, 200 mL saf su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (0,05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH:7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu (Toribio *et al.* 1996; Güvercin *et al.* 2008).





**Şekil 3.2.** Glutasyon-agaroz immobilizasyonu

### 3.2.5. Yaban mersini meyvesinden GST enziminin saflaştırılması için yapılan çalışmalar

#### 3.2.5.a. Yaban mersini temini ve homojenat hazırlanması

Bu tez kapsamında kullanılan yaban mersini meyvesi Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir. Eylül ve ekim aylarında hasat edilen yaban mersini (Şekil 1.21) Karadeniz Bölgesinin Tokat ili Erbaa ilçesinin yaylalarından toplanmıştır. Yaban mersini meyvesi antosiyanin, fenolik ve antioksidan özellikleri açısından incelenmiş ve aydınlatılmıştır (Prior *et al.* 1998; Moyer *et al.* 2002; Çelik *et al.* 2008).

20 g meyve sıvı azot kullanılarak mekanik olarak birkaç basamakta parçalandı. Sonra üzerine 25 mL homojenat tamponu ilave edildi ve homojenizatör vasıtasıyla yaklaşık 8 dakika homojenize edildi. Elde edilen 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**

Numune tatbik edilmeden önce dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisinin jel düzeyine inmesi sağlandı. Örnek (%10'luk gliserinli yaklaşık 4 mL) protein çözeltisinden küçük hacimde kolona tatbik edildi. Bu protein çözeltisi jele iyice emdirildi ve üzerine birkaç ml elüsyon tamponu dikkatlice ilave edilerek tekrar jele geçişi sağlandı. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak işleme devam edildi; her bir elüat yaklaşık 1,5 mL olacak şekilde tüplerde toplandı. Elüsyon tamponunun kör olarak kullanılmasıyla, toplanan elüatların herbirinin 280 nm de absorpsanları ölçüldü. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorpsan değerleri 0,05 oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorpsan gösteren tüplerde yine aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif protein tayini için alınan absorpsan değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2). Kromatografi işlemi sonunda enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi.

### **3.2.6. Enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması**

Jel filtrasyon kromatografisi sonunda birleştirilen yüksek aktiviteli tüpler glutatyon-agaroz afinite kolonuna uygulandı. Bunu takiben kolondan 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH:7,2 geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorpsan değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon dengelendikten sonra gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Elüsyon çözeltisi 50 mM Tris-HCl ve 5mM GSH (1,25-10 mM GSH, pH:9,5) içeren çözeltinin gradientinden oluşturuldu. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alındı ve 340 nm'deki absorpsanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı (Fournier *et al.* 1992).

### **3.2.7. 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).

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 aparatına konuldu. Öncelikle ayırma jeli hazırlandı akabinde enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Jelin donması beklendi, bu jelin 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 önendi. 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 120 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 sabitleştirme çözeltilisine konuldu. Sabitleştirme çözeltilisinde 30 dakika bekletilen jel, redüksiyon işlemine tabi tutuldu, bunun için çalkalayıcı üzerinde 30 dakika bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltilisine konuldu. Jel daha sonra boyama işlemi yapılmak üzere gümüş nitrat çözeltilisi içerisine konuldu. 20 dakika süren bu işlem sonrasında jel çıkarılarak yıkama 1 ve yıkama 2 çözeltililerine konuldu. Protein

bantlarının belirginleşmesine kadar çalkalayıcıda yıkanan jel alınarak fotoğraf çekimi yapıldı (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 etilendiamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 mL %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] 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. Yaban Mersini Meyvesinden Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi**

Yaban mersini 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 0,1 M fosfat tamponu ve pH'sı 7,0, 7,5, 8,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponu 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**

Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M, 1 M, 1,2 M fosfat tamponları hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri optimal pH olan 7,2'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 ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesi

Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığı,  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  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.  $0^\circ\text{C}$  ile  $70^\circ\text{C}$  arasında ve her  $10^\circ\text{C}$ 'de bir bu şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları ( $\log K$ ) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilererek grafikte  $1/T \times 1000^{-1}$  olarak ifade edildi (Çizelge 4.5-4.7 ve Şekil 4.8). (Danışan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) hesaplandı.

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

Aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ )'nin hesabında ise  $\Delta H = E_a - R \times T$  formülünden faydalanıldı (Wilson 1971; Segel 1975) (Çizelge 4.6). Daha sonra bir enzim için,  $10^\circ\text{C}$ 'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan  $Q_{10}$  değeri, aralarında  $10^\circ\text{C}$  fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Çizelge 4.7). (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

### 3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi

Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil olduğu pH'nın belirlenmesi için 100 mM'lık, pH değerleri 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 7,0 ve 7,5 olan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tamponu çözeltileri ile 100 mM'lık Tris-HCl tamponunun pH değerleri 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 olan çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 500  $\mu\text{l}$  alınarak üzerine yine 500  $\mu\text{l}$  enzim çözeltisi ilave edilerek ependorf tüplerine konulup ilk okuma yapıldıktan sonra  $+4^\circ\text{C}$ 'de

korunarak her 24 saatte bir 5 gün 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 4.6-4.7, Şekil 4.9-4.10).

### 3.3.5. Yaban mersini GST enziminin GSH ve CDNB substratları için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve özgüllük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasına yönelik çalışmalar

Yaban mersini 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, 0,1mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM ve 1,6 mM) ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre  $1/V$  ve  $1/[CDNB]$  değerleri bulunarak 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'nin 5 farklı konsantrasyonu (0,05 mM, 0,1mM, 0,2mM, 0,4 mM, 0,8 mM ve 1,6 mM) ile aktivite ölçümleri yapılarak  $1/V$  ve  $1/[GSH]$  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 özgüllük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasıdır. Özgüllük sabiti aşağıdaki formülle hesaplanır.

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

Elde edilen grafikler Şekil 4.11-4.12 ve Çizelge 4.9’da gösterilmektedir.

### **3.4. Yaban Mersini GST Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisit, Kimyasal Bileşik ve Metal İyonlarının IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

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<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu maddelerin Ki değerlerini belirlemek amacıyla yaban mersini 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 en az 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 (Şekil 4.13-4.30).

### **3.5. Yaban Mersini Meyvesinden Elde Edilen GST Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Kimyasal Bileşiklerin Ki Sabitlerinin Bulunması**

İnhibitör çalışmaları için, yaban mersini meyvesinden elde edilen GST enzimini inhibe eden NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CdSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O metal iyonu çözeltileri; askorbik asit, sitrik asit, kumarin, sodyum sülfid, sodyum azid organik bileşikleri ile diklorvos, asetamiprit, sipermetrin, imidakloprit, fenoksiaprop-p-etil, siyalotrin, haloksifop-p-Metil, 2,4 diklorophenoksi asetik asit, glifosfat izopropilamin tuzu pestisitleri kullanıldı. Ayrıca Pb<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve etanol kimyasallarında çalışılmış fakat enzim üzerine etki etmediği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çalışmalarda kullanılmak üzere en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu, stok çözeltiler kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine benzer olarak; her bir substrat

konsantrasyonu için en uygun olan üç farklı inhibitör konsantrasyonu, inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi.

Spektrofotometrede belirli hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneyler için de kullanıldı.

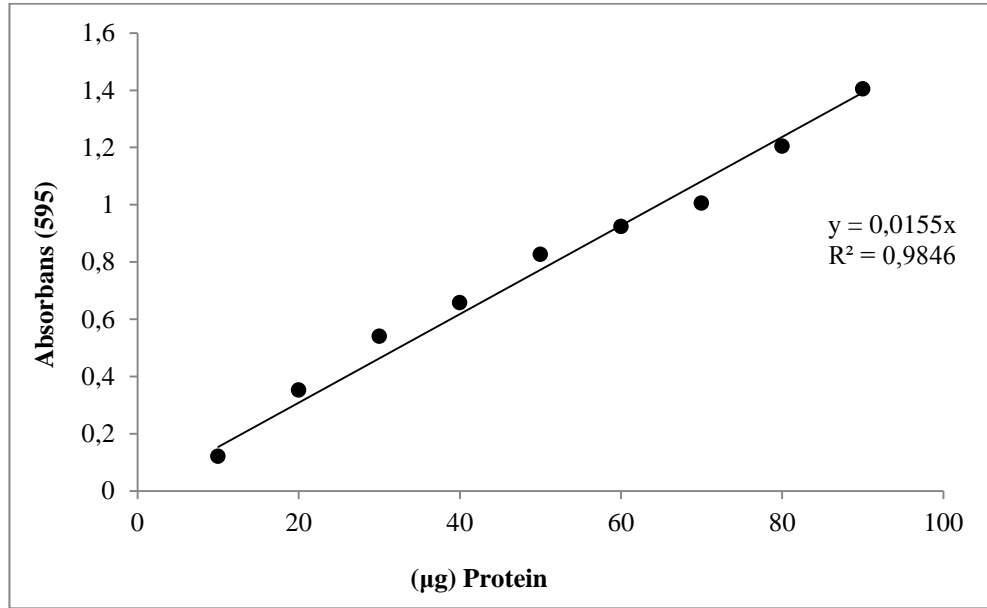
Daha sonra yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $V-[S]$  değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Şekil 4.31-4.43) (Lineweaver and Burk 1934).



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Elde edilen 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.



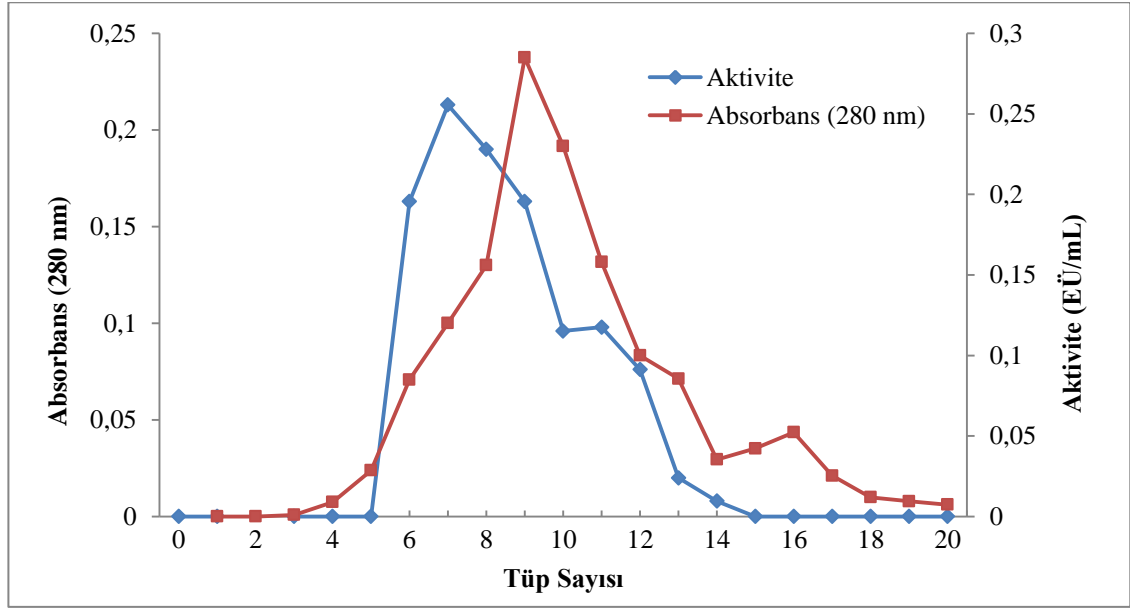
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

### 4.2. Yaban Mersini Meyvesi GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar

#### 4.2.1. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografi sonuçları

Yaban mersini meyvesi homojenatı (5 mL) hazırlanarak dengelenmiş olan jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Önceden hazırlanmış olan elüsyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elüsyonlar 2 mL'lik tüplere alındı, 280 nm'de absorbans değerleri ölçülerek

aktivite değerlerine bakıldı. Elde edilen elüatlardaki absorbans ve aktivite değerleri Şekil 4.2’de gösterildi. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu saflaştırılan GST enzimi için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterildi.

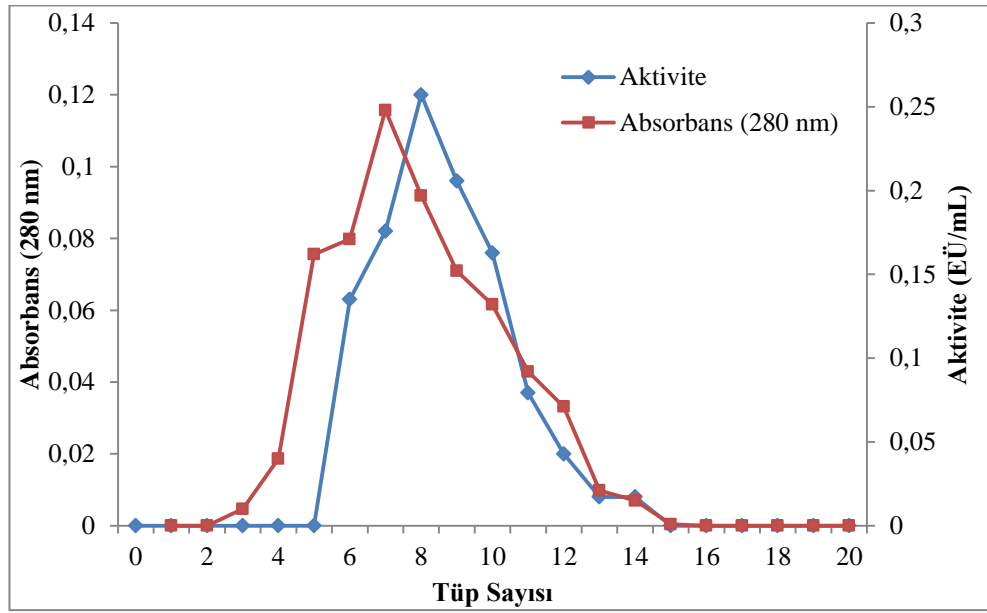


**Şekil 4.2.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği

#### 4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları

Jel filtrasyon sonrası elde edilen yüksek aktiviteli tüpler birleştirilerek (5 mL) önceden hazırlanmış ve dengelenmiş olan agaroz afinite kolonuna tatbik edildi. Önceden hazırlanmış olan elusyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elde edilen elüatlardaki absorbans ve aktivite değerleri ölçülerek tüp sayısına karşı çizilerek Şekil 4.3’de gösterildi.

Yaban mersini 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 4.3.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin glutasyon agaroz afinite kolonundan GSH ile elüsyon grafiği

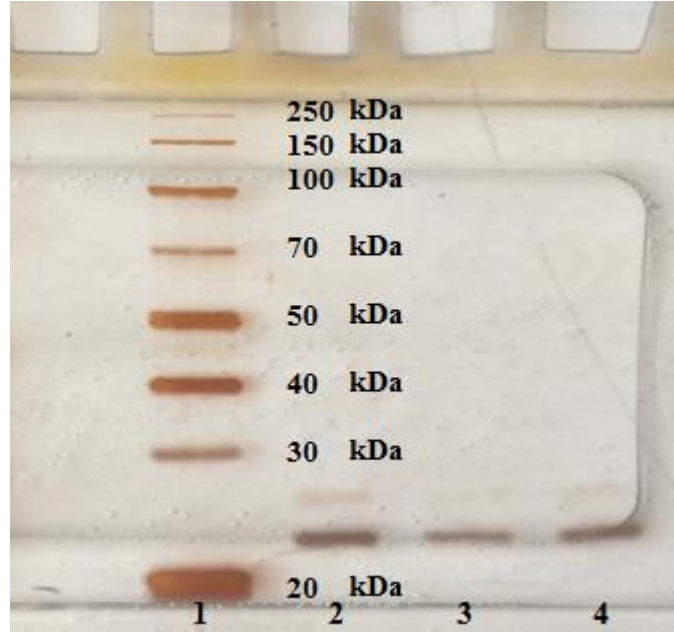
**Çizelge 4.1.** Yaban mersini meyvesi jel filtrasyon ve afinite kromatografisi sonrası saflaştırma sonuçları

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	30,00	0,120	0,806	3,600	24,180	0,148	100	1,00
Jel filtrasyon Kromatografisi	15,00	0,153	0,408	2,295	6,120	0,375	63,75	2,53
Afinite Kromatografisi	5,00	0,168	0,006	0,840	0,030	28,00	23,33	189,19

#### 4.3. SDS-poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile GST Enzim Saflığının Kontrolü

Yaban mersini bitkisi afinite kromatografisi sonrası elde edilen yüksek aktiviteli elüatlardaki GST enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.7’de 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.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi SDS-PAGE fotoğrafı

**1:** Standart Proteinler. **2,3,4:** Jel filtrasyon kromatografisi ve glutatyon agaroz kolonlarından elde edilen enzim numuneleri

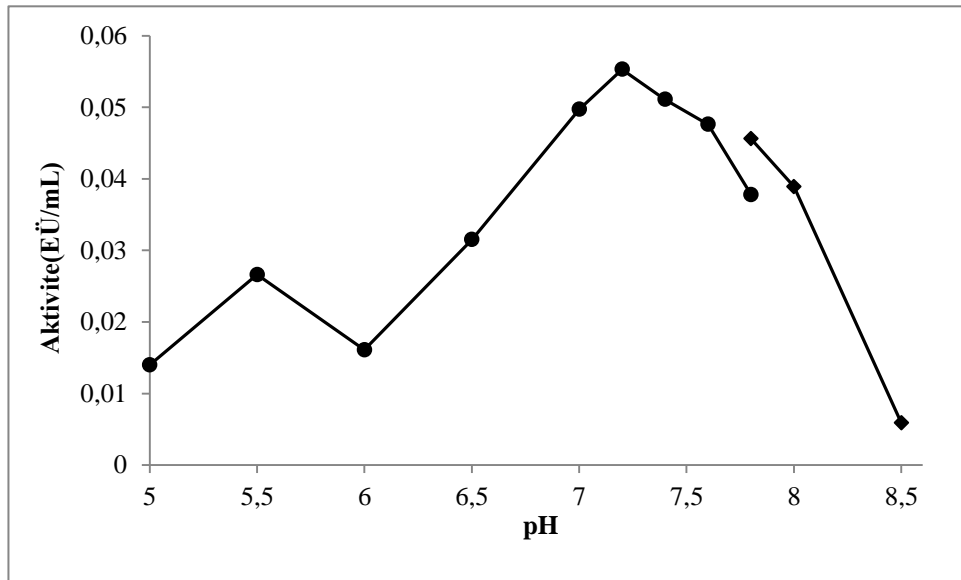
#### **4.4. Yaban Mersini Meyvesi GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları**

##### **4.4.1. Optimum pH’nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları**

Yaban mersini 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 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. Yaban mersini GST enziminin optimum pH değeri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5’de gösterildiği gibi K-fosfat tamponunda pH 7,2 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.2.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M  $K_2HPO_4$  tampon çözeltisi ile 0,1 M Tris-HCl çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	0,1 M $K_2HPO_4$ Aktivite (EÜ/mL)	0.1 M Tris-HCl Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,069	
5,5	0,131	
6,0	0,079	
6,5	0,156	
7,0	0,250	
7,2	0,274	
7,4	0,253	
7,6	0,236	0,243
7,8	0,187	0,226
8,0		0,131



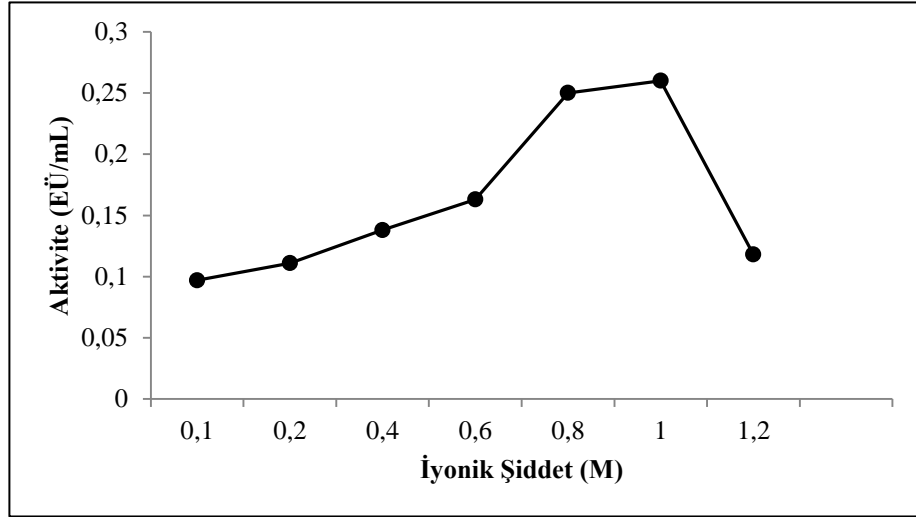
**Şekil 4.5.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin  $K_2HPO_4$  tamponu ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği

#### 4.4.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Yaban mersini 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  $K_2HPO_4$  konsantrasyonları kullanılarak enzimin gösterdiği absorban değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra her bir tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. Yaban mersini meyvesi GST enziminin iyonik şiddet değeri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'da gösterildiği gibi 1,0 M olarak belirlendi.

**Çizelge 4.3.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddeti için 0,1 M  $K_2HPO_4$  tampon çözeltisi ile kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

<b><math>K_2HPO_4</math></b>	
<b>İyonik Şiddet (M)</b>	<b>Aktivite (EÜ/mL)</b>
1,2	0,118
1	0,260
0,8	0,250
0,6	0,163
0,4	0,138
0,2	0,111
0,1	0,097



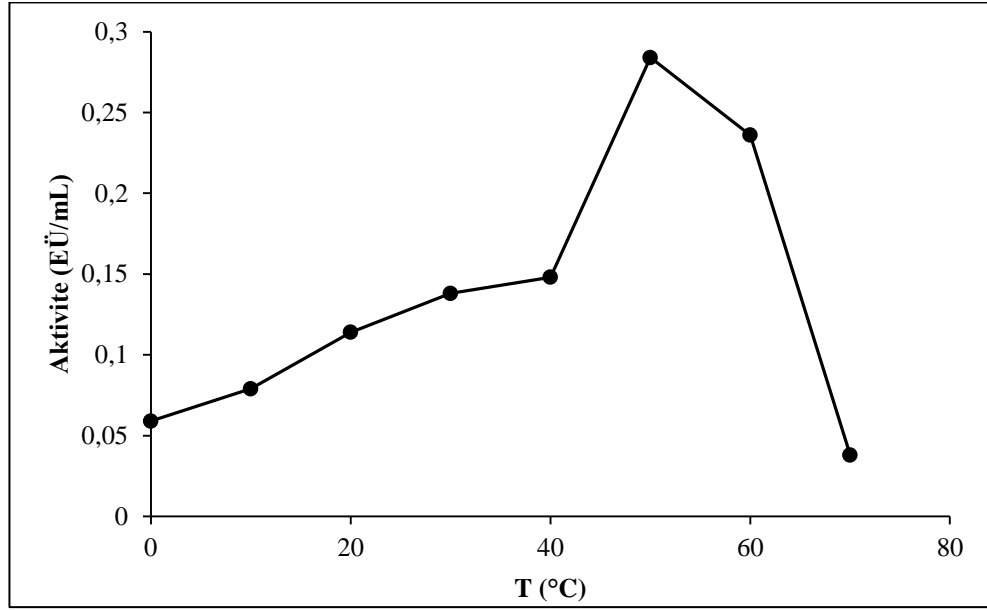
**Şekil 4.6.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek

#### 4.4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tampon çözelti kullanıldı. 0°C ile 70°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 50°C olarak belirlendi. Optimum sıcaklık çalışmalarından faydalanılarak enzimin  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplanarak Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8’de gösterildi.

**Çizelge 4.4.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,059
10	0,079
20	0,114
30	0,138
40	0,148
50	0,284
60	0,236
70	0,038

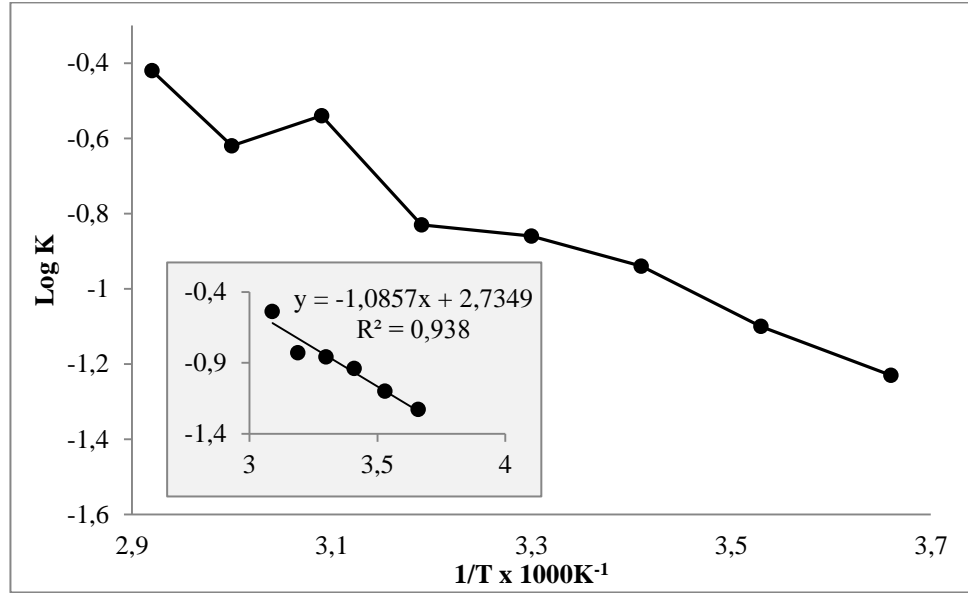


**Şekil 4.7.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

**Çizelge 4.5.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık,  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerlerinin belirlenmesi çalışmaları

Enzim	Optimum Sıcaklık (°C)	Aktivasyon Enerjisi ( $E_a$ ) (kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi ( $\Delta H$ ) (kcal/mol)	$Q_{10}$
<b>GST</b>	50	1,60	0,96	1,19





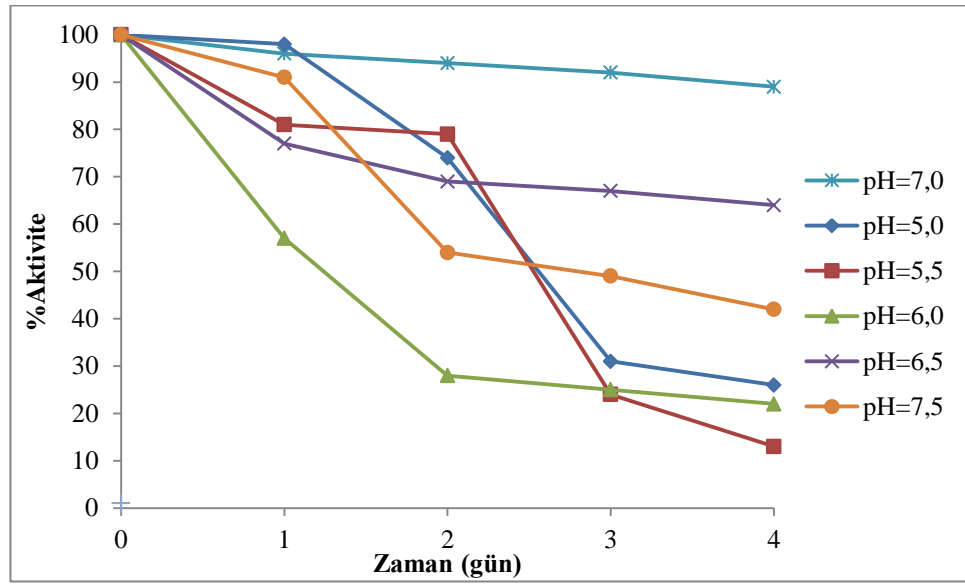
**Şekil 4.8.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi için optimum sıcaklık,  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerlerine ait grafik

#### 4.4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Yaban mersini 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 depo edildi ve 5 gün süreyle 24 saatte bir aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi ve zamana karşı %aktivite değerleri Çizelgeler 4.6-4.7 ve Şekiller 4.9-4.10'da gösterildiği gibi fosfat tamponu ile pH 7,0 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.6.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için fosfat tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

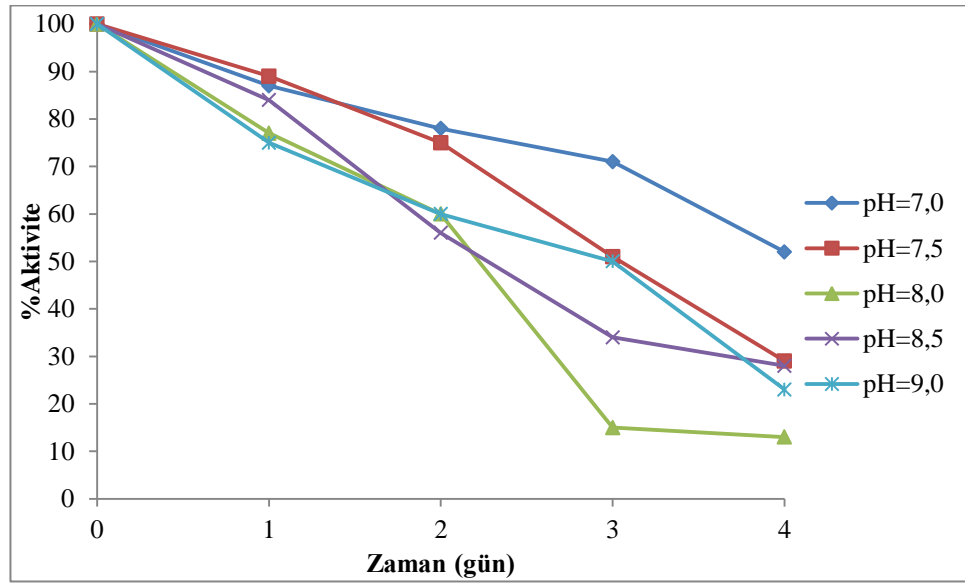
pH	5	5,5	6	6,5	7	7,5
<b>Zaman (saat)</b>	<b>Aktivite (EÜ/mL)</b>					
<b>0</b>	0,196	0,170	0,277	0,255	0,150	0,222
<b>24</b>	0,194	0,139	0,159	0,197	0,156	0,203
<b>48</b>	0,145	0,135	0,080	0,177	0,148	0,120
<b>72</b>	0,061	0,042	0,070	0,173	0,145	0,109
<b>96</b>	0,052	0,023	0,062	0,165	0,140	0,095



**Şekil 4.9.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için fosfat tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafiği

**Çizelge 4.7.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponuyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	7	7,5	8	8,5	9
<b>Zaman (saat)</b>	<b>Aktivite (EÜ/mL)</b>				
<b>0</b>	0,356	0,321	0,275	0,354	0,423
<b>24</b>	0,312	0,286	0,213	0,300	0,321
<b>48</b>	0,279	0,241	0,165	0,200	0,256
<b>72</b>	0,254	0,165	0,043	0,121	0,214
<b>96</b>	0,187	0,096	0,036	0,102	0,098



**Şekil 4.10.** Yaban mersini meyvesi GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik

**Çizelge 4.8.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi için belirlenen optimal aktivite şartları ve stabil pH değeri

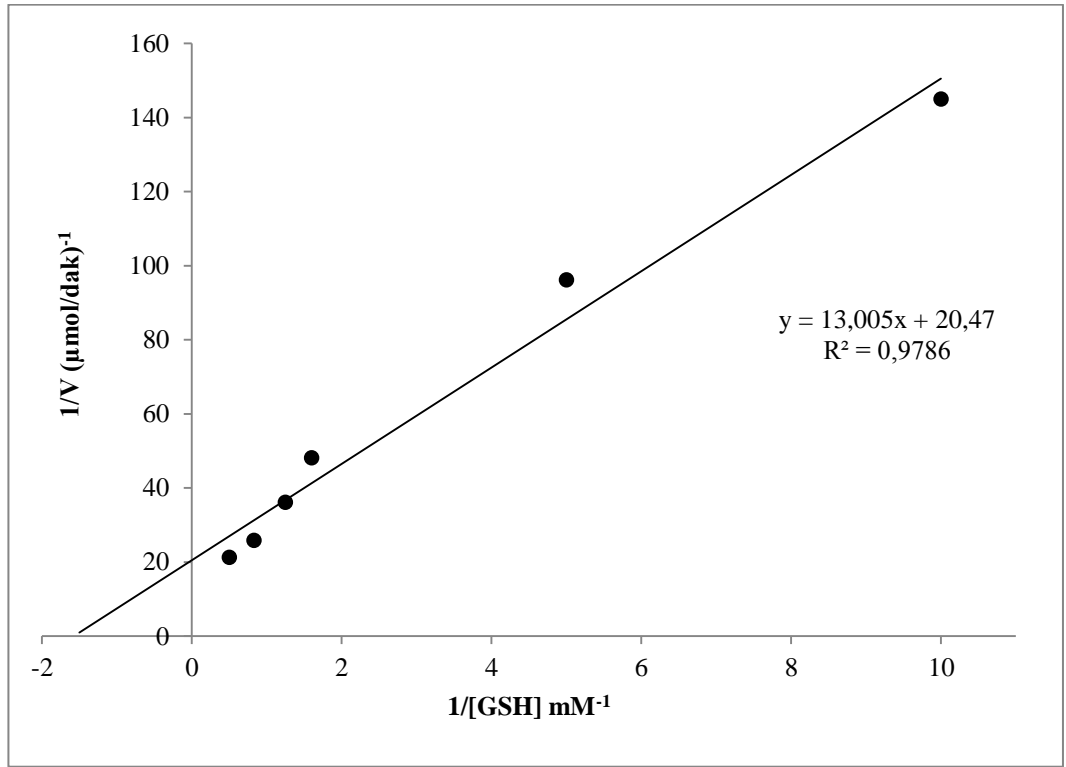
Enzim	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Optimum iyonik şiddet	Stabil pH
GST	7,2	50°C	1,0 M	7,0

#### 4.4.5. Yaban mersini 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

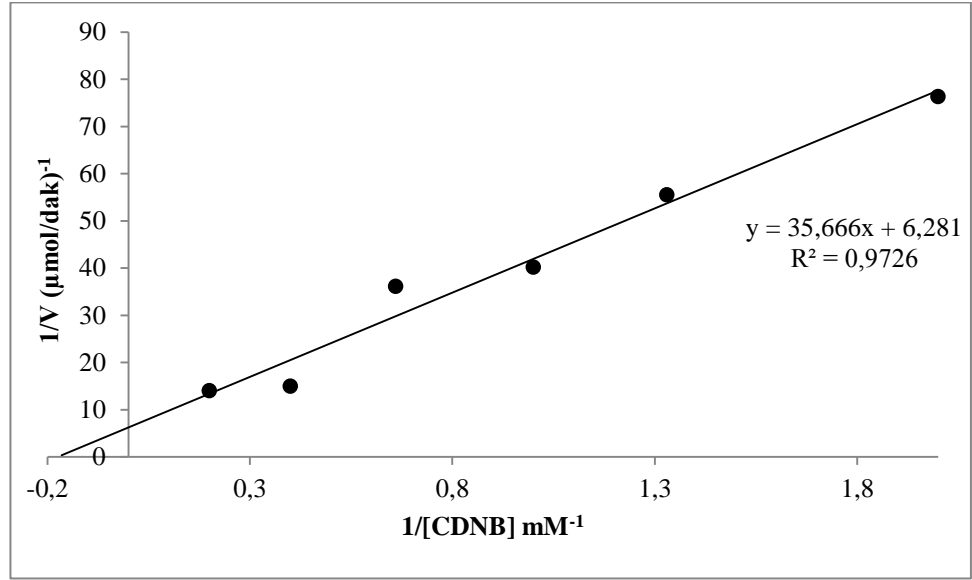
Yaban mersini meyvesi GST enziminin substratı olan GSH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi CDNB'nin 0,5 mM'lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı GSH konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Sonuçta elde edilen değerler ile  $1/V - 1/[GSH]$  grafiği çizilerek reaksiyon denkleminde  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.11 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'nin 1mM'lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonuyla aktivite

ölçümleri yapılarak  $1/V - 1/[CDNB]$  grafiği çizildi ve reaksiyon denkleminde  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.9).

Daha sonra bulunan  $K_M$  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 4.11.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi grafiği



**Şekil 4.12.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerlerinin belirlenmesi grafiği

**Çizelge 4.9.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi için GSH ve CDNB substratları için  $K_M$ ,  $V_{\max}$ ,  $k_{\text{cat}}$  ve  $V_0$  değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

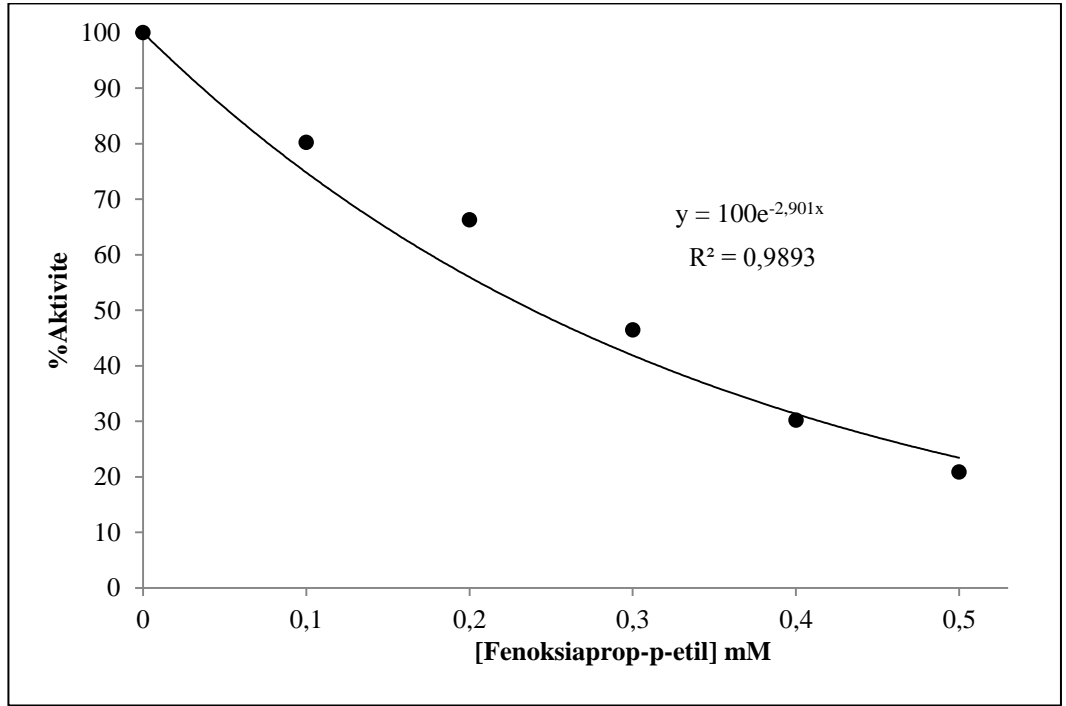
Enzim	Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (EÜ/mL)	$k_{\text{cat}}$ (s) $^{-1}$	$V_0$ (M $^{-1}$ .s $^{-1}$ )
GST	GSH	0,635	0,048	15,410	24267
	CDNB	5,681	0,159	50,210	8839

#### 4.5. Yaban Mersini Meyvesi GST Enzimi Üzerine Bazı Pestisit, Metal İyonları ve Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

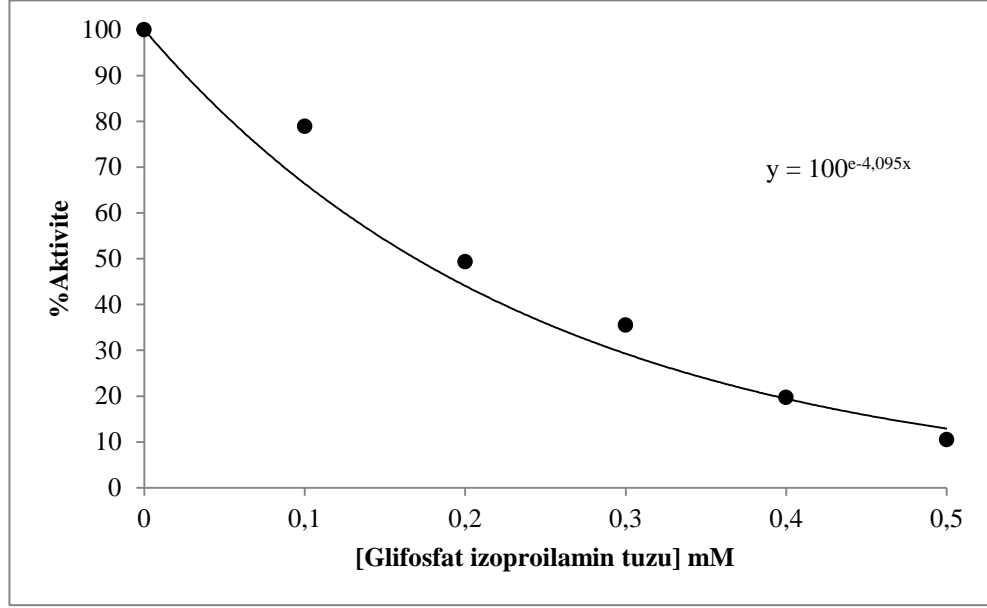
##### 4.5.1. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Yaban mersini meyvesinden jel filtrasyon ve afinite kromatografisiyle saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin inhibisyon etkileri incelendi. Enzim aktivitesini inhibe eden diklorvos, asetamiprit, siyalotrin, haloksifop-p-metil, 2,4 diklorofenoksi asetik asit, sipermetrin, imidakloprit, fenoksiaprop-p-etil, glifosfat

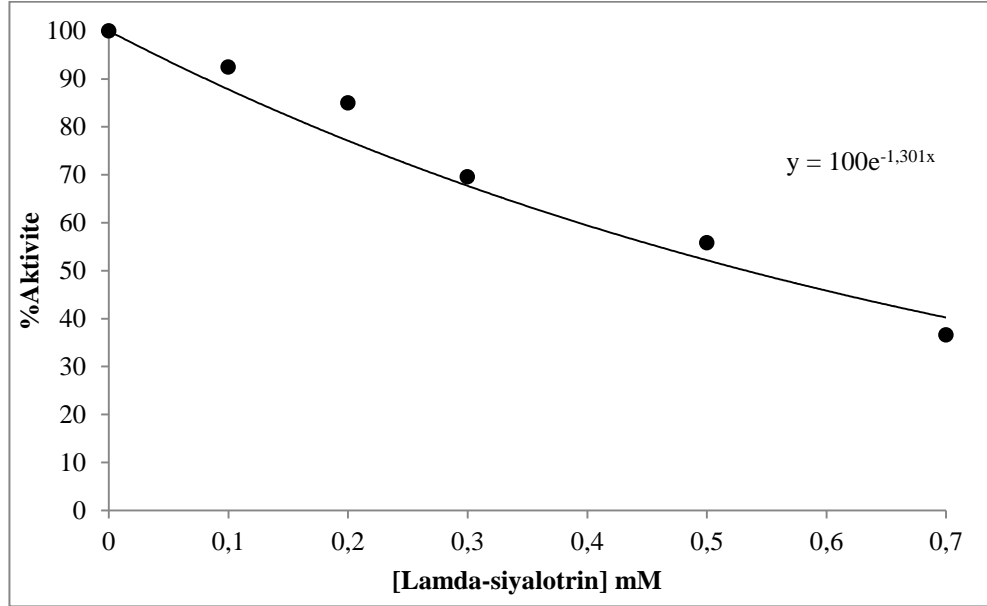
izopropilamin tuzu pestisitleri ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak  $IC_{50}$  değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile %aktivite-[I] grafikleri çizilerek Şekil 4.13-4.21 aralığında belirtildi ve grafiklerdeki denklemlerden faydalanılarak  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak Çizelge 4.10'da gösterildi.



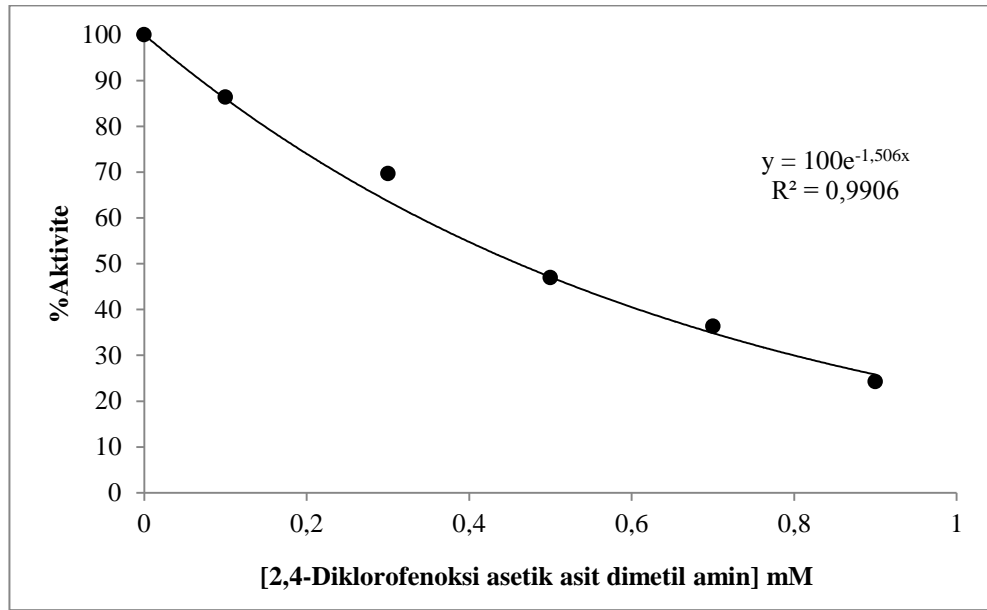
**Şekil 4.13.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi fenoksiapro-p-etil'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Fenoksiapro-p-etil] grafiği



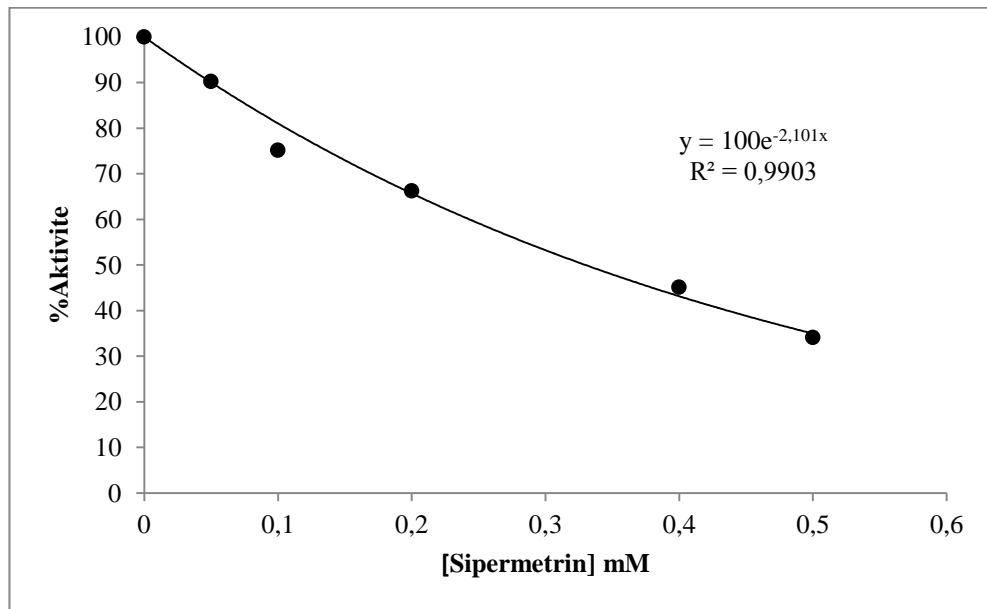
**Şekil 4.14.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Glifosfat izopropilamin tuzu'nun farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Glifosfat izopropilamin tuzu] grafiği



**Şekil 4.15.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Lamda-siyalotrin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Lamda-siyalotrin] grafiği

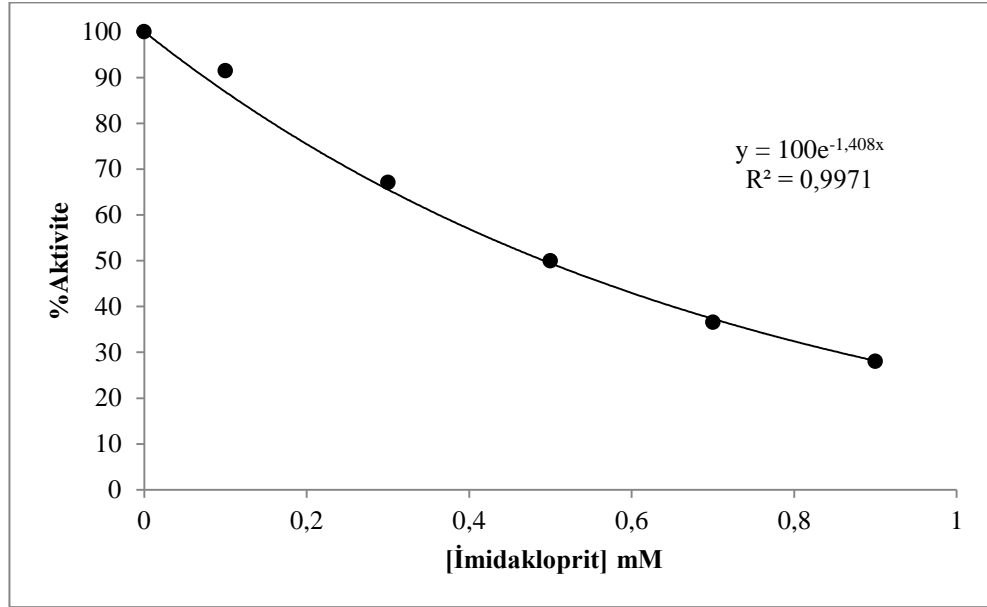


**Şekil 4.16.** Yabon mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine 2,4-diklorofenoksi asetik asit dimetil amin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [2,4-Diklorofenoksi asetik asit dimetil amin] grafiği

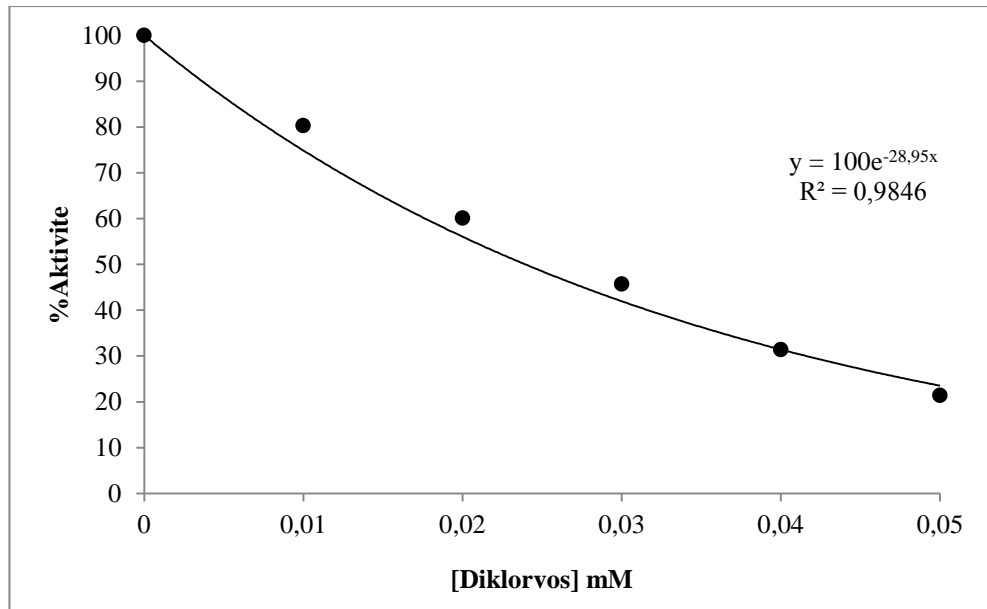


**Şekil 4.17.** Yabon mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Sipermetrin'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sipermetrin] grafiği

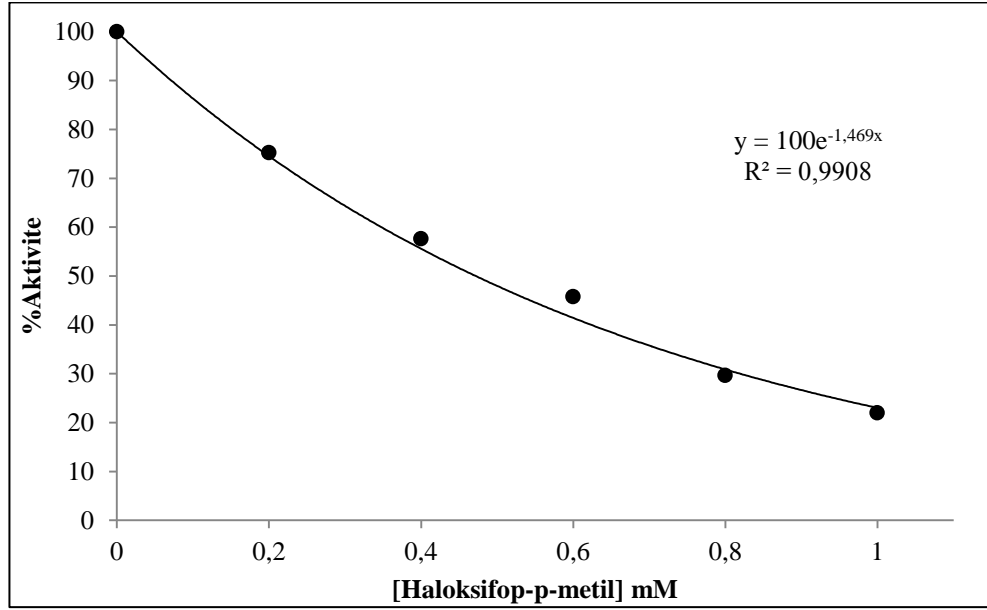




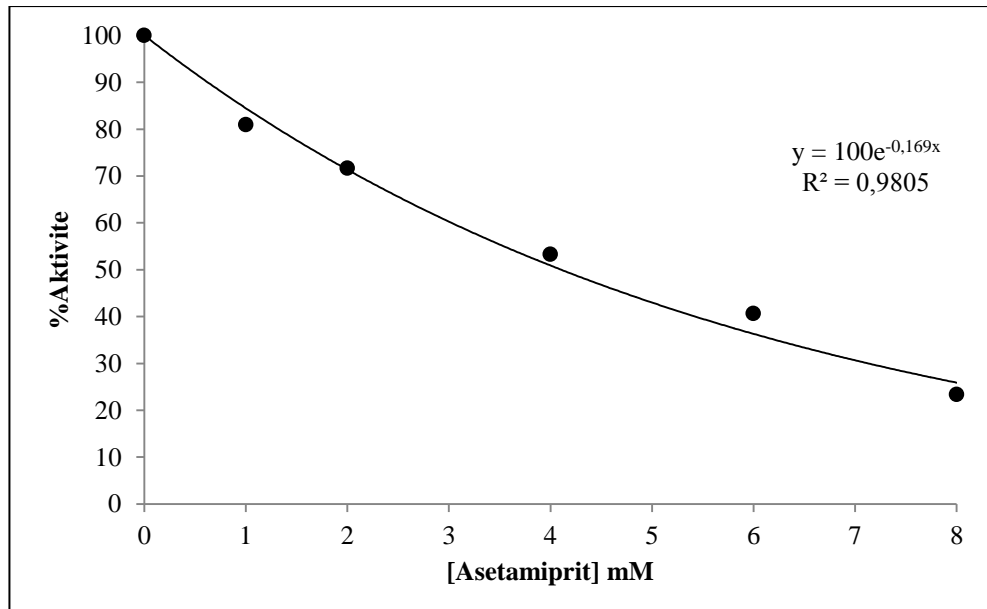
**Şekil 4.18.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine İmidakloprit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [İmidakloprid] grafiği



**Şekil 4.19.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Diklorvos] grafiği



**Şekil 4.20.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine haloksifop-p-metil'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Haloksifop-p-metil] grafiği



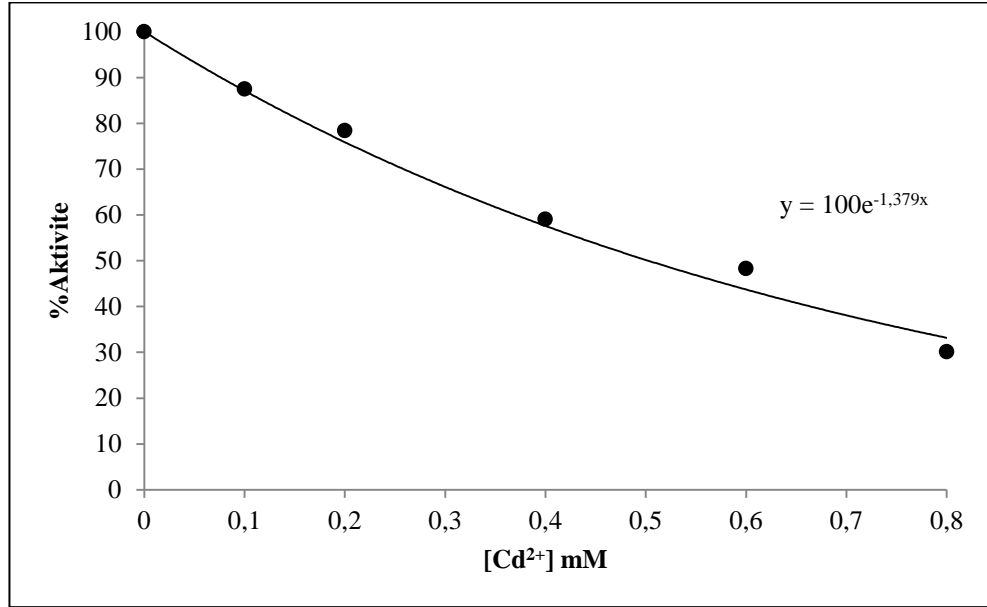
**Şekil 4.21.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Asetamiprit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Asetamiprit] grafiği

**Çizelge 4.10.** Yaban mersini meyvesi meyvesi GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerleri

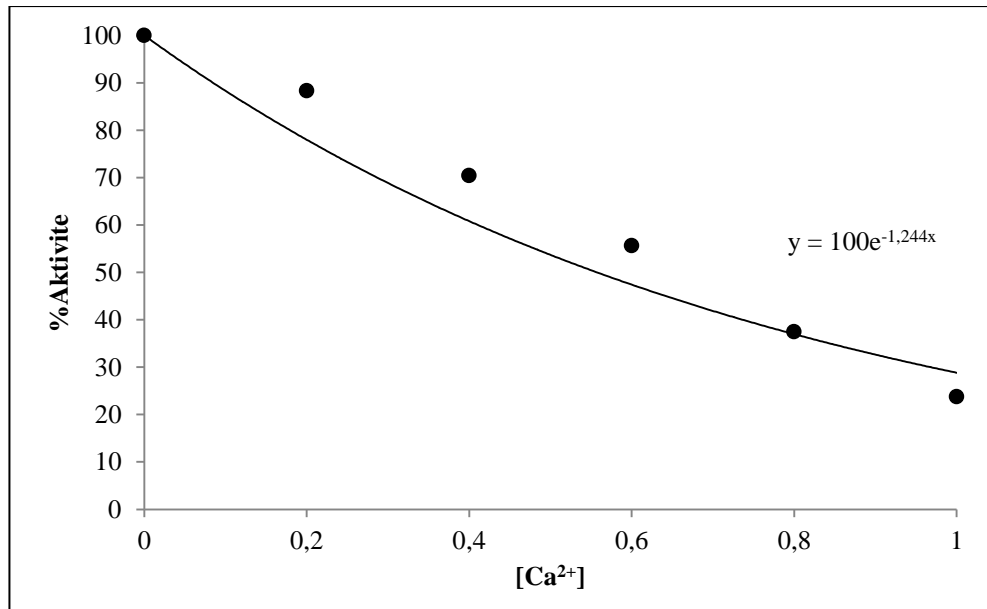
Kullanılan Pestisit	IC <sub>50</sub> (mM)
Glifosfat- izopropilamin tuzu	0,16
Fenoksiaprop- p-etil	0,23
Sipermetrin	0,32
Diklorvos	0,024
Imidakloprit	0,49
Asetamiprit	4,10
Lamda-Siyalotrin	0,53
Haloksifop-p-Metil	0,47
2,4 Diklorofenoksi asetik asit	0,46

#### 4.5.2. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

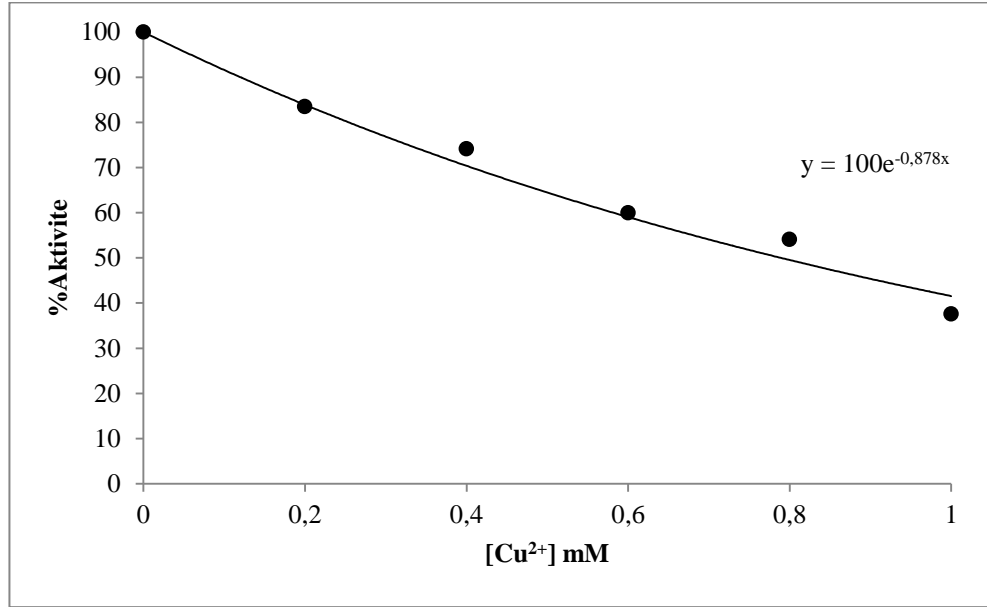
Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden Cadmiyum (Cd<sup>2+</sup>), Nikel (Ni<sup>2+</sup>), Bakır (Cu<sup>2+</sup>), Magnezyum (Mg<sup>2+</sup>), Kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) ile sabit substrat konsantrasyonunda en az beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC<sub>50</sub> değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile %aktivite-[I] grafikleri çizilerek Şekil 4.22-4.26 aralığında belirtilip IC<sub>50</sub> değerleri eğri denklemlerinden faydalanılarak hesaplandı ve Çizelge 4.11’de gösterildi.



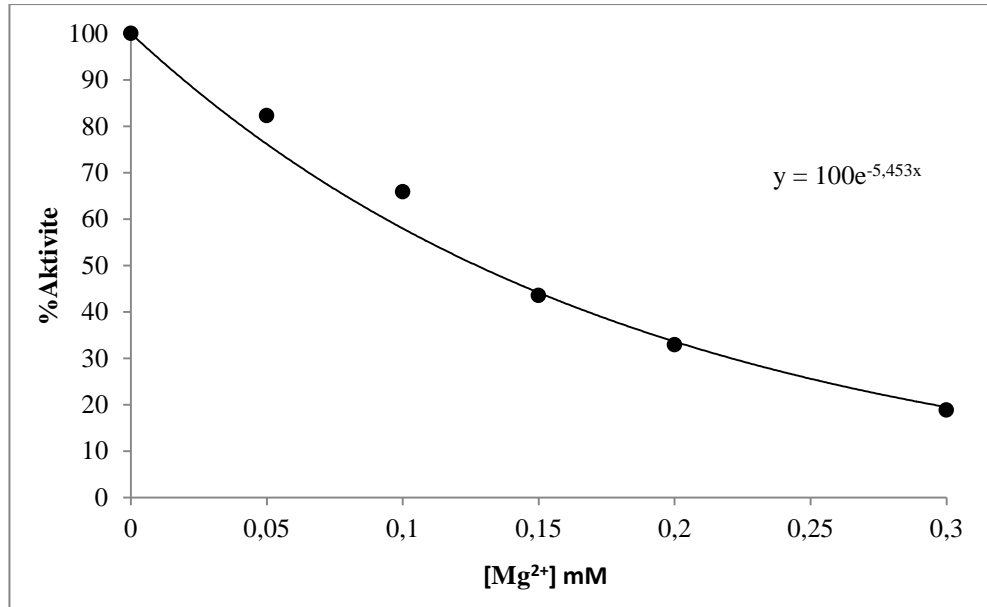
**Şekil 4.22.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Cd<sup>2+</sup>'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Cd<sup>2+</sup>] grafiği



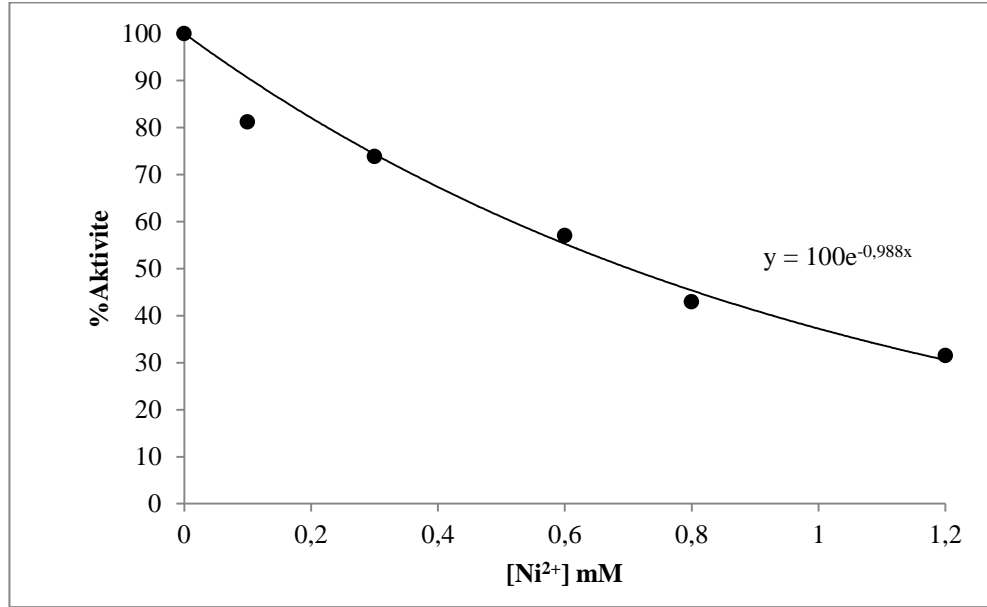
**Şekil 4.23.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine Ca<sup>2+</sup>'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Ca<sup>2+</sup>] grafiği



**Şekil 4.24.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite-  $[\text{Cu}^{2+}]$  grafiği



**Şekil 4.25.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine  $\text{Mg}^{2+}$ 'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite-  $[\text{Mg}^{2+}]$  grafiği



**Şekil 4.26.** Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Ni<sup>2+</sup>'nin farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Ni<sup>2+</sup>] grafiği

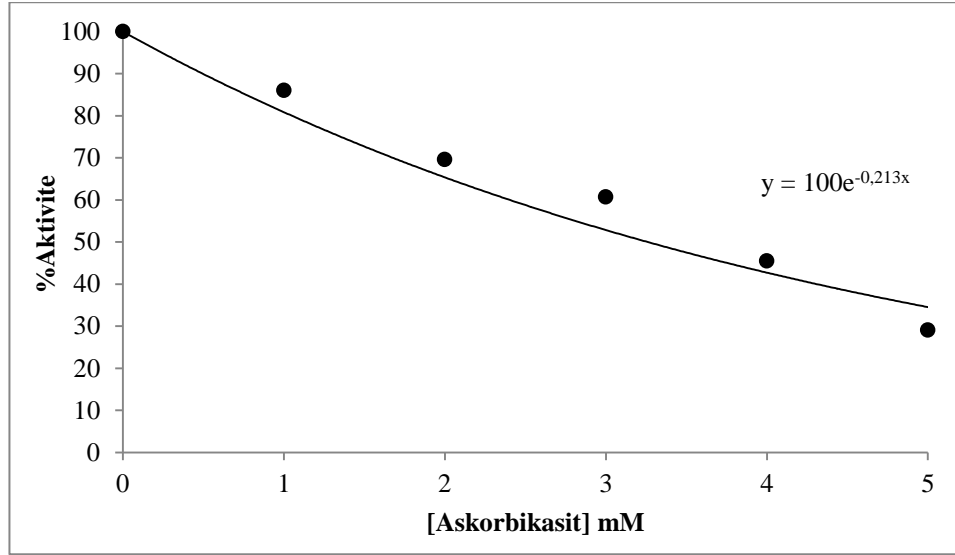
**Çizelge 4.11.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonların IC<sub>50</sub> değerleri

Kullanılan Metal İyonu	IC <sub>50</sub> (mM)
Cd <sup>2+</sup>	0,5025
Ni <sup>2+</sup>	0,7014
Cu <sup>2+</sup>	0,7890
Mg <sup>2+</sup>	0,1270
Ca <sup>2+</sup>	0,5500

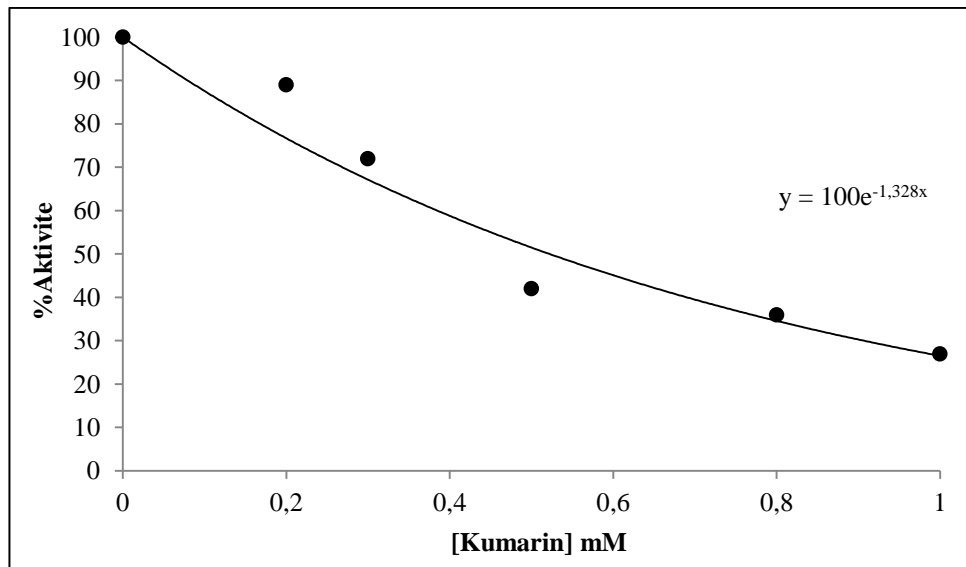
#### 4.5.3. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı kimyasal bileşikler için IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Yaban mersini meyvesinden afinite kromatografisiyle saflaştırılan GST enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Enzimin aktivitesini inhibe eden kumarin, askorbik asit, sodyum sülfid, sodyum azid, sitrik asit organik bileşikleri ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör

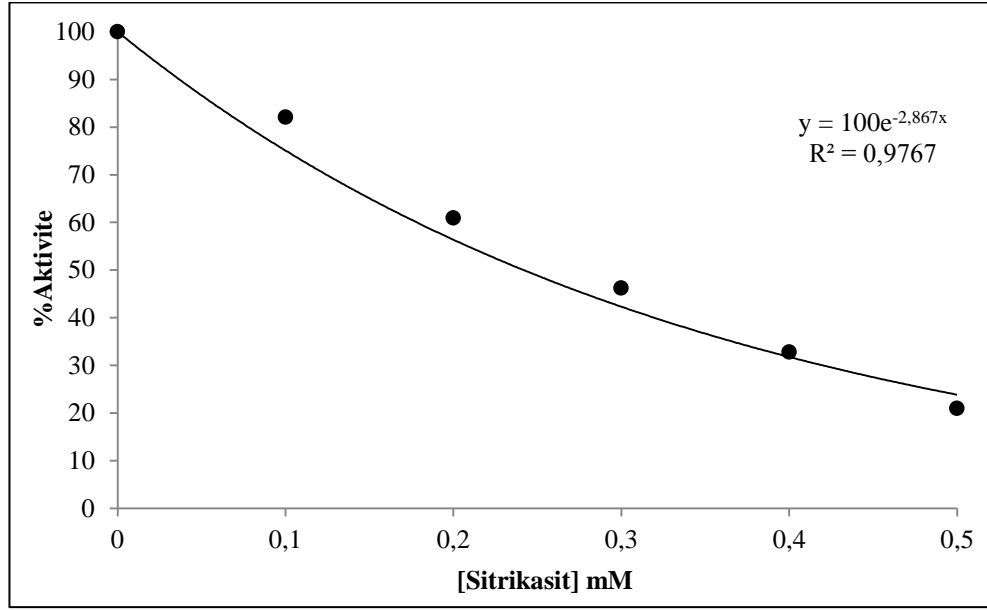
konsantrasyonu kullanılarak  $IC_{50}$  değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) ile % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Şekil 4.27-4.31 aralığında belirtilip çizilen grafiklerin eğri denklemlerinden faydalanılarak  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.12’de gösterildi.



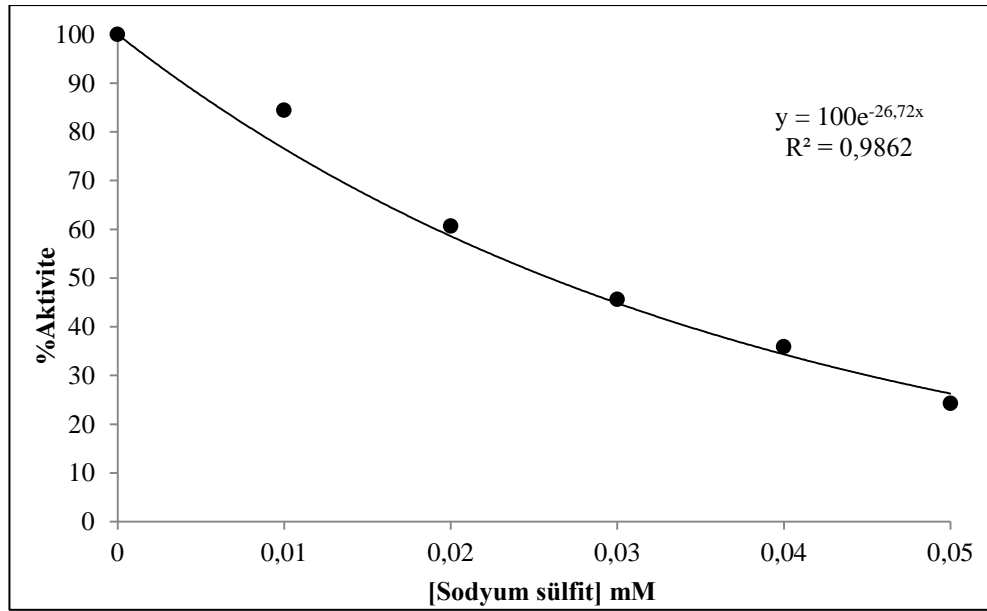
**Şekil 4.27.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine askorbik asit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [askorbik asit] grafiği



**Şekil 4.28.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine kumarin'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Kumarin] grafiği

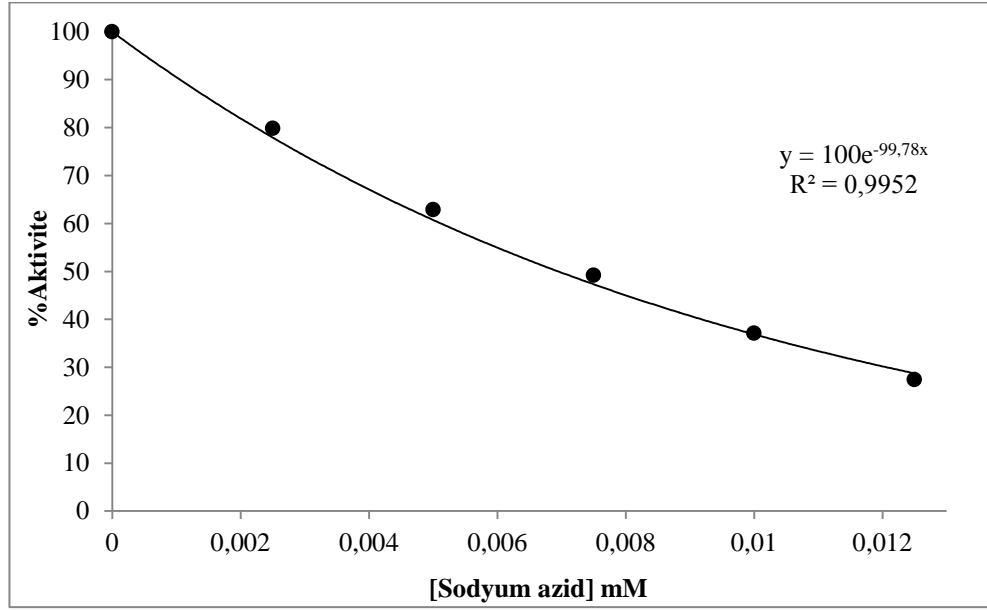


**Şekil 4.29.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sitrikasit'in farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sitrik asit] grafiği



**Şekil 4.30.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sodyum sülfite farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sodyum sülfite] grafiği





**Şekil 4.31.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine sodyum azid farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite- [Sodyum azid] grafiği

**Çizelge 4.12.** Yaban mersini meyvesi GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kimyasal bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri

Kullanılan Bileşik	IC <sub>50</sub> (mM)
Kumarin	0,522
Askorbik asit	3,253
Sodyum sülfid	0,025
Sodyum azid	0,006
Sitrik Asit	0,241

#### 4.5.4. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren pestisitler için K<sub>i</sub> sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Inhibitör çalışmasında yaban mersini bitkisi GST enzimi üzerine diklorvos, asetamiprit, siyalotrin, haloksifop-p-metil, 2,4 diklorofenoksi asetik asit, sipermetrin, imidakloprit, fenoksiaprop-p-etil, glifosfat 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. Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için  $K_i$  değerlerinin belirlenmesinde kullanılan pestisit için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği çizilip  $K_i$  değeri ve inhibisyon tipi tayin edilerek sonuçlar Şekiller 4.32-4.40 aralığında ve Çizelge 4.13'de gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

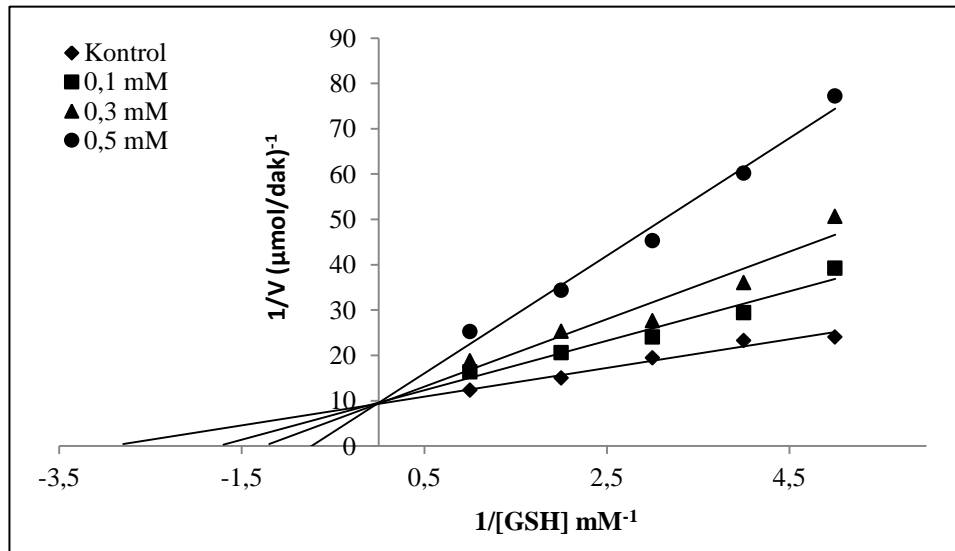
Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için inhibitör olarak kullanılan tüm maddeler için inhibisyon tipleri (yarşmalı inhibitör, yarı yarşmalı inhibitör, yarşmasız inhibitör) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

**Yarşmasız için ve Yarı Yarşmalı için:**

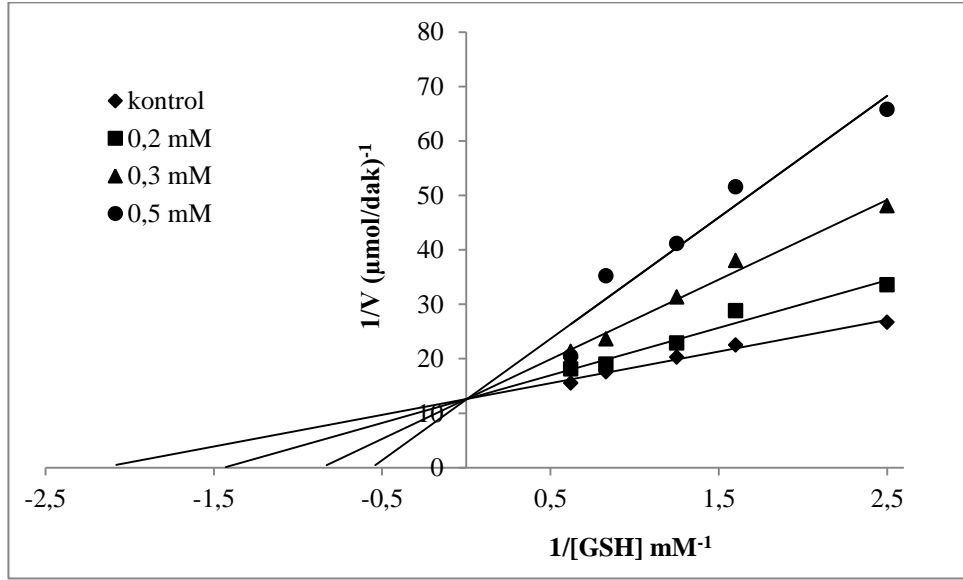
$$I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

**Yarşmalı için:**

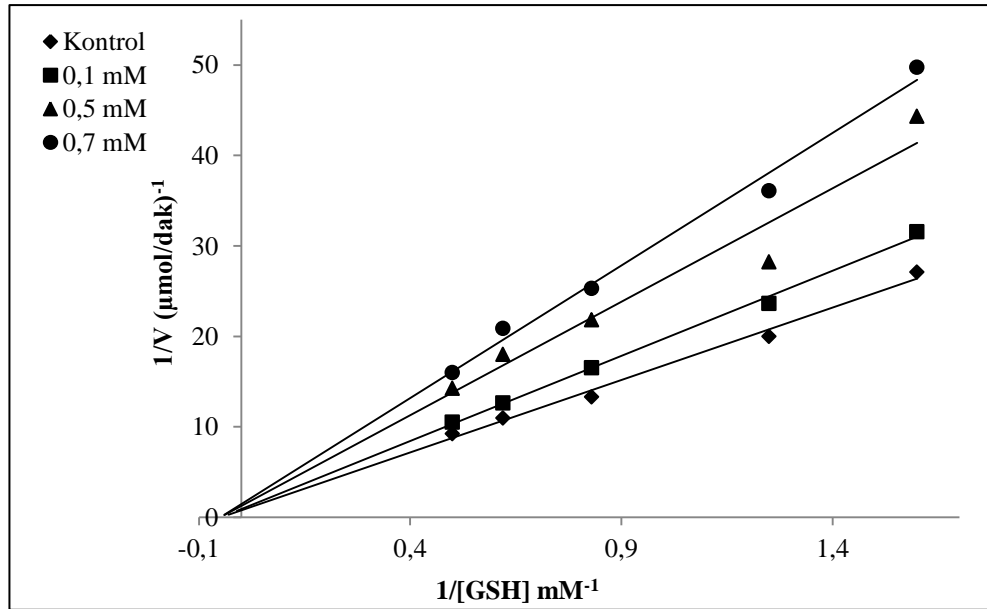
$$K_M I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$



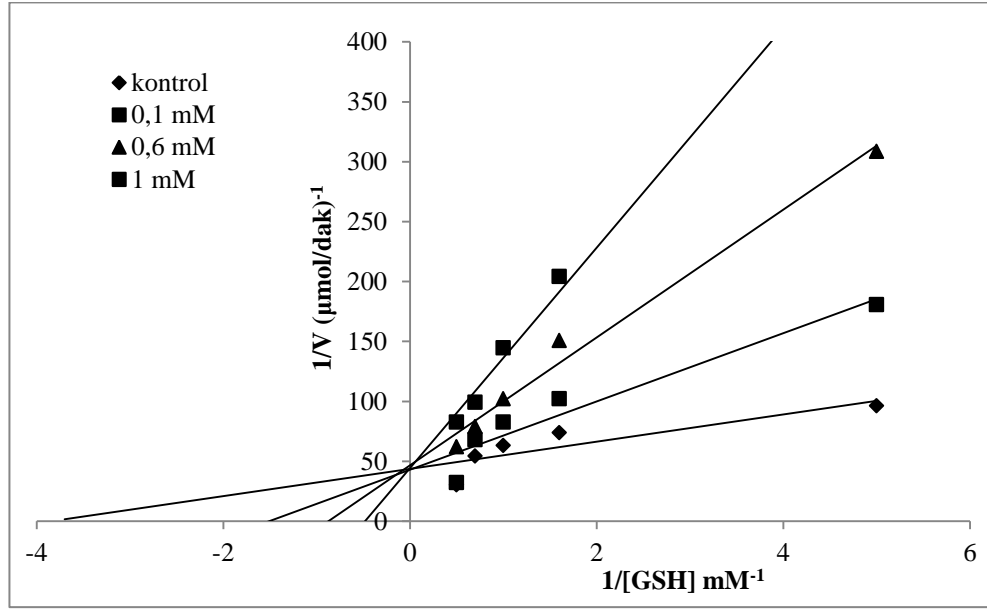
**Şekil 4.32.** Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Fenoksiaprop-p-etil'in inhibisyon etkisi



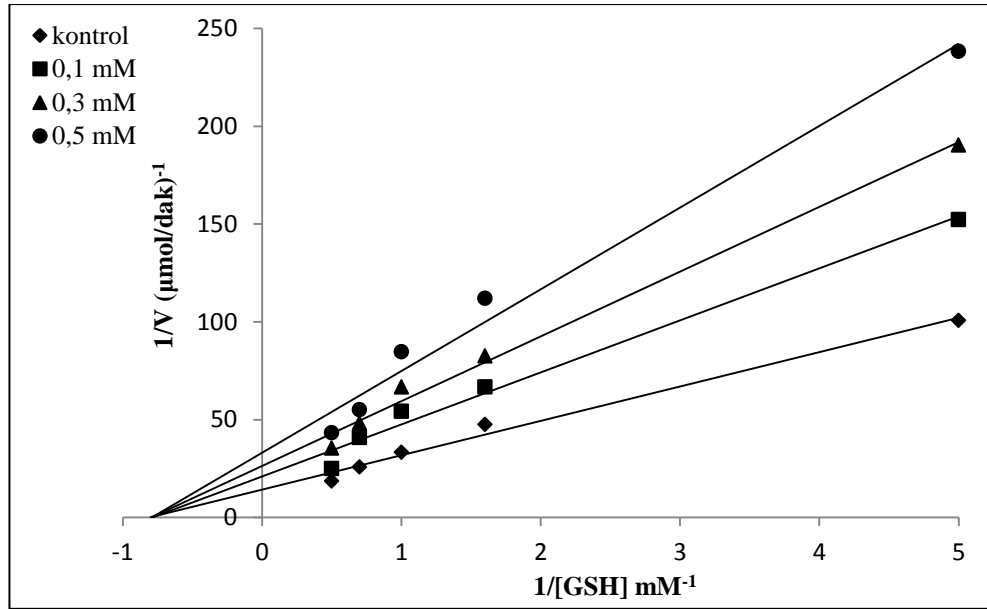
**Şekil 4.33.** Yabancı mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Glifosfat izopropilamin tuzu'nun inhibisyon etkisi



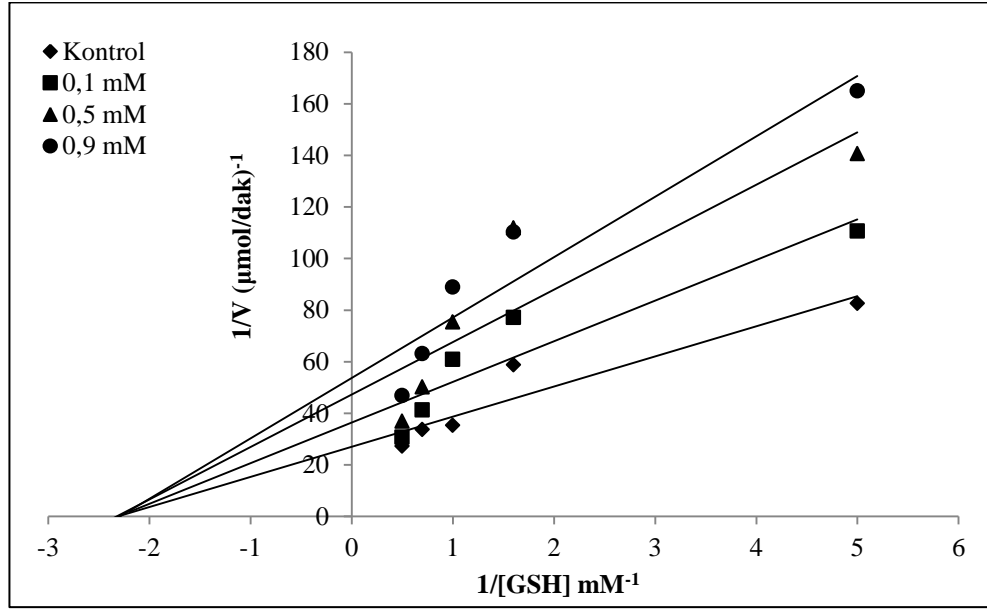
**Şekil 4.34.** Yabancı mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Lamda-siyalotrin'nin inhibisyon etkisi



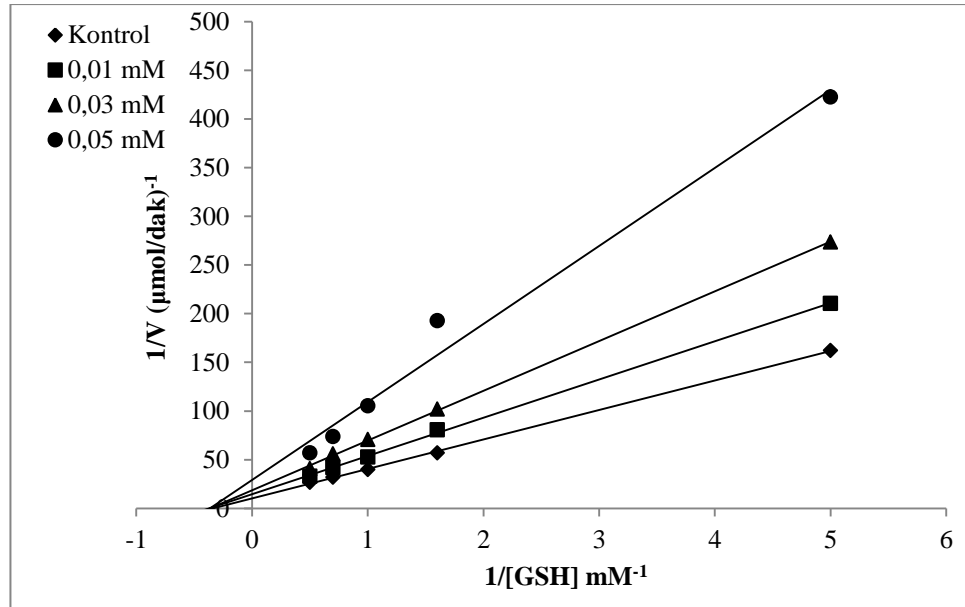
Şekil 4.35. Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine 2,4-Diklorofenoksi asetik asit'in inhibisyon etkisi



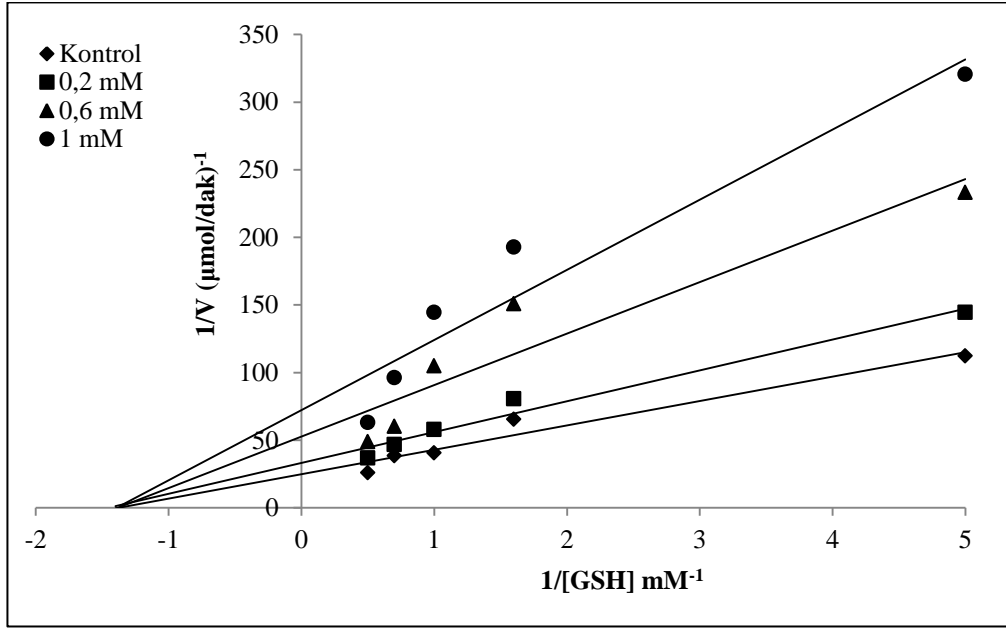
Şekil 4.36. Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Sipermetrin'in inhibisyon etkisi



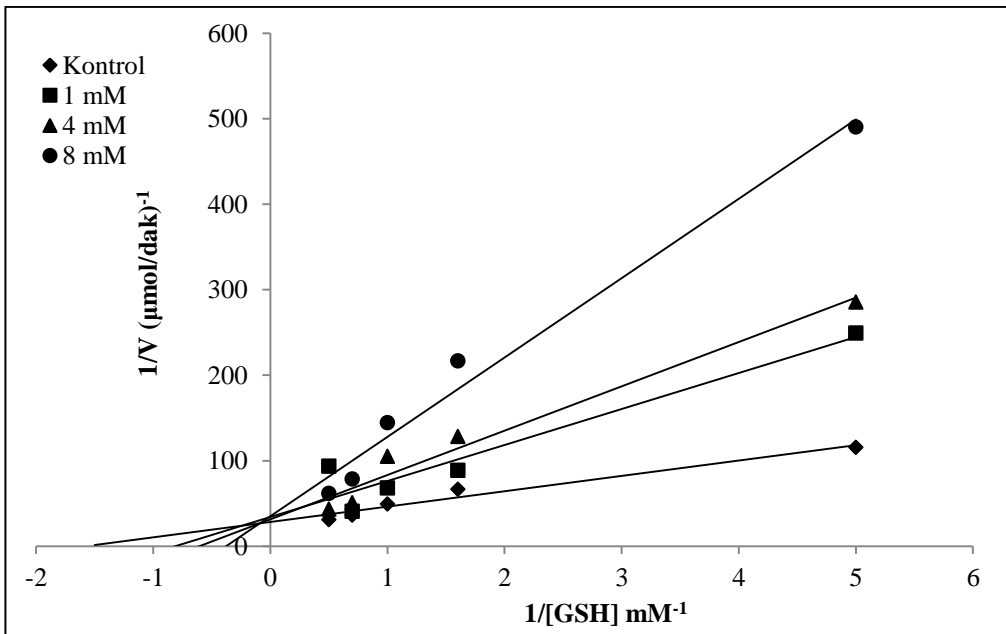
Şekil 4.37. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine İmidakloprit'in inhibisyon etkisi



Şekil 4.38. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un inhibisyon etkisi



Şekil 4.39. Yaban mersini GST enzimi aktivites üzerine Haloksifop-P-metil'in inhibisyon etkisi



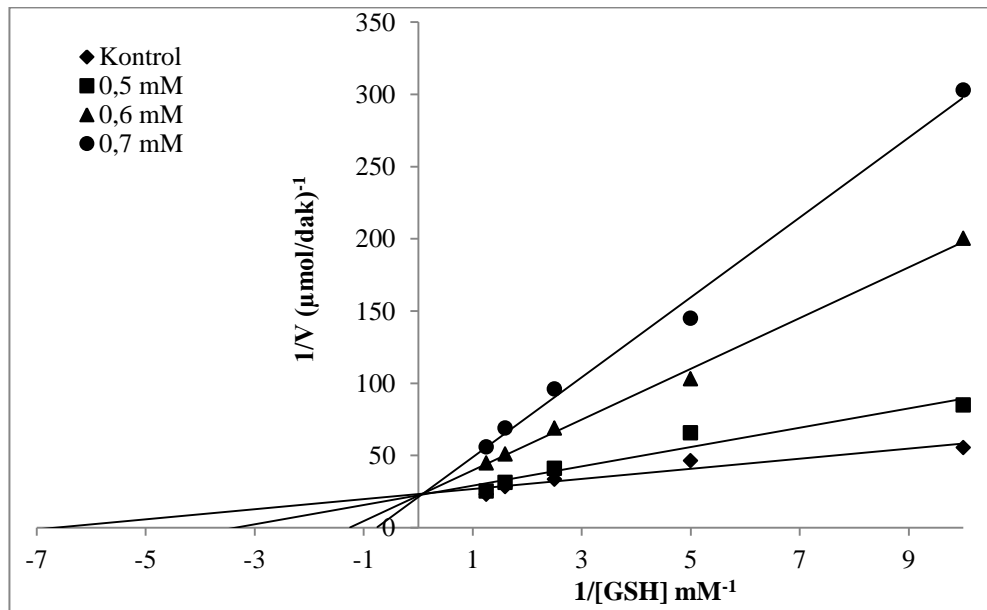
Şekil 4.40. Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine Asetamiprit'in inhibisyon etkisi

**Çizelge 4.13.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan pestisitler

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K <sub>i</sub> (mM)	Ortalama K <sub>i</sub> Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
<b>Glifosfat-izopropilamin tuzu</b>	0,2	0,4	0,266±0,100	<b>Yarışmalı</b>
	0,3	0,3		
	0,5	0,1		
<b>Fenoksiprop-p-etil</b>	0,1	0,20	0,133±0,4	<b>Yarışmalı</b>
	0,3	0,17		
	0,5	0,16		
<b>Sipermetrin</b>	0,1	0,21	0,310±0,088	<b>Yarışmasız</b>
	0,3	0,34		
	0,5	0,38		
<b>Diklorvos</b>	0,01	0,05	0,0175±0,005	<b>Yarışmasız</b>
	0,03	0,02		
	0,05	0,0025		
<b>İmidakloprit</b>	0,1	0,31	0,630±0,283	<b>Yarışmasız</b>
	0,5	0,73		
	0,9	0,85		
<b>Asetamiprit</b>	1	1,23	1,56±0,733	<b>Yarışmalı</b>
	4	1,66		
	8	1,19		
<b>Lamda-Siyalotrin</b>	0,1	0,5	0,633±0,115	<b>Yarışmasız</b>
	0,5	0,7		
	0,7	0,7		
<b>Haloksifop-p-Metil</b>	0,2	0,68	0,583±0,087	<b>Yarışmasız</b>
	0,6	0,51		
	1	0,56		
<b>2,4Diklorophenoksi asetik asit</b>	0,1	0,13	0,188±0,085	<b>Yarışmalı</b>
	0,3	0,13		
	0,4	0,29		

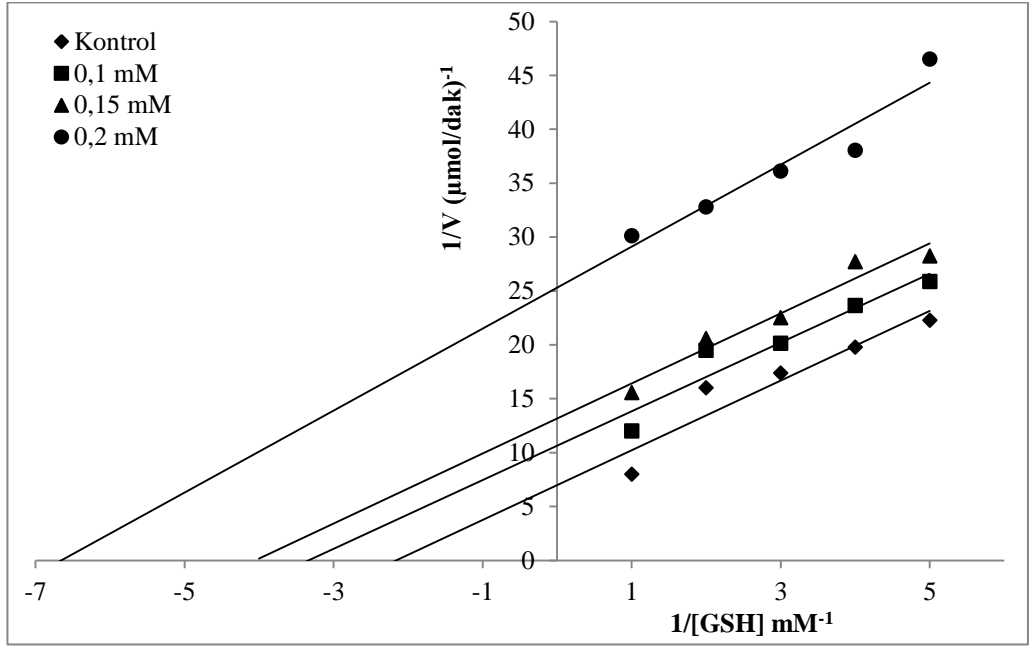
#### 4.5.5. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren metal iyonları için $K_i$ sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

İnhibitör çalışmasında Yaban mersini bitkisi GST enzimi üzerinde kadmiyum ( $Cd^{2+}$ ), nikel ( $Ni^{2+}$ ), bakır ( $Cu^{2+}$ ), magnezyum ( $Mg^{2+}$ ), kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ), demir ( $Fe^{2+}$ ), kobalt ( $Co^{2+}$ ), çinko ( $Zn^{2+}$ ), kurşun ( $Pb^{2+}$ ) 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. Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için  $K_i$  değerlerinin belirlenmesinde kullanılan metal iyonları için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen metal iyonu konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_i$  değerleri belirlenip inhibisyon tipi tayin edilerek sonuçlar Şekiller 4.41-4.45 aralığında ve Çizelge 4.14’de gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

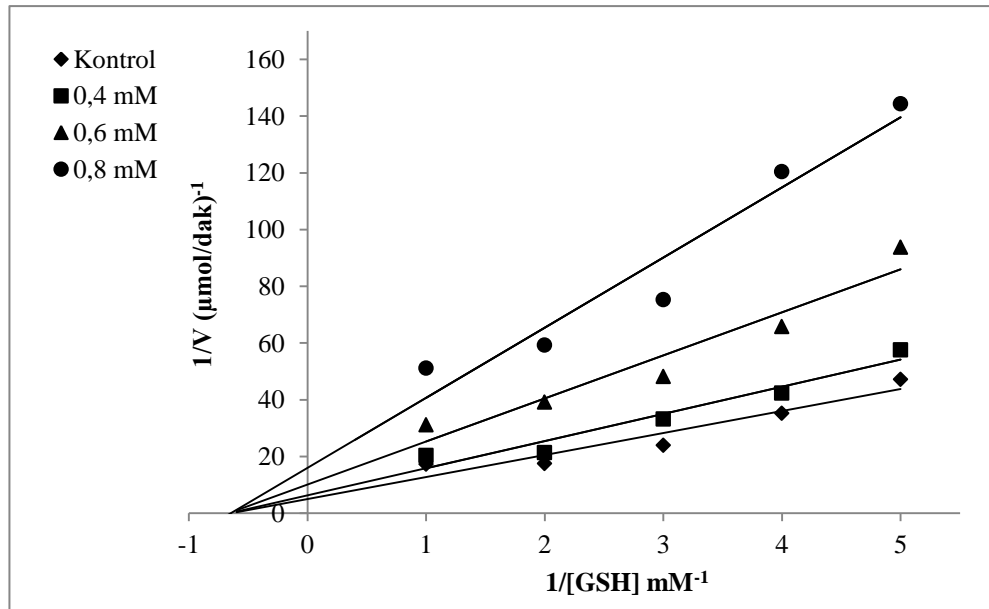


Şekil 4.41. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine  $Cd^{2+}$ 'un inhibisyon etkisi

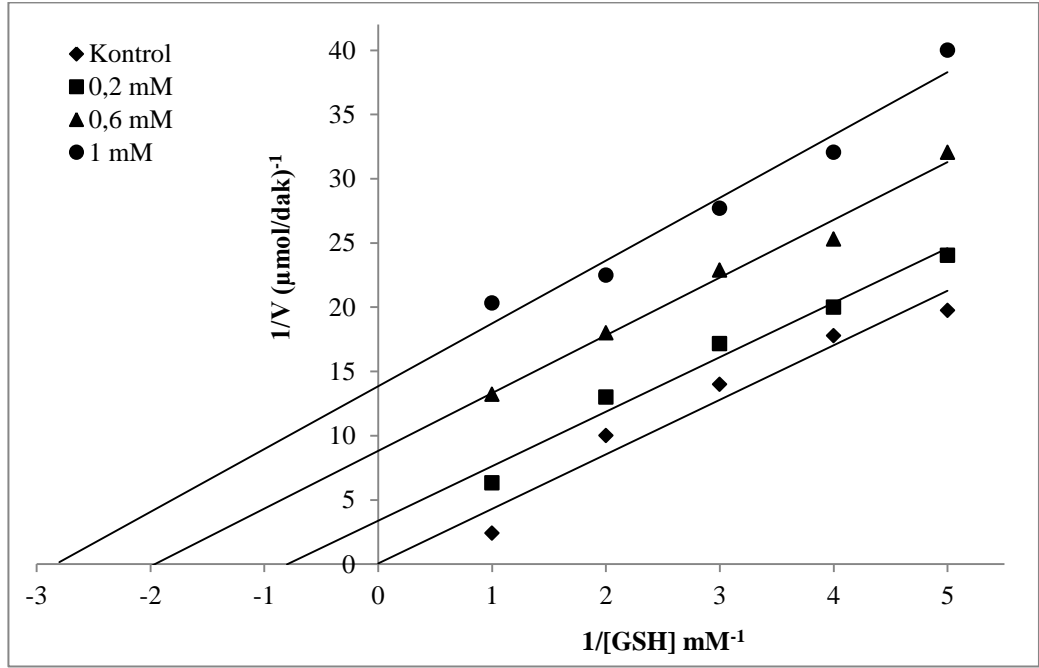




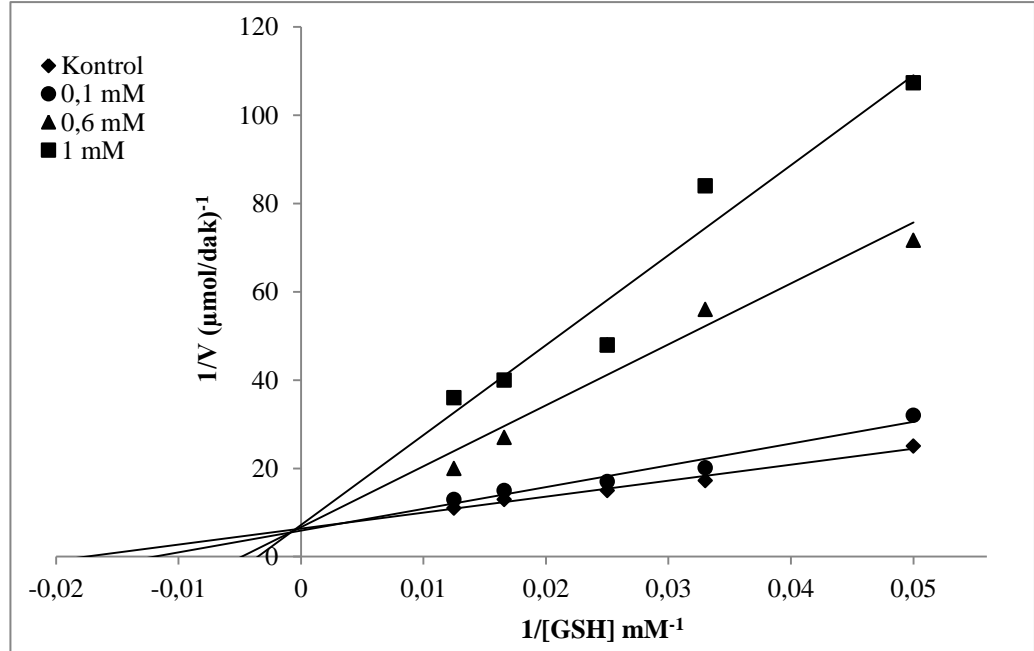
Şekil 4.42. Yaban mersini GST enzimi aktivitesi üzerine  $Mg^{2+}$ 'nin inhibisyon etkisi



Şekil 4.43. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine  $Ca^{2+}$ 'nin inhibisyon etkisi



Şekil 4.44. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Cu<sup>2+</sup>'nin inhibisyon etkisi



Şekil 4.45. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Ni<sup>2+</sup>'nin inhibisyon etkisi

**Çizelge 4.14.** Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan metal iyonları

İnhibitör Cinsi	[I] mM	$K_i$ (mM)	Ortalama $K_i$ Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
$Cd^{2+}$	0,5	0,3	0,150±0,055	Yarışmalı
	0,6	0,1		
	0,7	0,05		
$Ni^{2+}$	0,1	0,25	0,223±0,030	Yarışmalı
	0,6	0,23		
	1	0,19		
$Cu^{2+}$	0,2	0,026	0,002±0,0003	Yarı Yarışmalı
	0,6	0,030		
	1	0,032		
$Mg^{2+}$	0,1	0,18	0,136±0,058	Yarı Yarışmalı
	0,15	0,16		
	0,2	0,07		
$Ca^{2+}$	0,4	1,0	0,666±0,305	Yarışmasız
	0,6	0,6		
	0,8	0,4		

#### 4.5.6. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenen diğer kimyasallar

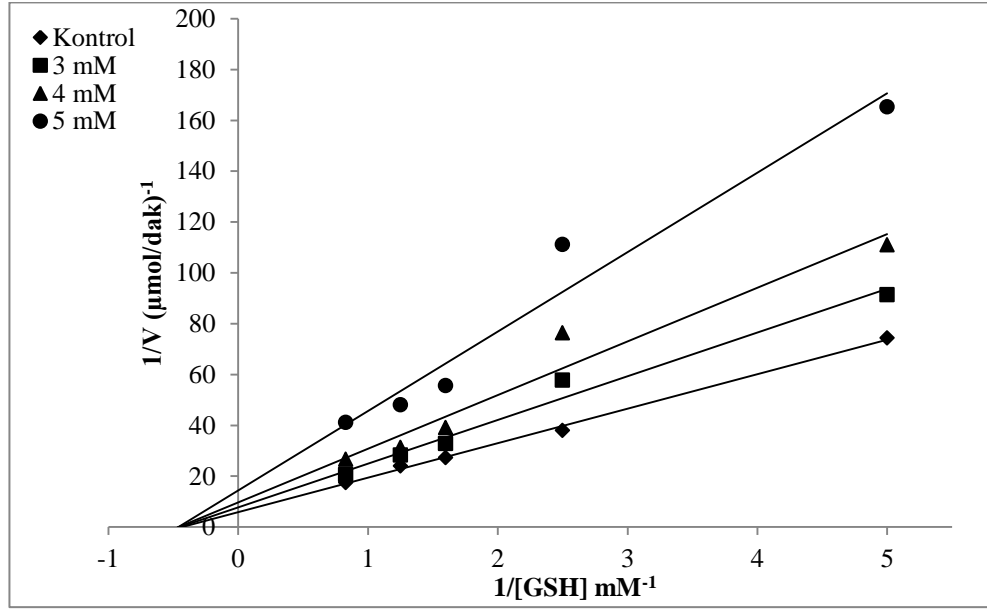
Yaban mersini meyvesi üzerine inhibisyon etkisi çalışılan bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi göstermediği görülmüş olup çalışılan kimyasal moleküller Çizelge 4.15'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.15.** Yaban mersini meyvesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan diğer kimyasal maddeler

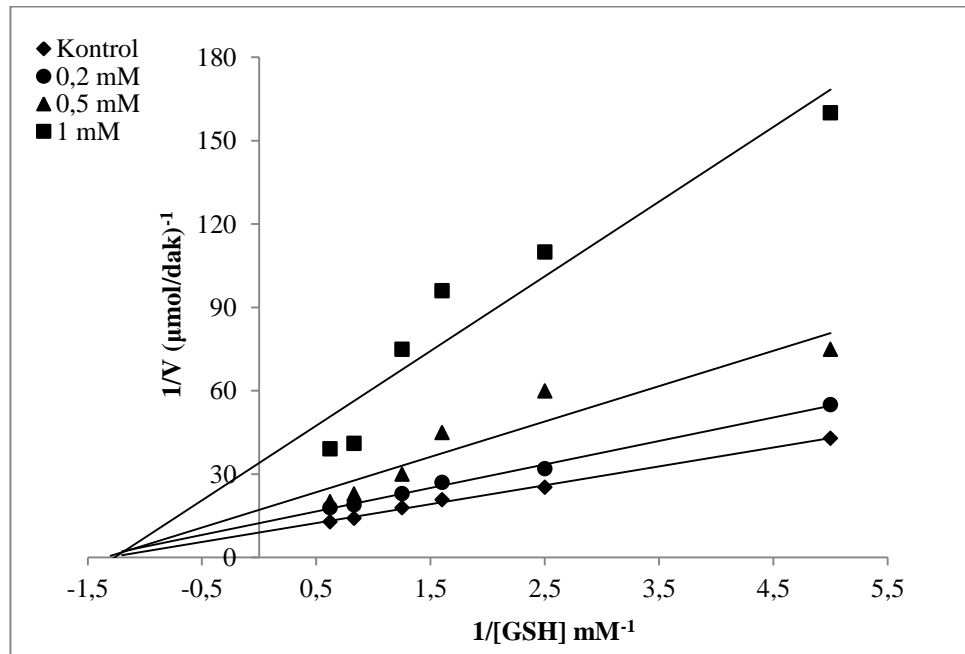
Kimyasal Maddeler	İnbibisyon Etkisi
Etanol	Etki etmedi
Pb <sup>2+</sup>	Etki etmedi
Co <sup>2+</sup>	Etki etmedi
Fe <sup>2+</sup>	Etki etmedi
Zn <sup>2+</sup>	Etki etmedi

**4.5.7. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren kimyasal bileşikler için K<sub>i</sub> sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları**

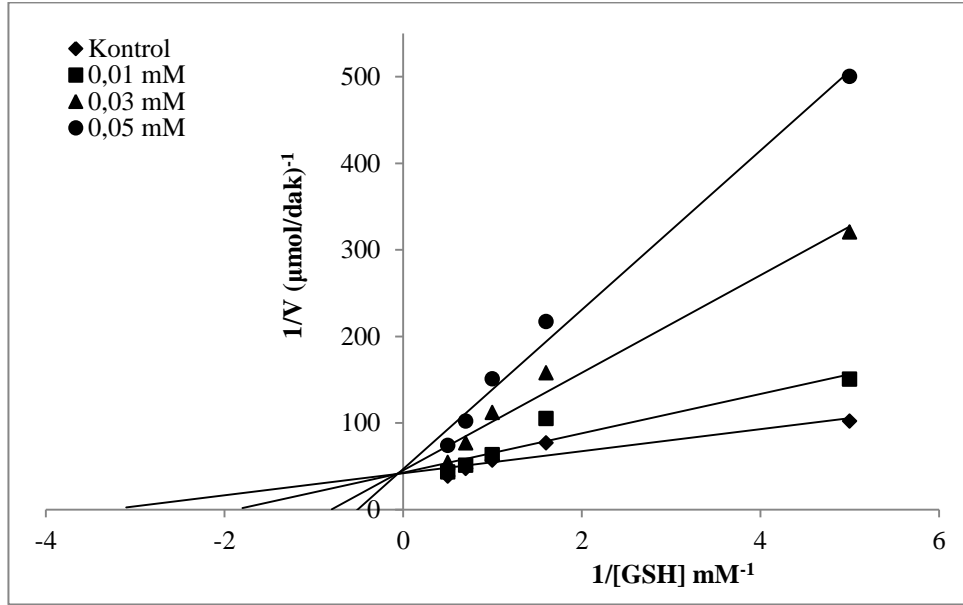
İnhibitör çalışmasında yaban mersini bitkisi GST enzimi üzerinde kumarin, askorbik asit, sodyum sülfid, sodyum azid ve sitrik asit kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için K<sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal bileşikler için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen kimyasal bileşik konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği çizilip K<sub>i</sub> değeri ve inhibisyon tipleri tayin edilerek Şekiller 4.45-4.49 aralığında ve Çizelge 4.16'da gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).



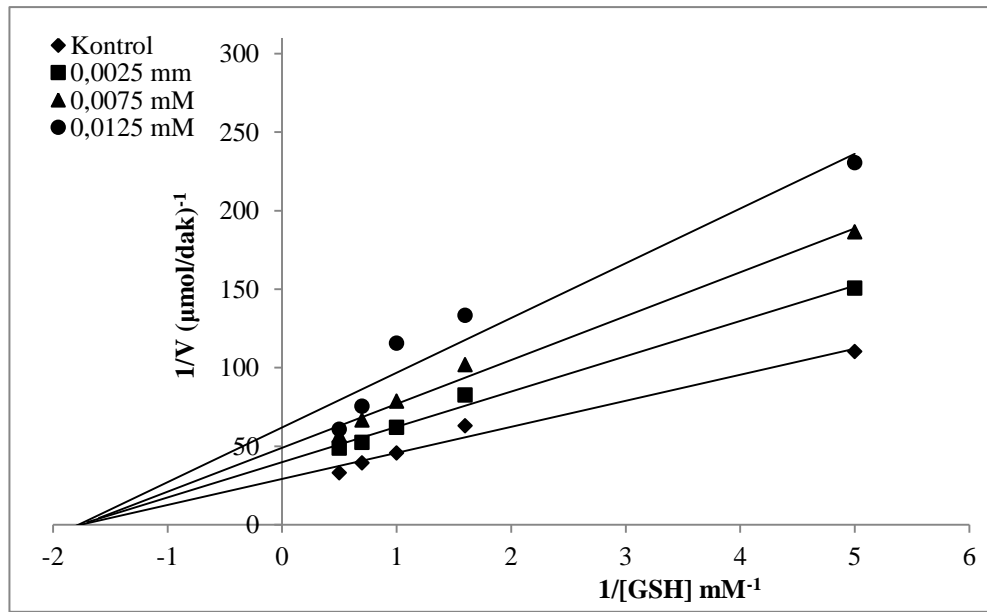
Şekil 4.46. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Askorbik asit'in inhibisyon etkisi



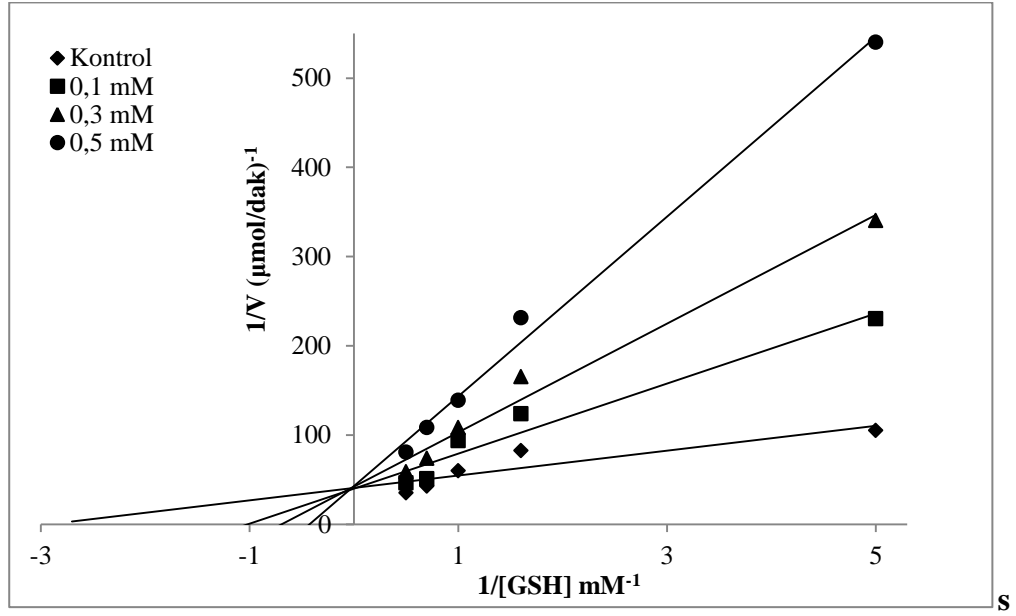
Şekil 4.47. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Kumarin'nin inhibisyon etkisi



Şekil 4.48. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sodyum sülfid'in inhibisyon etkisi



Şekil 4.49. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sodyum azid'in inhibisyon etkisi



Şekil 4.50. Yaban mersini GST enzim aktivitesi üzerine Sitrikasit'in etkisi

Çizelge 4.16. Yaban mersini meyvesi GST enzimi üzerine inhibisyon tipleri araştırılan kimyasal bileşikler

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K <sub>i</sub> (mM)	Ortalama K <sub>i</sub> Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
<b>Kumarin</b>	0,2	0,51	0,450±0,132	<b>Yarışmasız</b>
	0,5	0,53		
	1	0,30		
<b>Askorbik asit</b>	3	13,63	15,046±7,045	<b>Yarışmasız</b>
	4	20,80		
	5	10,71		
<b>Sodyum Sülfid</b>	0,01	0,01	0,0093±0,0011	<b>Yarışmalı</b>
	0,03	0,01		
	0,05	0,008		
<b>Sodyum Azid</b>	0,0025	0,015	0,022±0,006	<b>Yarışmasız</b>
	0,0075	0,024		
	0,0125	0,027		
<b>Sitrik asit</b>	0,1	0,11	0,120±0,360	<b>Yarışmalı</b>
	0,3	0,16		
	0,5	0,09		

## 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 (Boyland 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 Yaban mersini glutatyon S-transferaz enziminin sephadex G-100 jel filtrasyon ve agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitler, metal iyonları ve organik bileşiklerin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Karadeniz Bölgesi Tokat ili Erbaa ilçesi yaylalarından toplanan meyveler küçük buzdolabı poşetlerine konarak laboratuvarımızda derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Saflaştırma işlemi, Güvercin vd (2008), Çomaklı (2011) ile Natascha *et al.* (2004) uyguladığı prosedüre göre yapıldı. Öncelikle homojenatın hazırlanması, daha sonra sephadex G-100 jel filtrasyon ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi şeklinde gerçekleştirildi. Natascha *et al.* (2004) 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 0,375 EÜ/ mg protein spesifik aktiviteye sahip %63,75 verimle 2,53 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 28,00 EÜ/ mg protein, %23,33 lik verim ve 189,19 katlık saflaştırmaya ulaşıldı (Çizelge 4.1).

Değerler incelendiğinde sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisini takiben glutatyon agaroz afinite kolonuna homojenat uygulandığında spesifik aktivitede yaklaşık olarak 189,19 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<sup>2+</sup>'nin 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 görölmektedir. Huang *et al.* (2008) bir balık türünün olan (*Monopterus albus*) karaciğerinden GST enzimini glutatyon-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 glutatyon-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 göröldü.

Glutatyon S-transferaz enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sı 0,1 M potasyum fosfat tamponuyla 7,2 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. Gronwald and Plaisance (1989) kadife yaprak (velvetleaf) bitkisinden elde ettikleri GST enziminin optimum pH'sını 6,6-6,8 aralığında bulurken, Guddewar and Dauterman (1979) yılında mısır bitkisinden elde ettikleri GST enziminin pH'sını 8,0-8,5 aralığında saptamışlardır. Akkemik vd (2012)

hindi karaciğerinden elde ettikleri GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH'yı K-fosfat tamponunda 7,3 olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada Güvercin vd (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 glutasyon S-transferaz enzimini Tilapia (*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 glutasyon S-transferaz enziminin optimum pH'sı 6,6-8,5 arasında olabilmektedir.

Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine optimum iyonik şiddetin etkisi 1 M olarak belirlendi. Bu değer enzim aktivitesinin optimum olduğu potasyum fosfat tamponundaki 0,1'den farklıdır (Şekil 4.6).

GST enzimi için yaptığımız stabil pH çalışmaları sonucu elde ettiğimiz değer fosfat tamponu içerisinde 7,0 olarak gözlendi. Türkan ve arkadaşlarının (2015)'de yapmış oldukları GST enziminin karayemiştenden eldesi çalışmasında stabil pH değeri 6,5 olarak belirlenmiştir. Her iki çalışmada da değerlerin yakın olduğu görülmektedir. Sonuçlar spektrofotometrik olarak 24 saatte bir yapılmak üzere 5 gün tekrarlandı (Şekil 4.9).

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 yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve optimum sıcaklığı Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 50°C olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda Cho and Kong (2015) pirinçten (*Oryza sativa*) elde ettikleri GST enziminin optimum sıcaklığını 55°C olarak yine benzer olarak, Akkemik vd (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, Türkanoğlu (2007) insan kan serumdan saflaştırdığı enzimin optimum sıcaklığını 65°C olarak rapor etmişlerdir. Şekil 4.7'de 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 yaban mersini 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 4.11, 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 4.12, Çizelge 4.9). GSH için  $K_M$  sabiti 0,635 mM,  $V_{max}$  değeri ise 0,048 EÜ/mL olarak hesaplandı (Çizelge 4.9). CDNB için  $K_M$  sabiti 5,681 mM,  $V_{max}$  değeri ise 0,159 EÜ/mL olarak belirlendi (Çizelge 4.9). Elde edilen sonuçlara göre yaban mersini 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 vd 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.* 2008). Tadashi *et al.* (2005) çimden elde ettikleri GST enzimini GSH ve CDNB  $K_M$  değerlerini sırasıyla 0,285 ve 0,293 olarak bulmuşlardır. Gökkuşluğu 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 (Iizuka *et al.* 1989; Gadagbui and James. 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 vd 2008).

Yaban mersini 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.

Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.22-4.26). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla  $IC_{50}$

değerleri hesaplandı. Metal iyonlarının IC<sub>50</sub> değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında Mg<sup>2+</sup> < Cd<sup>2+</sup> < Ca<sup>2+</sup> < Ni<sup>2+</sup> < Cu<sup>2+</sup> şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11).

Metal iyonların enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırmacılar tarafından sürekli incelenmektedir. Çomaklı vd (2011) bazı metal iyonlarının gökkuşağı alabalık eritrositleri üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmış ve sonuçları şöyle rapor etmişlerdir: Metal iyonlarının IC<sub>50</sub> değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında Ag<sup>+</sup> < Cd<sup>2+</sup> < Cr<sup>2+</sup> < Mg<sup>2+</sup> şeklinde olduğu görülmektedir. Örneğin, Ekinci *et al.* (2007) kurşun, bakır, kobalt ağır metallerinin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II enzim, aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinden bahsetmişlerdir. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Al<sup>3+</sup> metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda metal iyonlarının IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,011; 0,020; 0,0252; 0,0373; 0,209 ve 0,229 mM olarak belirlenmiştir (Çoban vd 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, glifosfat izopropilamin tuzu, fenoksaprop-p-etil, sipermetrin, diklorvos, imidakloprit, 2,4 diklorofenoksi asetikasit dimetilamin tuzu, haloksifop-p-metil, lamda-siyalotrin, haloksifop-p-metil pestisitlerinin uygulaması sonrasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonun da suda çözünür son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki birinci basamağı katalizleyen GST aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Çalışmada çalışılan pestisitlerin hepsinin inhibisyon yaptığı gözlemlendi.

Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.13-4.21). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Pestisitlerin  $IC_{50}$  değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında dichlorvos< glifosat- izopropilamin tuzu< fenoxaprop-p-ethyl< cypermethrin< 2,4dichlorophenoxy acetic acid< haloxyfop-p-methyl< imidacloprid< lambda-cyhalothrin< acetamiprid şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13).

Metal iyonları ve pestisitlerde olduğu gibi organik bileşiklerinde enzim aktivitesini azaltıcı etkileri vardır. Çalışmamızda askorbik asit, etanol, kumarin, sodyum sülfid, sodyum azid, sitrikasit inhibisyon etkileri incelendi. Bu bileşiklerden askorbik asit, kumarin, sodyum sülfid, sodyum azid, sitrikasit inhibisyon özelliği gözlemlendi.

Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.27-4.31). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Organik bileşiklerin  $IC_{50}$  değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında sodyum azid< sodyum sülfid< sitrik asit< kumarin< askorbik asit şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12).

Yaban mersini meyvesinden saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları, pestisitler ve kimyasal 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 4.32-4.50). 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. Yaban mersini meyvesi, GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları, pestisitler ve kimyasal bileşiklerin ( $K_i$ )<sub>ort</sub> sabitleri hesaplandı. En düşük  $K_i$  değerleri pestisitler içinde

dichlorvos (0,0175); metal iyonları içinde  $\text{Cu}^{2+}$  (0,002); organik moleküller içinde, sodyum sülfid (0,0093) 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 yaban mersini meyvesinden (*Vaccinium arctostopylous L.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarına rastlanmadı. Gerek enzimin önemi gerekse Yaban mersininin antioksidan özelliği, halk hekimliğinde sıklıkla kullanılıyor olması gözönüne alındığında çalışmanın önemi artmaktadır. İnsan sağlığı için oldukça faydalı olan yaban mersininin 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 kasybettiği, 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**

- Abu- Hijleh, A. A., 1999. Purification and Kinetic and Immunologic Characterization of Theta Class Glutathione S-Transferase GSTT1-1 From Normal and Cancerous Human Breast Tissues. Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences. Ankara, Turkey. 150 pp.
- Ağaoğlu, Y.S., 1986. Üzümsü Meyveler. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay., 984, Ders Kitabı, 290, 330-362
- 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.
- Akyol, Ö., 2004. Şizofrenide Oksidatif Stres, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5 (Ek Sayı) 15-25.
- Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. and Walbot, V., 1998. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell*: 10, 1135-1149
- Alscher, R.G. and Hess, J. L., 1993. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Pres, pp 1-20.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C., 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* (92), 773–84.
- Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T., Kono, Y., 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 509-514.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 2-18.
- Ayaz, A., ve Yurttagül, M., 2008. Besinlerdeki Toksik Öğeler-II. Hacettepe Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 37, Ankara.
- Batar, B., Guven, M., Ünal, M., Sarıcı, A., Özaydın, A., 2007 glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and the risk of cataract development: a study in the Turkish population. *Curr Eye Res*, 32, 444-454.
- Beliles, R.V., 1987. V Metals, in *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. L.J.Casarett (1) Ditol (Eds.V Macmillan Publ. Co, Inc., New York).
- Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R. and Board, P.G., 1998. Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogen. Cell Genet*: 83, 104-114.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Holth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, characterization and crystal structure of the omega class of glutathione transferases. *J Biol Chem* 275:24798–24806

- Booth, I., Boyland, E. and Sins, P., 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516-524.
- Bottecchia, D., 1987. Preliminary report on the inhibitory effect of vaccinium myrtillus anthocyanosides on platelet aggregation and clot retraction. *Fitoterapia*, 48:3-8.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:83–116.
- Boyland, E. and Chasseaud, L.F., 1969. The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol.*, 32,173-219.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–25
- Bremner, I., 1974. Heavy metal toxicities. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 55, 75-124.
- Broxterman, H.J., Gotink, K.J. and Verheul, H.M., 2009. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib, *Drug Resist Updat*.
- Brunet, J.L., A. Badiou and L.P. Belzunces., 2005. In Vivo Metabolic Fate of [14C]-Acetamidiprid in Six Biological Compartments of the Honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* 61: 742-748.
- 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.
- Buchner, E., 1897. "Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung)". *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 30: 117–124.
- Burg, D. and Mulder, G.J., 2002. Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance. *Drug Metab. Rev.* 34: 821-863.
- Burg, D. and Mulder, G.J., 2002. Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance, *Drug Metab. Rev.* 34, 821-863.
- Cai, Y., Q. Luo, M. Sun and Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74: 2157-2184
- Capdevila, J., Parhil, I.L., Chaco, S.N., 1981. The oxidative metabolism of farachidononic Carr, R.,L, Richardson, J.R., Guarisco, J.A., Kachroo, A., Chambers, J.E., Couch, T.A., Durunna, G.C., Meek, E.C., 2002. Effect of PBC exposure on the toxic impact of or-ganophosphorus insecticides. *Toxicol Sci* 67, 311-321.
- Chalapathi, Rao, A.S.V., Reddy, A.R., 2008. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. in: N.A. Khan, S. Singh, S. Umar (Eds.), *Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants*. Springer, The Netherlands, pp. 111-147.
- Chaouch, S. and Noctor, G., 2010. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *New Phytologist* 188, 711–718.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127, 139–147.

- Charles, J.M., Hanley, T.R., Wilson, R.D., Van Ravenzwaay, B., Bus, J.S., 2001. Developmental Toxicity Studies in Rats and Rabbits on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and its Forms. *Toxicol. Sci.* 60, 121-131.
- Chen, H. and Juchau, M.R., 1998. Recombinant human glutathione S-transferases catalyze enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid. *Biochem. J.* 336, 223-226.
- Cho, H.Y., and Kong, K.H., 2005. Molecular cloning, expression, and characterization of a phi-type glutathione S-transferase from *Oryza sativa*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Volume 83, Issue 1, Pages 29–36.
- Chuang, J., Yen, T., Bollati, F., Conde, C., Caceres, A., Sung, C.H., 2005. The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev Cell* 9:75–86.
- Chuang, S.T., Chu, P., Sugimura, J., Tretiakova, M.S., Papavero, V., Wang, K., 2005. Overexpression of glutathione-s-transferase alpha in clear cell renal cell carcinoma, *Am.J.Clin.Pathol.*, 123, 421-429.
- 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.
- Cluzel, C., Bastide, P., Wegman, R., and Tronche, P., 1970. Enzymatic activities of retina and anthocyanoside extracts of *Vaccinium myrtillus* (lactate dehydrogenase, alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, 5-nucleotidase, phosphoglucose isomerase). *Biochem Pharmacol* 19(7), 2295-2302.
- Collins, A.R. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21, 238-46.
- Coşkun, Gülseren ve Zihnioğlu, Figen., 2002. Effect of some Biocides on Glutathione S-Transferase in Barley, Wheat, lentil and Chickpea Plants. *Türk J. Biol.*, 26, 89-98
- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1994. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102,167-175
- Cummins, I, Cole, D.J., and Edwards, R., 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18: 285-292.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş., 2005. Böceklerde İnektisitlere Direnç. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi*, 6 (1), 21-29.
- Çelik, H., 2008. Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* L.). *Bağbahçe Dergisi*, 18 (Temmuz-Ağustos), 28-29.
- Çelik, H., 2011. Samsun için yeni ve popüler üzüksü meyveler: Maviyemiş ve Turnayemişi. *Samsun Sempozyumu*, 13-16 Ekim, [http://www.samsunsempozyumu.org/Makaleler/1258316504\\_05](http://www.samsunsempozyumu.org/Makaleler/1258316504_05)
- Çelik, H., 2012. Yüksek Boylu Maviyemiş (Highbush Blueberry) Yetiştiriciliği. *Gifimey Mesleki Yayınlar Serisi-III*, 150p.

- Çelik, H., Özgen, M., Serçe, S., Kaya, C., 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Sci. Hortic.* 117, 345–348.
- 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. Glutasyon S-transferaz Enziminin Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. (Doktora Tezi) , Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzurum.
- Çoşkun, G., 2007. Glutathion-S-transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Dale, P.J., Clarke, B., Fontes, E.M.G., 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotech.*, 20 (6), 67-574.
- Danışan, A., Ceyhan, D., Ögüs, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Dass, P.D., Bermes, E.W., Holmes, E.W., 1992. Renal and Hepatic Output of Glutathione in Plasma and Whole Blood. *Biochim Biophys Acta*, 1156, 99-102.
- Davis, P.H., 1978. Flora of Turkey and East Aegean Islands. *Edinburgh Univ. Pres.* (6) 89-108.
- Dean, J.V., Devarenne, T.P., Lee, I., Orlofsky, L.E., 1995, Properties of a maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoids. *Plant Physiol* 108: 985-994
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M., Barroso, J.B., 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot.* 53, 1255-1272.
- Denizli, A., 2008. Ağır Metal Toksikolojisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 237.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1991. Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53,194-200.
- Diplock, A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium
- Dixon, D.P. and Edwards, R., 2009. Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 284: 21249-21256
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R., 2000. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch Biochem Biophys* 384, 407–412.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R., 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30859–30869
- Dixon, D.P., Skipsey, M. and Edwards, R., 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochem.* 71: 338-350

- Douglas, K.T., 1987. Mechanism of glutathione-dependent enzymes., Meister, A.,(ed). Avdan. Enzymol., John Wiley and Sons inc., New York. 59, 103-167.
- Droog, F.N.J., Hooykaas, P.J.J., Van der Jaal, B., 1995. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin regulated type-III glutathione S-transferases. *Plant Physiol* 107: 1139-1146
- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T., 1989. Oxi-dants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* 2, 51-62
- Duthie, S., 2007. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprevention at several stages in the carcinogenic processes. *Mol Nutr Food res* 52, 386-387.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum*L.), *Planta* 180, 278-284
- Edwards, R., Cole, D.J., 1996, Glutathione transferases in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pestic Biochem Physiol.* ;54:96–104.
- Edwards, R., Dixon, D.P., 2005. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 41, 169-186
- Edwards, R., Owen, W.J., 1986. Comparison of glutathione S-transfer- . ases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta* 169 208-215
- Edwards, R.D.P., Dixon, V., 2000. Plant glutathione S-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5(5), pp. 193-198.
- Eistner, E.W., 1991. The enlightened eye: Qualitative inquiry and the enhancement of educational practice. New York, NY: Macmillan Publishing Company.
- 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.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53(2), 46-48.
- Emahazion, T., Jobs, M., Howell, W.M., Siegfried, M., Wyoni, P.I., Prince, J.A., Brookes, A.J. 1999. Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene* 238, 315–324.
- Fdez, M., Zaragoza, F. and Alvarez, P., 1983. In vitro platelet aggregation effects of anthocyanosides of *vaccinium myrtilus* L. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 9, 79-90.
- Figueras, M.J., Soler, L., Chacon, M.R., Guarro, J. and Murcia, A.J.M., 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2069–2073.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Bergé, J., Plapp, F.W., 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 1840-1845.
- Franz, JE., 1974."N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions", issued and assigned to Monsanto Company

- Frear, D.S., Swanson, H.R., 1970. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry*, 9, 2123–2132.
- Frear, D.S., Swanson, H.R., Shimabukuro, R.H., Walsh, W.C., 1971. Glutathione conjugation: an enzymatic basis for atrazine resistance in corn. *Plant Physiol.* 47, 10–14
- Freman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease, free radicals and tissue injury Laboratory Investigation, 47(5), 412.
- Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. in: Meister A. (eds) *Advances In: Enzymology*, vol 58, John Wiley and Sons, New York, pp, 61-97.
- Fritz-Wolf, K., 2003. X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11-17
- Frova, C., 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure,
- Fulda, S., 2009, Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* Volume 13, Issue 7, pages 1221–1227
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49, 27–7.
- Gammon, D.W., 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 15:181-191
- Garrett, R.H., Grisham, C.M., 1999. *Biochemistry, Second Edition* Saunders College Publishing, 426-427.
- Glutathione Transferase from *Issatchenkia orientalis*. *Journal of Bacteriology*. 171 (2), 1173-1177.
- Gong, G., Jiang, T., Zhu, C., Zang, Y., Wang, F., Xie, S., 2005. Asymmetry analysis of cingulum based on scale-invariant parameterization by diffusion tensor image. *Hum. Brain Mapp.* 24, 92–98
- Gonneau, J., Mornet, R., Laloue, M., 1998. A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol Plant* 103,114-124.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005. Antioxidant approach to disease management and the role., *Physiol Plant*, 116-124.
- Goyer, R.A., 1989. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol.* 59, 11-16
- Griffith, M., 1999. *Sophocles. Antigone* (Cambridge).
- Gronwald, J.W. and Plaisance, L.K., 1998. Isolation and characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes from *Sorgum*. *Plant Physiol.*, 117, 877-892.
- Guddewar, M.B., Dauterman, W.C., 1979. Purification and properties of a glutathione S-transferase from corn which conjugates s-triazine herbicides. *Phytochemistry* 18: 735-740.
- Guenter, E., 1975. *The essential Oils*, Vol II, D. Von nostrand Ltd., New York.
- Gupta A., Waldhauser, L.K., Adverse drug reactions from birth to early childhood. *Pediatr Clin. North Am* 1997; 44: 79-92.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218

- Gülçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2010a. Antioxidant and Antimicrobial Activities of an Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34, 175-188.
- Güvercin, S., Erat, M., and Şakiroğlu, H., 2008. Determination of some kinetic and characteristic properties of glutathione S-transferase from bovine erythrocytes. *Prot. Peptid. Lett.* 15(1), 6-12.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G., 2002, Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin Chim Acta* 326: 131–142.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hadim, N., 2008. Pamuk yaprak kurdu *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae)'te insektisitlere karşı oluşan direncin biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Hahn, C., Strittmatter, G., 1994. Pathogen-defense gene *prp1-1* from potato encodes an auxin responsive glutathione S-transferase. *European Journal of Biochemistry* 226, 619–626.
- Haktanır, K., 1992, pollutants transferred to soil through food chains, *Turkish Journal of Agriculture and Engineering*, 43, 42-43.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Universty Pres Inc. New York, 936.
- Halliwell, B., 2007. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J* 401, 1-11.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- 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.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten-Bookum W.M., Schat, H. and Meharg, A.A., 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Plant Physiology* 126, 299–306.
- Havsteen, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 4-1- 32(7),1141-1148.
- 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, *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 30, 445-600.
- Hayeshi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V., Mukanganyama, S., 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin, *Food Chem. Toxicol.*, 45(2), 286-295.
- 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.
- Hell, R. and Bergman, L., 1988. *Physiol. Plant.* 72, 70-76.
- Hell, R. and Bergman, L., 1990.  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in higher plants; catalytic properties and subcellular localization. *Planta*, 180, 603-612.

- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Mini review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 3,; 1009-1015.
- Hernandez, L.E., Cooke, D.T., 1997. Modifications of root plasma membrane lipid composition of cadmium treated *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 48, p.1375-1381
- Hotton, K. S., Mahon, K., Chin, L., Chiu, F. C., Lee, H. W., Peng, D., Morgenbesser, S.D., Horner, J., and DePinho, R. A., 1996. Expression and activity of L-Myc in normal Mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1794-1804.
- Howie, A.F., Hayes, J.D. and Beckett, G. J., 1988, *Clin. Chim. Acta* 177, 65-76
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q.Y., 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 147, 96-100.
- Huang, S., and Han, Z., 2007. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricus) in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87 (1), 14-22.
- Huff, H.P., 1989. The herbicidal enantiomer of fenoxaprop was reported. (*Proc. Br. Crop Prot. Conf. - Weeds*, , 2, 717). Introduced by Hoechst AG (now Bayer CropScience).
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K., And Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, Nov., 6039-6042.
- Irzyk, G.P. and Fuerst, E.P., 1993. Purification and Characterization of a Glutathione S-Transferase from Benoxacor- Treated Maize (*Zea Mays*) . *Plant Physiol.*, 102, 803-810.
- Ishikawa, T., 1992. The ATP-dependent glutathione-S-conjugate export pump. *Trends Biol. Sci.* 17, 463-68.
- Jablonkai and Hatzios, 1991, Role of glutathione and glutathione s-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 41, 221-231.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., 2004. "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution". *Curr Opin Biotechnol.* 15(4), 305-313.
- Jepson, G.W., Gearhart, J.M., Clewell, H.J., Andersen, M.E., and Conolly, R.B., 1994. Physiologically based pharmacokinetic model for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphate esters. *Environ. Health Perspect.* 102(11), 51-60.
- Jimenez, J.A., Hernandez, G., Pastori, L.A., del Rio, F., 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves, *Plant Physiol.* 118, 1327-1335.
- Kaefer, C.M, Milner, J.A., 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 19:347-61.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. and Timur, S., 2007. Metallerin Çevresel Etkileri –I. (erişim adresi: [www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf), erişim tarihi: 13.05.2007).
- Kakkar, P., Jaffery, F. N., 2005. Biological Markers for Metal Toxicity. 137 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 335-349.



- Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P.N., Makris, A.M., 2000. A novel plant glutathione S-transferase/oxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J Biol Chem* 275, 29207-29216.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. and Hayaishi, O., 1997. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*: 90, 1085-1095.
- Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J.C., Kannan, R., Garcia-Ruiz, C., Ookhtens, M., Yi, J.R., 1996. GSH Transporters: Molecular Characterization and Role in GSH Homeostasis. *Biology Chem Hoppe-Seyler*, 377, 266-73.
- Karam, D., 1998. Glutathione S-transferase: an enzyme for chemical defense in plants. Brazilian Agricultural Research Corporation.
- Karg, S.R., Kallio, P.T., 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnol Adv* 27:879-894.
- Kasai, S., 2004. Role of Cytochrome P450 in mechanism of pyrethroid resistance. *Journal of Pesticide Science*, 29 (3), 220-221.
- Kauvar, L.M., Morgan, A.S., Sanderson, P.E., Henner, W.D., 1998. Glutathione based approaches to improving cancer treatment, *Chem.Biol.Interact.*, 111-112, 225-238.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınları*, Erzurum, s.97-125.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, Sirkeci/İstanbul.
- Keller, T., Danude, H.G., Werner, D., Do-erner, P., Dixon, R.A., Lamb, C., 1998. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell*. 10, 255-66.
- Kence, M., 1998. The Ecological Genetics of Malathion Resistance In House Fly *Musca Domestica* . PhD Thesis, METU, Ankara.
- Ketterer, B., Harris, J.M., Talaska, G., Meyer, J. S., Pemble, E., Taylor, J.B., Lang, N.P. and Kadulbar, F.F., 1992. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effect on susceptibility to lung cancer. *Environ. Health. Perspect.* 98, 87-94.
- Khalil, A.A., Aziz, F., Hall, J.C., 2006. Reperfusion Injury, Plastic and Reconstructive
- Kilili, K.G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P.N., Makris, A.M., Kampranis, S.C., 2004. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 24540-24551.
- Kim, Y.S., Young, M.R., Bobe, G., Colburn, N.H. and Milner, J.A., 2009. Bioactive food components, inflammatory targets and cancer prevention. *Cancer Prev Res* 2, 200-208.
- Kühn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic bio med* 33, 154-172.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lagadic, L., Cuany, A., Bergé, J.B. and Echaubard, M., 1993. Purification and Partial Characterization of Glutathione S-transferase from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (4), 467-474.

- Lamoureux, G.L., Rusness, D.G., 1989. The role of glutathione-S-transferases in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. In *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, ed. D Dolphin, R Poulson, O Ar-namovie, pp. 153–96. New York: Wiley Intersci.
- Lamoureux, G.L., Rusness, D.G., 1993. Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, ed. L.J. de Kok, I Stulen, H Rennenberg, C Brunold, W.E. Rauser, pp. 221–37. The Hague: SPB Academic.
- Laplaud, P. M., Lelubre, A. and Chapman, M. J. 1997. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 11(1), 35–40
- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27(4), 969-978.
- Lawrence, K.S., 2002. *Herbicide Handbook*, 8th ed.; Vencill, W.K. Ed.; Weed Science Society of America; pp 113-115.
- Lee, L.H., 1981. Geochemical cycles of elements and human perturbation. *Geochim Cosmochim Acta.*, 45: 2073-2084. Lietti, A. and Forni, G. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. II. Aspects of anthocyanins pharmacokinetics in the rat. *Arzneimittelforschung* 1976, 26(5), 832-835.
- Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.*, 349: 474-485.
- Lehninger, Principles of Biochemistry, 2005. Worth Publishers Inc., New York, 1152 p
- Lei, J., Xu, X.M., Xu, J., Chan, L., Jiang, P., Chang, F.x., Lu, G.N., Wang, Q., Wu, J.C., Tang, N., 2010. Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activities and DNA-Binding Studies of Ternary Copper (II), Complexes with New Coumarin Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 58(8), 1003-1010.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C., 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583–593
- Lietti, A. and Forni, G., 1976, Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides, Institute of Food Technologists annual Meeting Abstract 34B-49
- Lietti, A., Cristoni, A. and Picci, M., 1976. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity. *Arzneimittelforschung* 26(5), 829-832.
- Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
- Lison, D., Lauwerys, R., 1993. Evaluation of the role of reactive oxygen species in the interactive toxicity of carbide- cobalt, salt, oxides, and hard metal dust. *Occup Environ Med* 51(7), 447-450.
- Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J. and Van Breemen, R.B., 2003. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J Agric Food Chem* 9-24, 51(20), 5867-5870.
- Lyons-Alcantara, M., Tarazona, J.V. and Mothersill, C., 1996. The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biol. and Toxicol.*, 12, 29-38.
- Maitra, S.K., Mitra, A., 2008. Testicular functions and se-rum titers of LH and testosterone in methyl parathion-fed roseringed parakeets. *Ecotoxicol Environ Safe*. 71, 236-244.

- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *C R C Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337.
- Marcollet, M., Bastide, P. and Tronche, P., 1970. Effet angio-protecteur des anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus* objective vis a vis de la liberation de la lactate deshydrogenase (LDH) et de ses isoenzymes cardiaques chez le rat soumis a une epreuve de nage. *C R Soc Biol.* 163,17-86.
- Marrs, K.A., 1996. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. and Walbot, V., 1995. A glutathioneS-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature (London)*, 375, 397–400.
- Marrs, K.A. and Walbot, V., 1997. ekspression and RNA splicing of the maize gene Bronze- 2, nature 375:397-400.
- Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S., 1997. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: Cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pesticide Science*, 51, 265-270.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N., 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export 'pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, 364, 247–49.
- Masters, C., Holmes, R., 1977. Peroxisomes :A new spac to cell Physiology and biochemistry *Physiol Reviev*, 58 ,816.
- Matern, U., Reichenbach, C., Heller, W., 1986. Efficient up take of flavonoids into parsley (*Petroselinum hortense*) vacuoles requires acylated glycosides. *Planta* 167, 183–89.
- Mauch, F., Dudler, R., 1993. Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol* 102:1193–1201.
- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.M., Koeppe, M.K., and O'Keefe, D.P., 2000. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124: 1105-1120.
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science*, 220, 472-477.
- Meister, A., 1988. Glutathione Metabolism and its Selective Modification. *J Biol Chem*; 263, 17205-8.
- Meister, A., 1991. Glutathione Deficiency Produced by Inhibition of Its Synthesis, and Its Reversal; Application in Research and Therapy. *Pharmacol Ther*, 51, 155-185.
- Meister, A., 1995. Glutathione Metabolism. *Methods Enzymol*, 251, 3-7,
- Meister, A., 1998. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport methods *Enzymo.*, 571-85.
- Mian, E., 1977. Anthocyanosides and microvessel walls: new findings on the mechanism of action of their protective effect in syndromes due to abnormal capillary fragility. *Minerva Med.*, 68(52), 3565-3581.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Daxberger, A., 2001. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis by betaglucanelicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett.*, 508, 191-195.
- Mittler, B.A. Zilinskas, A., 2002. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase, *J. Biol. Chem.* 267, 21802-21807.

- Mizukami, S., Okada, S., Kimura, K., Kikuchi, K., 2009. Design and Synthesis of Coumarin-Based Zn<sup>+2</sup> Probes for Ratiometric Fluorescence Imaging, *Inorganic Chemistry*, 48, 7630-7638.
- Mojovic, M., Vuletic, M., Bacic, G.G., Vucinic, Z., 2004. Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: an EPR spin-trap study. *J Exp Bot.*, 55, 2523-2531.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M., Lee, I., 2005. Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 46, 292-299.
- Moon, Y.H., Chen, L., Pan, R.L., Chang, H.S., Zhu, T., Maffeo, D.M., and Sung, Z.R., 2003. EMF genes maintain vegetative development by repressing the flower program in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 681–693
- Morazzoni, P. and Bombardelli, E., 1996. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, 66, 3-29.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agr. Food Chem.* 50, 519–525.
- Munzuroglu ve Gur., 2000, The effects of pollen germination and tube growth to cadmium Heavy Metals on the pollen germination and with special reference to low concentration exposure. pollen tube growth of apples (*Malus sylvestris* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 51-55.
- Müller, R., Lind-Iversen, S., Stummann, B.M., Serek, M., 2000. Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 75, 12-18.
- Natascha, R., Ralf, N., 2004. Characterization and molecular cloning of a glutathion S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 321–329.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids. In “Food Chemistry”, O.R.Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2005. 'The Three Dimensional Structure of Proteins' ... Fluorescent Protein”, *Journal of Microbiology*, 217, pp 3- 15. 7.
- Noctor, G., Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 249–279.
- Noctor, G., Hamdi, M., Chaouch, S., Han, Y.I., Neukermans, J., X Marquez-Garcia, B., Queval and Christine, G., Foyer, H., 2012. Institut de Biologie des Plantes, UMR CNRS 8618, Université de Paris sud 11, Orsay cedex, France and Centre for Plant Sciences, Faculty of Biology, University of Leeds, Leeds, UK
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J.*
- Packer, L., and Cadenas, E. 1996. *Handbook Of Antioxidants*, New York: Marcel & Dekker.
- Paumi, C.M., Ledford, B.G., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S., 2001. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity, *J.Biol.Chem.* 276, 7952-7956.

- Polidoros, N.A., Scandalios, J.G., 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.), *Physiol. Plant.* 106, 112-120
- Pool-Zobel, B.L., 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: Review of experimental and human data. *Br J Nutr.*, 93, 73-90.
- Prior R.L., Cao G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agr. Food Chem.* 46, 2686–2693.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F.A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F. and Noctor, G., 2007. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *The Plant Journal*, 52, 640–657.
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B. and Noctor, G., 2009. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2, 344–356.
- Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Smith, B.D. and Langston, W.J., 2000. Observation on the Interaction of Zinc and Cadmium Uptake Rates in Crustaceans (Amphipods and Crabs) from Coastal Sites in UK and France Differentially Enriched With Trace Metals. *Aquatic Toxicology*, 50: 189-204
- Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.* 33:576-582.
- Rao, M.V., Davis, K.R., 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J*; 17: 603-614.
- Rausch, T., Wachter, A., 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations, *Trends Plant Sci.*, 10, 503-509.
- Raven, P.D., Khouw, A., Beltz, W.F., Parthasarathy, S., and Witztum, J.L., 1998 : Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection by vitamin E but not by  $\beta$ -carotene. *Arterioscler Thromb*, 13 : 590-600.
- Reddy, A.R., Raghavendra , A.S., 2006. Photooxidative stress. in: Madhava Rao, K.V., Raghavendra , A. S., Reddy, K.J. (Eds.), *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, The Netherlands, pp. 157-186.
- Reichers, A. E., Wanous, J. P. and Austin, J. T., 1997. Understanding and managing cynicism about organizational change. *Academy of Management Executive*, 11, 48-59.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neuefeind, T., Huber , R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I., Bartunik, H. D., and Bieseler, B., 1996. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of Molecular Biology*. 255: 289-309
- Riechers, H., Albrecht, H.P., Amberg, W., Baumann, E., Bernard, H., Böhm, H.J., Klinge, D., Kling, A., Müller, S., Raschack, M., Unger, I., Walker, N.,

- Wernet, W., 1996, Discovery and optimization of a novel class of orally active nonpeptidic endothelin-A receptor antagonists. *J Med Chem.* 24;39(11):2123-8.
- Romano, C.P., Cooper, M.L., Klee, H.J., 1993. Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Plant Cell*5: 181-189
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodriguez-Serrano, M., del Rio, L.A., Palma, J.M., 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme, *New Phytol.* 170, 43-52.
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A.J., Gorla, M.S., 1996. Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiol.* 112: 1595-1600
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., and Allen, R.D., 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41: 1229-1234.
- Ruessegger, A. and Brunold, C., 1993. Localization of [gamma]-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activity in maize seedlings. *Plant Physiol* 101, 561-566.
- Samuelsson, B., 1983. Leukotrienes :mediators of immediate hyper sensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220, 568–75.
- Sandermann, H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biol. Sci.*, 17, 82–84.
- Sandermann, H., 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics*, 4, 225–41.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Millar, A.H. and Singh, K.B., 2009. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing of multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58, 53–68.
- Sappl, P.G., Oñate-Sánchez, L., Singh, K.B. and Millar, A.H., 2004. Proteomic analysis of glutathione S-transferases of Arabidopsis thaliana reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol. Biol.*, 54, 205-219.
- Sarvajeet, S. G., Narendra, T., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Molecular Biology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*, 48, 909-930
- Scarponi, L., Nemat, M., Martinetti, L., 1992. Metolachlor in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*): Persistence and biochemical signs of stress during its detoxification. *J Agric Food Chem* 40: 884–889 *Shelp BJ (1993) Ph*
- Segel, H.I. and Woodin, T.S., 1968. Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine- S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys., Acta* 167(1), 78-88.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and*
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics.* Wiley-Interscience, New York, 564-567.
- Sen, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 8, 660-672.
- Shadnia, S., 2007. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *Am. J. Emerg. Med.* 26, 634.e1-634.e4

- Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, USA.
- Sharma, A., Patrick, B., Li, J., Sharma, R., Jeyabal, P.V.S., Reddy, P., Awasthi, S., Awasthi, Y., 2006. Glutathione S-transferases as antioxidant enzymes: small cell lung cancer (H69) cells transfected with hGSTA1 resist doxorubicin-induced apoptosis, *Arch.Biochem.Biophys.* 452, 165- 173.
- Sharma, N., Sinha, R., Singhvi, A. And Tandon, R., 2006. *Pseudomonaskeratitis* after laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 32, 519–521
- Sheehan, J.P., Phan, T.M., 2001, Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex by an allosteric mechanism. *Biochemistry.* 40(16):4980-9.
- Shilling, W., Longland, R., Crampton, C., 1969. Metabolism of Coumarin in Man, *Nature*, 221, 664.
- Shima, S., Mitsunaga, M., Nakao, K., 1971. Effect of ACTH on corticosteroidogenesis and adenylyl cyclase activities in the rat adrenal tissue. *Endocrinology.* 88:465–469.
- Shimabukuro, R.H., Swanson, H.R., Walsh, W.C., 1970. Glutathione conjugation: a trazine detoxification mechanism in orn. *Plant Physiol.*, 46, 103–7.
- Sies, H., 1999. "Glutathione and its role in cellular functions," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 9-10, pp. 916–921.
- Singh, S., Anjum, N.A., Khan, N.A., Nazar, R., 2008. Metal-binding peptides and antioxidant defence system in plants: significance in cadmium tolerance. In: N.A. Khan, S. Singh, (Eds.) *Abiotic Stress and Plant Responses*, IK International, New Delhi, pp. 159-189.
- Sinnett, D., Krajcinovic, M., 2000. "Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. " *Leuk Lymphoma.*, 38(5-6), 447-62.
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., and Goldsbrough, P.B. 2003. Arabidopsis At GSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transfer-ase that interacts with flavonoids. *Plant J.*, 36, 433-442.
- Smith, J.B., and Willis, A.L. 1971. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat. New Biol.*, 231: 235-237.
- Soderstrom, M., Mannervik, B., Orning, L., Hammerstrom, S., 1985. Leukotriene C4 Formation catalyzed by three distinct forms of human cytosolic glutathione S-transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 265–70.
- Somerville, C., Browse, J., Jarowski, J.G., Ohlrogge, J.B., 2000. Lipids. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp 456-527.
- Song, Y., 2014. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol.* Feb;56(2):106-13.
- Steady-state Enzyme Systems, New York: Wiley, pp. 18–99.
- Steinrücken, H.C., Amrhein, N., 1980. "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94 (4): 1207–12 Surgery, 117(3) , 1024-1033 p.
- Swain, T., 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annu. Rev. PlantPhysiol.* 28, 479–501.

- Tadashi, Ku., Taketomo, F., Toyoki, A. and Yuzo, S., 2005. Molecular Cloning and Characterization of a Senescence-induced Tau-class Glutathione S-transferase from Barley Leaves, 1. Department of Biological Science, Faculty of Science, Shizuoka University, Shizuoka, 422-8529.
- Takahashi, H., Miyazawa, Y., Fujii, N., 2009. Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism. *Plant Mol Biol.*, 69, 489–502.
- Takeyama, K., Mori, N. and Osakabe, M. H., 2006. Effect of cytochrome P450 inhibitor, piperonyl butoxide, on survival of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on citrus leaves. *Applied Entomology and Zoology*, 41 (3), 487– 491.
- Tamaki, H., Kumagai, H. and Tochikura, T., 1989. Purification and Properties of glutathione transferase from *Issatchenkia orientalis*. *J Bacteriol.* 171(2):1173-7.
- 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.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der) 59, İzmir.
- Tetlow, N., Coggan, M., Casarotto, M.G., Board, P.G., 2004. Functional polymorphism of human glutathione transferase A3: effects on xenobiotic metabolism and steroid biosynthesis, *Pharmacogenetics*. 14, 657-663.
- Thatcher, L.F., Carrie, C., Andersson, C.R., Sivasithamparam, K., Whelan, J. and Singh, K.B., 2007. Differential gene expression and subcellular targeting of *Arabidopsis* glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J. Biol. Chem.*, 282, 28915-28928.
- Thorburn, D.R., Kuchel, P.W., 1985. Regulation of the Human Erythrocyte Hexose Monophosphate Shunt Under Conditions of the Oxidative Stress. *Eur J Biochem.*, 150, 371-86.
- Tomlin, C.D.S., 1997. A World Compendium: The Pesticide Manual, 11th ed.; Ed.; British Crop Protection Council: Farnham, Surrey, UK.; pp 300-302.
- Tomlin, C.D.S., 2006. The Pesticide Manual, A World Compendium, 14th ed.; British Crop Protection Council: Surry, England; pp 598-599
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*. 684, 77-97.
- Türkanoğlu, A., 2007. Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University. Ankara.
- Ursini, F., Maiorino M., Brigellus- Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Iohé, L., Packer, L., 1995. Diversity of glutathione peroxidases. In *Methods Enzymol.* Academic press. pp. 38.
- Uyanık, A., 2008. Beta Galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Cell Biochem.*, 266:37–56.



- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., and Telser, I., 2007 Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.
- Van Zanden, J.J., Geraets, L., Wortelboer, H.M., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M., Cnubben, N.H.: Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, 67, 1607-1617 (2004)
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenaabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D. and Van Breusegem, F., 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139, 806–821
- Vivancos, P.D., Dong, Y., Ziegler, K., Markovic, J., Pallardó, F.V., Pellny, T.K., Verrier, P.J., Foyer, C.H., 2010, Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J. Dec*; 64(5):825-38.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P. and Mauch, F., 2002. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.*, 49, 515-532
- Ward, J.F., 1977. Molecular mechanism so fradiation-induced damage to nucleicacids.
- Webb, E., Ashton, C.H., Kelly, P. and Kamali, F. 1996. Alcohol and drug use in UK university students. *Lancet*, 348, 922–925.
- Weiss, Rick., 2007. Tainted Chinese Imports Common", *Washington Post*, retrieved 2010-04-25)
- Whalen, R., Bayer, T.D., 1998. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* 18, 345-58.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants. *The EMBO Journal* 16, 4806–4816.
- Wilson, J.E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. *Arch. Biochem. Biophys*, 147, 471–474.
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 134: 489-492.
- Xiang, B.L. Werner, E.M. Christensen, D.J. Oliver., 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels, *Plant Physiol.*, 126, 564-574.
- Yanbeyi, S., 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A., 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* Jun 25;117(7):927-39.
- Yıldırım, D., 2010. Mucormiehie ve Pseudomonassp Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florosil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayır Ayır

- İmmobilizasyonu Doktora Tezi Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.  
Adana, Türkiye
- Yoshikawa, H. S., 1982. Interaction of metals and metallothionein. Elsevier/North-Holland, New
- Yu, S.J., 2006. Insensitivity of Acetylcholinesterase in a Field Strain of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84, 135-142.
- Yu, S.J., Nguyen, S.N. and Abo-Elghar, G.E., 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77 (1), 1-11.
- Zaragoza, F., Iglesias, I. and Benedi, J., 1985. [Comparative study of the anti-aggregation effects of anthocyanosides and other agents]. *Arch Farmacol Toxicol*, 11(3), 183-188
- Zettl, R., Schell, J., and Palme, K., 1994. Photoaffinity labeling of Arabidopsis thaliana plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-<sup>3</sup>H]indole-3-acetic acid: Identification of a glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 689-693.
- Zhao, C., Giusti, M., Malik, M., Moyer, M.P. and Magnuson, B.A. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem.*, 10-6, 52(20), 6122-6128.
- Zhao, H., Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Milne, G.W.A., Pemmier, Y., Burke, T.R., 1997. Coumarin Based Inhibitors of HIV Integrase, *J. Med.Chem.*, 40(2),242-249.

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Tokat Erbaa'da dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini Erbaa'da tamamladı. 2003 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2011 yılında aynı fakültede yüksek lisansını, 2015 yılında doktora eğitimini tamamladı.