

*Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'NİN  
SOLUNGAÇ, KARACİĞER, BÖBREK DOKULARINDAN  
GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ İLE  
GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI METALLERİN ENZİM  
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muammer KIRICI

Doktora Tezi

Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

2014

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

*Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'NİN SOLUNGAÇ,  
KARACİĞER, BÖBREK DOKULARINDAN GLUKOZ 6-FOSFAT  
DEHİDROGENAZ İLE GLUTATYON REDÜKTAZ  
ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI METALLERİN  
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muammer KIRICI

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

*Capoeta capoeta umbla ve Capoeta trutta*'NIN SOLUNGAÇ, KARACİĞER, BÖBREK DOKULARINDAN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ile GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP danışmanlığında, Muammer KIRICI tarafından hazırlanan bu çalışma 09/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (5/0.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

İmza :

Üye : Prof. Dr. Telat YANIK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Gonca ALAK

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 26.06.2014. tarih ve 26/810 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
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

### ***Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'NİN SOLUNGAÇ, KARACİĞER, BÖBREK DOKULARINDAN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ İLE GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Muammer KIRICI

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

Bu çalışmada, *Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından metabolizma için oldukça önemli olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49; G6PD) ve glutatyon redüktaz (Glutatyon: NADP<sup>+</sup>, oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7.; GR) enzimleri ilk kez saflaştırıldı. Saflaştırma işlemleri, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirildi. *Capoeta capoeta umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD enzimi sırasıyla %22,7, %19,28, %23,15 verimle ve 402,14, 3353,19, 736,5 kat; *Capoeta trutta* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD enzimi sırasıyla %20,38, %31,15, %34,43 verimle ve 576,65, 568,27, 803,9 kat; *Capoeta capoeta umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından GR enzimi sırasıyla %23,09, %17,24, %48,74 verimle ve 389,18, 925,11, 1166,98 kat; *Capoeta trutta* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından GR enzimi sırasıyla %35,4, %21,07, %38,8 verimle ve 794, 734,86, 910,05 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Ayrıca *in vitro* olarak bazı metallerin (Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Co<sup>+2</sup>) saflaştırılan enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenerek inhibisyon gösteren metaller için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı. Sonuçta, Ag<sup>+</sup> iyonunun tüm balık dokularında enzim aktiviteleri üzerine etkili inhibisyonu gösterdiği belirlendi.

**2014, 167 sayfa**

**Anahtar Kelime:** *Capoeta capoeta umbla*, *Capoeta trutta*, G6PD, GR, saflaştırma, metal, inhibisyon

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### **PURIFICATION OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE and GLUTATHIONE REDUCTASE FROM *Capoeta capoeta umbla* and *Capoeta trutta* KIDNEY, LIVER, GILL TISSUES and INVESTIGATION EFFECTS OF SOME METALS ON ENZYMES ACTIVITY**

Muammer KIRICI

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Fisheries

Supervisor: Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

In this study, glucose 6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP<sup>+</sup> oksidoreductase, EC 1.1.1.49; G6PD) and glutathione reductase (glutathione: NADP<sup>+</sup>, oksidoreductase, EC 1.8.1.7.; GR) enzymes which are of great importance for the metabolism were purified from kidney, liver and gill tissues of *Capoeta capoeta umbla* and *Capoeta trutta* for the first time. The purification was performed by preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. *Capoeta capoeta umbla* kidney, liver and gill G6PD enzymes were purified 402.14, 3353.19, 736.5 fold in a yield of 22.7%, 19.28%, 23.15%, respectively. *Capoeta trutta* kidney, liver and gill G6PD enzymes were purified 576.65, 568.27, 803.9 fold in a yield of 20.38%, 31.15%, 34.43%, respectively. *Capoeta capoeta umbla* kidney, liver and gill GR enzymes were purified 389.18, 925.11, 1166.98 fold in a yield of 23.09%, 17.24%, 48.74%, respectively. *Capoeta trutta* kidney, liver and gill GR enzymes were purified 794, 734.86, 910.05 fold in a yield of 35.4%, 21.07%, 38.8%, respectively. The purify of the enzymes were checked by SDS-PAGE. In addition, the effects of some metals (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>) on enzymes from all tissues were investigated *in vitro*. IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values were calculated for these metals which showed inhibition effects. In conclusion, it was detected that Ag<sup>+</sup> metal ion showed the most effective inhibition on enzyme activities on the all fish tissues.

**2014, 167 pages**

**Keywords:** *Capoeta capoeta umbla*, *Capoeta trutta*, G6PD, GR, purification, metal, inhibition

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışmanın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP'a, tez çalışmamın yurütulmesinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Saltuk Buğra CEYHUN'a, Sayın Doç. Dr. Gonca ALAK'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Yeliz DEMİR, Sayın Mesut IşIK, Su Ürünleri Fakültesi çalışanlarına ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndaki bütün arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın her aşamasında maddi, manevi desteğinin yanı sıra göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı eşim Sayın Öğr. Gör. Mahinur KIRICI'ya,

Hayatım boyunca maddi, manevi desteklerinden dolayı sevgili annem, babam ve ablama teşekkür ederim.

**Muammer KIRICI**

**Haziran, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Balık materyalinin temin edildiği yer.....	27
3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer.....	27
3.1.3. Balık materyali.....	28
3.1.4. Su materyali.....	29
3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler.....	30
3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	30
3.1.6.a. G6PD enzimi çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.6.b. GR enzimi çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.6.c. Elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	33
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması.....	35
3.2.1.a. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> dokularının temini ve homojenat hazırlanması.....	35
3.2.1.b. G6PD enziminin aktivite ölçümü.....	35
3.2.1.c. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	36
3.2.1.d. Afinite kolonunun hazırlanması.....	39
3.2.1.e. Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve G6PD'nin elüsyonu.....	40
3.2.2. Glutasyon reduktaz enziminin saflaştırılması.....	40
3.2.2.a. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> dokularının temini ve homojenat hazırlanması.....	40
3.2.2.b. GR enziminin aktivite ölçümü.....	41

3.2.2.c. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	42
3.2.2.d. Afinite kolonunun hazırlanması .....	45
3.2.2.e. Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve GR'nin elüsyonu.....	46
3.2.3. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü .....	46
3.2.4. Bradford protein tayini .....	50
3.2.5. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD ve GR enzim aktiviteleri üzerine bazı metallerin etkilerinin belirlenmesi.....	51
3.2.6. İnhibitör etkisi gösteren metaller için IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	51
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>52</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	52
4.2. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> Böbrek, Karaciğer ve Solungaç G6PD Enzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları.....	52
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	52
4.2.2. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD enziminin, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları .....	58
4.2.3. Kinetik çalışmaların sonuçları.....	61
4.3. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> Böbrek, Karaciğer ve Solungaç GR Enzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları .....	93
4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	93
4.3.2. <i>C. trutta</i> ve <i>C. c. umbla</i> böbrek, karaciğer ve solungaç GR enziminin, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları .....	99
4.3.3. Kinetik Çalışmaların Sonuçları .....	102
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>134</b>
KAYNAKLAR .....	148
EKLER .....	165
EK 1.....	165
EK 2.....	167
ÖZGEÇMİŞ .....	168



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Bovine serum albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis
DTT	Ditiyotreitöl
EC	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
G6P	Glukoz 6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
I	İnhibitör
IC <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K <sub>i</sub>	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum per sülfat
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat

TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
$V_{\max}$	Maksimum hız

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Metalin su ortamında izlediği yol.....	2
Şekil 1.2. Ağır metallerin besin zinciriyle balıklara ve insanlara geçişi.....	3
Şekil 1.3. Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik yanıtları ...	5
Şekil 1.4. Ağır metallerin vücuda alınımı ve dağılımı.....	6
Şekil 1.5. Glukoz 6-fosfat Dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon .....	12
Şekil 1.6. Glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon .....	13
Şekil 1.7. Glutasyon redüktaz enziminin reaksiyonları.....	14
Şekil 3.1. Balık materyalinin temin edildiği istasyon.....	27
Şekil 3.2. <i>Capoeta capoeta umbla</i> .....	28
Şekil 3.3. <i>Capoeta trutta</i> .....	29
Şekil 3.4. <i>C. trutta</i> böbrek, karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE bandları .....	48
Şekil 3.5. <i>C. c. umbla</i> böbrek, karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE bandları .....	48
Şekil 3.6. <i>C. trutta</i> böbrek, solungaç ve karaciğer dokularından saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE bandları .....	49
Şekil 3.7. <i>C. c. umbla</i> solungaç, böbrek ve karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE bandları .....	49
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	52
Şekil 4.2. <i>C. trutta</i> karaciğeri G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	53
Şekil 4.3. <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	54
Şekil 4.4. <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	55
Şekil 4.5. <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	56

<b>Şekil 4.6.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	57
<b>Şekil 4.7.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	58
<b>Şekil 4.8.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	61
<b>Şekil 4.9.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı $\text{AgNO}_3$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	62
<b>Şekil 4.10.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	62
<b>Şekil 4.11.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı $\text{FeCl}_3$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	63
<b>Şekil 4.12.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	63
<b>Şekil 4.13.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	64
<b>Şekil 4.14.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı $\text{AgNO}_3$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	64
<b>Şekil 4.15.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı $\text{FeCl}_3$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	65
<b>Şekil 4.16.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	65
<b>Şekil 4.17.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	66
<b>Şekil 4.18.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı $\text{AgNO}_3$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	66
<b>Şekil 4.19.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	67
<b>Şekil 4.20.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı $\text{ZnCl}_2$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	67
<b>Şekil 4.21.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	68

<b>Şekil 4.22.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı FeCl <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	68
<b>Şekil 4.23.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO <sub>3</sub> .8H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	69
<b>Şekil 4.24.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	69
<b>Şekil 4.25.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	70
<b>Şekil 4.26.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	70
<b>Şekil 4.27.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 5 farklı ZnCl <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	71
<b>Şekil 4.28.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO <sub>3</sub> .8H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	71
<b>Şekil 4.29.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	72
<b>Şekil 4.30.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	72
<b>Şekil 4.31.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	73
<b>Şekil 4.32.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	73
<b>Şekil 4.33.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	74
<b>Şekil 4.34.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı FeCl <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	74
<b>Şekil 4.35.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	75
<b>Şekil 4.36.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	75
<b>Şekil 4.37.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	76

<b>Şekil 4.38.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	76
<b>Şekil 4.39.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	77
<b>Şekil 4.40.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	77
<b>Şekil 4.41.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{FeCl}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	78
<b>Şekil 4.42.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	78
<b>Şekil 4.43.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	79
<b>Şekil 4.44.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	79
<b>Şekil 4.45.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{FeCl}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	80
<b>Şekil 4.46.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	80
<b>Şekil 4.47.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	81
<b>Şekil 4.48.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	81
<b>Şekil 4.49.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	82
<b>Şekil 4.50.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{ZnCl}_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	82
<b>Şekil 4.51.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	83
<b>Şekil 4.52.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{FeCl}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	83
<b>Şekil 4.53.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	84

<b>Şekil 4.54.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	84
<b>Şekil 4.55.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	85
<b>Şekil 4.56.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	85
<b>Şekil 4.57.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için 3 sabit $\text{ZnCl}_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	86
<b>Şekil 4.58.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri....	86
<b>Şekil 4.59.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	87
<b>Şekil 4.60.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri....	87
<b>Şekil 4.61.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri....	88
<b>Şekil 4.62.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	88
<b>Şekil 4.63.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{AgNO}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	89
<b>Şekil 4.64.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{FeCl}_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	89
<b>Şekil 4.65.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	90
<b>Şekil 4.66.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri....	90
<b>Şekil 4.67.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için 3 sabit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	91
<b>Şekil 4.68.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	94
<b>Şekil 4.69.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	95

<b>Şekil 4.70.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	96
<b>Şekil 4.71.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	97
<b>Şekil 4.72.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	98
<b>Şekil 4.73.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği .....	99
<b>Şekil 4.74.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	102
<b>Şekil 4.75.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	103
<b>Şekil 4.76.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	103
<b>Şekil 4.77.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	104
<b>Şekil 4.78.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı ZnCl <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	104
<b>Şekil 4.79.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	105
<b>Şekil 4.80.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	105
<b>Şekil 4.81.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	106
<b>Şekil 4.82.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	106
<b>Şekil 4.83.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	107
<b>Şekil 4.84.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	107
<b>Şekil 4.85.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	108



<b>Şekil 4.86.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	108
<b>Şekil 4.87.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	109
<b>Şekil 4.88.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı ZnCl <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	109
<b>Şekil 4.89.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı 3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	110
<b>Şekil 4.90.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	110
<b>Şekil 4.91.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	111
<b>Şekil 4.92.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	111
<b>Şekil 4.93.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 5 farklı ZnCl <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	112
<b>Şekil 4.94.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	112
<b>Şekil 4.95.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	113
<b>Şekil 4.96.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	113
<b>Şekil 4.97.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	114
<b>Şekil 4.98.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 5 farklı ZnCl <sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	114
<b>Şekil 4.99.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği .....	115
<b>Şekil 4.100.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	115
<b>Şekil 4.101.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	116

<b>Şekil 4.102.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı $Pb(NO_3)_2$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	116
<b>Şekil 4.103.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 5 farklı $ZnCl_2$ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	117
<b>Şekil 4.104.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	117
<b>Şekil 4.105.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	118
<b>Şekil 4.106.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	118
<b>Şekil 4.107.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	119
<b>Şekil 4.108.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $ZnCl_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	119
<b>Şekil 4.109.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	120
<b>Şekil 4.110.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	120
<b>Şekil 4.111.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	121
<b>Şekil 4.112.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	121
<b>Şekil 4.113.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $Pb(NO_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	122
<b>Şekil 4.114.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	122
<b>Şekil 4.115.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	123
<b>Şekil 4.116.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	123
<b>Şekil 4.117.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $Pb(NO_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	124

<b>Şekil 4.118.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $ZnCl_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	124
<b>Şekil 4.119.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	125
<b>Şekil 4.120.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	125
<b>Şekil 4.121.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	126
<b>Şekil 4.122.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $Pb(NO_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	126
<b>Şekil 4.123.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için 3 sabit $ZnCl_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	127
<b>Şekil 4.124.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	127
<b>Şekil 4.125.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	128
<b>Şekil 4.126.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	128
<b>Şekil 4.127.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $Pb(NO_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	129
<b>Şekil 4.128.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için 3 sabit $ZnCl_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	129
<b>Şekil 4.129.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $AgNO_3$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	130
<b>Şekil 4.130.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri.....	130
<b>Şekil 4.131.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	131
<b>Şekil 4.132.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için 3 sabit $Pb(NO_3)_2$ için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri .....	131

**Şekil 4.133.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $ZnCl_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri ..... 132

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Uluslararası standartlara göre balık dokularındaki bazı metallerin kabul edilebilir değerleri (mg/kg).....	3
<b>Çizelge 1.2.</b> <i>C. c. umbla</i> ve <i>C. trutta</i> 'nın sistematikteki yeri.....	17
<b>Çizelge 3.1.</b> Murat Nehri'nin bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları .....	29
<b>Çizelge 3.2.</b> G6PD ve GR enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenen ağır metallerin stok çözeltileri.....	34
<b>Çizelge 3.3.</b> G6PD enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği .....	36
<b>Çizelge 3.4.</b> GR enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	41
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>C. trutta</i> karaciğeri G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	53
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi .....	54
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi .....	54
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	55
<b>Çizelge 4.5.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	56
<b>Çizelge 4.6.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	57
<b>Çizelge 4.7.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları .....	59
<b>Çizelge 4.8.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları .....	59
<b>Çizelge 4.9.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları .....	59
<b>Çizelge 4.10.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	60

<b>Çizelge 4.11.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	60
<b>Çizelge 4.12.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	60
<b>Çizelge 4.13.</b> <i>C. trutta</i> böbrek G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	91
<b>Çizelge 4.14.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	91
<b>Çizelge 4.15.</b> <i>C. trutta</i> solungaç G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	92
<b>Çizelge 4.16.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	92
<b>Çizelge 4.17.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	92
<b>Çizelge 4.18.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	92
<b>Çizelge 4.19.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	93
<b>Çizelge 4.20.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	94
<b>Çizelge 4.21.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	95
<b>Çizelge 4.22.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	96
<b>Çizelge 4.23.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	97

<b>Çizelge 4.24.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doyunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi.....	98
<b>Çizelge 4.25.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	100
<b>Çizelge 4.26.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	100
<b>Çizelge 4.27.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	100
<b>Çizelge 4.28.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	101
<b>Çizelge 4.29.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	101
<b>Çizelge 4.30.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	101
<b>Çizelge 4.31.</b> <i>C. trutta</i> böbrek GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	132
<b>Çizelge 4.32.</b> <i>C. trutta</i> karaciğer GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	132
<b>Çizelge 4.33.</b> <i>C. trutta</i> solungaç GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	133
<b>Çizelge 4.34.</b> <i>C. c. umbla</i> böbrek GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	133
<b>Çizelge 4.35.</b> <i>C. c. umbla</i> karaciğer GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	133
<b>Çizelge 4.36.</b> <i>C. c. umbla</i> solungaç GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu .....	133

<b>Çizelge 5.1.</b> Farklı türlere ait G6PD enziminin moleköl kütleleri.....	137
<b>Çizelge 5.2.</b> Farklı türlere ait GR enziminin moleköl kütleleri .....	138



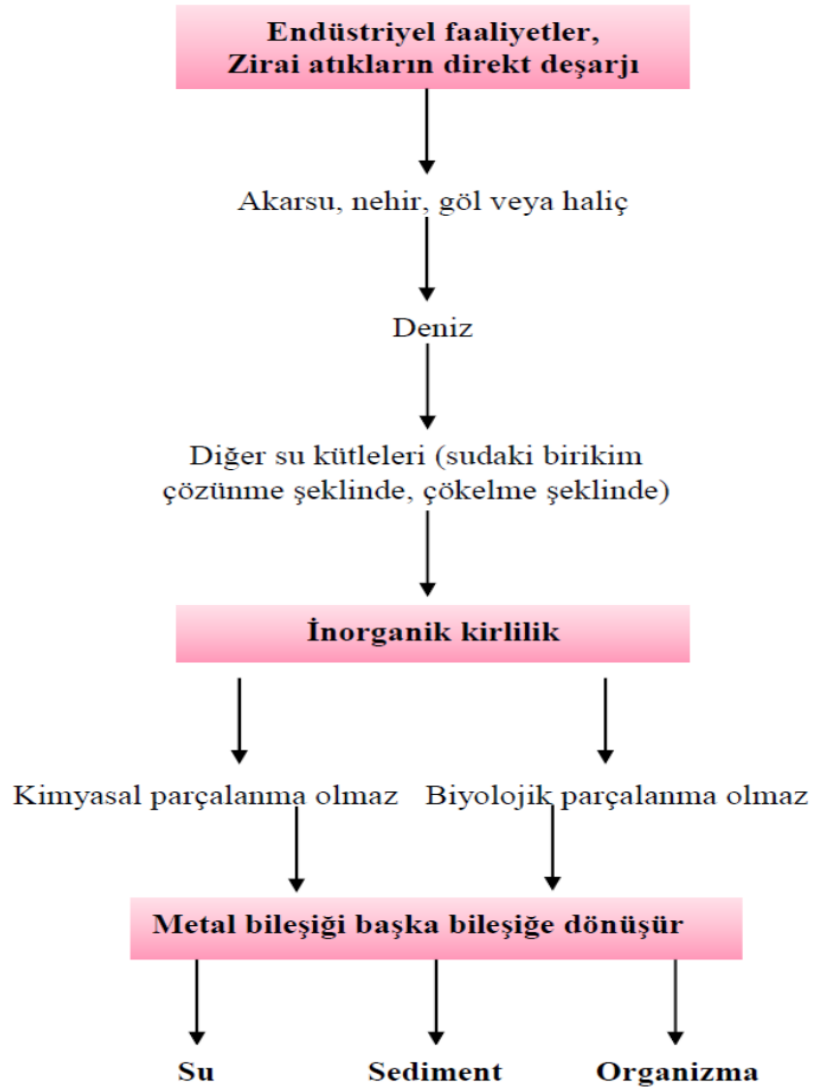
## 1. GİRİŞ

Çevre sorunları, yaşadığımız yüzyılda ekolojik dengeyi tehdit eden ve bozulmasına neden olan en önemli tehlikelerin başında gelmektedir. Çevre sorunları kentsel yaşamın başlaması ve insan nüfusunun artması sonucu ortaya çıkmış ve sanayinin gelişmesine paralel olarak artmıştır. Bu artış teknolojinin gelişmesi ile bütün toplumlar için vazgeçilmez bir amaç ve süreç haline gelmiştir. Ancak bu amaç ve sürece bağlı olarak insanoğlunun ekosisteme yaptığı etkiler artmış ve özellikle su kaynaklarını ve su canlılarını tehdit eder boyutlara ulaşmıştır (Canpolat 2007).

Ekosistemde canlılar arasındaki dengeyi bozan kirleticileri organik ve inorganik kirleticiler olarak sınıflandırmak mümkündür. Bu kirleticiler metaller, pestisitler, poliklorlu bifeniller, poliaromatik hidrokarbonlar olup organizmalara toksik etki yapmaktadırlar (Taylan ve Özkoç 2007). Yapılan çalışmalarda genel olarak kirleticiler; kalıcılıkları, zehirlilik dereceleri ve biyoakümülatif kapasitelerine göre sınıflandırılmaktadır. Bütün bu özelliklerin hepsine sahip maddeler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) tarafından “Kara Liste” maddeleri olarak nitelendirilmektedir. Bu “Kara Liste” de, 114’ü organik bileşikler, 13’ünde ağır metaller olmak üzere toplam 127 öncelikli kirletici bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programının (UNEP) “Kara Liste” ye aldığı ağır metallerin, canlılara ve çevreye oldukça önemli etkileri vardır. Yaşadığımız yüzyılda çevreye önemli etkisi olan metal kirliliğinin oluşmasını sağlayan beş önemli kaynak vardır. Bunlar; jeolojik olaylar, maden filizleri ve metallerin endüstriyel üretimi, metal ve metal bileşiklerinin kullanımı, çöp ve katı atıkların doğaya boşaltılması, ağır metal içeren hayvan ve insan atıklarıdır (Alam *et al.* 2002; Liaghati *et al.* 2003; Ikem and Egiebor 2005).

Rainbow (1995)’a göre çevrede bulunan veya çevreye salınan metallerin çoğu sularda birikerek kirliliğe neden olur. Sulardaki bu kirlilik, çözünme şeklinde olabileceği gibi, çözünmeden suların dibinde çökelme şeklinde de olabilmektedir. Metaller, organik kirleticiler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmazlar, bir metal bileşiği başka

bir metal bileşiğine dönüşür ve böylece metal iyonları bulunduğu ortamdan kaybolmazlar (Taylan ve Özkoç 2007; Atabeyoğlu 2011). Bu dönüşme işlemi sonucu ne olursa olsun sucul ortamlarda bulunan metal iyonları, ortamda yaşayan organizmaların bünyelerinde birikerek besin zincirine dahil olurlar. Sucul organizmalar besin zinciri içinde çeşitli yollarla, metali birbirleri arasında taşıyabildikleri gibi insanlarda taşıyabilmektedirler (Şekil 1.2). Bunun sonucu olarak metaller, insan sağlığını tehdit edip, bazen tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir (Sarıeyyüpoğlu ve Say 1991).

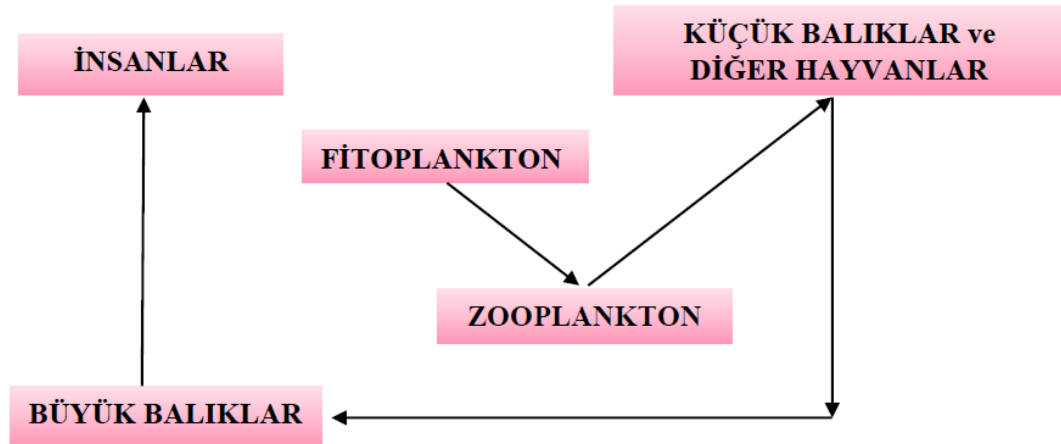


**Şekil 1.1.** Metalin su ortamında izlediği yol (Rainbow 1995; Atabeyoğlu 2011)

Önemli bir insan gıdası olan balıklarda, ağır metal birikimi üzerine ulusal ve uluslararası birçok kuruluş çalışmalar yapıp balık dokularına kabuledilebilir metal miktarlarını belirlemişlerdir. Bu kuruluşlardan WHO (Dünya Sağlık Örgütü), EC (Avrupa Birliği Komisyonu), MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, İngiltere), Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) ve Türk Gıda Kodeksi (TGK) tarafından belirtilen balık dokularındaki bazı metallerin kabul edilebilir değerleri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Uluslararası standartlara göre balık dokularındaki bazı metallerin kabul edilebilir değerleri (mg/kg) (Kırıcı vd 2013a)

	Pb	Cu	Ni	Mn	Cd	Zn	Kaynaklar
<b>WHO 1989</b>	2.00	30	0.5-1.0	1.00	1.00	100	Mokhtar 2009
<b>EC 2005</b>	0.2	-	-	-	0.05	-	EC 2005
<b>MAFF 1995</b>	2.00	20	-	-	-	50	Ikema and Egieborb 2005
<b>UNEP</b>	0.3	-	-	-	0.3	-	UNEP 1985
<b>TGK</b>	0.2	20	-	-	0.05	50	TGK 2002



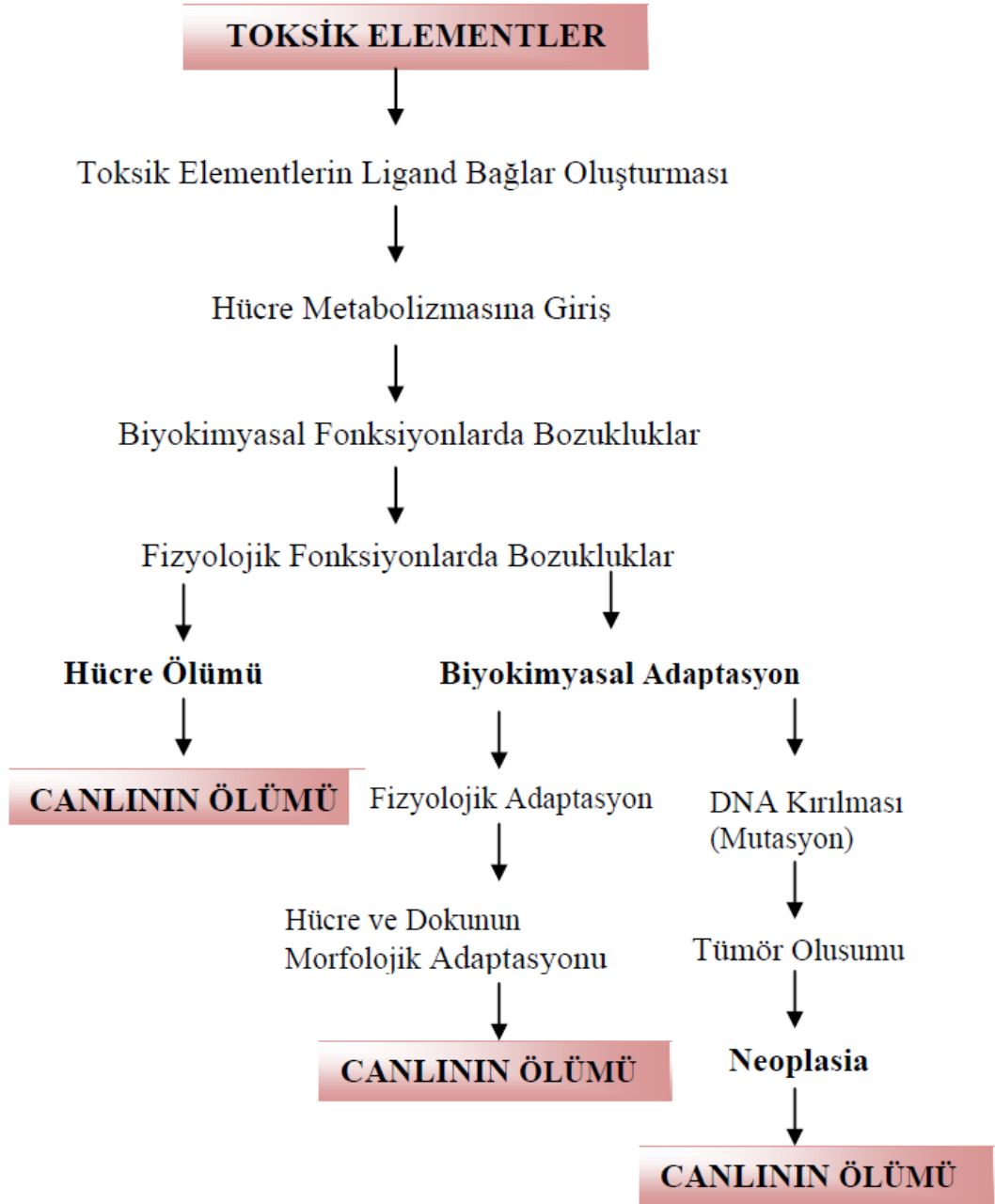
**Şekil 1.2.** Ağır metallerin besin zinciriyle balıklara ve insanlara geçişi (Tumantozlu 2010; Atabeyoğlu 2011)

Çeşitli faktörler sonucu sucul ortamda bulunan ağır metallerin toksisitesi; hedef organizmanın türüne, metalin davranışına, organizmanın yaşam safhasına, pH,

çözünmüş oksijen, sıcaklık, balığın büyüklüğüne oranla çözeltinin hacmi, çözeltinin yenilenme frekansı, çözeltideki diğer maddeler ve sinerjik etki gibi faktörlere bağlıdır. (Mutluay ve Demirak 1996; Kargın *et al.* 2001). Bununla birlikte metallerin toksik etkileri; metalin kimyasal formuna, biyolojik bulunurluğuna, alınımla yoluna, metalin aksiyon etkisine ve metabolizmasına, diğer metallerle etkileşimine, metalin kısa ve uzun dönemli etkisine, toksik etkisini göstereceği hedef bölgeye, hücre içi fizyolojik proseslere ve genetik adaptasyonlara bağlıdır. Sucul ortamda bulunan metallerin bu toksik etkilerine karşı canlıların gösterdiği yanıt mekanizmaları şunlardır; özel olarak üretilen organik bileşiklerce metallerin depolanması, hücreler tarafından detoksifikasyon mekanizması ve metal iyonlarının tekrardan dışarı atılmasıyla olmaktadır (Fırat 2007). Ağır metallerin organizmalara toksik etkileri, ya enzimin aktif bölgesinde yararlı bir metalle yer değiştirerek veya molekül üzerinde aktif olmayan bölgeye bağlanarak yaptıkları saptanmıştır (Viarengo 1985). Metaller organizmalarda, proteinlerin imidazol, amino, sülfidril ve karboksil gruplarına bağlandıkları belirtilmiştir (Murphy and Spiegel 1983; Viarengo 1985).

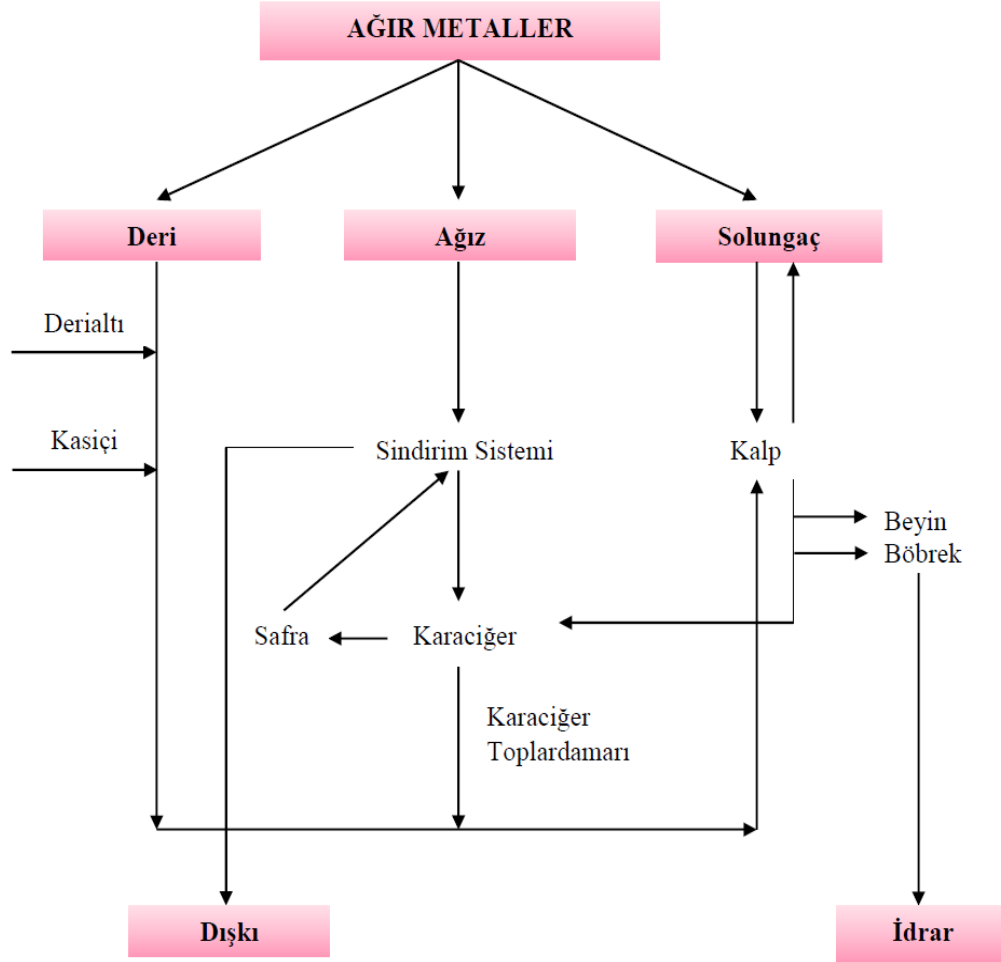
Yüksek metal konsantrasyonları şu etkilerle toksisiteye neden olmaktadır:

1. Fosfat grupları ve aktif ADP ya da ATP gruplarıyla tepkimeye girerek
2. Gerekli iyonlarla yer değiştirerek
3. Hücre zarlarının geçirgenliğini değiştirerek
4. Sülfidril (-SH) gruplarıyla tepkimeye girerek (Patra *et al.* 2004).



**Şekil 1.3.** Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik yanıtları (Kayhan vd 2009)

Ağır metaller balık vücuduna solungaç, deri veya sindirim yolu ile geçerler. Bunların bir kısmı idrar veya dışkı ile vücuttan uzaklaştırılırlar. Şekil 1.4’de ağır metallerin giriş ve çıkış yolları görülmektedir.



**Şekil 1.4.** Ağır metallerin vücuda alınımı ve dağılımı (Dökmeci 1988)

Metallerin birçoğu organizmanın yaşamı için gerekli elementler olup (Na, Ca, Mg, Zn, K, Mn, Cu, Co, Fe, Mo, ve Se) eksikliklerinde çeşitli semptomatik bozukluklara, belirli sınırların üzerine çıktığında ise toksik etki göstererek organizmada ölüme varan olumsuz etkilere neden olurlar (Şekil 1.3) (Sarıyüpoğlu ve Say 1991).

Sucul ortamda yüksek oranda çözünürlüğe sahip olan ve organizmalar tarafından kolayca absorbe edilebilen ağır metaller, gıda zinciri içine dahil olduktan sonra canlı vücudunda yoğun şekilde birikmesi sonucu canlılarda, özellikle de insanlarda önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bazı ağır metallerin canlılarda neden olduğu sağlık sorunları şunlardır:

**Bakır (Cu):** Tüm canlı organizmaların gereksinim duyduğu bir iz element olan bakır, tüm hücrelerde pikomolar düzeyinde bulunmakla birlikte yaklaşık 30 enzimin kofaktör olarak bakırı kullandığı belirlenmiştir (Arellano *et al.* 1999). Hafif alkali sularda hidroksit, çürüten organik madde içeren sularda sülfür şeklinde çökeler. Bakır balıklar ve küçük canlılar için yüksek derecede toksiktir. Alabalıklar için toksite sınırı 0,14 mg Cu/lit (bakır çözünen tuz olarak suda bulunuyorsa) olup sert sularda zehir etkisi daha azdır. Suda çözülmüş halde bulunan diğer tuzlar bakırın zehir etkisini azaltır. 2,5 mg Cu/lit yüksek su bitkilerine zarar vermezken, içme sularında en fazla 0,05 mg Cu/lit bulunmalıdır (Anonymous 2011). Ayrıca bakırın subletal derişimlerinin balıklarda büyüme, gelişme ve üreme üzerine olumsuz etkiler yaptığı bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Buckley *et al.* 1982; Hilmy *et al.* 1985). Bakırın hücrede şelatlama kapasitesinin üstünde birikmesi durumunda çok fazla sitotoksik olduğu, oksidatif strese neden olduğu ve hücresel düzeyde zarar verdiği de bilinmektedir. Kronik bakır etkisindeki balıklarda; oksijen tüketiminde artış, yüzme hızında azalma, iyon regülasyonunda değişiklikler, lenfosit düzeyinde azalma, nötrofil düzeyinde artma, bağışıklık sisteminde değişiklikler, enzim aktivitelerinde negatif etkiler gibi fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Henczova *et al.* 2008).

**Kurşun (Pb):** Organizmalarda herhangi bir biyolojik işlevi bulunmayan kurşun yer kabuğunda, kayalarda, toprakta ve suda doğal olarak bulunmaktadır. Doğal sularda normal kurşun düzeyleri 0.0006-0.12 mgL<sup>-1</sup> arasındadır. Kurşun su ortamına, madencilik, kömür ve petrol yakıtlarından, çeşitli yapıştırıcı maddelerin imalinden, kauçuk sanayinden, benzin katkı maddesi olarak, akü, boya ve pil yapımı gibi insan aktiviteleri sonucu girmektedir (Berman 1980; Roger *et al.* 2003). Organizmalarda iz miktarlarda bile gerekli olmayan kurşunun düşük düzeyleri üreme, büyüme ve davranış değişikliklerine neden olmaktadır (Burden *et al.* 1998). Kurşun balıklarda büyüme ve eritrositlerde hem sentezinde görev alan δ aminolevulinik asit dehidrataz enzimi (Burden *et al.* 1998), lipid peroksidasyon enzimi (Campana *et al.* 2003), anemi rahatsızlığı ve ALAD (Delta aminolevulinik asid dehidrataz) enziminin (Ruparelia *et al.* 1989) inhibüsyonuna neden olduğu belirtilmiştir.

**Kadmiyum (Cd):** Yüksek derecedeki toksik etkisi (Faroon *et al.* 1994), çevredeki geniş yayılımı (Cinier *et al.* 1999) ve düşük düzeylerde bile organizmalara olumsuz etkileri (Cope *et al.* 1994) nedeniyle 1993'te insanlar için birinci dereceden kanserojenik elemanlar grubuna dahil edilmiştir. Kadmiyum endüstriyel aktiviteler (boya sanayisi, plastikler ve akümülatör üretiminde) (Drastichova *et al.* 2004), madencilik ve uygulamaları ve pestisit olarak tarımsal kullanımına bağlı olarak (Chowdhury *et al.* 2004) antropojenik kaynaklardan da su ortamlarına karışmaktadır. Kadmiyum çok düşük düzeylerde su organizmalarında Ca homeostasisinin bozulmasına, böbrek, solungaç ve bağırsak gibi organlarda histolojik ve morfolojik değişikliklere, ekstraselular sıvıda iyon konsantrasyonunda dengesizliğe ve osmoregülasyon kapasitesinde değişikliğe neden olmaktadır (De la Torre *et al.* 2000). Kadmiyumun, hücre membranlarının yapısında değişikliklere, permeabilitesinin bozulmasına, birçok enzimatik reaksiyonun değişmesine ve yaşamsal öneme sahip inorganik katyonların düzeylerinde dengesizliklere neden olduğu da belirlenmiştir (Suresh *et al.* 1995). Cd, biyokimyasal düzeyde toksik etkisini DNA, RNA ve ribozom sentezini olumsuz etkileyerek (Gerhard *et al.* 1998), bazı enzim aktivitesini engelleyerek (Doi *et al.* 1993), ozmotik ve iyon dengesini bozarak (Heath 1987) ve immün yanıtlarda değişikliğe neden olarak (Saxena *et al.* 1992) göstermektedir. Ayrıca balıklarda Cd'un toksik etkileri şunlardır; balıkların büyüme ve gelişimini yavaşlatır, karaciğer, üreme, beyin ve sinir sisteminde patolojik değişikliklere neden olur, solungaçlardan  $Ca^{+2}$  alınımını engeller ve solungaç lamelleri epitelyumunda erime, hipertropi ve kılcal damarlarda tıkanma gibi solungaç yapısında patolojik değişikliklere, ayrıca mukus salgılamasını arttırarak doku düzeyinde hipoksiyaya neden olur, iskelet deformasyonununa yol açar (Cicik and Engin 2005). Cd'nin neden olduğu toksik etkilerin süresi ve yoğunluğu; çalışılan balık türüne, derişime ve etki süresine bağlı olmakla birlikte (Sörensen 1991; Heath 1995), Cd dokularda önemli bir birikime sahip olması, çok uzun bir süre vücutta kalabilmesi ve atılımının az olması dolayısıyla detoksifikasyonu da oldukça yavaştır (Pitter 1999).

**Çinko (Zn):** Zn hücresel fonksiyonların yerine getirilmesi için eser düzeyde gerekli bir metaldir. Ancak belirli bir konsantrasyondan sonra balıkları da içeren sucul organizmalar için oldukça toksik olmaktadır. Çinko, hücre bölünmesi, büyüme ve



immün sistemde bütünleyici bir rol oynadığından (Coleman 1992; Prasad 1995; Cousins 1998) tüm canlı organizmalar için gerekli bir iz elementtir (Eisler 1993). Aynı zamanda Zn yaklaşık 300 enzimin yapısına girer. Çinko taşıyan metallo enzimlerden karbonik anhidraz, alkalın fosfataz, RNA ve DNA polimerazlar, alkol dehidrogenaz, glutamik asit dehidrogenaz, süperoksit dismutaz gibi pek çok enzimin integral bir komponentidir. Çinko içeren enzimlerin; karbonhidrat, lipid ve nükleik asit metabolizmasında, protein sentezinde önemli fonksiyonları vardır (Vallae 1959). Hücrede çinko derişiminin artması sonucu özellikle glutatyon redüktaz (GR) önemli ölçüde etkilenir. Çinko toksik derişimlerde bulunduğunda GR inhibisyonuna bağılı olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) derişiminde bir azalma olurken yükseltgenmiş glutatyonda (GSSG) ise bir artış meydana gelir (Mize and Langdon 1962; Walther *et al.* 2000). Çinko, astrositlerde GR'yi inaktive ederek GSSG: GSH oranının artmasına ve hücreiçi reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine neden olur (Bishop *et al.* 2007). Balık kanındaki total çinko düzeyi 0,013 (Grober-van Heerden *et al.* 1991) –1,15 mM (Lovegrove and Eddy 1982) arasında değışmektedir. Çinkonun balıklar tarafından alınıml düzeyi, derişime, etki süresine, balığın büyüklüğüne, suyun sertliğine ve balığın beslenme düzeyine bağılı olarak değışiklik göstermektedir (Sorensen 1991). Çinko solungaç, karaciğer, böbrek, kalp ve beyin gibi dokularda önemli miktarlarda birikim göstermektedir (Seghal and Saxena 1986). Çinko çeşitli enzimlerin bağlanma bölgelerinde bulunan diğere metallerle yer değıştirerek (Roche and Boge 1993), tiyol ve/veya bazı aminoasitlere bağlanıp polipeptid zincirinde yapısal değışikliklere yol açarak (Kellogg and Hof 1996), hücrelerin enerji metabolizmasını etkileyerek (Borghesi and Lynes 1996) ve tüm zarlardaki iyon-taşıma kanallarıyla etkileşime girerek (McGeer *et al.* 2000) biyokimyasal düzeylerde toksik etkilerini göstermektedir.

**Nikel (Ni):** Endüstride sıkça kullanılan bir metal olup alerjik özelliğinin bulunduğu ve akciğer kanserine neden olduğu bildirilmiştir (Garner 2004; Costa *et al.* 2005). Redoks aktif bir metal olan nikel peroksidasyona karşı koruyucu hücrenel antioksidan savunma mekanizmalarına zarar verir (Athar *et al.* 1987; Misra *et al.* 1990). Nikel hücrede ROT üretimini ve lipid peroksidasyonunu arttırarak redoks dengeyi bozar ve bunun sonucunda hücrenel proteinlere zarar verir. Ayrıca, süperoksit dismutaz, Fe(II)/alfa-

ketoglutarat (alphaKG)-bağımlı hidrosilaz, maya heksokinaz, horseradish peroksidaz ve mikrozomal epoksit hidrolaz enzimlerini inhibe eder (Shainkin-Kestenbaum *et al.* 1991; Mahmoudi *et al.* 2003).

**Civa (Hg):** Civa besin zinciri ile insanlara taşınabildiği ve zararlı etkiler gösterebildiğinden dolayı önemlidir. Civa inorganik form olarak balık tarafından alınabilir. Fakat bunun temel yolu sedimentteki bakteriyel etkilerle metilleştirilmiş olan civanın absorpsiyonudur (Lloyd 1992). Civa, ölüme, zayıf gelişmeye ve balıkların embriyo, larva ve genç dönemlerinde büyümenin azalmasına sebep olabilir (Gül vd 2004). Fabrikalardan atılan civa, sedimentte mikroorganizmalar tarafından metil civaya ( $\text{CH}_3\text{Hg}^{++}$ ) dönüşür ve çok toksik olan bu bileşik biyobirikim ve besin zinciri ile insanlara ulaşır (Beğenirbeş 2002). Ağır metallere kaynaklanan gıda zehirlenmeleri çok nadir görülmekle birlikte, bu durum genelde çevresel kirlenmeden sonra meydana gelmektedir. Böyle bir çevresel kirlenmenin en iyi bilinen örneği 1932–1955 yılları arasında Japonya’da meydana gelmiştir. 1932’den itibaren, Japonya’da Chisso’s kimyasalları tarafından civa içeren lağım Minimata sahiline serbest bırakılmıştı ve bu da civanın deniz ürünlerinin vücudunda birikmesine sebep olmuştu. Daha sonra burada yaşayan halkta civa zehirlenmesi gözlenmiş ve bunun nedeni olarak civa ile kirlenmiş balıkların tüketimi gösterilmişti. 1950’lerde bu bölgede toplam 500 ölüm vakası kaydedildi. Bu olaydan sonra; Japonya, endüstri dünyasının en katı çevresel kanunlarını çıkardı ve hastalık da Minimata sendromu olarak literatüre geçmiş oldu (Anonim 2009).

Ağır metallere olumsuz etkilerinden biri de oksidatif reaksiyonları katalizleme ve böylece ROT oluşumuna neden olmasıdır. ROT’lar; süperoksit, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinden oluşmaktadır. ROT’lar oldukça yüksek reaktif bileşikler olup DNA, protein ve lipid gibi önemli biyolojik moleküllerin oksidasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur (Yu 1994). ROT’un zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize edilmektedir. Sağlıklı bir hücrede metabolik tepkimeler sonucu oluşan reaktif radikaller ile çeşitli savunma mekanizmaları ile oluşturulan antioksidan molekül düzeyi arasında fizyolojik bir denge söz konusudur (Finkel and Holdbrook; Smith *et al.* 2004). Bu dengenin oksidanlar yönünde bozulması

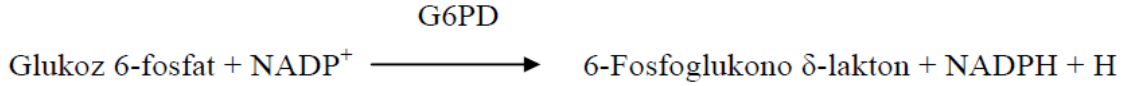
oksidatif stres olarak tanımlanır (Sies 1997). Bu durum da hücre işlevlerinin bozulması, apoptoz veya nekrozla sonuçlanabilir. Dolayısıyla, antioksidan savunma sistemlerinin işlevselliği ve oksidanlar/antioksidanlar dengesinin sağlanması hücre için yaşamsal öneme sahiptir (Nordberg and Arner 2001).

Daha yüksek omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da antioksidan savunma sistemleri; hem süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gibi enzimatik olan hem de glutatyon, spesifik proteinler (serum albumin, transferin, seruloplazmin) ve vitaminler (Vitamin C ve E, karotenoidler) gibi enzimatik olmayan iki savunma mekanizması tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu savunma sistemleri tüm dokular gibi kanında önemli bir savunma sistemini oluşturmaktadır. Antioksidanlar, ROT oluşumunu önleyerek ya da ROT'ları etkisiz hale getirerek etkilerini göstermektedir (Benzie 2000). Kirleticilerin etkisine yanıtta antioksidan sistem aktivasyonu çeşitli balık türlerinde belirlenmiştir (Filho 1996; Hai *et al.* 1997; Ahmad *et al.* 2000). Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler, metal iyonları tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı biyolojik savunmada önemli roller oynamaktadır (Lopes *et al.* 2001). Balıklarda oksidatif stres biyomarkırları özellikle de antioksidan enzimler sulardaki kirliliğin indikatörleri olarak kullanılmaktadır (Pandey *et al.* 2003).

Antioksidan savunma sisteminin önemli enzimlerinden biri olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (E.C.1.1.49; G6PD) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen anahtar bir enzimdir. Bu enzim NADP<sup>+</sup> varlığında glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukonata dönüşümünü sağlar ve hücreler için son derece önemli olan NADPH oluşur (Lehninger *et al.* 1993; Keha ve Küfrevioğlu 1997).

Canlılarda NADPH oluşumu için pentoz fosfat metabolik yolu çok önemlidir ve G6PD eksikliğinde NADPH önemli ölçüde azalır. NADPH'ın en önemli rolü ise okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesini sağlamaktır. Bu reaksiyon GR enzimi tarafından katalizlenir. GSH, serbest tiyol grubu ihtiva eden bir tripeptiddir. Serbest tiyol grubu, proteinleri indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür; aynı zamanda

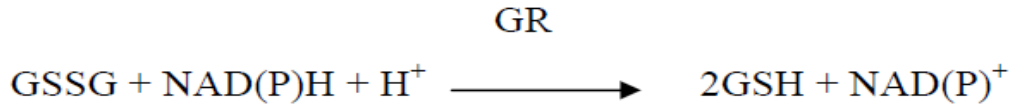
hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır (Yüreğir vd 1988; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



**Şekil 1.5.** Glukoz 6-fosfat Dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon

G6PD enziminin klinik önemi: G6PD eksikliği oksidan ajanların detoksifiye edilmemesi sonucu oluşan, hemolitik anemi ile karakterize genetik bir hastalıktır. G6PD eksikliği, insanlarda en sık görülen ve hastalığa neden olan bir enzim anomolisidir ve dünyada 200 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Bu eksiklik, en fazla Orta Doğu, tropikal Afrika, Asya ve Akdeniz Bölgesi'nde görülür. Bu X kromozomuna bağlı enzim eksikliği G6PD'yi kodlayan gendeki 400'den fazla farklı mutasyonun neden olduğu bir grup eksikliktir. Bu mutasyonların sadece bazıları klinik bulgulara neden olur. G6PD eksikliği olan kişilerin çoğunun hayat süreleri kronik hemolizden kaynaklanan komplikasyonlar nedeniyle kısaldır. G6PD eksikliğinin bu olumsuz etkisi yaşamdaki bir avantaj ile dengelenmiştir. Bu da mutasyonlu kadın taşıyıcılarda, falsiparum malaria (sıtma)'ya karşı direncin artmış olmasıdır. G6PD aktivitesinin azalması, hücrenin NADPH oluşturma yeteneğini bozar. NADPH ise redükte glutatyon havuzunun sürdürülmesi için mutlaka gereklidir. Bunun sonucunda, hücre içinde oluşan serbest radikallerin ve peroksitlerin hücresel detoksifikasyonlarında azalma olur. Glutatyon, hemoglobin dahil, proteinlerin sülfidril gruplarının redükte durumda kalmalarına da yardımcıdır. Bu sülfidril grupların oksidasyonu sonucunda denatüre proteinler oluşur. Bunlar da çözünmez kütleler oluşturarak eritrositlerin membranlarına tutunurlar. Membran proteinlerinin daha ileri oksidasyonu ile eritrositler rijit ve deforme edilemez hale gelirler. Böylece eritrositler dolaşımdan, karaciğer ve dalak makrofajları tarafından uzaklaştırılırlar. G6PD eksikliği kişinin tüm hücrelerinde olmasına rağmen eritrositlerde daha ağır seyreder. Çünkü eritrositlerde NADPH üreten tek yol pentoz fosfat yoludur. Diğer dokular glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için alternatif NADPH üretim kaynaklarına sahiptir (Champe and Harvey 2007).

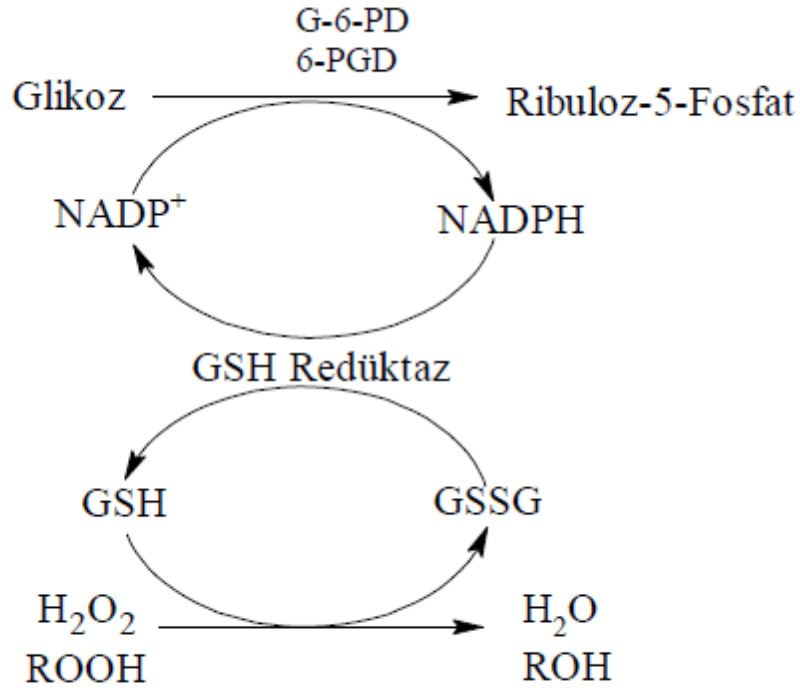
Glutasyon redüktaz (Glutasyon; NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, E.C: 1.8.1.7: GR) flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim glutasyon disülfiti (GSSG), indirgenmiş glutatyona ( $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil glisin; GSH), NADPH yada NADH'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak indirgenmesini katalizler (Müller 1992; Gül *et al.* 2000).



**Şekil 1.6.** Glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

GR enzimi, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında GPx enzimi tarafından GSSG'nin indirgenmesi reaksiyonunu katalizler. Böylece organizmada sınırlı miktardaki GSH tekrar kullanıma hazır hale gelmiş olur. Fakat bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a gereksinim duyulmaktadır. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan elde edilir. Burada G6PD enzimi ile GR enzimi arasındaki ilişki ortaya çıkar. G6PD enziminin çalışmaması, NADPH üretimini; NADPH miktarının azalması GR enziminin işlevini; GR aktivitesinin düşmesi de GSH oluşumunu etkiler (Akkuş 1995; Ciftci *et al.* 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2004). GR enzimi daha çok sitozole lokalize olmuş dimer yapıda bir enzimdir. Her bir alt ünitesinde birer flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunmaktadır. NADPH, FAD'i indirgemekte, FAD'deki elektronlar da okside glutatyondaki disülfür köprüsüne aktarılmaktadır. GR aktivitesi, NADPH kullanılarak GSSG'nin GSH'a indirgenmesi sırasında NADPH'ın oksidasyonunun spektrofotometrik olarak izlenmesi ile belirlenir. GR enzimi hücre içi GSH/GSSG oranını yükselterek özellikle eritrositleri hemolizden korur (Akkus 1995; Mullineaux *et al.* 1996; Lamotte *et al.* 2000; Reed 2001; Keha ve Küfrevioğlu 2004; Bülbül and Erat 2008). Anlaşıldığı gibi hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını dengede tutmak GR enziminin katalizlediği reaksiyonun en önemli hedeflerinden biridir. Bu oran kırmızı kan hücrelerinde yaklaşık olarak 500/1'dir. Eritrositlerde GSH eksikliği zorunlu metabolik işlemlerin ciddi bir şekilde bozulmasıyla sonuçlanır ve bu durum hemolize yol açar. Bu nedenle pentoz fosfat yolunun etkin olarak çalışabilmesi için 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimiyle beraber bu yolun

enzim aktivitelerinin yeterli miktarda olması gerekir (Montgomery 1996; Keha ve Küfrevioğlu 2004).



**Şekil 1.7.** Glutatyon redüktaz enziminin reaksiyonları

GSH, ilaç ve detoksifikasyonu ve hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması reaksiyonlarında önemli bir role sahiptir. Bu rol özellikle karaciğerde çok önemlidir. Çünkü detoksifikasyon olayı karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemin işleyişinde oksijen molekülüne yeterli miktarda elektron aktarılmazsa süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) veya peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Hücrede bu zararlı iyonları zararsız hale getirecek sistem mevcuttur. SOD ve CAT enzimleri, hücrede oksidatif strese sebep olan süperoksit radikali ve peroksitin suya dönüşmesine sebep olarak hücre membranı proteinlerinin hasar görmesini önlerler. Bu enzimlerin fonksiyonu askorbik asit, GSH ve K vitamini tarafından güçlendirilir. GR enzimi klinik kimyada karaciğer ve kanser hastalıklarının belirlenmesinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde ve bazı genetik eksikliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Beutler 1969). Ayrıca antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan GR hücrede serbest radikallerin lipid, protein ve DNA üzerinde

oluşturduğu zararlı etkilerden korur. Hücrede GR ve GSH eksikliği oksidatif hasara yol açarak Alzheimer, Parkinson, karaciğer ve akciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, HIV, AIDS, kanser, ateroskleroz, felç, şizofreni, epilepsi ve diyabet gibi birçok hastalığa neden olur (Townsend *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004).

Örneğin: Malarya yaygın olarak Afrika ve Asya'nın tropikal bölgeleri, Orta-Doğu ve Akdeniz'in bazı bölgelerinde görülen yaklaşık olarak 600 milyondan fazla sayıda insanı etkileyen bir bulaşıcı hastalıktır. Antimalaryal tedavilere gösterilen direnç sebebiyle ölüm oranı son yıllarda artış göstermiştir. Malarya hastalığına neden olan Plazmodyum parazitleri reaktif oksijen türlerine karşı korunmak için antioksidan sisteme ve özellikle glutatyonla ihtiyaç duyarlar. Glutatyon, oksidatif hasara karşı paraziti koruyarak hayatta kalmasını sağlar. GR glutatyonun indirgenmesini katalizleyen enzimdir bu nedenle malaryal parazitler için yaşamsaldır. Enzim aktivitesinin kaybına neden olan GR inhibitörleri malarya hastalığına ve ilaç direncine karşı kullanılmaktadır. Antioksidatif sistemdeki rolü nedeniyle GR antimalaryal ilaç araştırmalarının hedef enzimi olarak görülmektedir (Ereser 2010).

Yukarıda görüldüğü üzere sucul ortamlarda çeşitli faktörler sonucu bulunan ağır metallerin yol açtığı kirlilik sonucu sucul ortamlar, canlılar için zararlı bir ortam haline gelmekte ve canlıların hastalanmasına hatta ölmesine neden olmaktadır. Sucul ortamda bulunan bu ağır metaller besin zinciri yoluyla canlılarda birikmekte ve insana kadar ulaşmaktadır. Son yıllarda sucul ortamdaki kirliliklerin etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik toksikoloji çalışmalarında moleküler yöntemlerin kullanılması en çok tercih edilen metotlardan biridir. Dolayısıyla toksikoloji ile ilgili yapılan çalışmalarda kirletici ve kimyasalların sucul organizmaların dokularına olan etkisinin moleküler olarak belirlenmesi büyük önem arz etmektedir (Atabeyoğlu 2011).

Dünyada omurgalı hayvanların %42'sini oluşturan balıkların 40.000 civarında türü olduğu, bu sayının %40 gibi büyük bir bölümünü sazangillerin (*Cyprinidae*) oluşturduğu ileri sürülmektedir (Çelikkale 1991). *Cyprinidae* familyasına mensup *Capoeta* genusu Güney Çin, Kuzey Hindistan, Afganistan, Türkistan, Aral Gölü,

Ortadoğu ve Anadolu'yu içermekte olup çok geniş bir coğrafyada dağılışı göstermektedir. Memleketimizin iç sularında 5 türü (*Capoeta capaeta*, *Capoeta trutta*, *Capoeta barroisi*, *Capoeta pestai*, *Capaeta tinca*) ve 6 alt türü (*Capaeta capoeta sieboldi*, *Capoeta capoeta umbla*, *Capoeta capoeta bergama*, *Capoeta capoeta kasswigi*, *Capoeta capoeta angorae* ve *Capoeta capoeta capoeta*) yaşadığı bildirilmektedir (Kuru 1975a; Geldiay ve Balık 1996).

Türkiye iç su varlığı yönünden dünya ortalamasının altında olmasına karşın, bulunduğu bölge itibari ile zengin sayılabilecek kaynaklara sahiptir. Doğu Anadolu Bölgesi ise bu bakımdan daha şanslı bir bölgedir. Mevcut iç su potansiyelinin %35'i ve tür zenginliğinin %20'sine sahiptir (Akyurt vd 1990). Bölgedeki mevcut türlerin yalnızca bir kaçı ekonomik anlamda avlanma kompozisyonuna girmekte (alabalık, inci kefali, yayın, aynalı sazan, siraz (*C. c. umbla*), karabalık (*C. trutta*) gibi diğer türler üzerinde ciddiyetle durulmamaktadır. Mevcut türlerin üretim potansiyelleri ve ekonomik değerleri yanı sıra, ekolojik bakımdan önemleride dikkate alındığında bütün türlerin çalışılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber gelecekte hangi balıkların daha stratejik noktalarda kullanılabileceği de henüz bilinmediğinden biyolojik zenginliklerimizin bir bütün olarak ele alınıp çalışılması kaçınılmaz olmaktadır (Güneş 2007).

*C. trutta* ve *C. c. umbla*, başta Fırat ve Dicle nehir sisteminde olmak üzere Hazar gölü, Murat nehri, Karasu, Munzur suyu, Haman suyu, Batman suyu gibi Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki birçok akarsu ve göllere yayılmıştır (Geldiay ve Balık 1996; Atay 1987). Avcılığı yapılan ve ekonomik öneme sahip *C. trutta* ve *C. c. umbla*'nın sistematikteki yeri Çizelge 1.2'de verilmiştir.



**Çizelge 1.2.** *C. c. umbla* ve *C. trutta*'nın sistematikteki yeri (Ekingen 1988).

	<i>C. c. umbla</i>	<i>C. trutta</i>
Alem	Animalia	Animalia
Alt alem	Metazoa	Metazoa
Şube	Chordata	Chordata
Alt şube	Vertebrata	Vertebrata
Üst sınıf	Pisces	Pisces
Grup	Gnathostomata	Gnathostomata
Sınıf	Osteichthyes	Osteichthyes
Alt sınıf	Actinopterygii	Actinopterygii
Takım	Cypriniformes	Cypriniformes
Alt takım	Cyprinoidei	Cyprinoidei
Aile	Cyprinidae	Cyprinidae
Cins	Capoeta	Capoeta
Tür	<i>Capoeta capoeta</i>	<i>C. trutta</i> (Heckel, 1843)
Alttür	<i>C. c. umbla</i> (Heckel, 1843)	

*C. c. umbla*'nın belirgin özellikleri şunlardır; D III-IV/(8) 9-10; A III/5; L. Lateral 73-92 şeklindedir. Vücut silindirik ve nispeten yanlardan basık, vücut uzunluğu (*C. hariç*) maksimum vücut yüksekliğinin 4,0-4,4 katıdır. Vücut genellikle küçük pullarla örtülüdür. Bir çift bıyıkları olup, baş sivri, burun basık, ağız büyük, üst dudak iyi gelişmiş ve alt dudak ise hiç gelişmemiştir. Dudaklar boynuzsu yapıdaki sert deri ile örtülüdür. Solungaç dikenleri 17-19 tanedir. Dorsal yüzgeçteki dallanmamış son kemiksi ışın çok kuvvetli, fakat ucu oldukça incedir (Kuru 1975b). Kuyruk yüzgeci orta derecede çatallı ve yüzgeç loplarının kenarları sivri değildir. Diğer yüzgeçlerin serbest kenarları düze yakın dış bükeydir. Renk sırtta koyu esmer, yanlarda kahverengi, sarı, karın bölgesi çoğu zaman kirli beyaz görünüm olup periton ise daima siyah renklidir (Çoban 2010). *C. c. umbla*'nın en önemli özelliğinden biri de farinks dişlerinin 4.3.2-2.3.4 şeklinde üç sıralı olmasıdır. Bu balığın eti kılçıklı olmasına rağmen bölgesel olarak avlanılmakta ve sevilerek tüketilmektedir. Diğer alttürlerden basık burun, geniş

ağız ve dorsal yüzgecin kuvvetli bir şekilde dallanmış ışınları sayesinde ayrılır (Çelikkale 1988).

*C. trutta*'nın belirgin özellikleri şunlardır; vücut yanlardan yassılaştırmış ve yüksek yapılı olup, orta büyüklükteki pullarla örtülüdür. Baş boyu maksimal vücut yüksekliğinden daima küçüktür ve standart boyda 4,5-5 defa vardır. Ağız küçük ve ventral konumlu olup, köşelerinde bir çift kısa bıyık taşır. Dorsal yüzgecin sonuncu kemik ışınının çok fazla gelişmiş olması bu türü diğerlerinden kolaylıkla ayırır. Çünkü bu ışın gayet iyi kemikleşmiş olup, posteriyor kenarı boyunca çok kuvvetli dişler taşır ve uzunluğu yumuşak ışınların yaklaşık iki katına eşittir. Renk sırtta koyu iken yanlarda ve karın altında gri-kahverengiye dönüşür. Uzunluğu 50 cm kadar olabilir (Geldiay ve Balık 2007).

Bu çalışmamızda ülkemiz içsularında yoğun şekilde bulunan ve avlanarak insanlar tarafından tüketilen, ekonomik değeri olan *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD ve GR enzimlerinin saflaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, saflaştırma işlemlerinin ardından doğada sıklıkla bulunan bazı ağır metallerin enzimler üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ülkemizde *C. trutta* ve *C. c. umbla* ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Köprücü ve Özdemir 2003; Altun 2008; Kalkan 2008; Dağlı ve Erdemli 2009; Patır vd 2009; Eroğlu 2011; Kırıcı vd 2013b). Bu çalışmalar kısaca şunlardır; yaş-boy ilişkisi, yaş-ağırlık ilişkisi, boy-ağırlık ilişkisi, eşeyssel olgunluk ve üreme zamanı, taksonomik özellikleri, et verimi ve organları arasındaki ilişki, besin analizleri, yaş tayinleri, mide muhteviyatı ve ağır metal analizleri şeklindedir (Celayir 2007).

Literatürde, *C. trutta* ve *C. c. umbla* ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, enzim saflaştırmasıyla ilgili tek çalışma Kırıcı vd (2012) yaptıkları çalışma olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada Kırıcı vd. 2012 yılında *C. c. umbla* solungaç dokusundan karbonik anhidraz (CA) enzimini saflaştırmışlar ve bazı metallerin ( $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$ ) bu enzim üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin enzimi inhibe ettiğini belirlemişlerdir.  $Fe^{+3}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin,  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla 0,136, 0,191, 0,289 ve 0,924 mM olarak;  $Ki$  değerlerini de sırasıyla 0,105, 0,094, 0,158 ve 0,207 mM olarak tespit edilmişlerdir. Bununla beraber,  $Fe^{+3}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  metallerini yarışmalı inhibisyon,  $Ni^{+2}$  metalini ise yarışmasız inhibisyon olarak belirlemişlerdir.

G6PD ve GR enzimlerinin saflaştırılmasında diğer enzim saflaştırma yöntemlerinde olduğu gibi ağırlıklı olarak kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. G6PD ve GR enzimlerinin saflaştırılmasında en çok kullanılan teknik afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi, matrikse kovalent olarak bağlı spesifik bir liganda biyomoleküllerin tersinir olarak tutunması prensibine göre çalışır. Ayrıca saflaştırma için iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri de kullanılmıştır. G6PD ve GR için en çok afinite kromatografisi kullanılmakla beraber, birkaç tekniğin birlikte kullanılmasıyla yapılan saflaştırma çalışmaları da bulunmaktadır. Örneğin; bir alg türü olan *Spirulina maxima*'dan amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz üzerinde iyon değişim

kromatografisi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B üzerinde afinite kromatografisi uygulanmış ve 1300 kat saflaştırma yapılmıştır (Mannervik *et al.* 1976; Altun 2010).

Pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici enzimi olan G6PD enzimi 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde keşfedilmiş olup, bu enzime o zamanlarda “Zwischenferment” adı verilmiştir (Warburg and Christian 1931). Enzim saf olarak ilk kez 1936 yılında Brewers mayasından Noltmann, Gubler ve Kuby tarafından kristal yapıda elde edilmiş (Noltmann *et al.* 1961; Yue *et al.* 1969), daha sonra diğer memeli eritrositlerinde keşfedilmiştir (Hauschild *et al.* 2003).

1966 yılında G6PD enzimi, Yoshida tarafından insan eritrositlerinden homojen halde ve en yüksek saflık derecesine sahip olarak (258.000 kat) saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 750 U/mg protein olarak bulunmuştur. Yoshida'ya göre G6PD enzimi en aktif durumda hegzamer yapıya sahiptir (Yoshida 1966). Daha sonraki yıllarda, çeşitli mikroorganizma, bitki ve hayvanlardan bu enzimin izolasyonu ve kinetik parametreleri üzerine çalışmalar yapılmış, enzime ait moleküler, katalitik ve düzenleyici özelliklerine ait bilgiler elde edilmiştir.

G6PD enzimi, Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde keşfedildiği 1931 yılından günümüze kadar çeşitli canlı dokularından saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Bu enzimin saflaştırıldığı bazı canlılar:

G6PD enziminin saflaştırıldığı insan dokuları; eritrositler (Yoshida 1966; Çiftçi *et al.* 2000; Büyükokuroğlu ve Süleyman 2001; Özmen *et al.* 2005), trombositler, beyin, böbrek ve karaciğerden (Cho and Joshi 1990) ve plasentadan (Kahler and Kirkman 1983; Aksoy 1992) saflaştırılmış ve bu dokularda bulunan enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enziminin saflaştırıldığı hayvan dokuları: koyun eritrositleri ve göz lensinden (Beydemir 2002), sığır eritrositlerinden, adrenal korteksinden, lensinden (Yoshida 1970; Ulusu *et al.* 1999), tavşan beyin korteksinden, ince bağırsağından, eritrositleri ve

retikülositlerinden (Oertel and Benes 1972; Reilly and Allred 1995), tavşan karaciğer mikrozomundan ve kemik iliğinden (Chilla *et al.* 1973), laktasyondaki sıçan meme bezlerinden (Criss and McKerns 1968), domuz beyni, ince bağırsağı ve karaciğerinden (Cho and Joshi 1990; Velasco *et al.* 1994; Tappia *et al.* 1998), tavuk karaciğerinden (Erat 2005), fare böbrek ve karaciğerinden (Corpas 1995), köpek karaciğerinden (Ninfali *et al.* 2001), sıçan karaciğeri ve beyninden (Jeffery *et al.* 1989; Capellaci *et al.* 2001), kaz eritrositlerinden (Beydemir *et al.* 2003), farklı metodlarla saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enziminin saflaştırıldığı bitkiler: bezelye yapraklarından (Fickenser and Schiebe 1986), maydanoz yapraklarından (Coban *et al.* 2002), ıspanaktan (Schnarrenberger *et al.* 1973; Lenzian 1980), mısır yapraklarından (Valenti 1984), soya fasulyesi yapraklarından (Robinson 2000), tütün yapraklarından (Knight 2001), arpa yapraklarından (Semenihina 2001), patatesten (Wendt *et al.* 2000), buğday germinden (Mirfakhrai and Auleb 1989), arpa ve arpa köklerinden (Esposito *et al.* 2003; Esposito *et al.* 2005), soya fasulyesi yumrularından (Hutchings *et al.* 2005), fındık (*Corylus avellana* L.) kotiledonlarından (Gossling and Ross 1979), şeftaliden (Wei-Fu *et al.* 2007) farklı metodlarla saflaştırılarak çeşitli kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enziminin saflaştırıldığı mikroorganizmalar: *Aspergillus aculeatus*'tan (Ibraheem *et al.* 2005), *Trypanoma brucei*'den (Heise and Opperdoes 1999), *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans*'tan (Wennekes *et al.* 1993), *Acetobacter hansenii*'den (*Acetobacter xylinum*) (Levy and Cook 1991), *Pseudomonas multivorans*'tan (Wyk and Lessie 1974), *Pseudomonasaeruginosa*'dan (Lessie and Neidhart 1967), *Escherichia coli*'den (Bowman *et al.* 1967; Sanwal 1970), *Drosophila melanogaster*'den (Ganguly *et al.* 1985), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'tan (Shan and Andrews 1994), çeşitli metodlarla saflaştırılmıştır.

G6PD enzimi birçok balık dokusundan da saflaştırılmış olup çeşitli kinetik özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmalar; Çiltaş *et al.* (2003) yaptıkları çalışmada 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodunu kullanarak gökkuşağı alabalığı

eritrositinden G6PD enzimini saflaştırmışlar ve *in vitro* ve *in vivo* olarak Kloramin-T ve  $\text{CuSO}_4$ 'ün alabalık eritrositindeki G6PD enzimi üzerine etkilerine bakmışlardır. Çalışma da enzim, %70,38 verimle 1,319 kat saflaştırılmıştır. Bununla beraber spesifik aktivite 14,51 EU/mg protein olarak bulunmuştur. *In vitro* olarak yapılan çalışmada Kloramin-T ve  $\text{CuSO}_4$  enzimi inhibe ederken, *in vivo* çalışmada,  $\text{CuSO}_4$  enzimi inhibe etmiş, kloramin-T enzimi ise inhibe etmemiştir.

Çiltaş *et al.* (2004) yaptıkları başka bir çalışmada gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimi saflaştırarak, hipotermia, tranquil ve MS 222 maddelerinin G6PD enzimi üzerine *in vivo* etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hipotermia, tranquil ve MS-222 maddeleri G6PD enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Erdoğan *et al.* (2004) 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodunu kullanılarak gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimini saflaştırmıştır. Yaptıkları çalışmada gökkuşığı alabalığı eritrositinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine *in vitro* olarak bazı antibiyotiklerin (thiamphenicol, amikacin, gentamicin ve netilmicin) etkisini incelemişlerdir. *In vitro* olarak uygulanan tüm antibiyotikler enzimi inhibe etmiştir.

Erdoğan *et al.* (2005) benzer metodla gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimini %60 verimlilikle, 1600 kat olarak saflaştırmış ve spesifik aktivite 16,7 EU/mg protein olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonucunda, amonyak ve ürenin *in vivo* ve *in vitro* olarak G6PD enzime etkisi incelenmiştir. Hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışma sonucunda amonyak ve ürenin enzimi inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Beydemir *et al.* (2005) yaptıkları çalışmada gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimi saflaştırılmış ve *in vivo* ve *in vitro* olarak melatoninin enzim üzerine etkisini incelemişlerdir. *In vitro* çalışmada melatoninin 0,22 mM konsantrasyonuna kadar enzim aktivitesinin yükseldiği, 0,22 mM' dan yüksek konsantrasyonlarda ise inhibisyonun arttığı görülmüştür. *In vivo* çalışmada ise, başlangıçta enzim aktivitesi  $8,33 \pm 1,13$  EU/g olarak belirlenmiştir. 10 mg/kg melatoninin injeksiyonundan 3 saat sonra enzimin inhibe olduğunu belirlemişlerdir.

Bir diğerk araştırmada Şentürk *et al.* (2009) *in vivo* ve *in vitro* olarak bazı pestisitlerin (deltamethrin, cypermethrin ve propoxur) gökkuşağı alabalığının eritrositinde G6PD enzimine etkisini incelemişlerdir. *In vitro* alışmada saflaştırma, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Enzim %63 verimlilikle, 1691 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 16,235 EU/mg protein olarak tespit edilmiştir. Cypermethrin ve propoxur, *in vitro* alışmada enzimi inhibe etmiştir. Fakat deltamethrin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak enzimi inhibe etmiştir.

am (2011), ıpara (*Sparus aurata*) balığı karaciğer ve solungaç dokularından G6PD enzimini saflaştırmıştır. Saflaştırmayı, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirmiştir. ıpara karaciğer ve solungaç dokuları için tüm saflaştırma işlemleri boyunca %verim ve saflaştırma kat sayıları sırasıyla %54,6, %52,2,1864,3 ve 283,0 olarak tespit etmiştir. Enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapmış ve tek bant elde etmiştir. Ayrıca bu çalışmada; ıpara karaciğer G6PD enzimi üzerinde Ag<sup>+</sup> ve Ni<sup>+2</sup> metallerin inhibisyon etkisi gösterdiği, Co<sup>+2</sup>, Al<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metallerinin ise ıpara karaciğer G6PD enzimi aktive ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte solungaç G6PD enzimi zerine Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği Fe<sup>+3</sup> metalinin ise enzimi aktive ettiği belirlenmiştir.

omaklı *et al.* (2013), gökkuşağı alabalığı karaciğerinden G6PD enzimini %77 verimlilikle, 1444 kat saflaştırmışlardır. Çalışmada saflaştırma işlemi 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodu ile yapılmıştır. Enzimin optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık ve optimum iyonik şiddeti belirlenmiştir. Ayrıca alışmada, Ag<sup>+</sup>, Tl<sup>+</sup>, Co<sup>+2</sup> ve As<sup>+5</sup> metal iyonlarının enzime *in vitro* olarak etkisine bakılmıştır. Çalışma sonucunda, Ag<sup>+</sup>, Co<sup>+2</sup> ve As<sup>+5</sup> metal iyonlarının IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, 0,0044, 0,084 ve 4,058 mM olarak belirlenirken, K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 0,0052± 0,00042, 0,087± 0,0157 ve 4,833± 1,753 mM olarak tespit edilmiştir.

Hu *et al.* (2013), Ot Sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) hepatopankreasından G6PD enzimini 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografisi metodlarını kullanarak saflaştırmıştır. Enzim, %19,5 verimlilikle, 1,066 kat olarak saflaştırılmış ve spesifik aktivite 18 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada bazı metallerin enzim üzerine IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleride incelenmiştir. Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Cd<sup>+2</sup> metallerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,42, 0,54, 0,94, 1,20 ve 4,17 mM olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber çalışmada Zn<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Cd<sup>+2</sup> metallerinin K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 0,52, 1,12, 0,26 ve 4,8 mM olarak belirlenmiştir.

GR enzimi ile ilgili çalışmalar 1935 yılında Meldrum ve Tarr tarafından kanda GSSG' nin indirgenmesinin ve NADPH' nin bu sistemde kofaktör olduğunun deneysel olarak saptanması ile başlamıştır (Meldrum and Tarr 1935). GR enzimi ilk defa 1951'de tanımlanmıştır. GR ilk olarak 1955 yılında Asnis tarafından *Escherichia coli*' den saflaştırılmıştır (Asnis 1955).

GR enzimi ilk olarak saflaştırıldığı 1955 yılından günümüze kadar pek çok mikroorganizma, bitki ve hayvan dokusundan saflaştırılmış, yapısal ve karakterizasyon özellikleri belirlenmiştir. İnsan eritrositlerden (Worthington and Rosemeyer 1976; Erat 2004; Erat and Çiftçi 2006; Şentürk *et al.* 2008; Akkemik *et al.* 2011), dana karaciğerinden (Carlberg and Mannervik 1981), buzağı karaciğerinden (Le Trang *et al.* 1983), sığır böbrek korteksinden (Ereser 2010), sığır eritrositinden (Erat *et al.* 2003), sığır karaciğerinden (Ulus and Tandoğan 2007), hindi karaciğerinden (Taşer and Çiftçi 2012), koyun beyninden (Açan and Tezcan 1989), domuz eritrositlerinden (Boggaram *et al.* 1979), sıçan böbreğinden (Can 2010), sıçan karaciğerinden (Carlberg and Mannervik 1975; Adem and Çiftçi 2012), tavuk karaciğerinden (Erat *et al.* 2005), birçok mikroorganizmadan (Asnis 1955; Serrano and Rivas 1984; Jiang *et al.* 1995; Arias *et al.* 2010; Yadav *et al.* 2013), çok sayıda bitkiden (Bielawski and Joy 1986; Halliwell and Gutteridge 1986; Mahan and Burke 1987; Lamotte *et al.* 2000; Jen Chen *et al.* 2009) saflaştırılarak özellikleri incelenmiştir.



Tekman (2007), gökkuşığı alabalık karaciğerinden GR enzimini saflaştırmıştır. 13,957 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan GR enzimi %47,28 verimle elde etmiştir. Ayrıca saflaştırılan enzimin karakterizasyonunu belirlemiş ve karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiş ve  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla; 0,509 mM, 0,082 mM, 0,797 mM, 0,804 mM, 0,122 mM, 0,0655 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  nin enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir.

Altun (2010), İnci Kefalinin (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) karaciğer ve eritrositlerinden GR enzimini, 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodunu kullanarak saflaştırmış ve enzimin karakterizasyonunu belirlemiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimlerinin saflaştırılması sırasıyla 4552 ve 7619 kat olarak gerçekleştirmiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimleri için optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkisini tespit etmiştir. SDS-PAGE ile enzimlerin alt birimlerinin molekül ağırlıklarını 55 kDa olarak hesaplamıştır. Ayrıca İnci Kefalinin, karaciğer ve eritrosit GR enzim aktiviteleri için amikasin, sefazolin, ivermektin ve kanamisin ilaçlarının etkilerini incelemiştir. Yarışmasız inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için  $K_i$  sabitleri ve  $I_{50}$  değerlerini hesaplamıştır.

Ekinci and Şentürk (2013) yaptıkları çalışmada gökkuşığı alabalığı karaciğerinden GR enzimini saflaştırarak,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Sn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  metal iyonlarının enzim üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada GR enzimi gökkuşığı alabalığı karaciğerinden %38,41 verimlilikle 1419 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 22.846 U/mg protein olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$  ve  $Sn^{+2}$  metal iyonlarının enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir.  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cr^{+3}$  metal iyonlarının inhibisyon türü yarışmalı iken  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Sn^{+2}$  iyonlarının inhibisyon türünü yarışmasız olarak belirlemişlerdir.

Alak vd (2013), bir fungusit olan karboksinin gökkuşığı alabalığı karaciğerinde GR enzimine yaptığı etkiyi inceledikleri çalışmalarında balıkların 7 gün boyunca bu toksik bileşiğin 3,85 ppm'lik dozuna maruz bırakmışlar ve karaciğerlerden alınan örneklerde

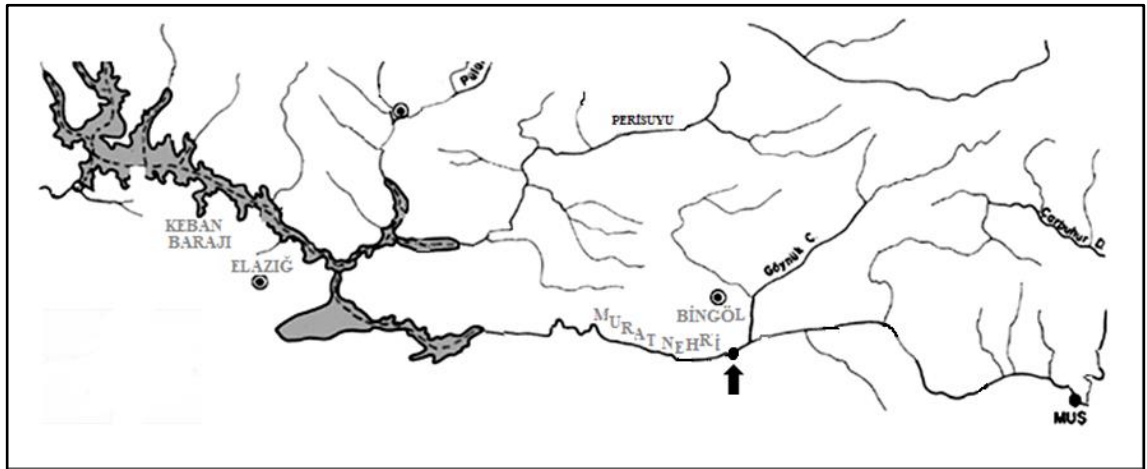
GR enzimi ölçümü yapılmıştır. Çalışma sonucunda, karboksine maruz bırakılan gökkuşuğu alabalıklarının karaciğerlerinde GR aktivitesinin önemli oranda ( $p<0,01$ ) arttığı ve bu türde oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Balık materyalinin temin edildiği yer

Balık materyali örnekleri, Bingöl İli Genç İlçesinden geçen Murat nehrinde tek istasyondan alındı (Şekil 3.1). Murat nehri, Doğu Anadolu'da, Van Gölü'nün kuzeyinde Aladağ'dan ve Muratbaşı Dağı'ndan çıkan kolların birleşmesiyle oluşan ve Batıya doğru hareketle Bingöl İli Genç İlçesinin kuzeyinden geçerek Keban Barajı'na akan 722 km uzunluğunda bir nehirdir. Bingöl İli içindeki toplam uzunluğu 96 km olup Bingöl İlinin en önemli su kaynağından biridir.



Şekil 3.1. Balık materyalinin temin edildiği istasyon

##### 3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer

Murat Nehri'nde yakalanan balıklar Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Laboratuvarına getirilerek böbrek, karaciğer ve solungaç dokuları çıkarıldı. Çıkarılan dokular  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Soğuk zincir kuralına göre çalışmanın yapılacağı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Laboratuvarına götürüldü ve

kullanılana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Deneysel çalışmalar, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı ve Su Ürünleri Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

### 3.1.3. Balık materyali

İç sularımızda bulunan ve kaliteli gıda kaynağı olarak insanlar tarafından özellikle İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde fazlaca tüketilen *C. c. umbla* (Şekil 3.2) ve *C. trutta* (Şekil 3.3) balıkları çalışmada kullanıldı.

Çalışmada, Cyprinidae familyasına ait olan 46 adet *C. trutta* ve 50 adet *C. c. umbla* kullanıldı. Balıklar, 5 kg ağırlığında, 600 gözlü, göz açıklığı 15 mm olan el örgüsü serpme ağ ile avlandı.



Şekil 3.2. *Capoeta capoeta umbla* (Orjinal)



Şekil 3.3. *Capoeta trutta* (Orjinal)

### 3.1.4. Su materyali

Balık materyallerinin temin edildiği istasyondan 2013 yılında her ay düzenli olarak su örnekleri alınarak su analizi yapıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Murat Nehri'nin bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

Aylar	Sıcaklık (°C)	pH	Oksijen (mg/L)	İletkenlik (ppm)	Nitrit (mg/L)	Nitrat (mg/L)	Klorür (mg/L)	Amonyum (mg/L)	Magnezyum (mg/L)	Potasyum (mg/L)	Sodyum (mg/L)	Sülfat (mg/L)	Fosfat (mg/L)	Kalsiyum (mg/L)
Ocak	0,0	8,04	11,20	393	0,09	2,56	38,71	0,125	8,28	4,09	23,13	17,31	0,010	26,74
Şubat	1,5	8,48	11,56	475	0	1,96	50,48	0,016	3,64	3,73	37,41	18,81	0,004	22,83
Mart	3,0	7,99	12,47	321	0	2,18	42,65	0	2,41	3,95	32,21	19,74	0,001	21,85
Nisan	5,0	8,25	10,13	225	0,04	3,13	23,38	0,075	12,68	3,64	22,66	17,39	0,003	35,63
Mayıs	12,0	8,25	9,24	178	0,03	3,18	27,56	0,016	10,49	2,53	20,58	18,08	0,009	34,18
Haziran	18,0	7,98	6,32	285	0	2,76	36,51	0,010	10,47	2,97	19,59	21,68	0,023	30,16
Temmuz	21,0	7,93	5,92	421	0,005	1,56	32,60	0,330	6,36	3,51	21,27	20,11	0	27,84
Ağustos	25,0	7,98	7,24	563	0,003	1,98	40,27	0,085	11,75	3,07	28,76	19,92	0,004	32,69
Eylül	19,0	8,02	6,55	601	0,007	2,02	37,12	0,120	11,24	4,29	29,97	17,42	0,011	33,01
Ekim	10,0	8,13	7,60	597	0,009	1,64	39,67	0,093	10,58	5,23	36,39	19,27	0,010	29,77
Kasım	7,0	8,27	10,54	629	0,06	2,24	28,59	0,210	11,23	4,29	30,16	21,56	0,020	32,48
Aralık	2,0	8,18	12,01	427	0,12	2,45	19,92	0,036	13,06	4,05	24,11	18,32	0,016	31,33

### 3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları,  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form) (NADPH),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form) (NADP<sup>+</sup>), okside glutasyon (GSSG), indirgenmiş glutasyon (GSH) ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; 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.Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-200, agar, amonyum persülfat,  $\beta$ -merkaptto etanol ve 2',5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edildi.

### 3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur. Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

#### 3.1.6.a. G6PD enzimi çalışmalarında kullanılan çözeltiler

1. 1M Tris-HCl+5 mM EDTA (pH=7,5) (Enzim aktivitesinde kullanılan tampon): 6,057 g (0,05 mol) Tris ve 0,0605 g (0,00025 mol) EDTA alınarak 40 ml destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 7,5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 0,2 M MgCl<sub>2</sub> (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan aktivatör çözeltisi): 0,475 g MgCl<sub>2</sub> (0,005 mol) alınıp hacmi destile suyla 50 ml ye tamamlandı.
3. 2 mM NADP<sup>+</sup> (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti): 0,0765 g NADP<sup>+</sup> (0,0001 mol) alınıp hacmi destile su ile 50 ml ye tamamlandı.

4. 6 mM G-6P (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,091 g G-6P (0,0003 mol) alınıp hacmi destile su ile 50 ml' ye tamamlandı.
5. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7,4) (Homojenat tamponu): 1,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  alınarak pH=7,4'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
6. 50 mM K-asetat+50 mM K-fosfat (pH=7,5) (Çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon):2,45 g K-asetat (0,05 mol), 4,35 g K-fosfat (0,05 mol) alınarak 300 ml suda çözüldü, pH=7,5 ye ayarlandı ve toplam hacim 0,5 L'ye tamamlandı.
7. 0,1 M K-asetat+0,1 M K-fosfat (pH=6,0) (Afinite kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan 1.tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 6.0'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.
8. 0,1 MK-fosfat+0,1 M KCl (pH=7,85) (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 2.tampon): 13,6 K-fosfat (0,1 mol) ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.
9. 0,1 M K-asetat+0,1 M K-fosfat (pH=7,85) (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 3.tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.
10. 80 mM K-fosfat+80 mM KCl+0,5 mM  $\text{NADP}^+$ +10 mM EDTA (pH=7,85) (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz 6-fosfat dehidrogenazı elüe etmek için kullanılan tampon): 5,44 g K-fosfat (0,04 mol), 2,98 g KCl (0,04 mol), 0,1913 g  $\text{NADP}^+$  (0,025 mol) ve 1,21g EDTA (0,003 mol) karıştırıldı. pH=7,85 'e ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 500 ml' ye tamamlandı.
11. %0,02'lik  $\text{NaN}_3$  çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg  $\text{NaN}_3$  alınarak hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
12. 0,1 M Tris+0,5 M NaCl (pH=8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 6,05 g Tris (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH=8,5'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 500 ml' ye tamamlandı.
13. 0,1 M Na-asetat+0,5 M NaCl (pH=4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan 2. tampon): 4,1 g Na-asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp

suda çözüldü, pH=4,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 500 ml' ye tamamlandı.

### **3.1.6.b. GR enzimi çalışmalarında kullanılan çözeltiler**

1. 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA (pH=8.0) (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan tampon): 0,61 g (5 mmol) Tris ve 0,029 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 90 ml destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH=8,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 20 mM GSSG (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 61,88 mg okside glutatyon (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü, toplam hacim suyla 5 ml'ye tamamlandı.

3. 2 mM NADPH (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti): 8,3 mg NADPH ( $9,9 \times 10^{-3}$  mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Suyla 5 ml'ye tamamlandı.

4. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7,5) (Homojenat tamponu): 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $5 \times 10^{-3}$  mol) alınıp 80 ml destile suda çözüldü. pH'sı KOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5. 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA (pH=7,5) (Diyaliz tamponu): 1,21 g Tris, 0,292 g EDTA alınarak 975 ml suda çözüldü, pH=7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

6. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ +1 mM EDTA+1 mM DTT (pH=7,3) (Affinite kolonun dengelenmesi ve numune tatbik ettikten sonra yıkanması için kullanılan 1.tampon): 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mmol), 0,292 g EDTA (1 mmol) ve 0,152 g DTT (1 mmol) alınarak 950 ml suda çözüldü. pH=7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

7. 0,1 M K-asetat+0,1 M K-fosfat (pH=6,0) (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 2. tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü.pH'sı 6,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

8. 0,1 M K-fosfat+0,1 M KCl (pH=7,85) (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 3. tampon): 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) ve 7,45 g



(0,1 mol) KCl karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

**9.** 50 mM K-fosfat+1 mM EDTA+1 mM GSH+0,5 mM NADPH (pH=7,3) (Afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon); 0,34 g K-fosfat, 0,0146 g EDTA, 0,0307 g GSH, 0,02075 g NADPH karışımı 45 ml suda çözüldü. pH=7,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

**10.** 0,1 M Tris+0,5 M NaCl (pH=8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 6,05 g Tris (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH=8,5'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

**11.** 0,1 M Na-asetat+0,5 M NaCl (pH=4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan 2. tampon): 4,1 g Na-asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH=4,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 500 ml'ye tamamlandı.

**12.** %0,02'lik  $\text{NaN}_3$  çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg  $\text{NaN}_3$  alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### **3.1.6.c. Elektroforez için kullanılan çözeltiler**

**1.** 1 M Tris-HCl (pH=8,0): 12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

**2.** 1 M Tris-HCl (pH=6,0):12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

**3.** %30 Akrilamid-%0,9 Bisakrilamid çözeltisi: 17 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 ml su karıştırılarak çözüldü.

**4.** %10'luk amonyum persülfat çözeltisi:1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**5.** %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözümlenerek 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=8,0'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8,3)'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 tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.
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 brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.
11. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlandı.
12. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %90'luk etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %90'luk 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.
13. %0,05'lük brom timol mavisini çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 ml 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim suyla 250 ml'ye tamamlandı.
14. *C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularından saflaştırılan G6PD ve GR enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenen ağır metallerin stok çözeltileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** G6PD ve GR enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenen ağır metallerin stok çözeltileri

Madde Adı	Stok Çözelti Konsantrasyonu (mM)	Madde Miktarı (g)	Çözelti Miktarı (ml)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	100	0,249	10
ZnCl <sub>2</sub>	100	0,136	10
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	100	0,237	10
3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	100	0,769	10
AgNO <sub>3</sub>	100	0,169	10
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	100	0,331	10
FeCl <sub>3</sub>	100	0,162	10
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	100	0,291	10

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.1.a. *C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularının temini ve homojenat hazırlanması**

Deneylelerde kullanılan balıklar Bingöl İli Genç İlçesinde geçen Murat nehrinden yakalandı. Balıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuara getirilerek böbrek, karaciğer ve solungaç dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Kullanılacakları süreye kadar -20°C’de muhafaza edildi.

Dokularla çalışılmaya başlandığında doku örnekleri kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9’luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Doku homojenatlarını hazırlamak için, ilk olarak dokular ultraturrax cihazı kullanılarak parçalandı. Böylece dokular oldukça küçük parçalara ayrılmış oldu. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,4) homojenat tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Bu süspansiyon 60 dakika 13000 rpm’de 2 defa santrifüj edildi. Süpernatantlar daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanıldı.

#### **3.2.1.b. G6PD enziminin aktivite ölçümü**

Enzim aktivitesi UV-Vis spektrofotometrede oda sıcaklığında Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metoda göre; nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz tarafından glukoz 6-fosfat varlığında indirgenir. NADPH’in oluşum oranı glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine bağımlı olup 340 nm’deki absorbans artışı ile ölçülebilir.

**Çizelge 3.3.** G6PD enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok aktivite çözeltileri	Kontrol küveti		Numune küveti	
	Hacim(µl)	Konsantrasyon	Hacim(µl)	Konsantrasyon
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA
0,1 M MgCl <sub>2</sub>	100	0,01 mM	100	0,01 mM
2 mM NADP <sup>+</sup>	100	0,2 mM	100	0,2 mM
6 mM G-6P	100	0,6 mM	100	0,6 mM
Su	600	-	570	-
Enzim numunesi	-	-	30	-

Çözeltiler küvete konulduktan sonra kontrole karşı numunenin absorbands artışları 3 dakika süreyle 1 dakikada bir kaydedildi (Beutler 1971).

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

- E $\ddot{U}$ /ml : 1 ml'deki enzim ünitesi  
 $\Delta OD$  : Bir dakikadaki absorbands değişimi  
6,22 : 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbands değeri (ekstinksiyon katsayısı)  
 $V_T$  : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi  
 $V_E$  : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi  
 $S_F$  : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

### 3.2.1.c. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

*C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularından elde edilen G6PD enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. çöktürme işlemleri sırasında 13000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katıldı ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S<sub>1</sub> : l'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> : l'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda *C. trutta* dokularıyla yapılan çalışmalarda; *C. trutta* karaciğer G6PD aktivitesinin tamamının %40-70 aralığında çöktüğü, *C. trutta* solungaç G6PD aktivitesinin tamamının %30-60 aralığında çöktüğü ve *C. trutta* böbrek G6PD aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü belirlendi.

*C. c. umbla* dokularıyla yapılan çalışmalarda; *C. c. umbla* karaciğer G6PD aktivitesinin tamamının %30-80 aralığında çöktüğü, *C. c. umbla* solungaç G6PD aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü ve *C. c. umbla* böbrek G6PD aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü belirlendi.

*C. trutta* karaciğer homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek

çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. trutta* solungaç homojenatına %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %60 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. trutta* böbrek homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* karaciğer homojenatına %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C’de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* solungaç homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C’de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* böbrek homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, 4°C’de gerçekleştirildi.

#### **3.2.1.d. Afinite kolonunun hazırlanması**

10 ml’lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile 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 (0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH=6,0) 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. Dengelemede ve yıkamada akış hızı 50 ml/h absorbanasının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

### **3.2.1.e. Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve G6PD'nin elüsyonu**

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen derişikleştirilmiş numune, 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=6,0) tamponu ile dengelenmiş kolona tatbik edildi. Daha sonra kolon sırasıyla 25 ml 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=6,0), 25 ml 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=7,85) ve 25 ml 0,1 M KCl/0,1 M K-fosfat (pH=7,85) çözeltisiyle yıkandı. Dengeleme ve yıkama hızı 50 ml/h'ya ayarlandı. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutuldu. Böylece enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 80 mM K-fosfat+80 mM KCl+0,5 mM NADP<sup>+</sup>+10 mM EDTA (pH=7,85) çözeltisi kolona uygulanarak enzim elüe edildi. Elüsyonlar 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere alındı ve herbirinde aktivite ayrı ayrı ölçüldü. Bütün bu işlemler esnasında sıcaklık 4°C kontrol altında tutuldu (Morelli *et al.* 1978; Ninfali *et al.* 1990). Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda dondurularak saklandı. Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılarak elektroforez bantları elde edildi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

### **3.2.2. Glutatyon reduktaz enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.2.a. *C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularının temini ve homojenat hazırlanması**

Deneyleerde kullanılan balıklar Bingöl İli Genç İlçesinden geçen Murat nehrinden yakalandı. Balıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuara getirilerek karaciğer ve solungaç dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Kullanılacakları süreye kadar -20°C saklandı.



Dokularla çalışılmaya başlandığında doku örnekleri kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Doku homojenatlarını hazırlamak için, ilk olarak dokular ultraturrax cihazı kullanılarak parçalandı. Böylece dokular oldukça küçük parçalara ayrılmış oldu. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,4) homojenat tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Bu süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Süpernatantlar daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanıldı.

### 3.2.2.b. GR enziminin aktivite ölçümü

GSSG, NAD(P)H ile reaksiyona girerek 340 nm'de maksimum absorbanı vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NAD(P)H'in azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de takip edilmektedir (Carlberg and Mannervik 1985).

Aktivite ölçümü yapılırken hemolizat, amonyum sülfat çökeleği ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen elüsyonlar seyreltilmeden kullanıldı.

**Çizelge 3.4.** GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok aktivite çözeltileri	Kontrol küveti		Numune küveti	
	Hacim(μl)	Konsantrasyon	Hacim(μl)	Konsantrasyon
50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA	100	5 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA	100	5 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA
20 mM GSSG	100	2 mM	100	2 mM
2 mM NADPH	100	0,2 mM	100	0,2 mM
Su	600	-	570	-
Enzim numunesi	-	-	30	-

Aktivite ölçüm küvetleri Çizelge 3.4'de gösterildiği şekilde önce enzim numunesi katılmaksızın pipetlendi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra numune küvete pipetlenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika boyunca absorbanı değerleri kaydedildi (Calberg and Mannervik 1985).

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

E $\ddot{U}$ /ml	: 1 ml'deki enzim ünitesi
$\Delta OD$	: Bir dakikadaki absorbans değişimi
6,22	: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)
$V_T$	: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi
$V_E$	: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi
$S_F$	: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

### 3.2.2.c. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

*C. c. umbla* ve *C. trutta* dokularından elde edilen GR enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. çöktürme işlemleri sırasında 13000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katıldı ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S<sub>1</sub> : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda *C. trutta* dokularıyla yapılan çalışmalarda; *C. trutta* karaciğer GR aktivitesinin tamamının %30-70 aralığında çöktüğü, *C. trutta* solungaç GR aktivitesinin tamamının %20-70 aralığında çöktüğü ve *C. trutta* böbrek GR aktivitesinin tamamının %40-70 aralığında çöktüğü belirlendi.

*C. c. umbla* dokularıyla yapılan çalışmalarda; *C. c. umbla* karaciğer GR aktivitesinin tamamının %30-80 aralığında çöktüğü, *C. c. umbla* solungaç GR aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü ve *C. c. umbla* böbrek GR aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü belirlendi.

*C. trutta* karaciğer homojenatına %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. trutta* solungaç homojenatına %20 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen

numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. trutta* böbrek homojenatına %40 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %70 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* karaciğer homojenatına %30 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* solungaç homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

*C. c. umbla* böbrek homojenatına %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, 4°C'de gerçekleştirildi.

#### **3.2.2.d. Afinite kolonunun hazırlanması**

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile 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 (0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH=6,0) 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. Dengelemede ve yıkamada akış hızı 50 ml/h absorbanasının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

### **3.2.2.e. Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve GR'nin elüsyonu**

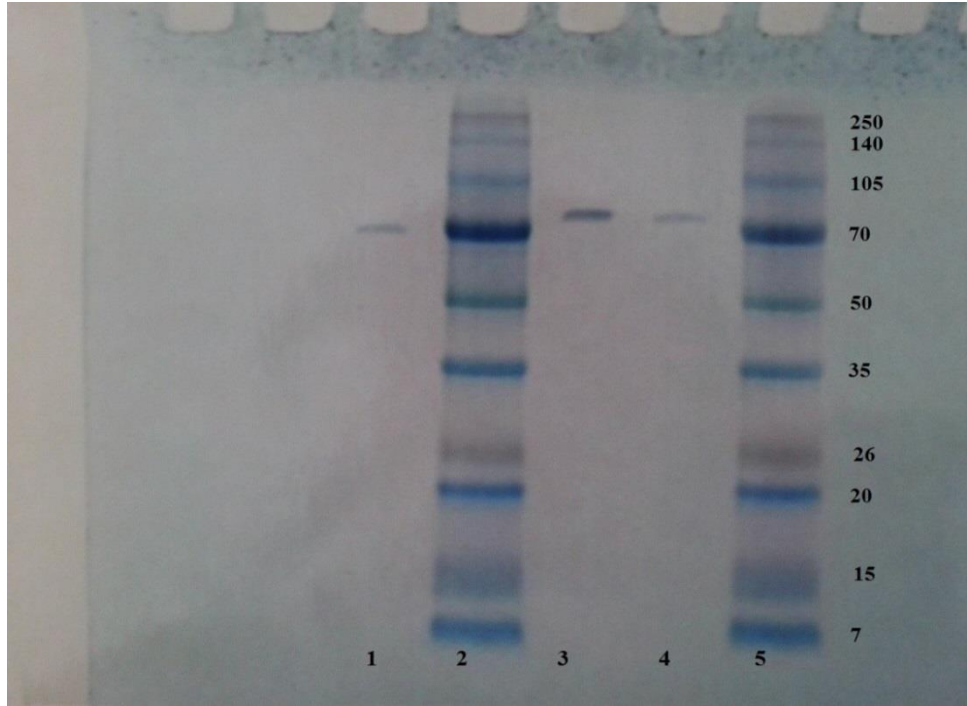
Numune daha önceden dengeleme tamponu (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ +1 mM EDTA+1 mM DTT, pH=7,3) ile dengelenmiş olan kolona yüklendi. Daha sonra kolon sırasıyla 50 ml dengeleme tamponu, 25 ml 0,1 M K-asetat+0,1 M K-fosfat (pH=6,0) ve 25 ml 0,1 M KCl+0,1 M K-fosfat (pH=7,85) çözeltisiyle yıkandı. Dengeleme ve yıkama hızı 50 ml/h'ya ayarlandı. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutuldu. Böylece enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 50 mM K-fosfat+1 mM EDTA+1 mM GSH+0,5 mM NADPH (pH=7,85) çözeltisi kolona uygulanarak enzim elüe edildi. Elüsyonlar 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere alındı ve herbirinde aktivite ayrı ayrı ölçüldü. Bütün bu işlemler esnasında sıcaklık 4°C kontrol altında tutuldu (Danner *et al.* 1977; Boggaram *et al.* 1979; Carlbeg and Mannervik 1981). Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda dondurularak saklandı. Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılarak elektroforez bantları elde edildi (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).

### **3.2.3. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

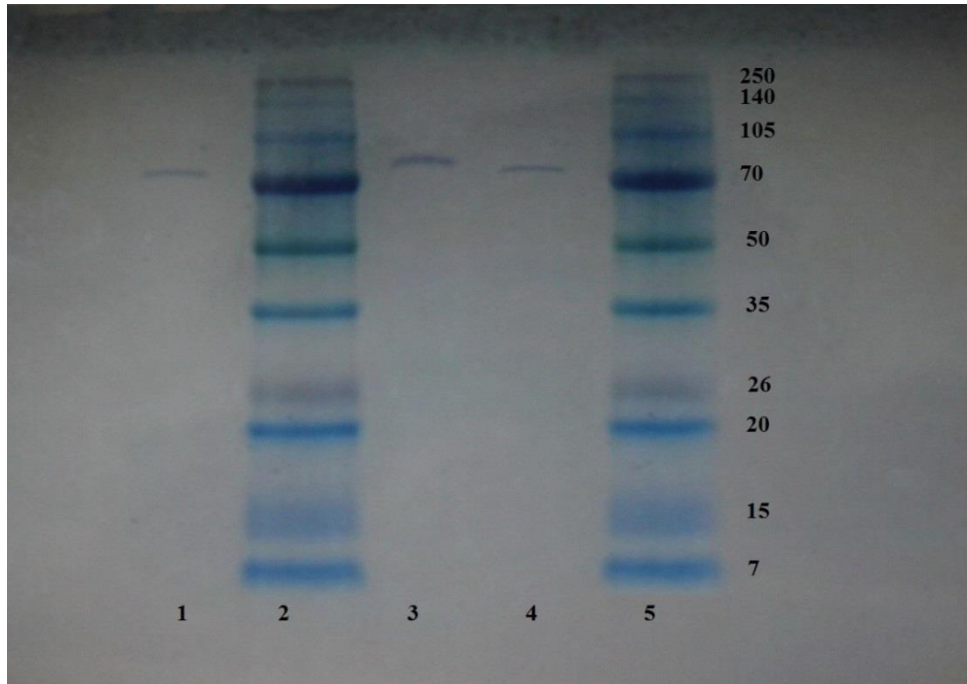
Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli SDS-PAGE Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 2 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma

jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kurumaması önlemleri alındı. Yığıma jeli katıldıktan 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 akım 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 2.1-2.4). Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 ml 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 3,3 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,15 ml %10'luk SDS, 0,1 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %1,5'lik PER ve 2,35 ml saf su karıştırıldı. Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,3325 ml %30 Akrilamid %0,8 bisakrilamid, 0,025 ml %10'luk SDS, 0,025 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %1,5'lik PER ve 1,84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen döküldü.

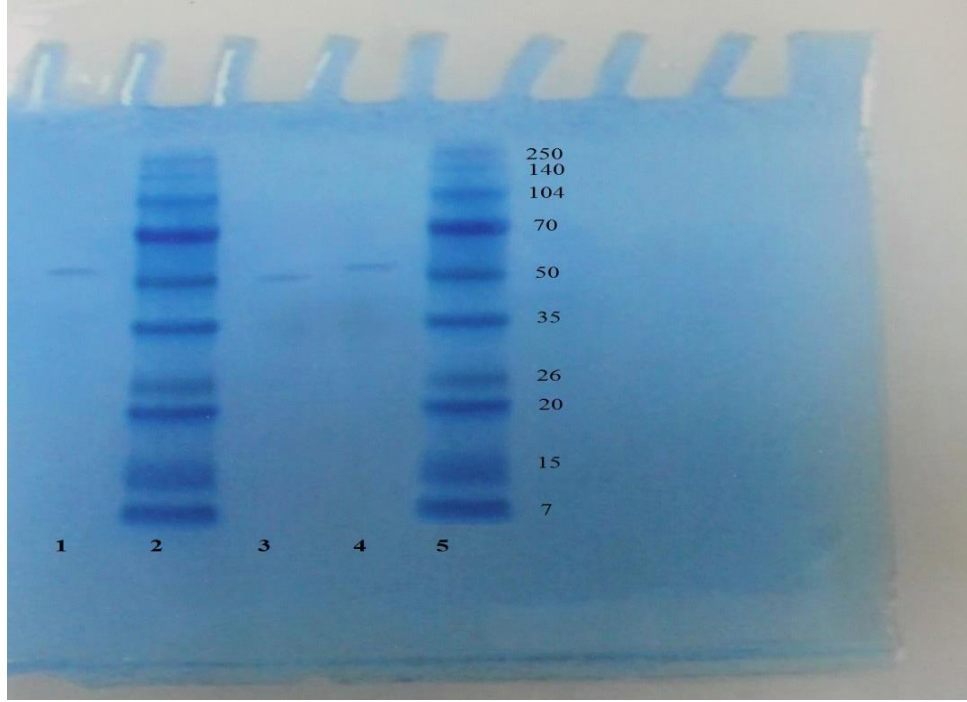


**Şekil 3.4.** *C. trutta* böbrek, karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE bandları  
\*1: Böbrek; 2, 5: Standart Proteinler; 3:Karaciğer; 4:Solungaç

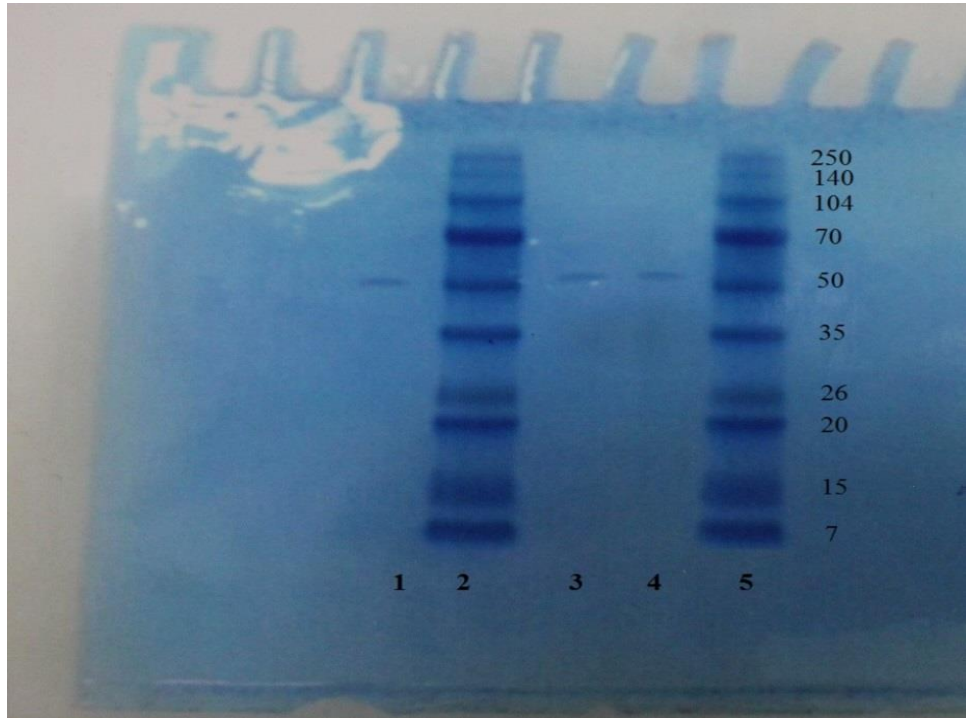


**Şekil 3.5.** *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE bandları  
1: Böbrek; 2, 5: Standart Proteinler; 3:Karaciğer; 4:Solungaç





**Şekil 3.6.** *C. trutta* böbrek, solungaç ve karaciğer dokularından saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE bandları  
\*1: Böbrek; 2, 5: Standart Proteinler; 3: Solungaç; 4: Karaciğer).



**Şekil 3.7.** *C. c. umbla* solungaç, böbrek ve karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE bandları  
\*1: Solungaç; 2, 5: Standart Proteinler; 3: Böbrek; 4: Karaciğer

### 3.2.4. Bradford protein tayini

*C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularının homojenatları, amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu yöntemle 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 hassasiyeti oldukça azdır (1-100  $\mu\text{g}$  arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{l}$  konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4900  $\mu\text{l}$  Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile 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 4900 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil 4.1).

*C. trutta* ve *C. c. umbla* dokularının homojenatlarından ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 ml tüplere konularak üzerine 4900'er ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

### 3.2.5. *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD ve GR enzim aktiviteleri üzerine bazı metallerin etkilerinin belirlenmesi

*C. trutta* ve *C. c. umbla* karaciğer, böbrek ve solungaç G6PD ve GR enzim aktiviteleri üzerine bazı metallerin etkilerinin belirlemek amacıyla kuvvet ortamına değişik konsantrasyonlarda metal ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan metallerin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman kuvete katılan su hacmi azaltılarak metal konsantrasyonu arttırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

### 3.2.6. İnhibitör etkisi gösteren metaller için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

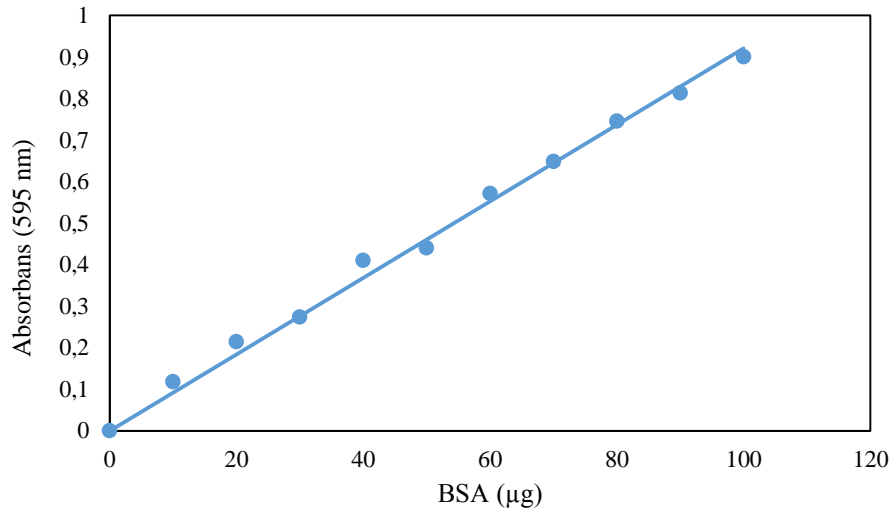
İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren metaller belirlendi. Bu metallerden inhibisyon etkisi yüksek olanların % Aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanan bazı metallerin K<sub>i</sub> değerlerini belirlemek amacıyla *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD ve GR enzim aktivitesini yarıya düşüren metal konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit metal konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan  $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$  ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için  $V_{max}=V_{max}^I(1+[I]/K_i)$  formülünden yararlanılarak K<sub>i</sub> değerleri belirlendi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.4'deki konuda anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

### 4.2. *C. trutta* ve *C. c. umbla* Böbrek, Karaciğer ve Solungaç G6PD Enzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları

#### 4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

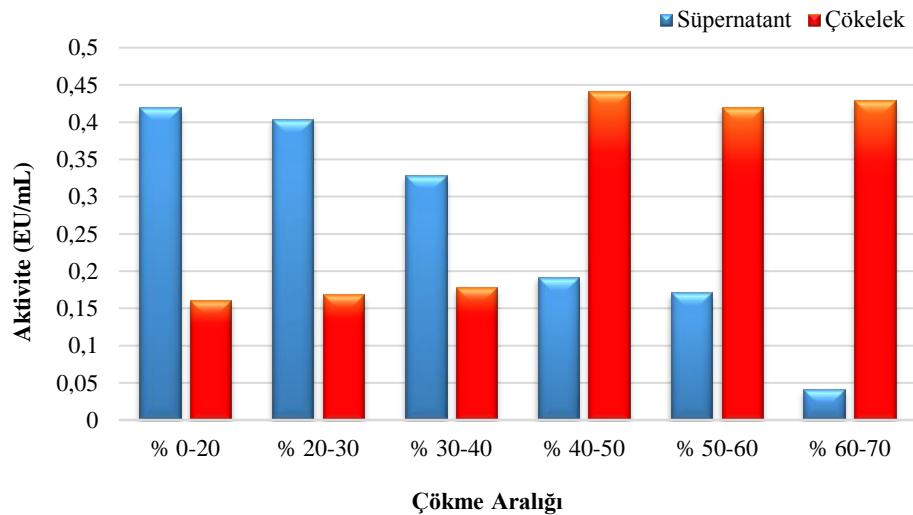
*C. trutta* ve *C. c. umbla* karaciğer, böbrek ve solungaç dokularından elde edilen homojenatlar, ardışık olarak %0 ile %80 arasındaki amonyum sülfat çöktürmesi

işlemine (her seferinde doygunluk %10 artırılarak) tabi tutuldu. G6PD aktivitesi içeren proteinlerin yoğun olarak çökmeye başladığı %aralıklarla aktivitenin tamamına yakının çöktüğü %aralıklar belirlendi. Bundan sonraki saflaştırma çalışmalarında, saflaştırma işleminde ilk basamak olarak belirlenen bu aralıklarda amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Elde edilen çökelekler 13000 rpm de 15 dakika santrifüjlendi ve 1-2 mL'lik homojenat tamponunda çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi. *C. trutta* ve *C. umbla* karaciğer, böbrek ve solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralıkları Çizelge 4.1-4.6 ve Şekil 4.2-4.7'de gösterilmiştir.

*C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-70 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** *C. trutta* karaciğeri G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,420	0,404	0,328	0,192	0,171	0,082
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,160	0,169	0,178	0,441	0,420	0,429

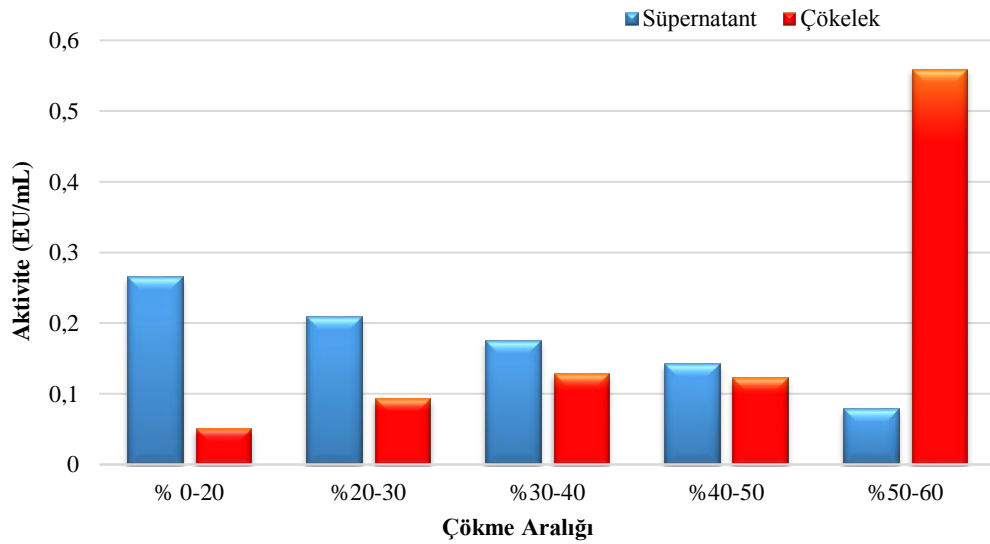


**Şekil 4.2.** *C. trutta* karaciğeri G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. trutta* solungaç G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-60 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,266	0,210	0,176	0,143	0,079
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,051	0,094	0,129	0,123	0,560

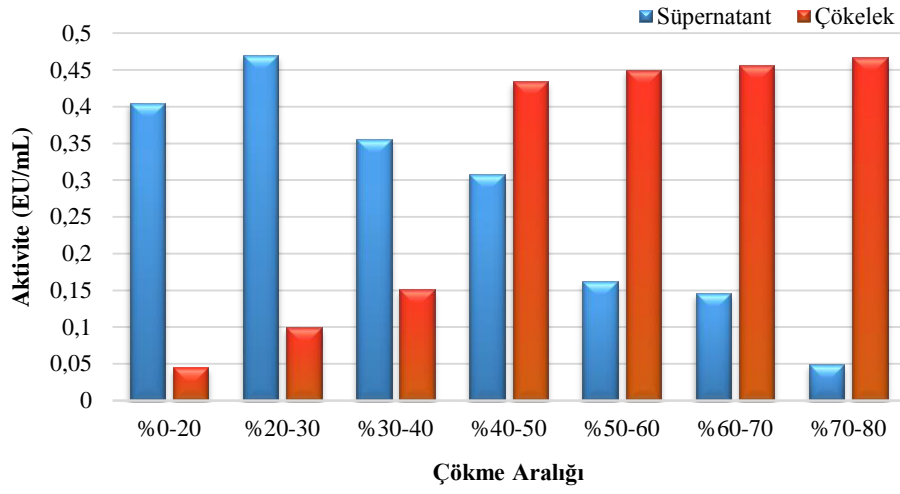


**Şekil 4.3.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. trutta* böbrek G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,405	0,470	0,356	0,308	0,162	0,146	0,049
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,045	0,099	0,151	0,434	0,450	0,456	0,467

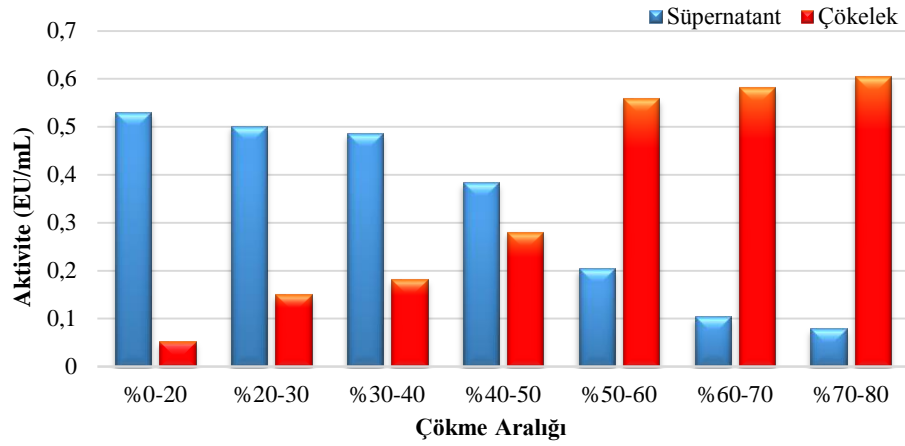


**Şekil 4.4.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,530	0,502	0,486	0,384	0,205	0,104	0,079
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,052	0,151	0,182	0,281	0,559	0,582	0,605



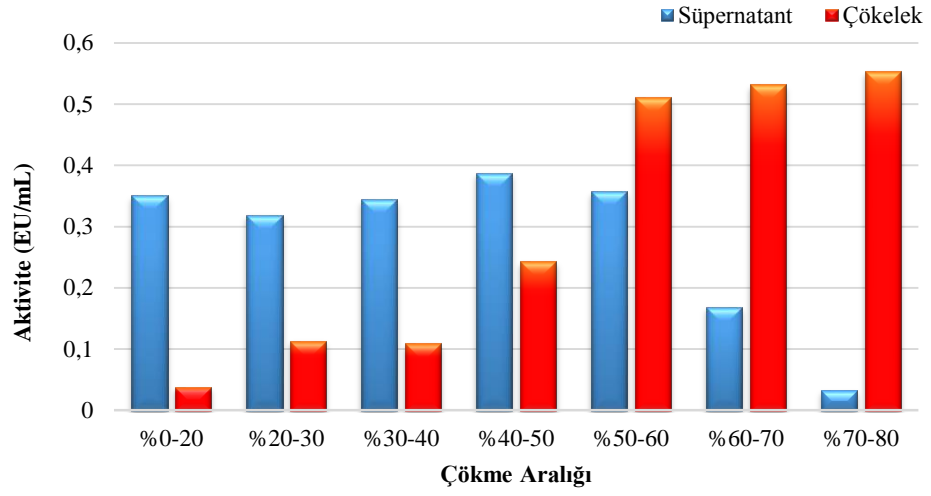
**Şekil 4.5.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,351	0,319	0,344	0,388	0,357	0,169	0,033
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,038	0,113	0,109	0,243	0,511	0,532	0,553



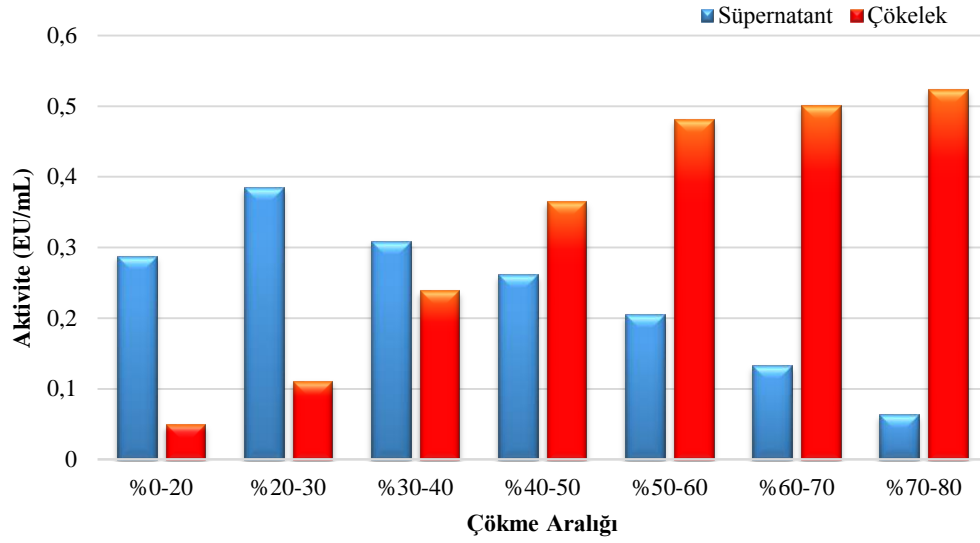


**Şekil 4.6.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,288	0,385	0,309	0,262	0,205	0,133	0,064
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,050	0,111	0,239	0,365	0,481	0,502	0,524



**Şekil 4.7.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

#### 4.2.2. *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD enziminin, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Çalışmada öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak enzimin çökme aralığı belirlenmiş ve bu aralığa göre saflaştırma çalışmasına başlanmıştır. Homojenat hazırlanması, amonyut sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra numune, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolonuna yüklenerek 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzimler Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi ve bu oranlar Çizelge 4.7-4.12'de verildi.

**Çizelge 4.7.** *C. trutta* böbrek G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,473	2,26	33,5	15,85	75,71	0,209	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,605	1,26	8	4,84	10,08	0,48	2,3	30,54
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,807	0,0067	4	3,23	0,0268	120,52	576,65	20,38

**Çizelge 4.8.** *C. trutta* karaciğer G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,197	7,21	32	6,304	230,72	0,027	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,384	12,84	8,5	3,264	109,14	0,03	1,11	51,78
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,491	0,032	4	1,964	0,128	15,344	568,27	31,15

**Çizelge 4.9.** *C. trutta* solungaç G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,397	5,98	33	13,1	194,34	0,066	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,537	2,1	10	5,37	21	0,256	3,88	40,99
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,902	0,017	5	4,51	0,085	53,06	803,9	34,43

**Çizelge 4.10.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,274	9,78	31	8,494	303,18	0,028	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,462	14,2	6	2,772	85,2	0,033	1,18	32,6
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,642	0,057	3	1,926	0,171	11,26	402,14	22,7

**Çizelge 4.11.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

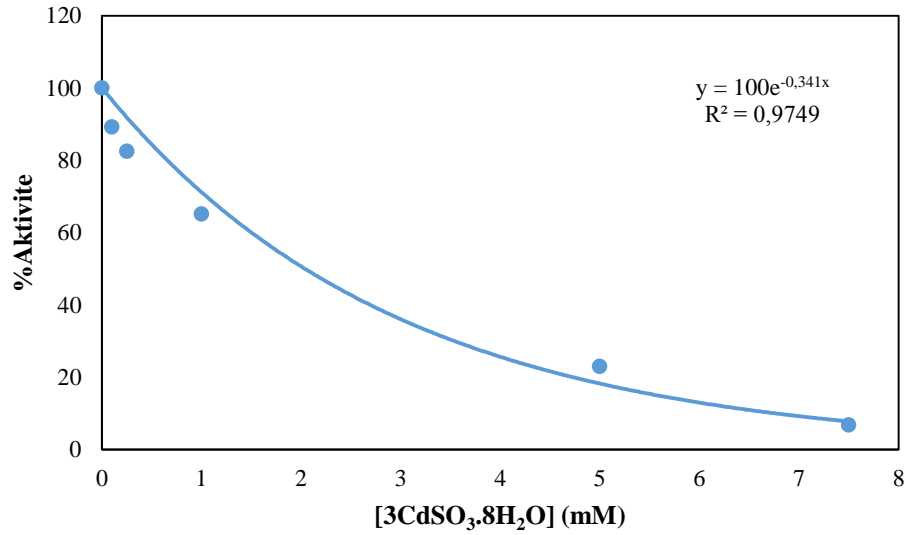
Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,535	57,07	33	17,655	1883,31	0,0094	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,747	55,76	8	5,976	446,08	0,013	1,38	33,85
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,851	0,43	4	3,404	0,108	31,52	3353,19	19,28

**Çizelge 4.12.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

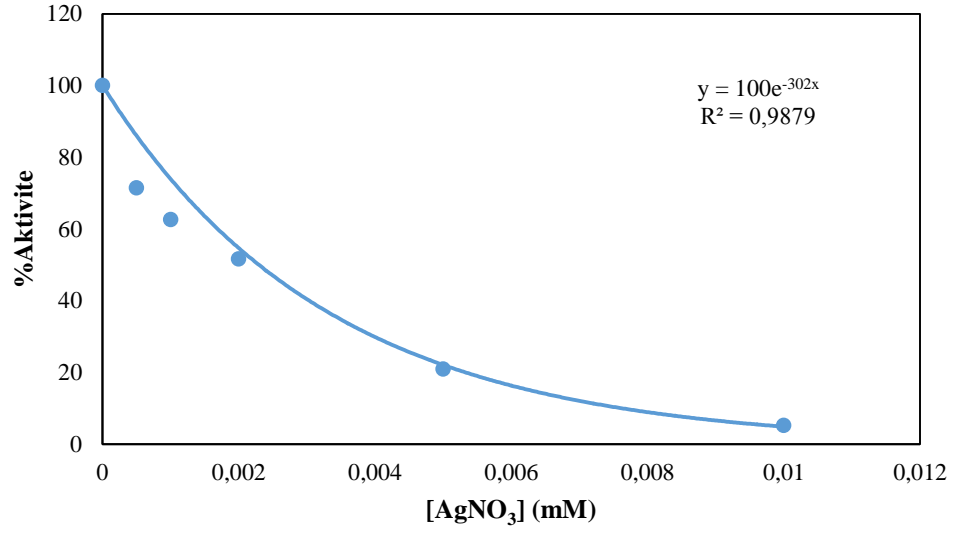
Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,286	9,13	30	8,58	273,9	0,031	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,613	19,56	6	3,678	117,6	0,0313	1,01	42,87
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,662	0,029	3	1,986	0,087	22,83	736,5	23,15

#### 4.2.3. Kinetik çalışmaların sonuçları

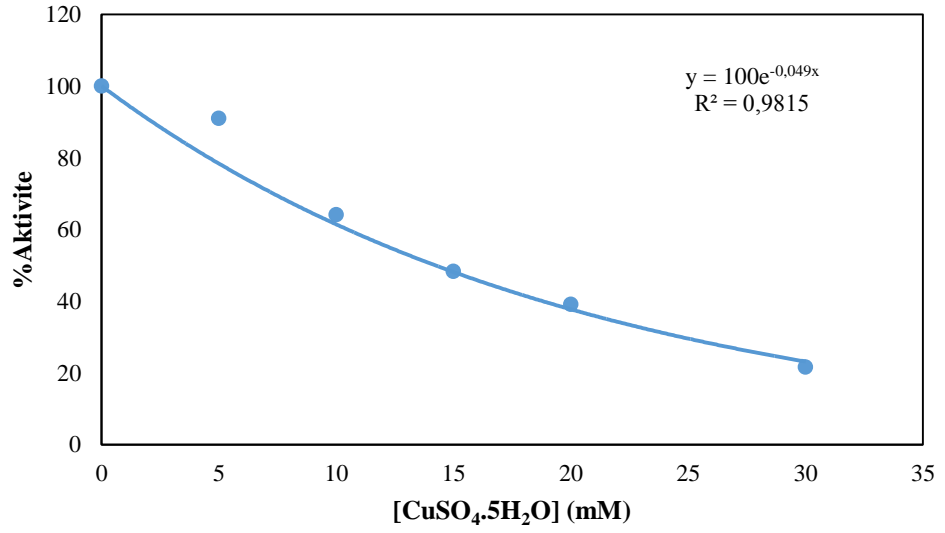
*C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç G6PD enzimi için ayrı ayrı olmak üzere çalışılan metaller için farklı metal konsantrasyonlarında aktiviteler bulunarak % Aktivite-[Metal] grafikleri çizildi (Şekil 4.8-4.37) ve bu grafiklerden  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak Çizelge 4.13-4.18’de verildi. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metaller için 5 sabit substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek (Şekil 4.38-4.67), bu grafiklerden her bir inhibitör için  $K_i$  sabiti bulundu ve Çizelge 4.13-4.18’de verildi.



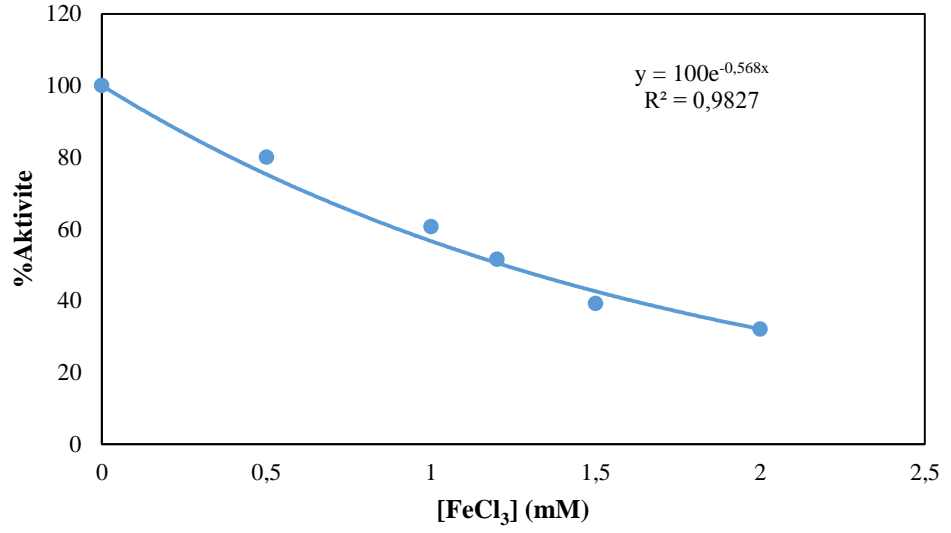
**Şekil 4.8.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı  $3CdSO_3.8H_2O$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



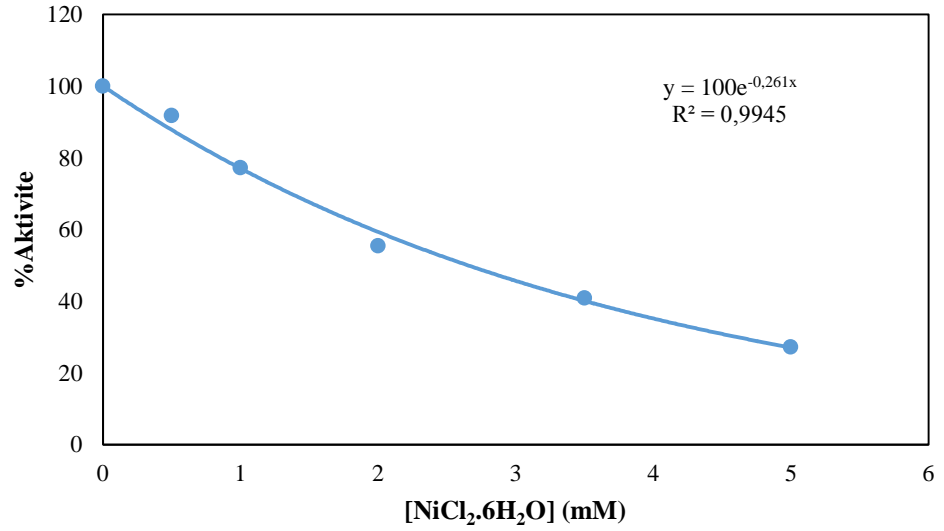
**Şekil 4.9.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



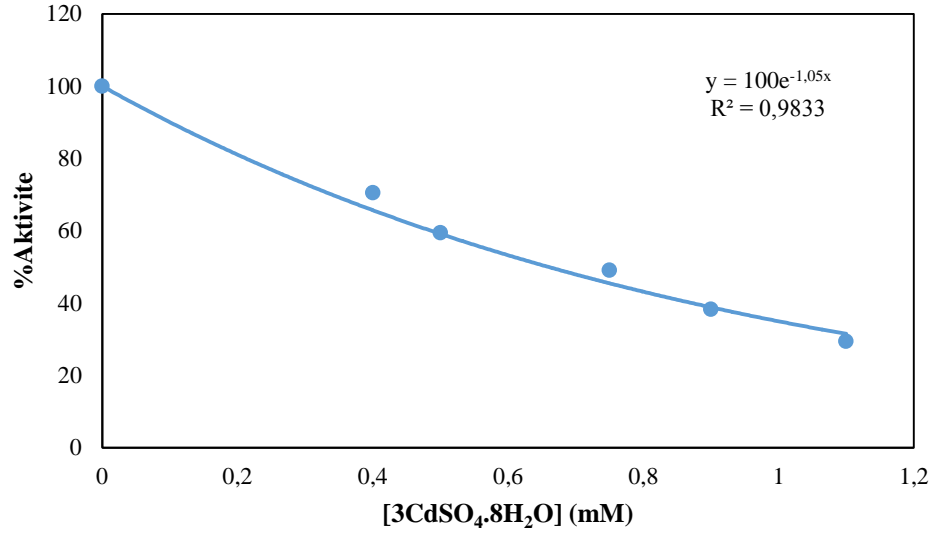
**Şekil 4.10.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



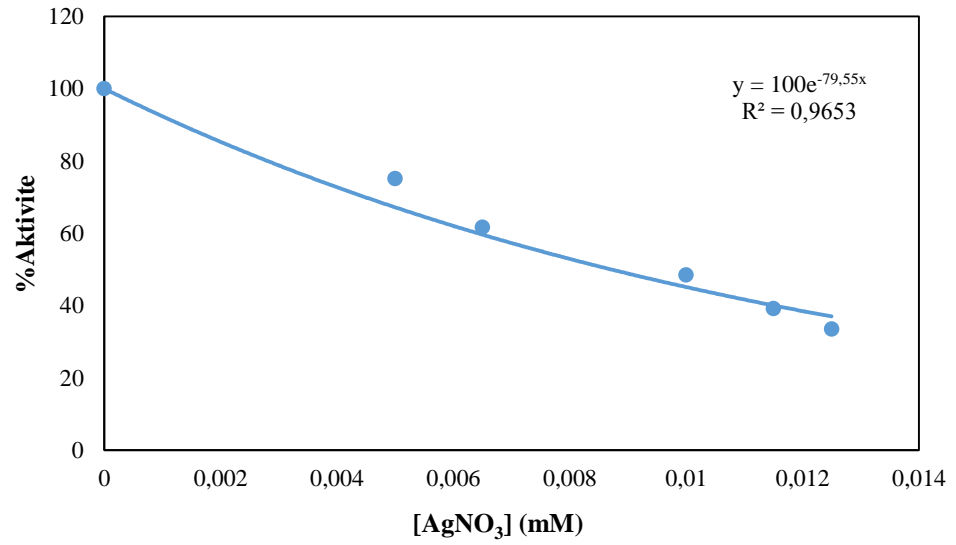
**Şekil 4.11.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı FeCl<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



**Şekil 4.12.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

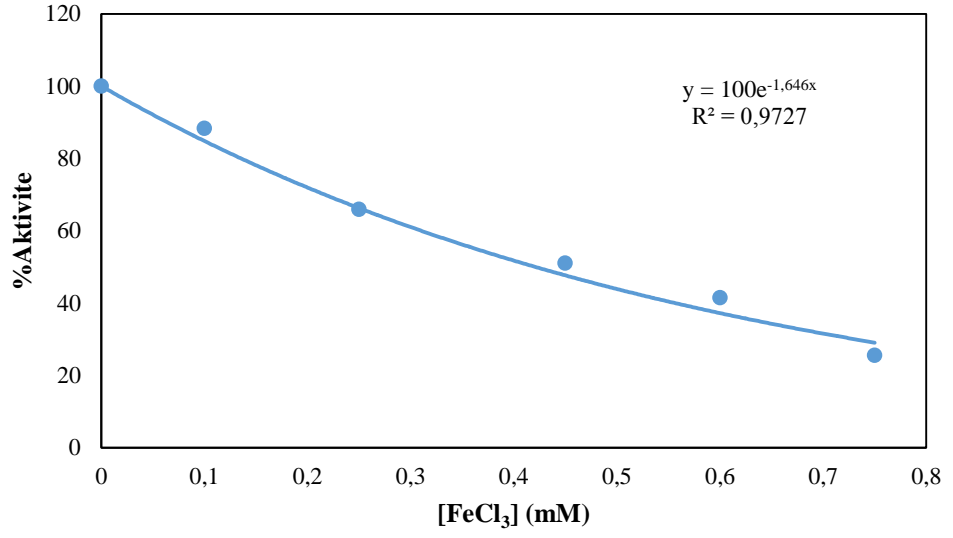


**Şekil 4.13.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

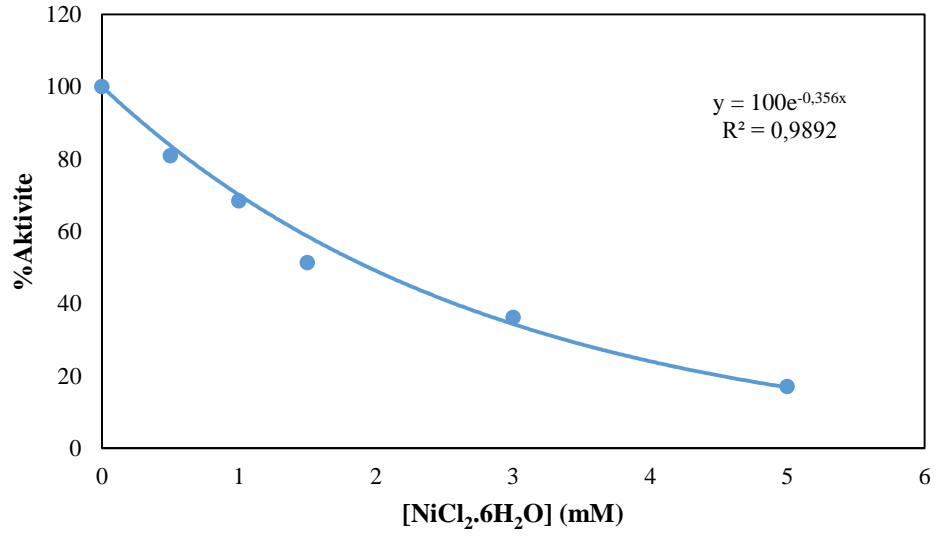


**Şekil 4.14.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

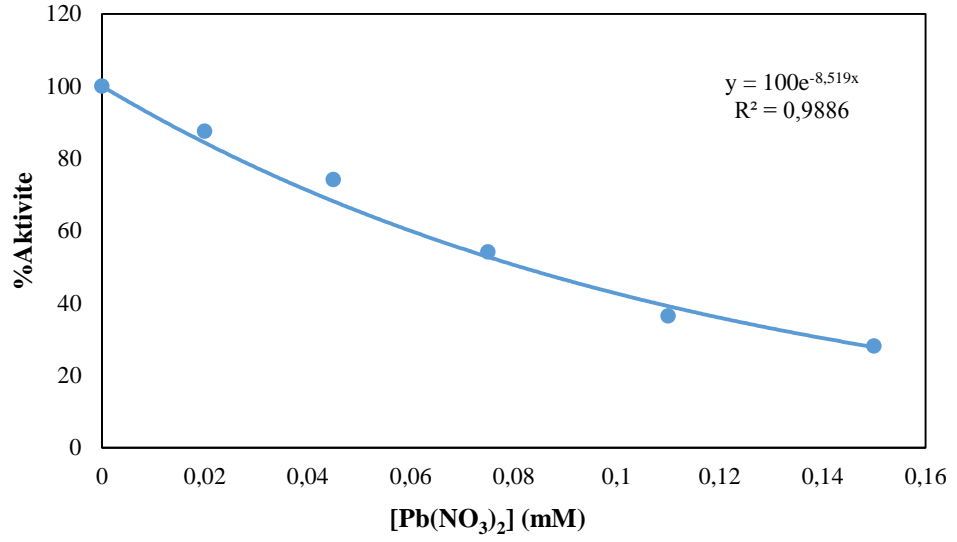




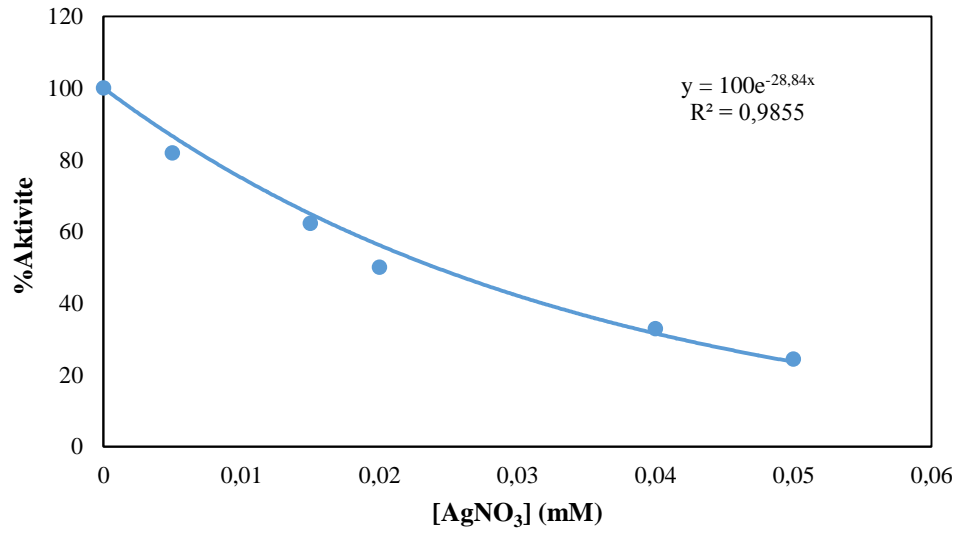
**Şekil 4.15.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı FeCl<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



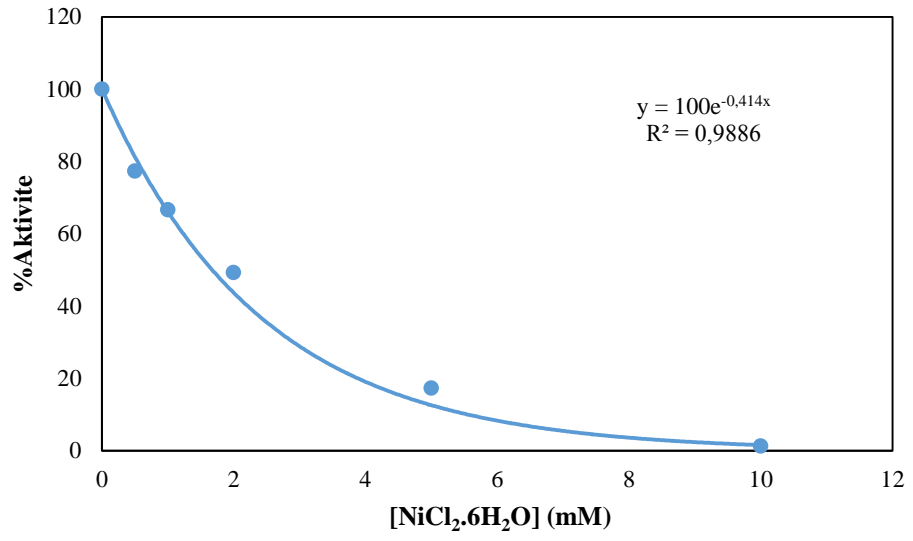
**Şekil 4.16.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



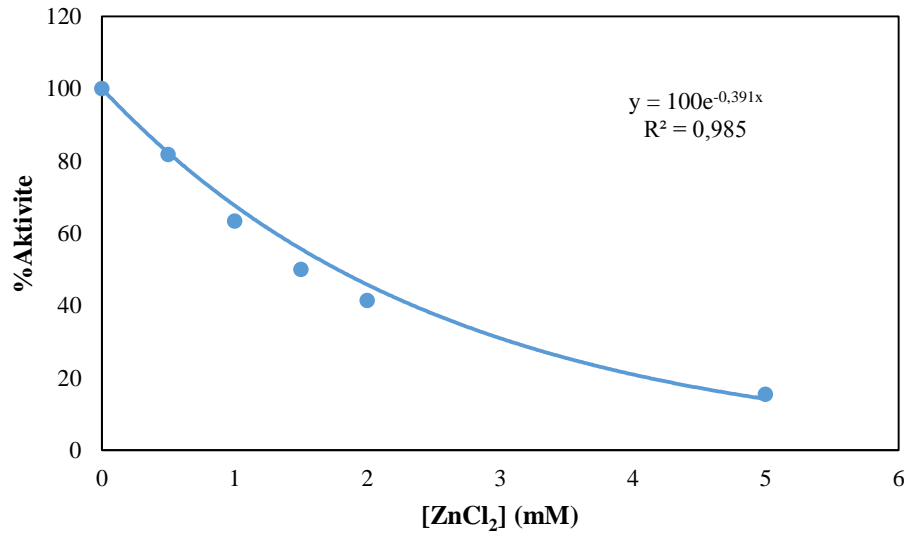
**Şekil 4.17.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



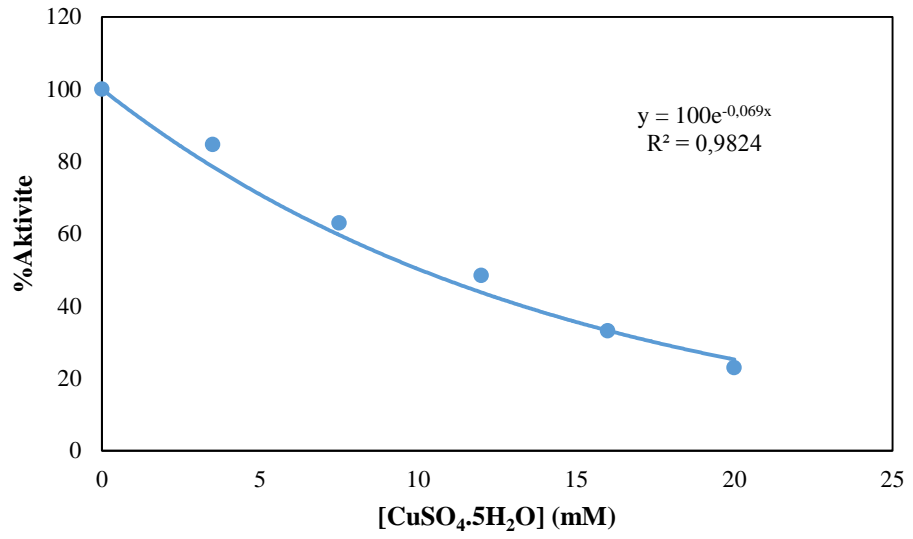
**Şekil 4.18.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



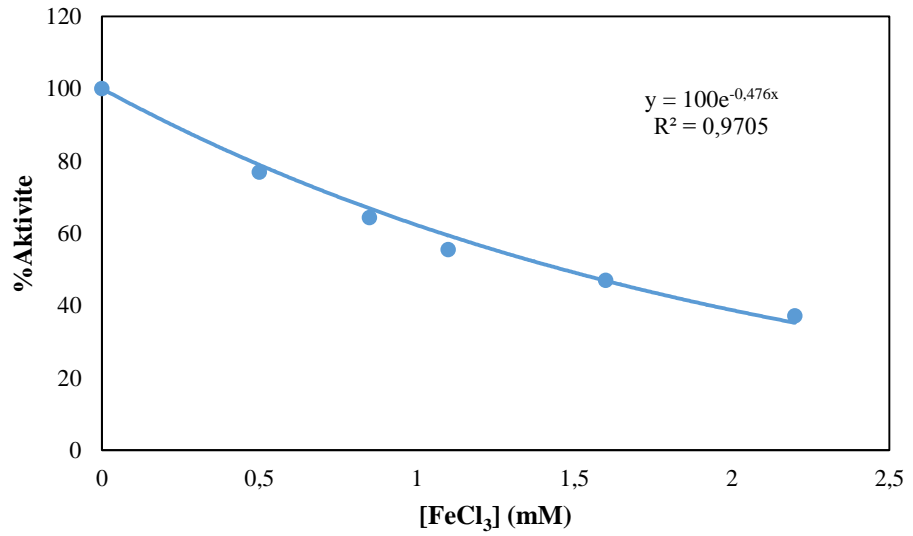
**Şekil 4.19.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



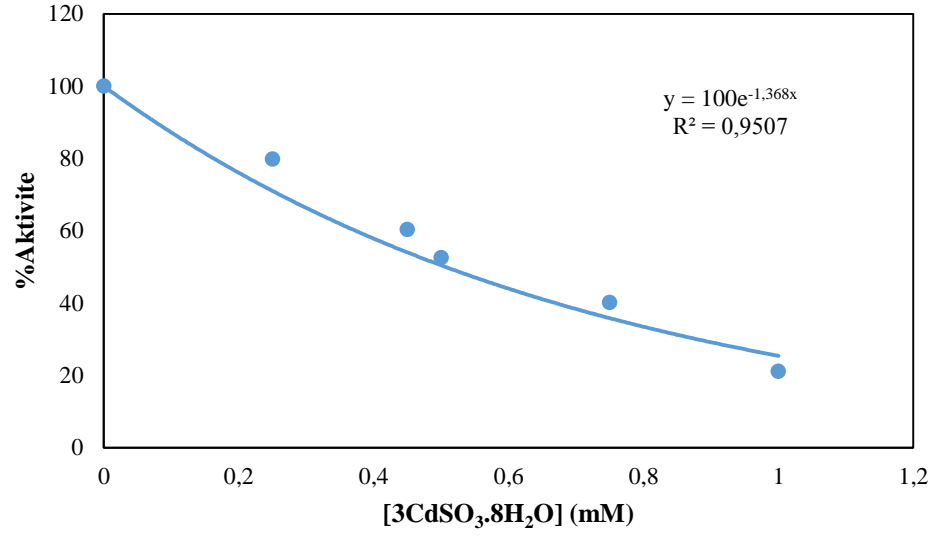
**Şekil 4.20.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı  $\text{ZnCl}_2$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



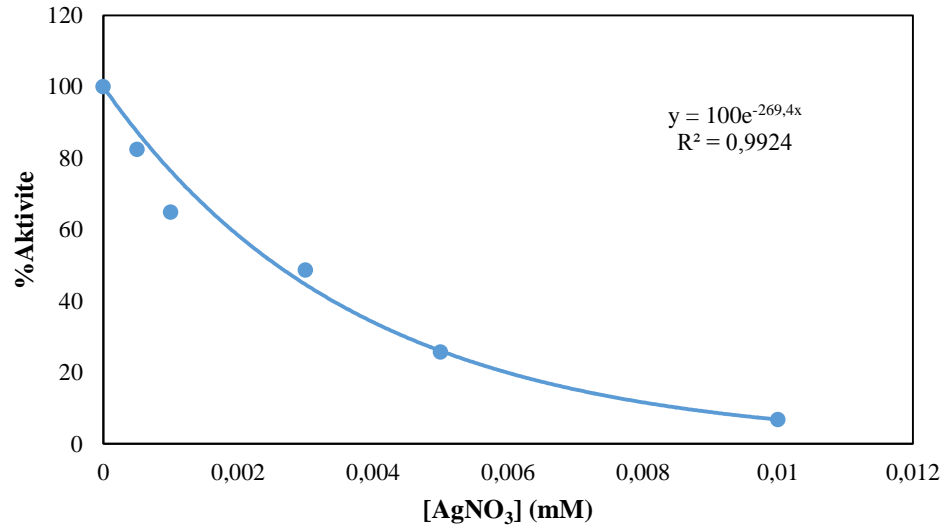
**Şekil 4.21.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



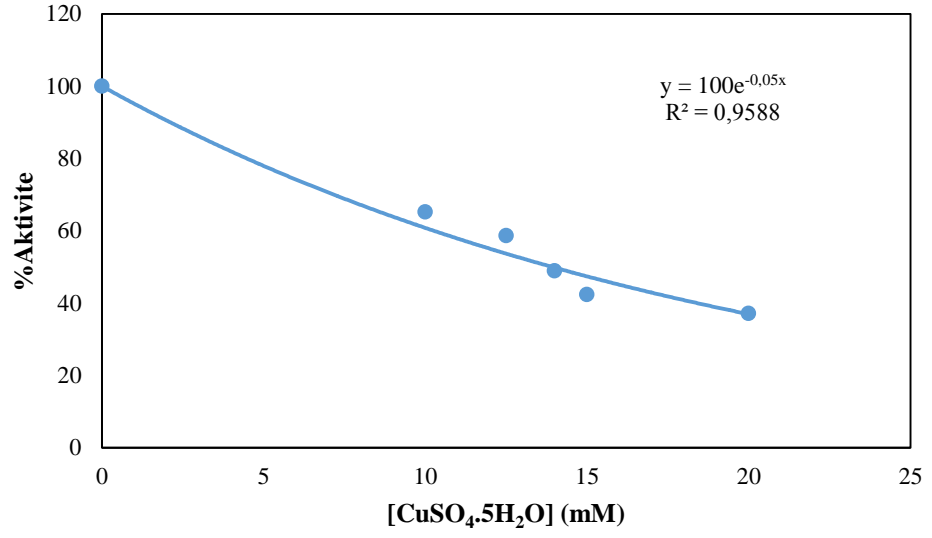
**Şekil 4.22.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı FeCl<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



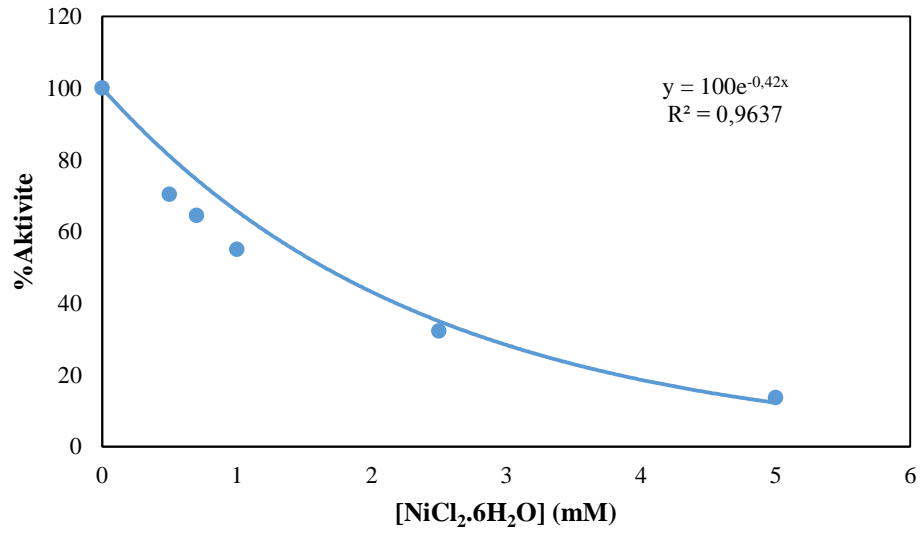
**Şekil 4.23.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO<sub>3</sub>.8H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



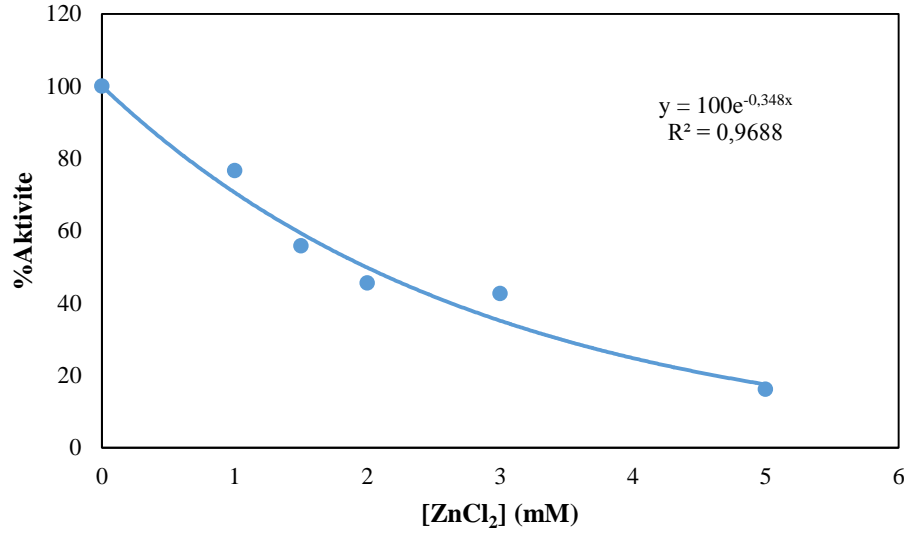
**Şekil 4.24.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



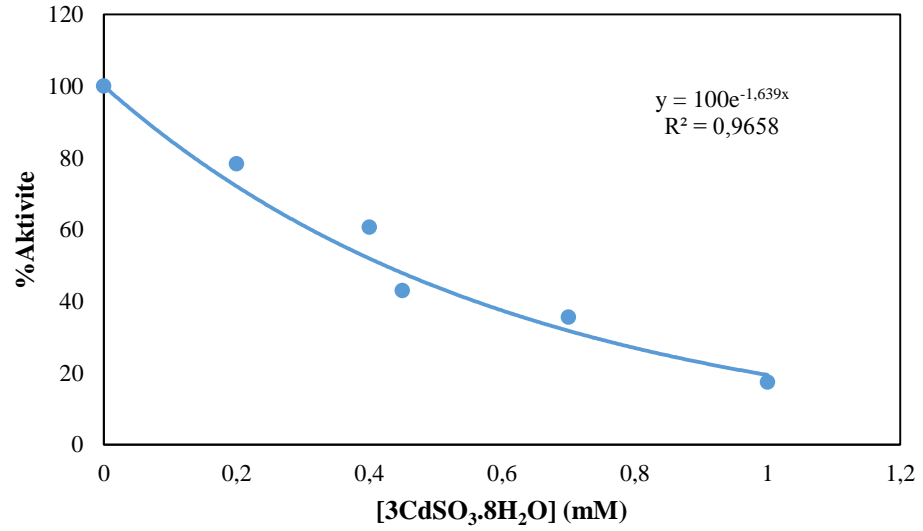
**Şekil 4.25.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



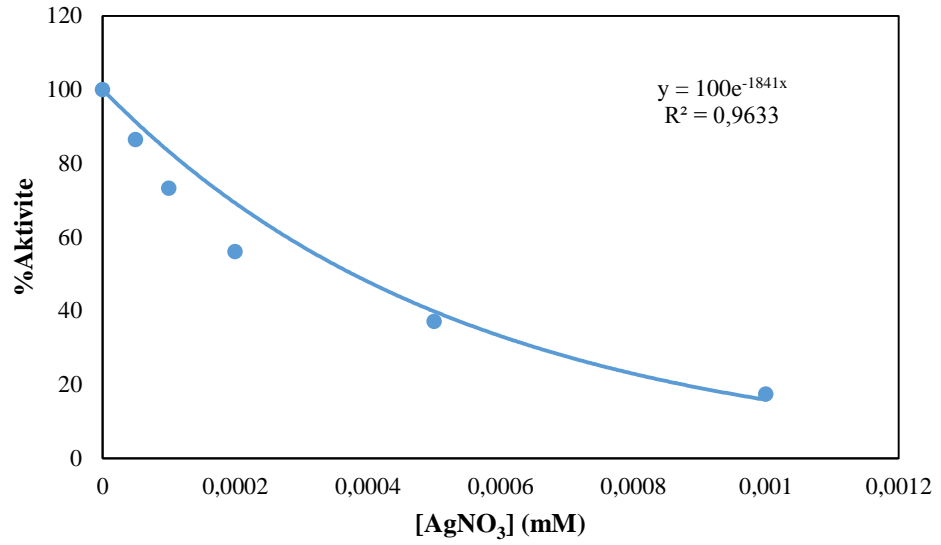
**Şekil 4.26.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



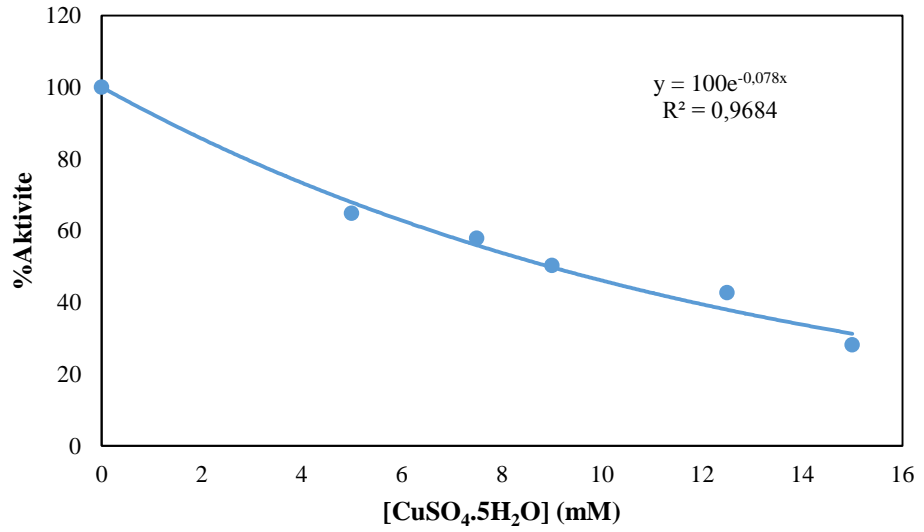
**Şekil 4.27.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 5 farklı ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



**Şekil 4.28.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO<sub>3</sub>.8H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

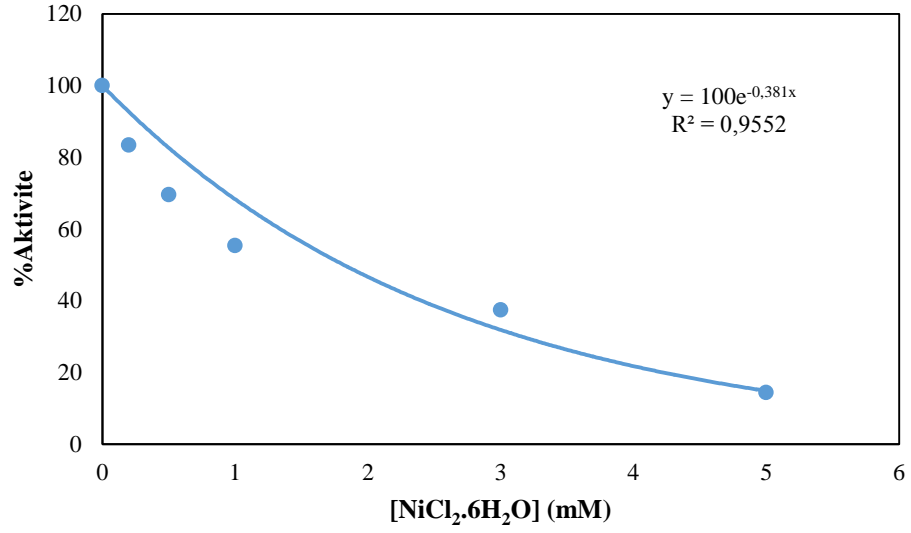


**Şekil 4.29.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

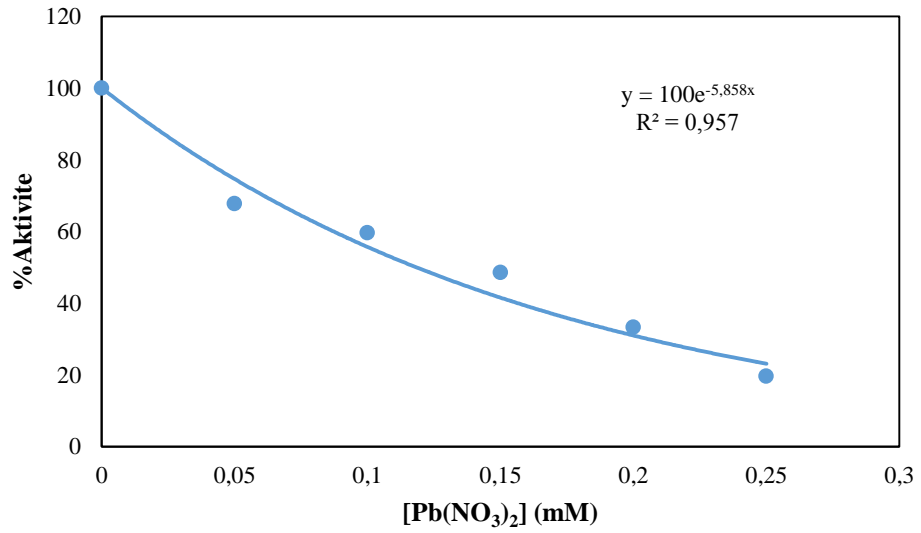


**Şekil 4.30.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

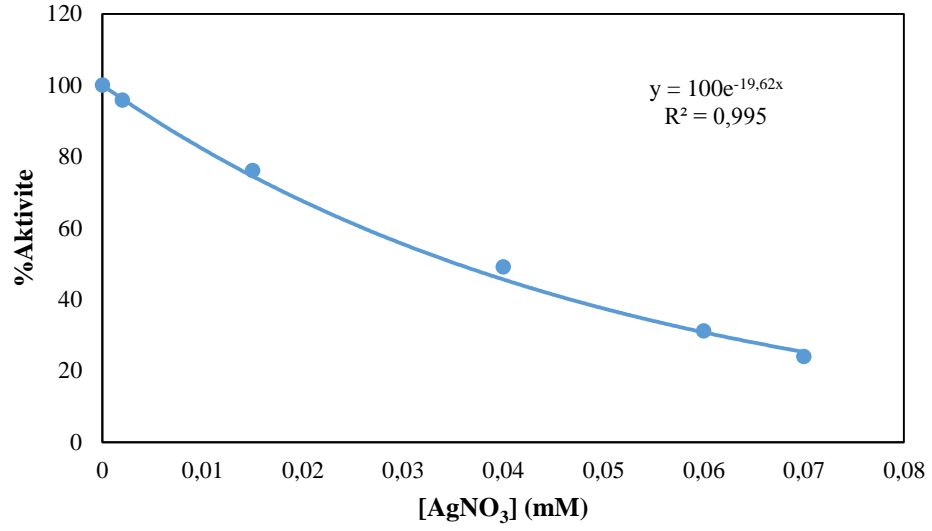




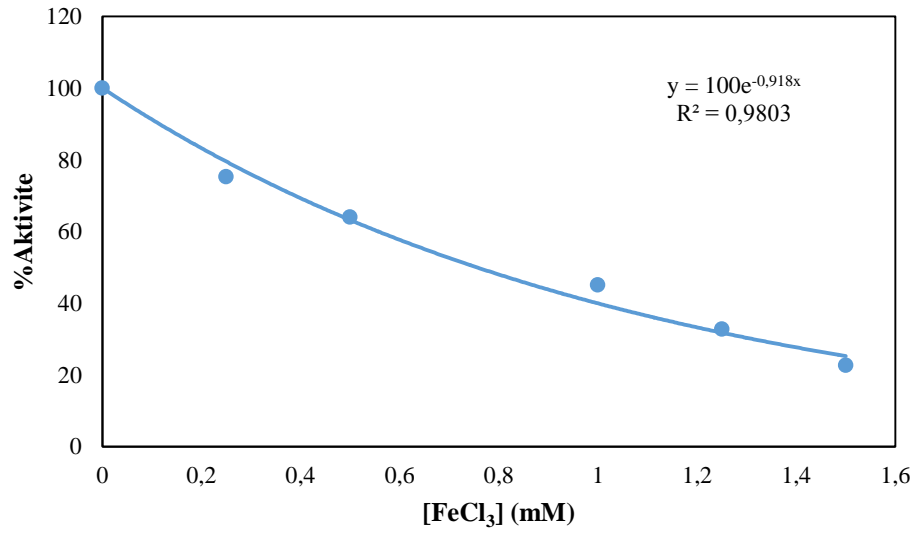
**Şekil 4.31.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



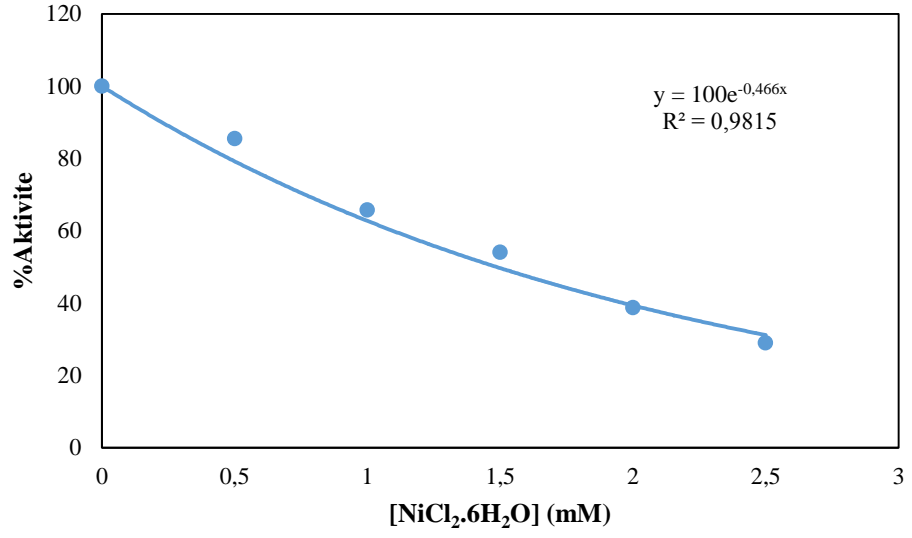
**Şekil 4.32.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



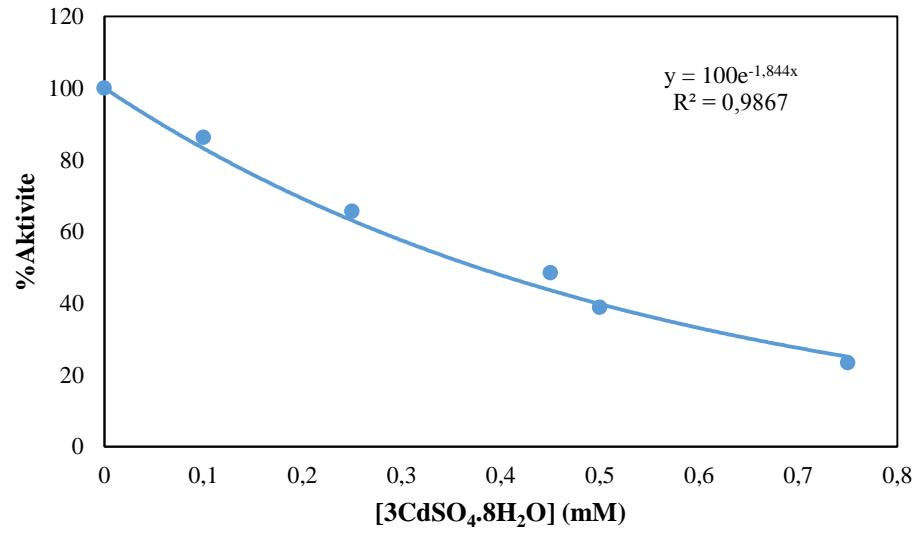
**Şekil 4.33.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



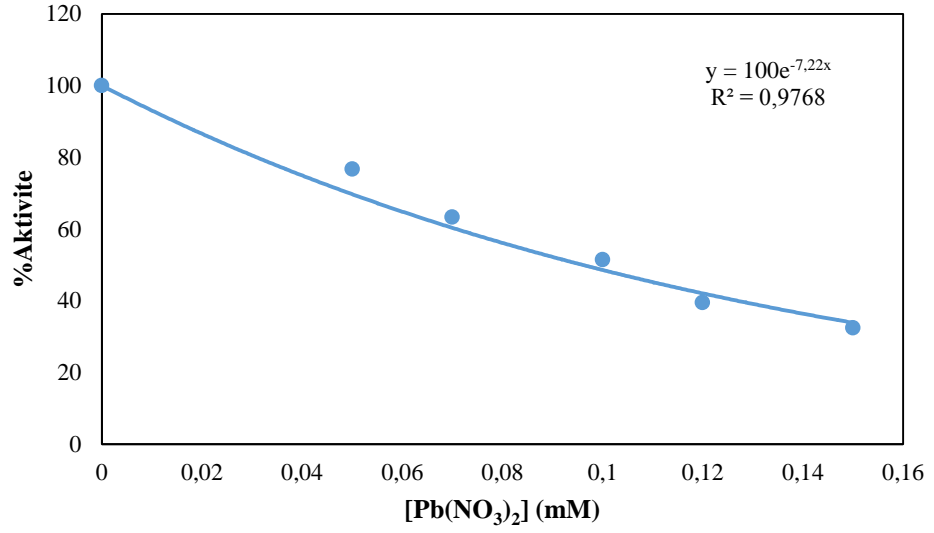
**Şekil 4.34.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı FeCl<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



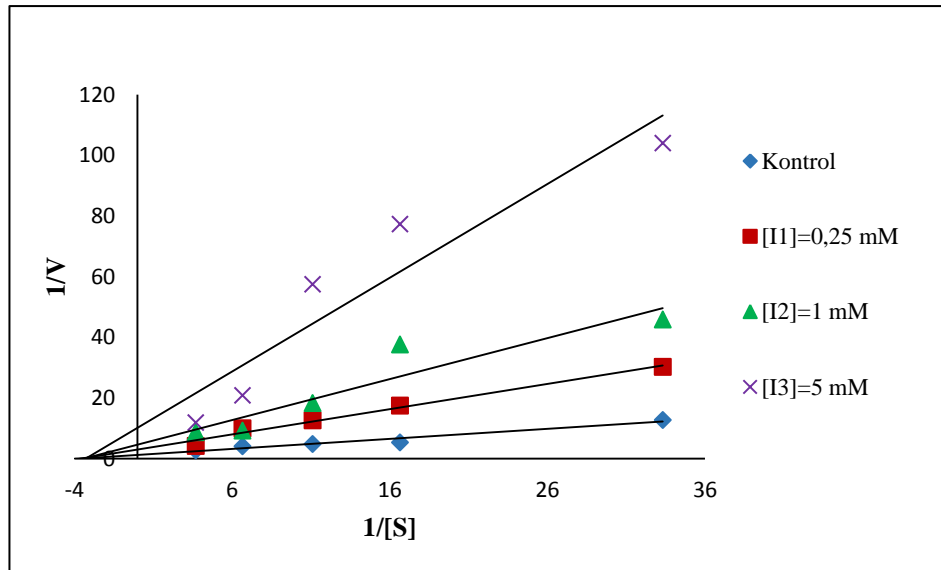
**Şekil 4.35.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



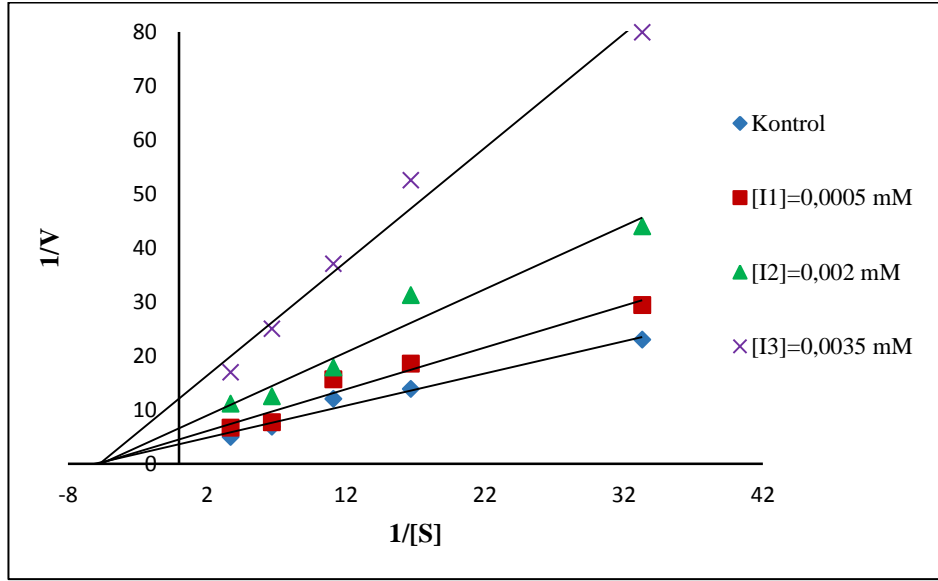
**Şekil 4.36.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı 3CdSO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



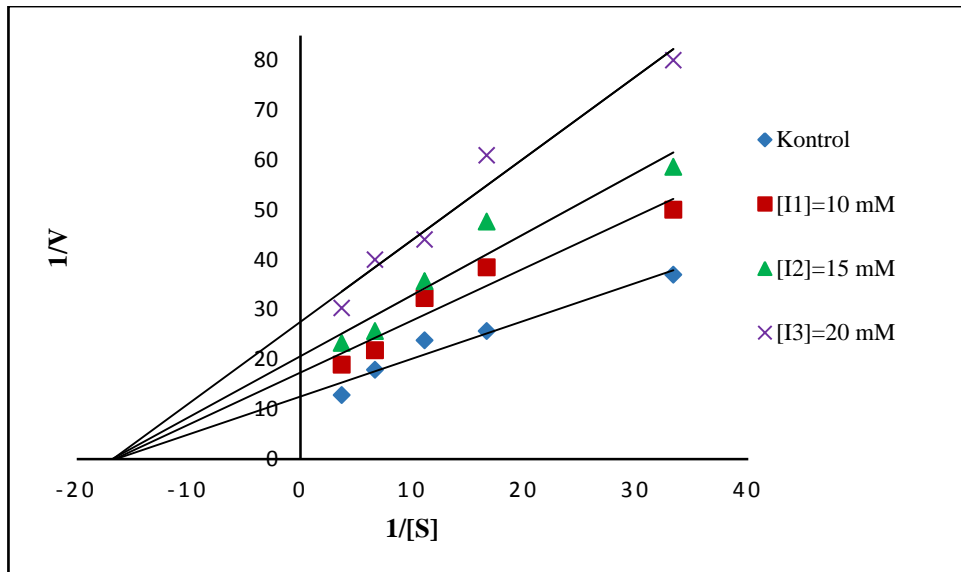
Şekil 4.37. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 5 farklı  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



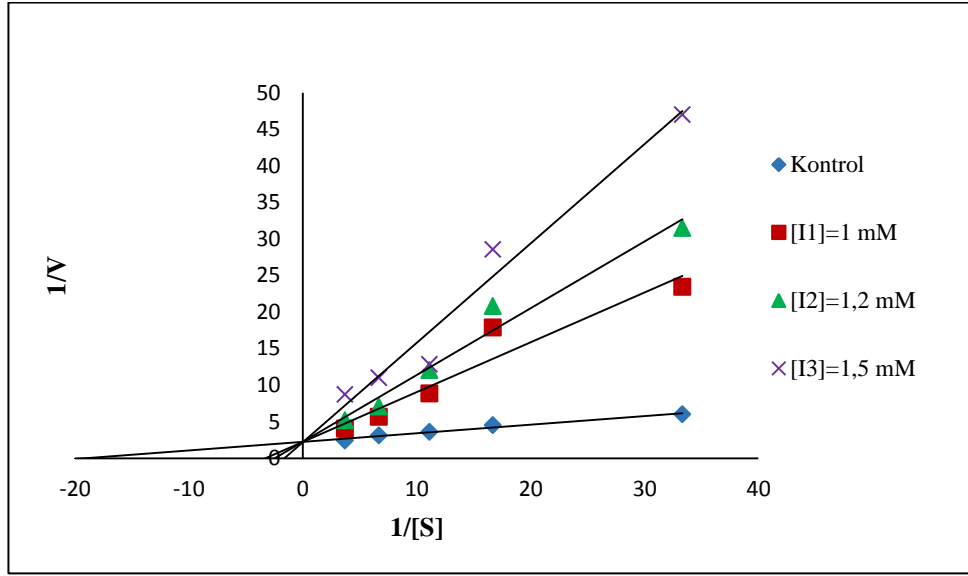
Şekil 4.38. *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



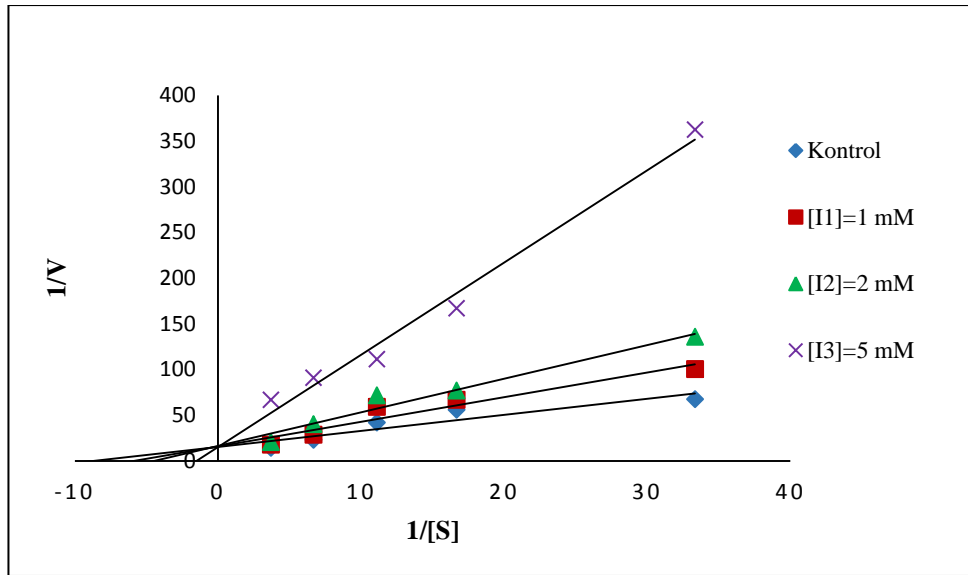
Şekil 4.39. *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



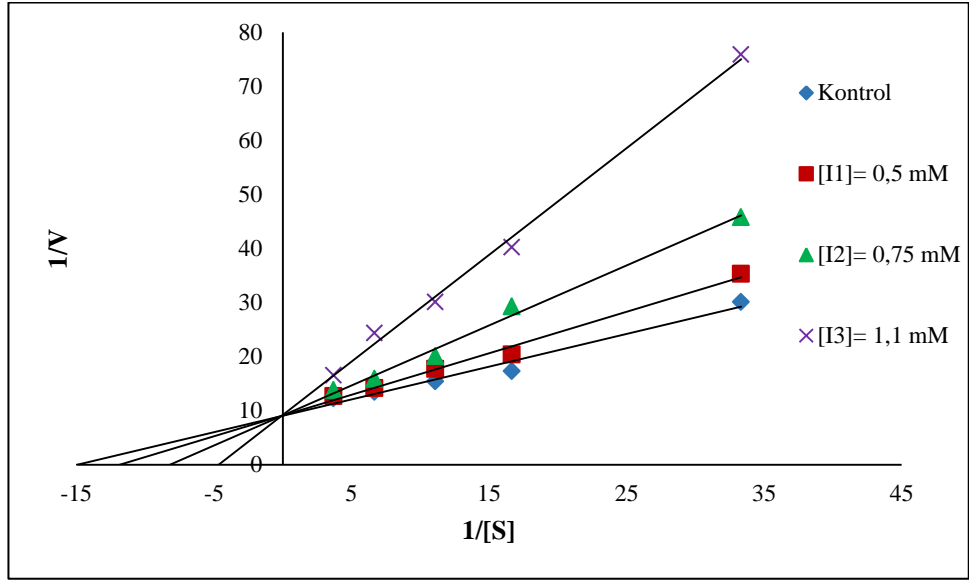
Şekil 4.40. *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



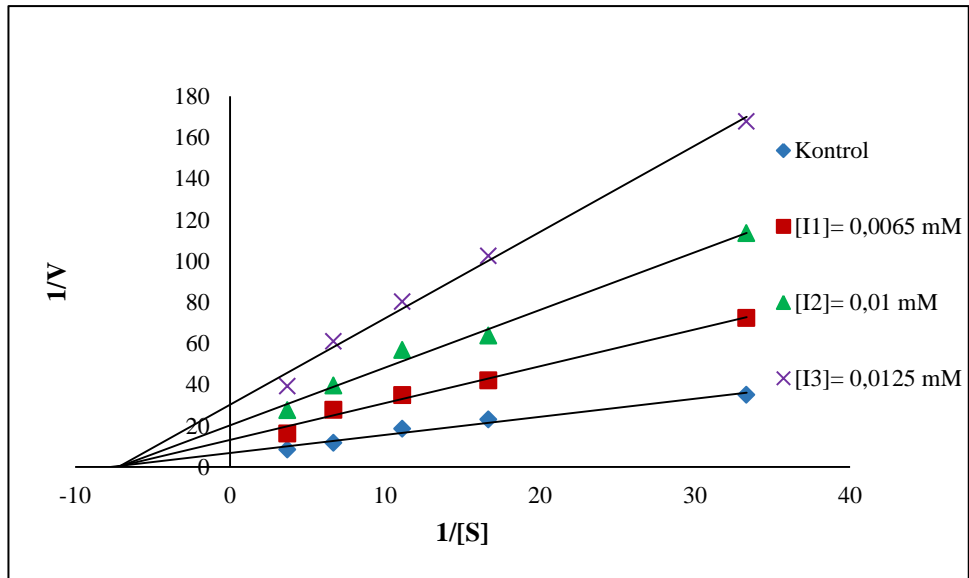
Şekil 4.41. *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{FeCl}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



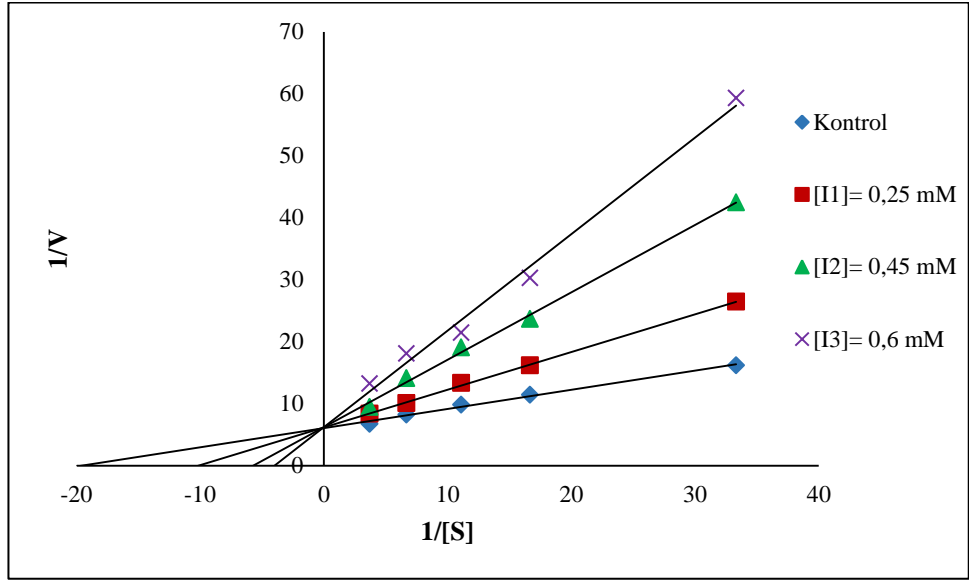
Şekil 4.42. *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



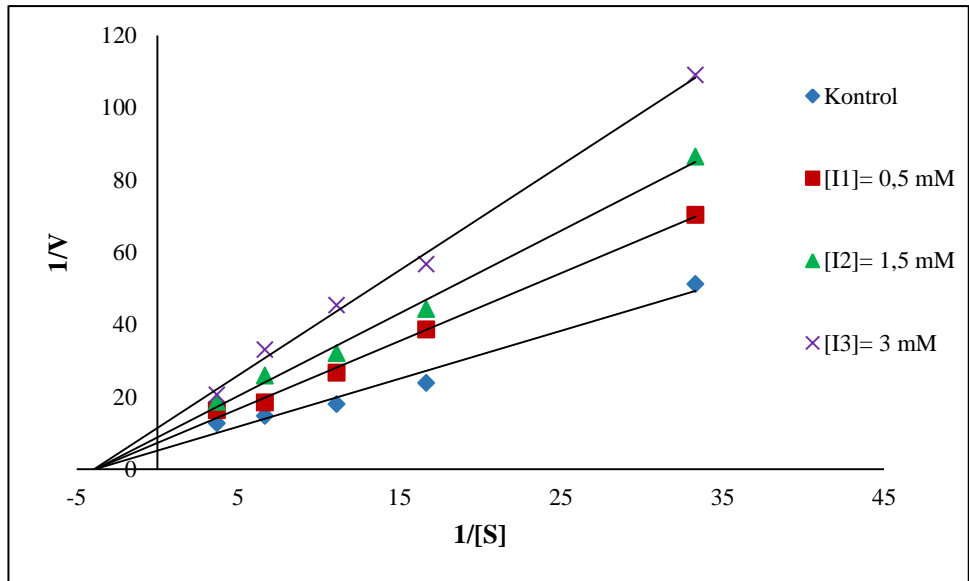
Şekil 4.43. *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.44. *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

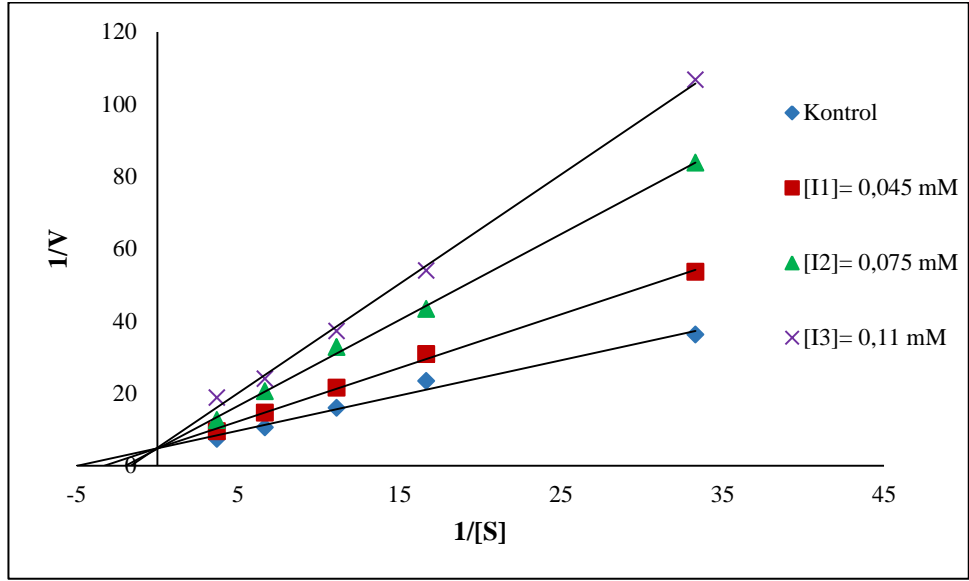


**Şekil 4.45.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{FeCl}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

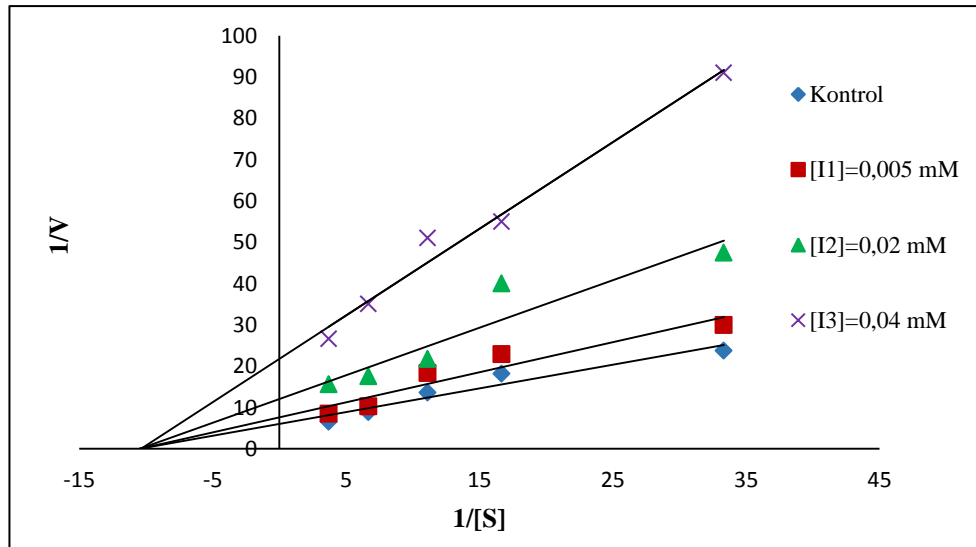


**Şekil 4.46.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

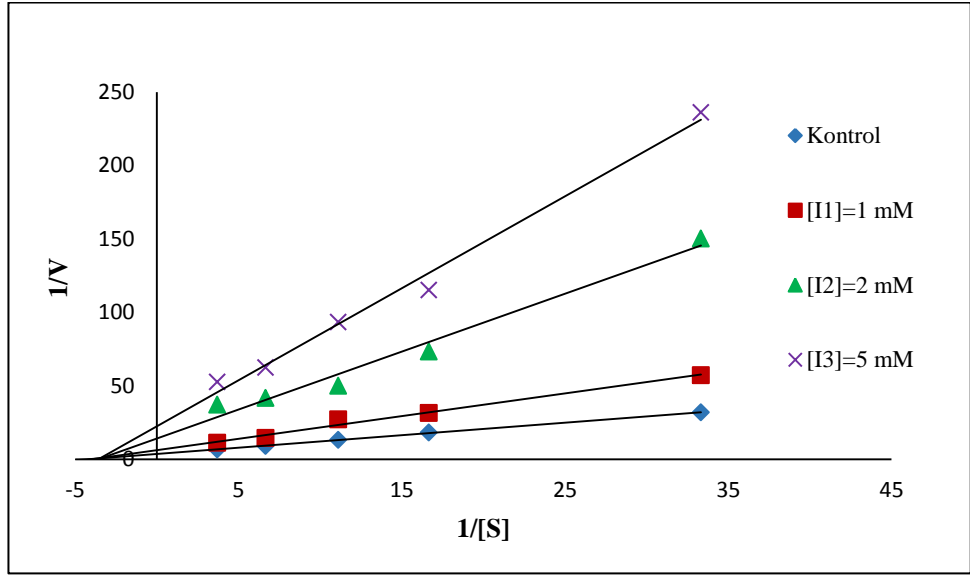




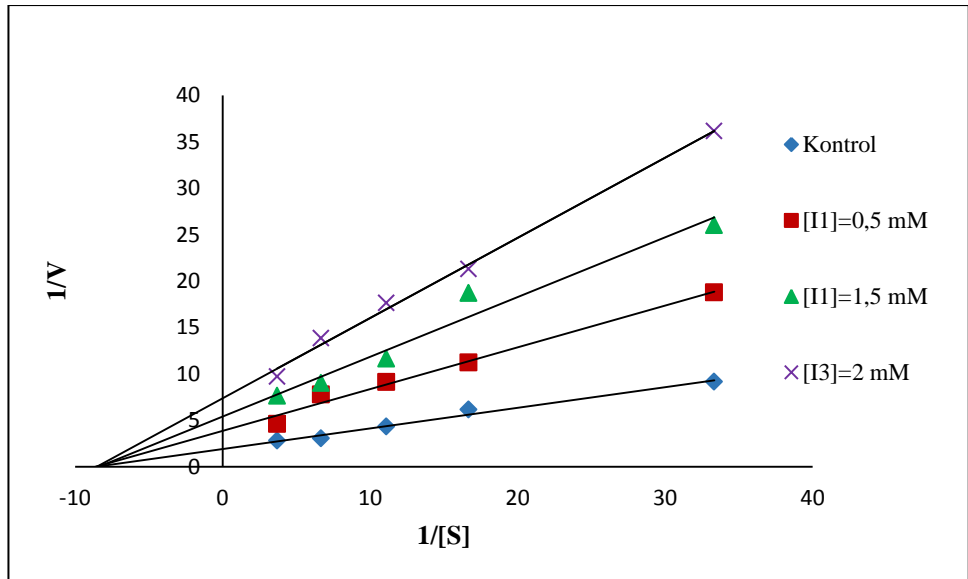
**Şekil 4.47.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $Pb(NO_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



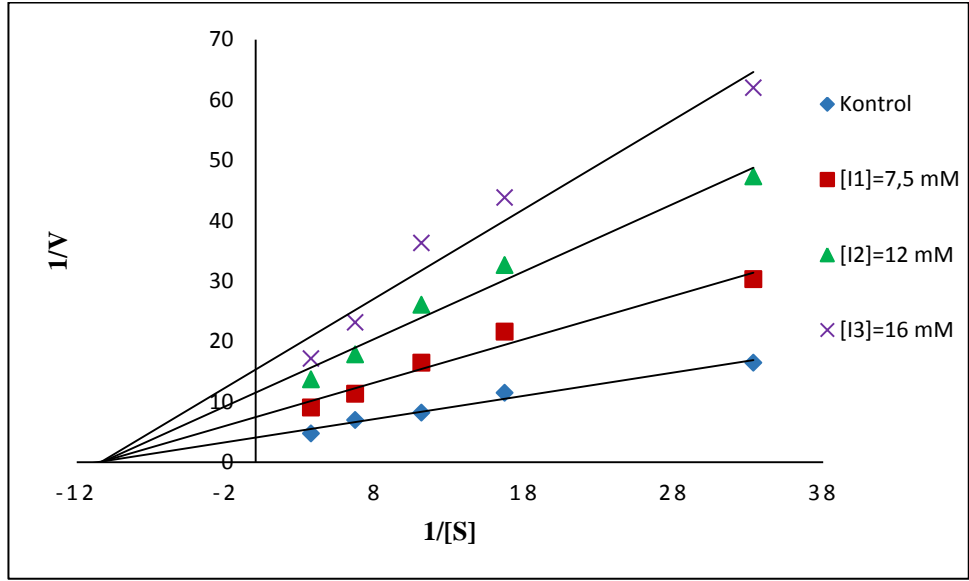
**Şekil 4.48.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $AgNO_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



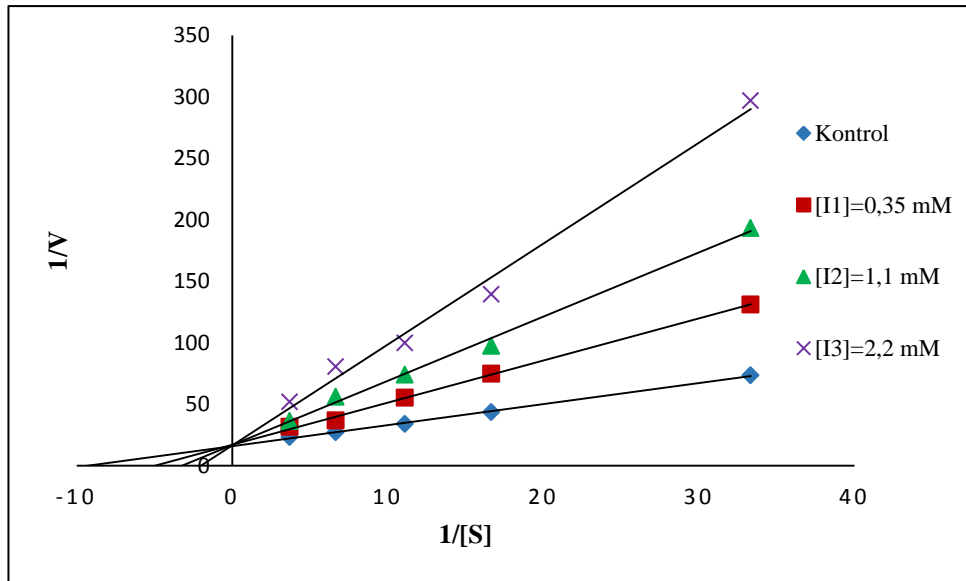
**Şekil 4.49.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



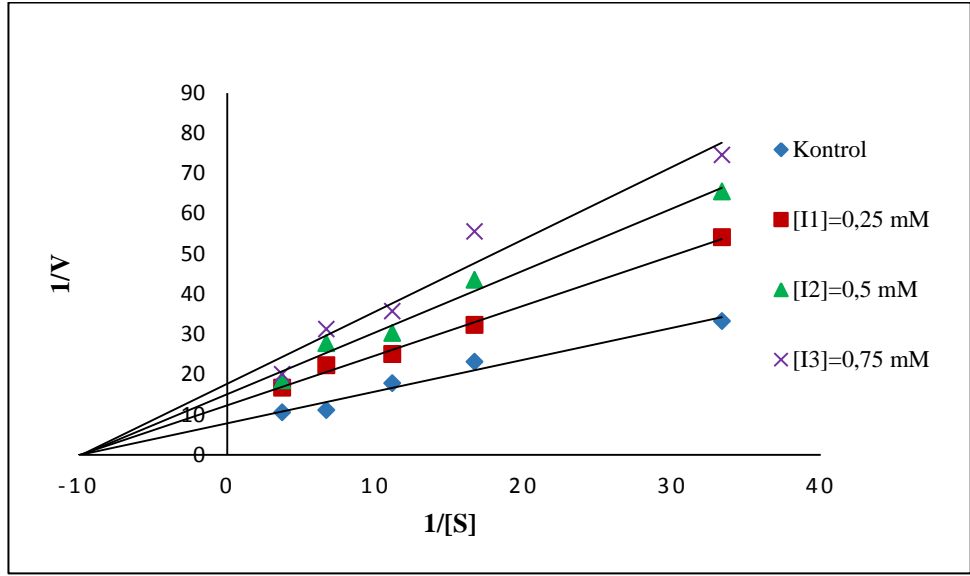
**Şekil 4.50.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{ZnCl}_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



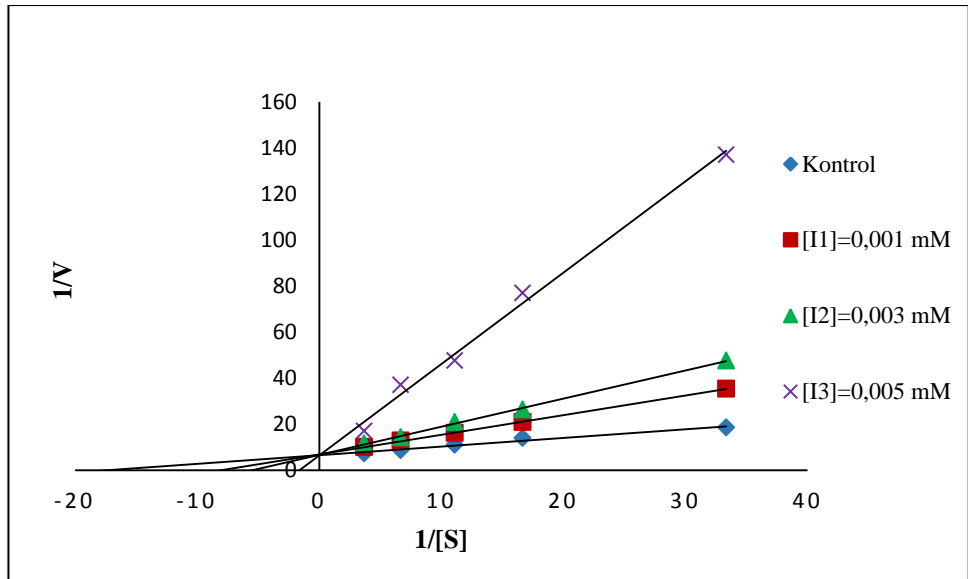
Şekil 4.51. *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



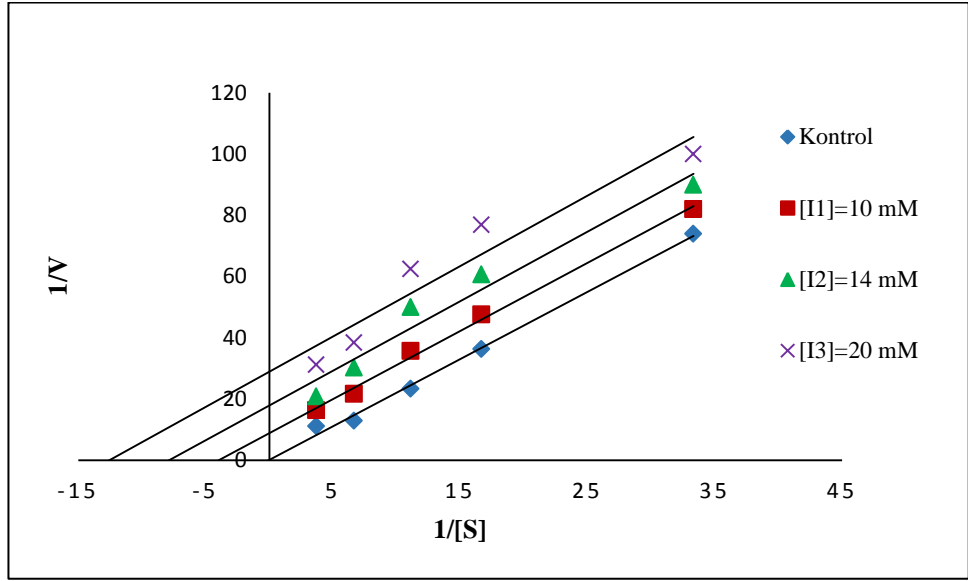
Şekil 4.52. *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{FeCl}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



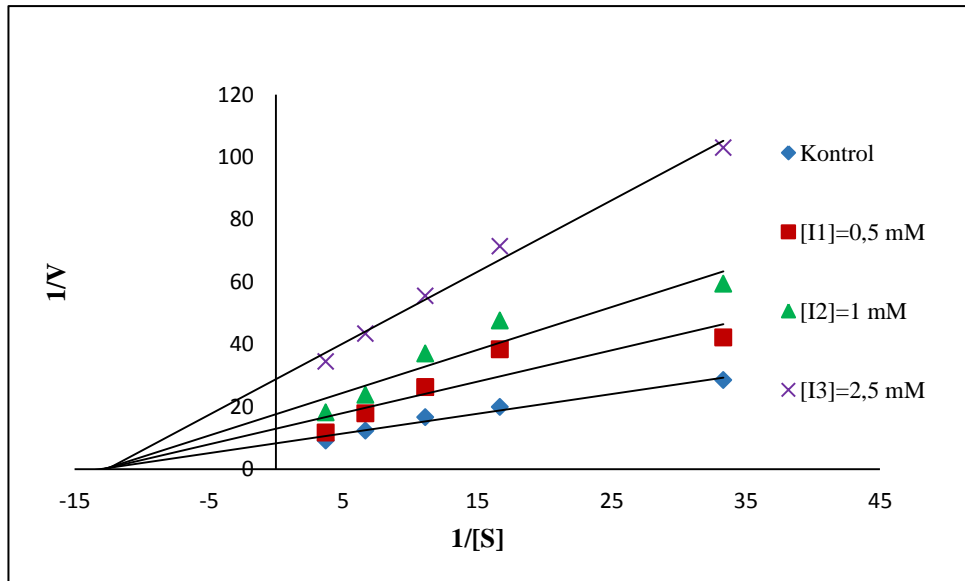
Şekil 4.53. *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $3\text{CdSO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



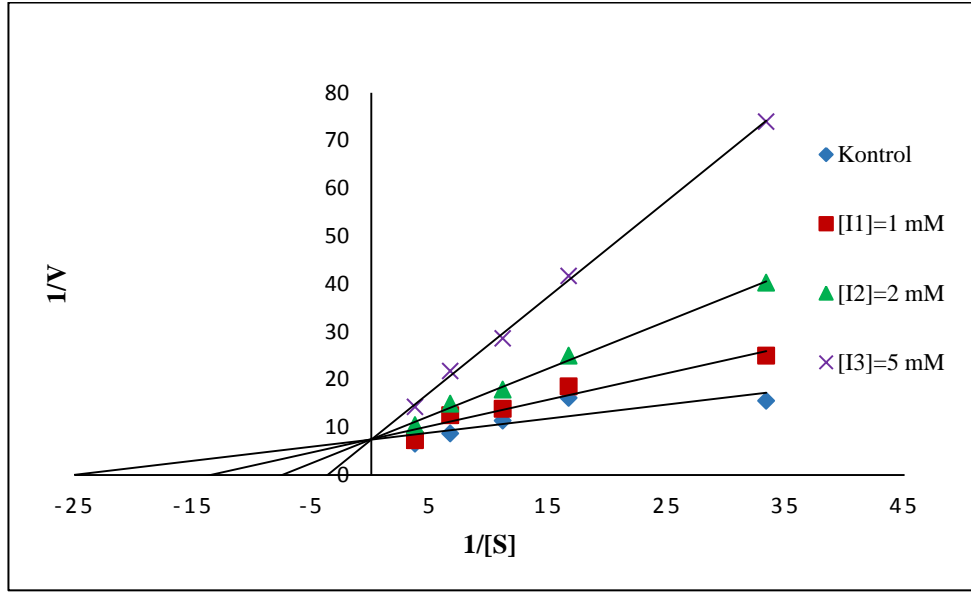
Şekil 4.54. *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



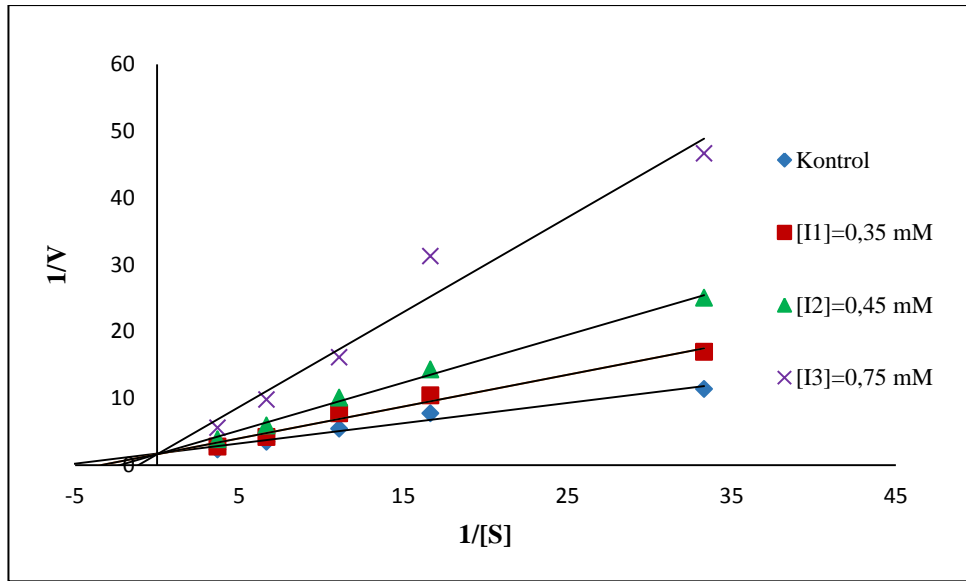
**Şekil 4.55.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



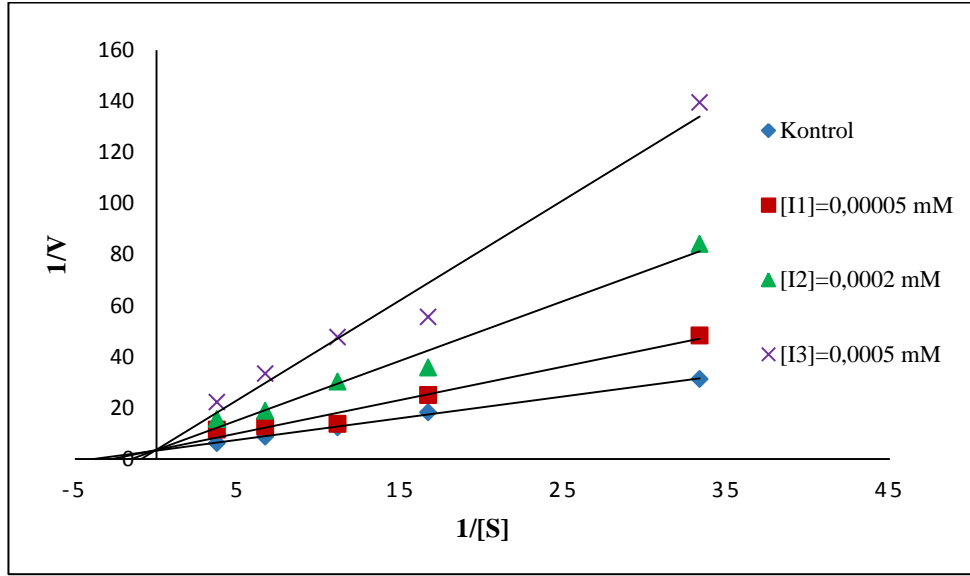
**Şekil 4.56.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



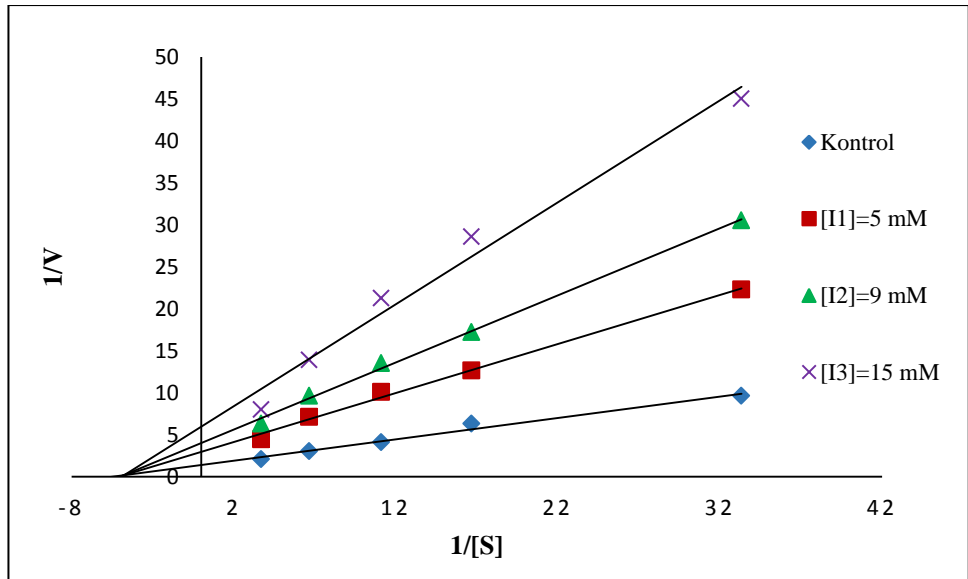
Şekil 4.57. *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit ZnCl<sub>2</sub> için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



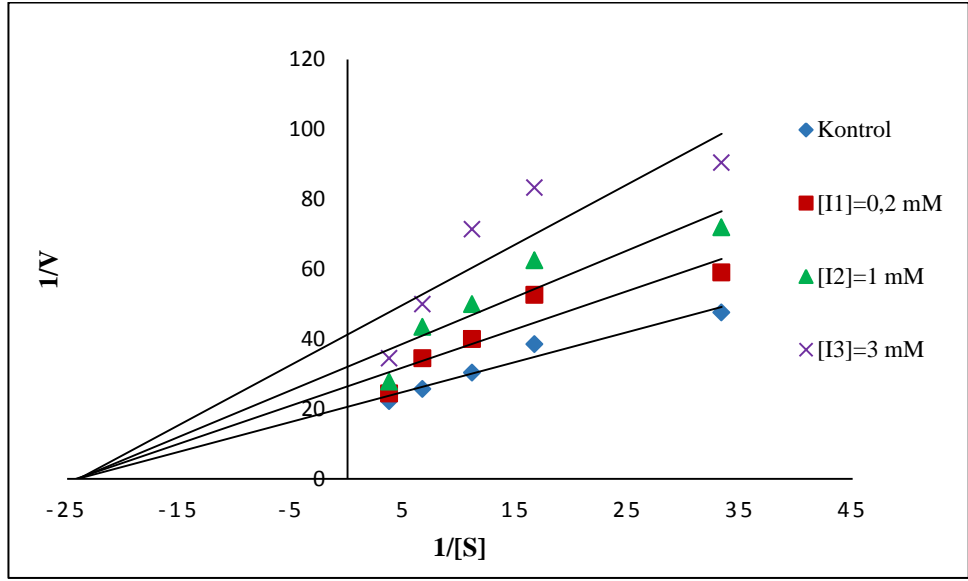
Şekil 4.58. *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit 3CdSO<sub>3</sub>.8H<sub>2</sub>O için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



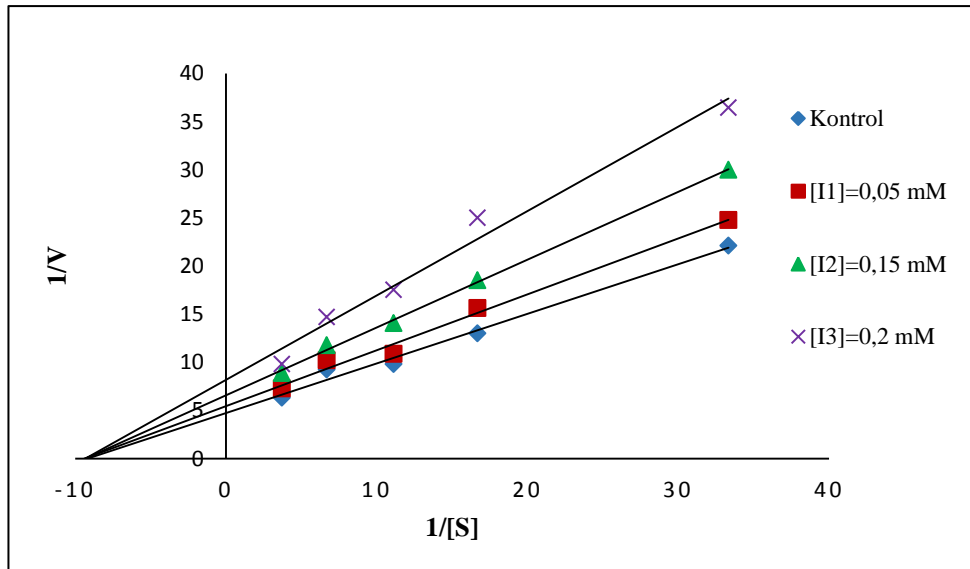
Şekil 4.59. *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.60. *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

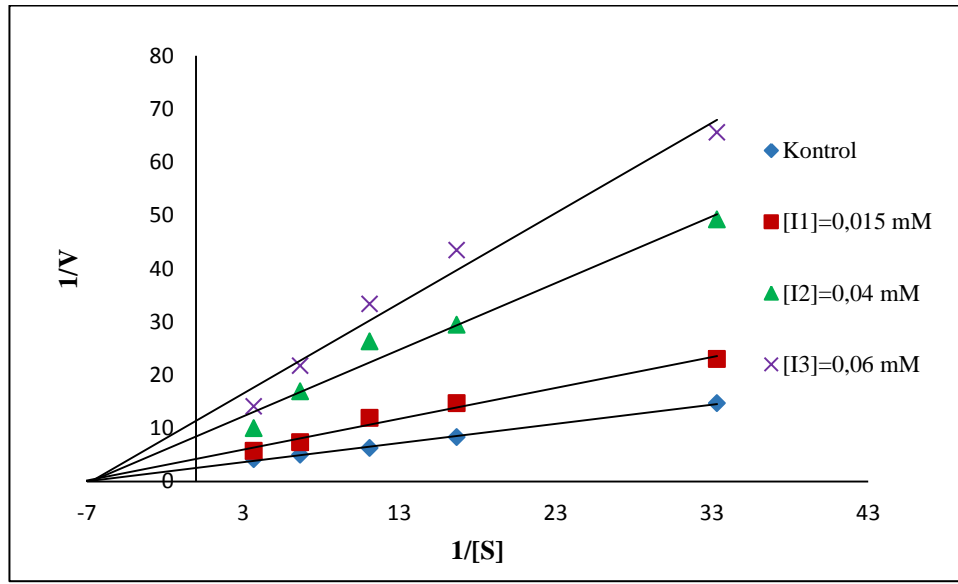


**Şekil 4.61.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

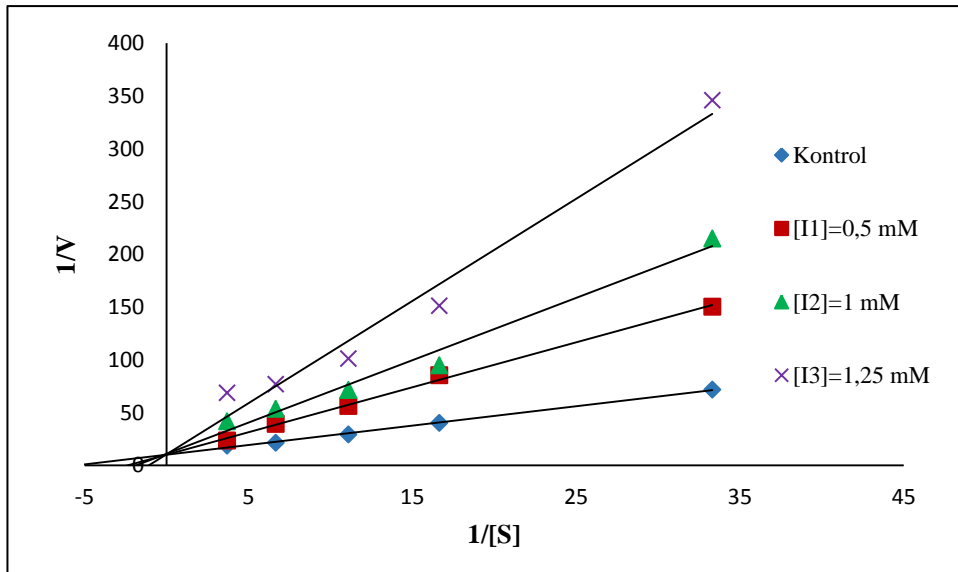


**Şekil 4.62.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

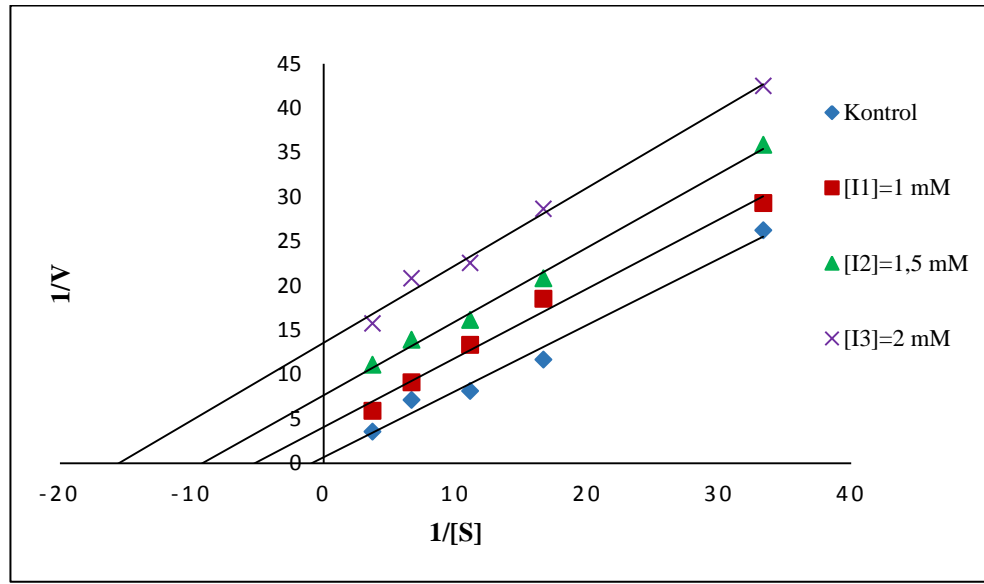




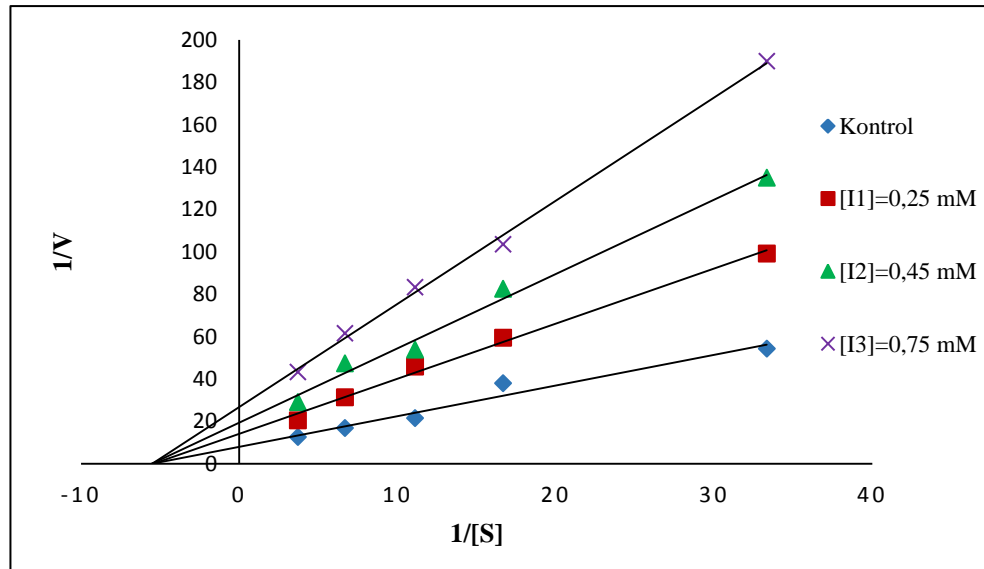
Şekil 4.63. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



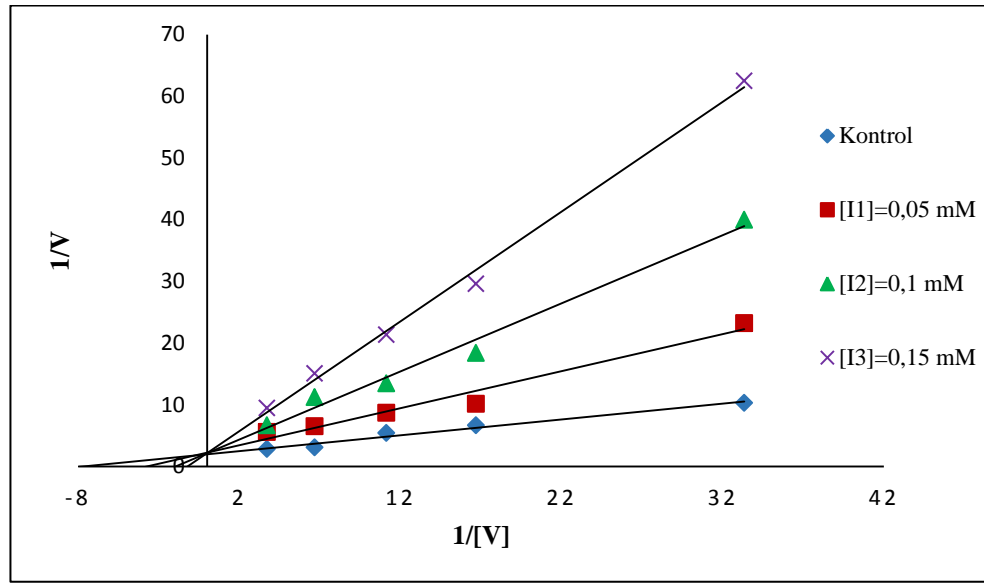
Şekil 4.64. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{FeCl}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.65. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.66. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



**Şekil 4.67.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için 3 sabit  $Pb(NO_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

**Çizelge 4.13.** *C. trutta* böbrek G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $IC_{50}$  değerleri,  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	$IC_{50}$ (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon Tipi
$FeCl_3$	1,220	$0,171 \pm 0,034$	Yarışmalı
$AgNO_3$	0,0023	$0,00202 \pm 0,00048$	Yarışmasız
$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$	2,033	$0,394 \pm 0,253$	Yarışmasız
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	2,656	$1,751 \pm 0,610$	Yarışmalı
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	14,146	$22,116 \pm 4,875$	Yarışmasız

**Çizelge 4.14.** *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $IC_{50}$  değerleri,  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	$IC_{50}$ (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon Tipi
$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$	0,660	$1,113 \pm 0,731$	Yarışmalı
$AgNO_3$	0,00871	$0,00523 \pm 0,00168$	Yarışmasız
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	1,947	$1,955 \pm 0,650$	Yarışmasız
$Pb(NO_3)_2$	0,081	$0,065 \pm 0,022$	Yarışmalı
$FeCl_3$	0,421	$0,203 \pm 0,060$	Yarışmalı

**Çizelge 4.15.** *C. trutta* solungaç G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
AgNO <sub>3</sub>	0,024	0,0185± 0,00272	Yarışmasız
ZnCl <sub>2</sub>	1,773	0,669± 0,168	Yarışmasız
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,674	1,003± 0,350	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	10,046	7,099± 1,655	Yarışmasız
FeCl <sub>3</sub>	1,456	0,528± 0,116	Yarışmalı

**Çizelge 4.16.** *C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
ZnCl <sub>2</sub>	1,992	0,969± 0,189	Yarışmalı
AgNO <sub>3</sub>	0,00257	0,000929± 0,00044	Yarışmalı
3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	0,507	0,526± 0,0806	Yarışmasız
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,650	0,932± 0,0689	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	13,863	0,146± 0,0396	Yarı Yarışmalı

**Çizelge 4.17.** *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,118	0,327± 0,054	Yarışmasız
AgNO <sub>3</sub>	0,000377	0,00014± 0,0000423	Yarışmalı
3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	0,423	0,335± 0,167	Yarışmalı
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,819	1,828± 1,142	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,887	4,287± 0,197	Yarışmasız

**Çizelge 4.18.** *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
FeCl <sub>3</sub>	0,755	0,402± 0,102	Yarışmalı
AgNO <sub>3</sub>	0,0353	0,019± 0,00308	Yarışmasız
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,487	0,152± 0,048	Yarı Yarışmalı
3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	0,376	0,318± 0,00612	Yarışmasız
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,096	0,036± 0,0099	Yarışmalı

### 4.3. *C. trutta* ve *C. c. umbla* Böbrek, Karaciğer ve Solungaç GR Enzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları

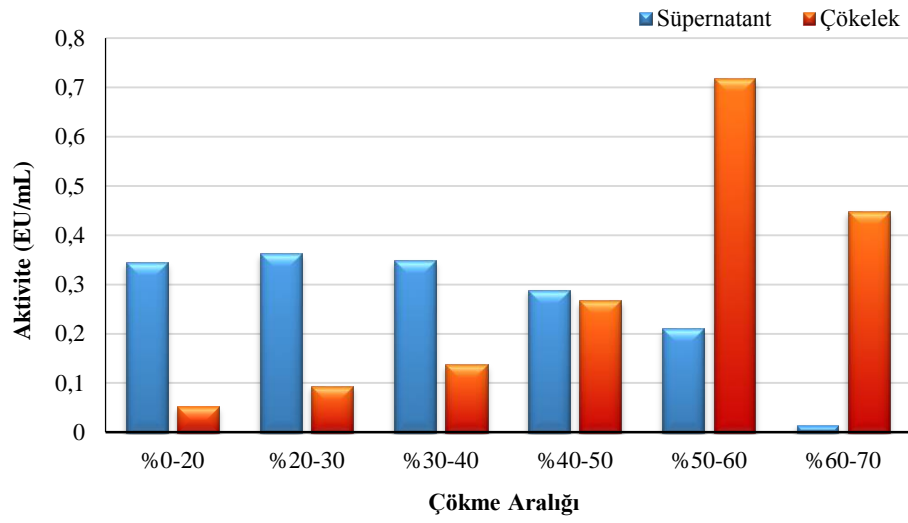
#### 4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

*C. trutta* ve *C. c. umbla* karaciğer, böbrek ve solungaç dokularından elde edilen homojenatlar, ardışık olarak %0 ile %80 arasındaki amonyum sülfat çöktürmesi işlemine (her seferinde doyumluk %10 artırılarak) tabi tutuldu. G6PD aktivitesi içeren proteinlerin yoğun olarak çökmeye başladığı %aralıkla aktivitenin tamamına yakının çöktüğü %aralıklar belirlendi. Bundan sonraki saflaştırma çalışmalarında, saflaştırma işleminde ilk basamak olarak belirlenen bu aralıklarda amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Elde edilen çökelekler 13000 rpm de 15 dakika santrifüjlendi ve 1-2 mL'lik homojenat tamponunda çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi. *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralıkları Çizelge 4.19-4.24 ve Şekil 4.68-4.73'de gösterilmiştir.

*C. trutta* böbrek GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-70 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.19.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doyumluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum Sülfat Aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,345	0,363	0,348	0,289	0,211	0,015
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,053	0,094	0,138	0,268	0,718	0,449

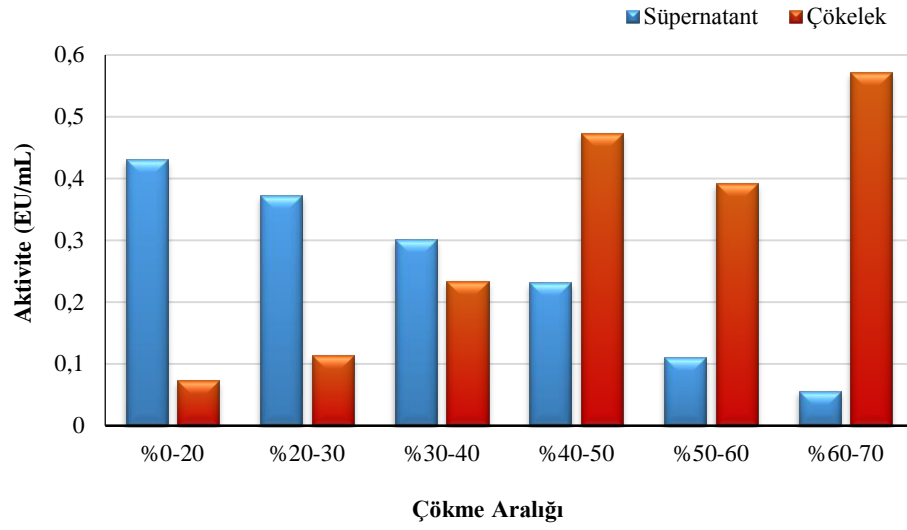


**Şekil 4.68.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. trutta* karaciğer GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-70 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.20.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum Sülfat Aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,431	0,372	0,301	0,232	0,111	0,056
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,073	0,114	0,234	0,473	0,392	0,571

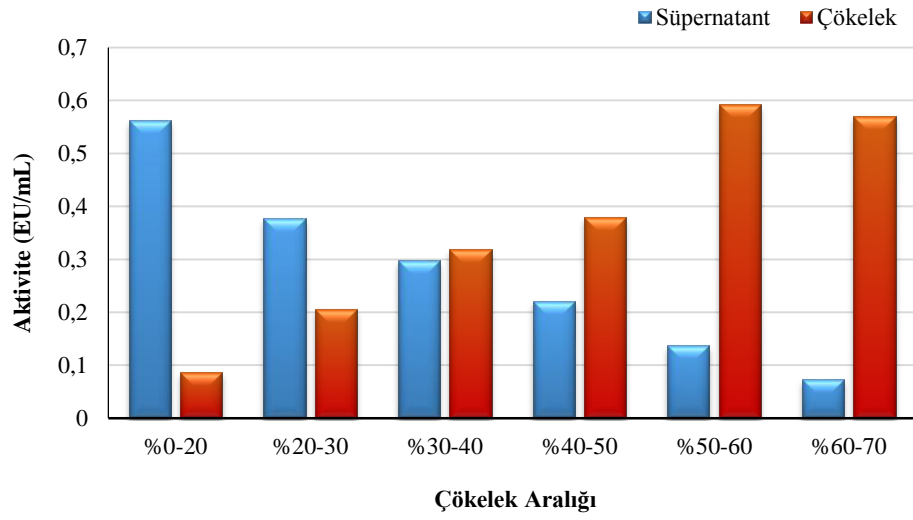


**Şekil 4.69.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. trutta* solungaç GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %20-70 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.21.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum Sülfat Aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,562	0,378	0,298	0,221	0,138	0,074
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,086	0,206	0,318	0,379	0,593	0,571



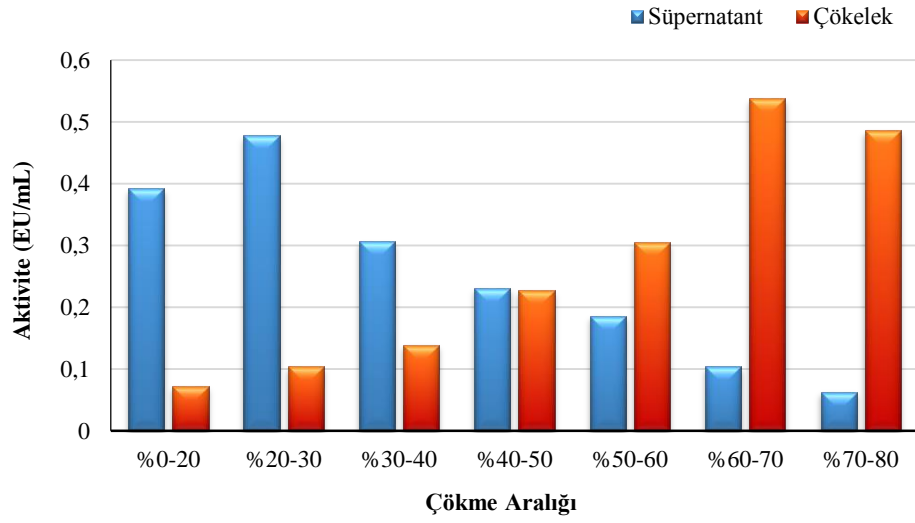
**Şekil 4.70.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* böbrek GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.22.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum Sülfat Aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,392	0,478	0,307	0,231	0,186	0,104	0,063
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,073	0,104	0,139	0,227	0,305	0,538	0,486



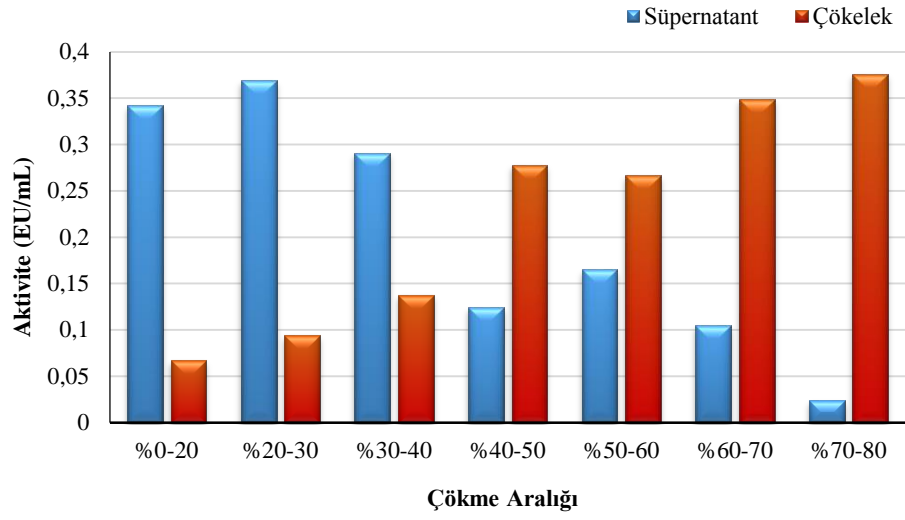


**Şekil 4.71.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.23.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,342	0,369	0,291	0,124	0,165	0,105	0,024
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,067	0,094	0,138	0,278	0,267	0,349	0,376

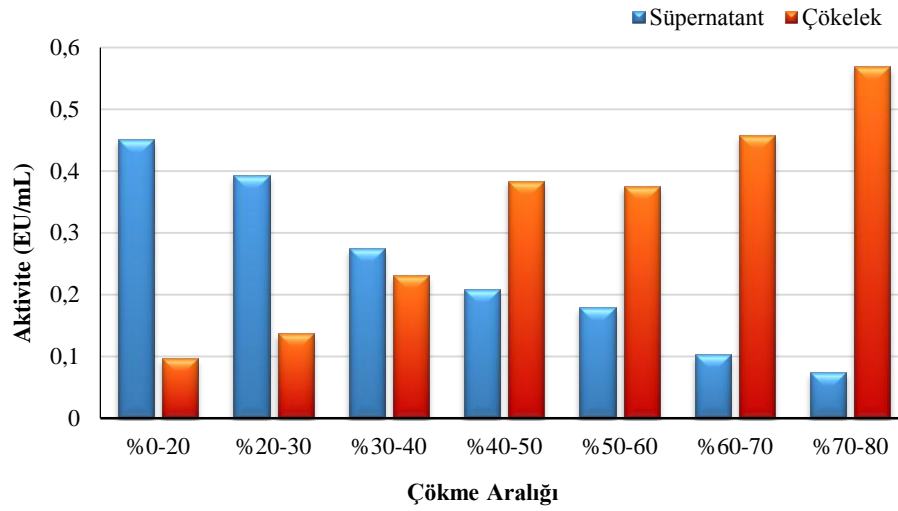


**Şekil 4.72.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

*C. c. umbla* solungaç GR enzimi için; amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-80 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.24.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,451	0,393	0,275	0,209	0,179	0,103	0,074
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,097	0,137	0,231	0,384	0,375	0,458	0,569



**Şekil 4.73.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

#### 4.3.2. *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç GR enziminin, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Çalışmada öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak enzimin çökme aralığı belirlenmiş ve bu aralığa göre saflaştırma çalışmasına başlanmıştır. Homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra numune, 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolonuna yüklenerek 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzimler Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi ve bu oranlar Çizelge 4.25–4.30'de verildi.

**Çizelge 4.25.** *C. trutta* böbrek GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,207	13,69	26	5,382	355,94	0,015	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,295	8,2	9,5	2,803	77,9	0,036	2,4	52,08
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,381	0,032	5	1,905	0,16	11,91	794	35,4

**Çizelge 4.26.** *C. trutta* karaciğer GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,317	14,25	30,5	9,669	434,63	0,022	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,423	9,73	8,5	3,595	82,705	0,043	1,95	37,18
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,679	0,042	3	2,037	0,126	16,167	734,86	21,07

**Çizelge 4.27.** *C. trutta* solungaç GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,197	9,25	27	5,319	249,75	0,021	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,329	5,73	6,5	2,139	37,245	0,057	2,73	40,21
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,516	0,027	4	2,064	0,108	19,111	910,05	38,80

**Çizelge 4.28.** *C. c. umbla* böbrek GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,276	7,28	25	6,9	182	0,038	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,334	1,06	6,5	2,171	6,89	0,315	8,31	31,46
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,531	0,036	3	1,593	0,108	14,75	389,18	23,09

**Çizelge 4.29.** *C. c. umbla* karaciğer GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

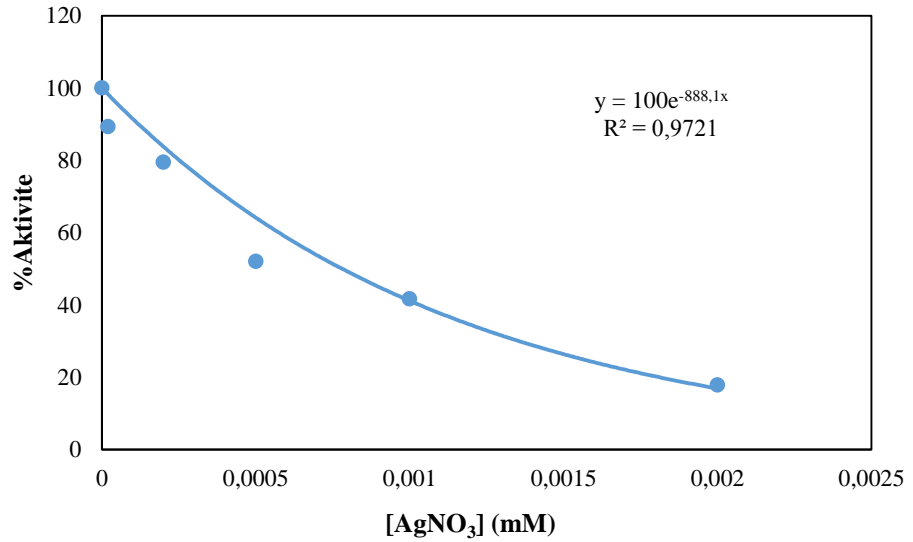
Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,463	43,81	31	14,353	1358,1	0,011	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,609	33,46	11,3	6,882	378,1	0,018	1,72	47,95
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,825	0,049	3	2,475	0,147	16,837	925,11	17,24

**Çizelge 4.30.** *C. c. umbla* solungaç GR enziminin 2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

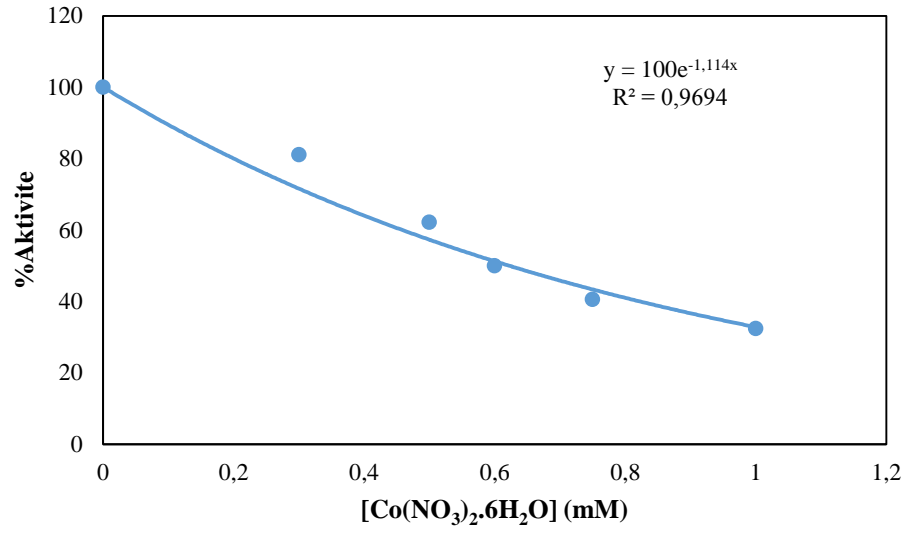
Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0,193	16,64	29,5	5,694	490,88	0,0116	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,328	4,27	9,6	3,149	40,992	0,0768	6,621	55,304
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0,555	0,041	5	2,775	0,205	13,537	1166,983	48,736

### 4.3.3. Kinetik Çalışmaların Sonuçları

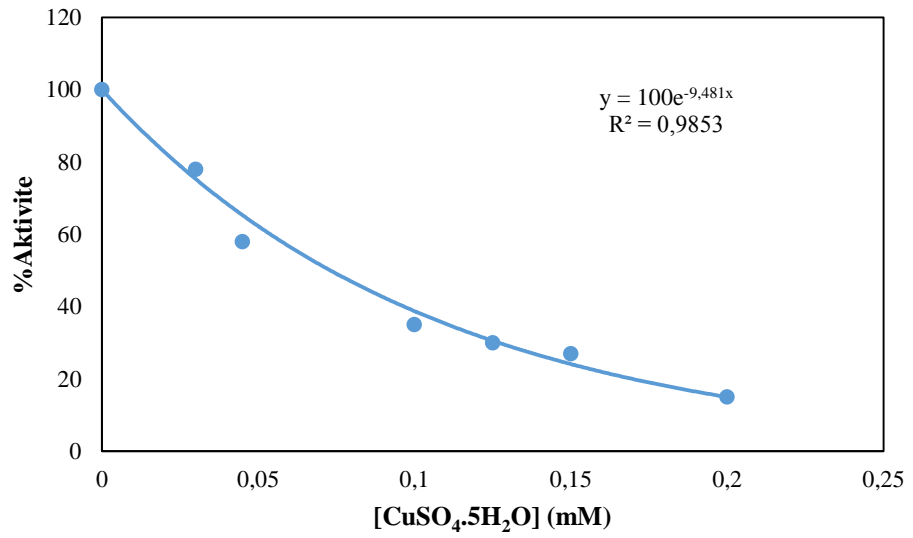
*C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç GR enzimi için ayrı ayrı olmak üzere çalışılan metaller için farklı metal konsantrasyonlarında aktiviteler bulunarak % Aktivite-[Metal] grafikleri çizildi (Şekil 4.74-4.103) ve bu grafiklerden  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak Çizelge 4.31-4.36'da verildi. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metaller için 5 sabit substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek (Şekil 4.104-4.133), bu grafiklerden her bir inhibitör için  $K_i$  sabiti bulundu ve Çizelge 4.31-4.36'da verildi.



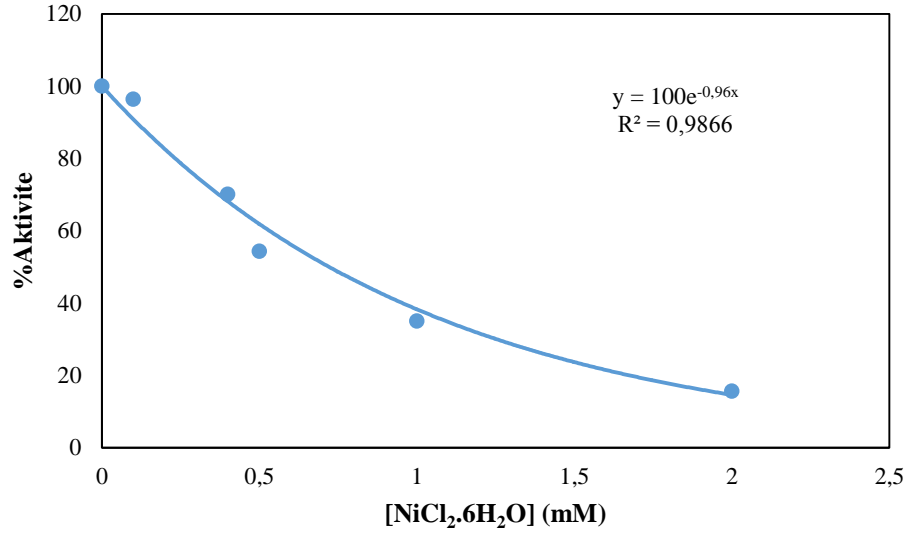
**Şekil 4.74.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



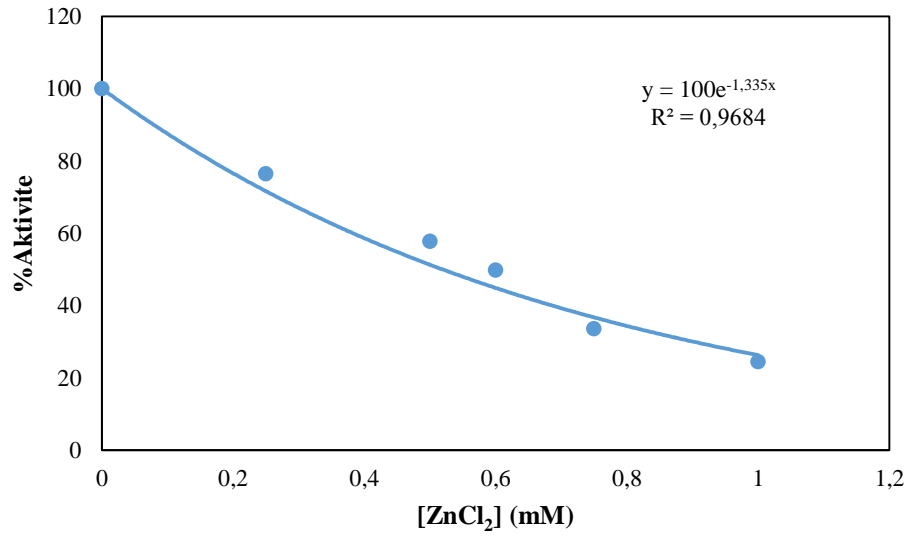
**Şekil 4.75.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 5 farklı Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



**Şekil 4.76.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

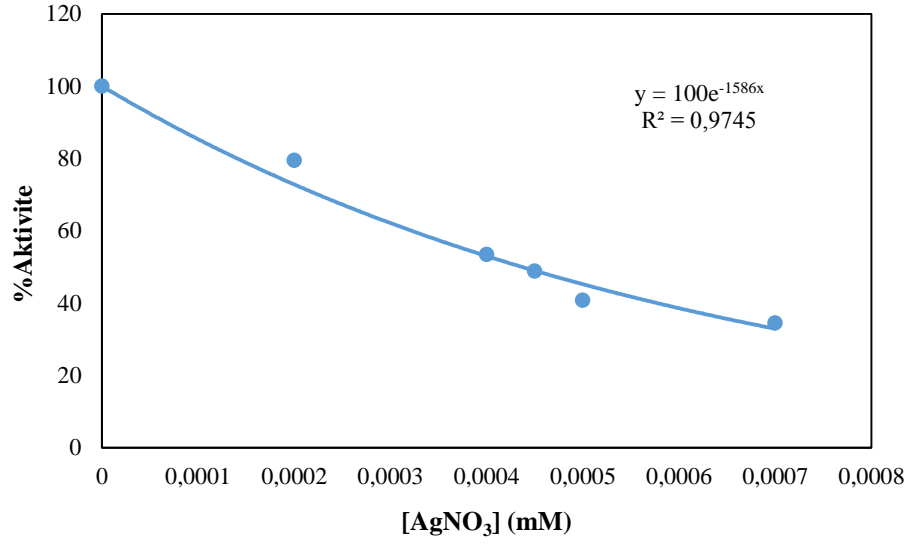


**Şekil 4.77.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

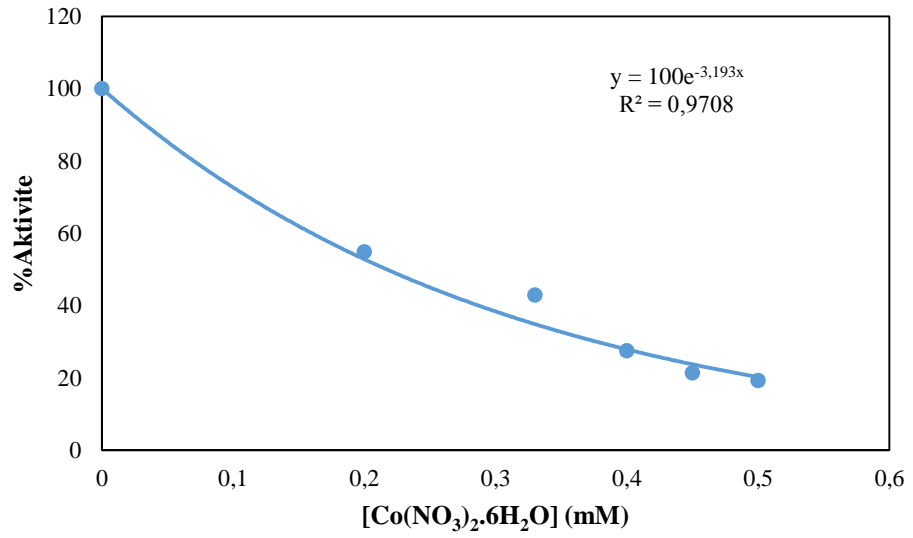


**Şekil 4.78.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 5 farklı ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

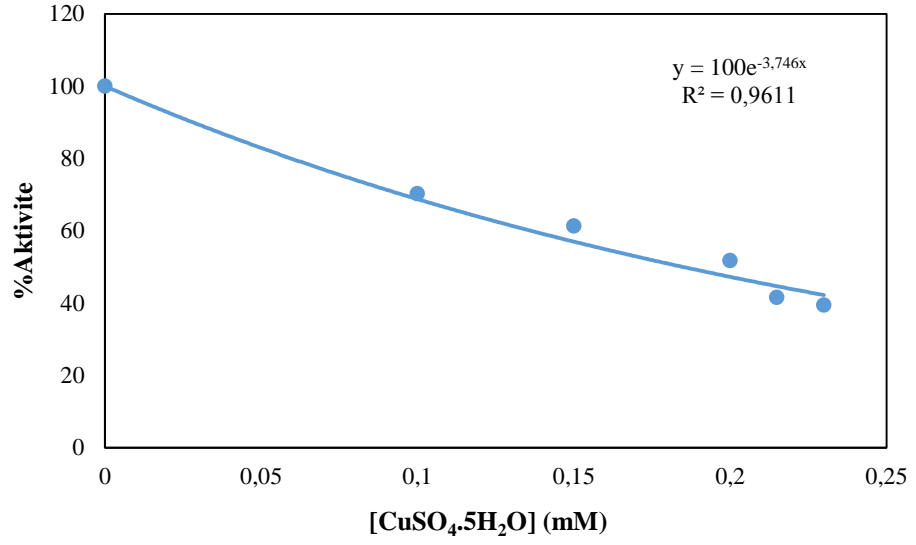




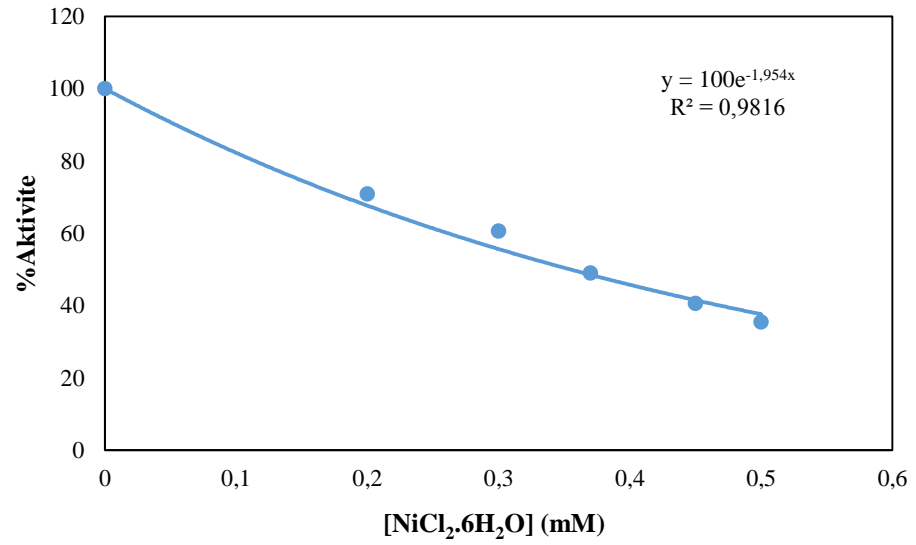
**Şekil 4.79.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



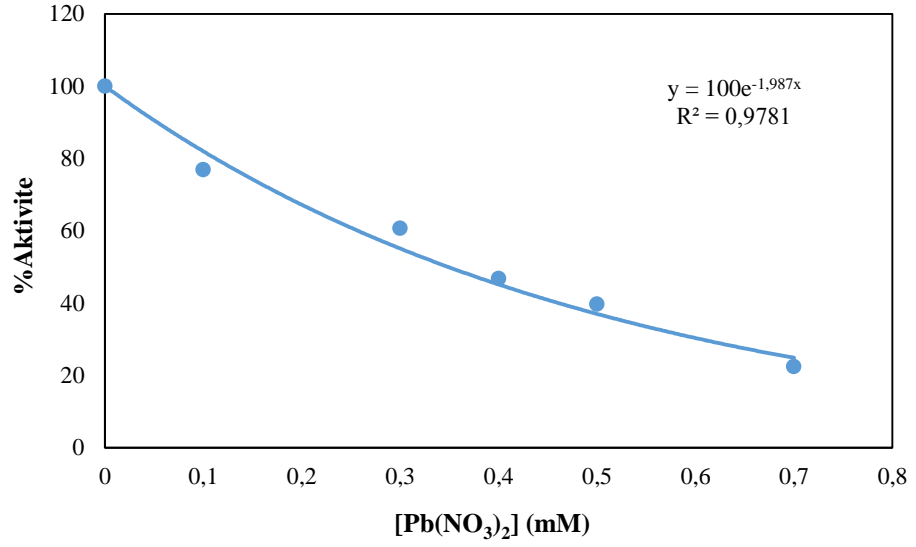
**Şekil 4.80.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 5 farklı Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



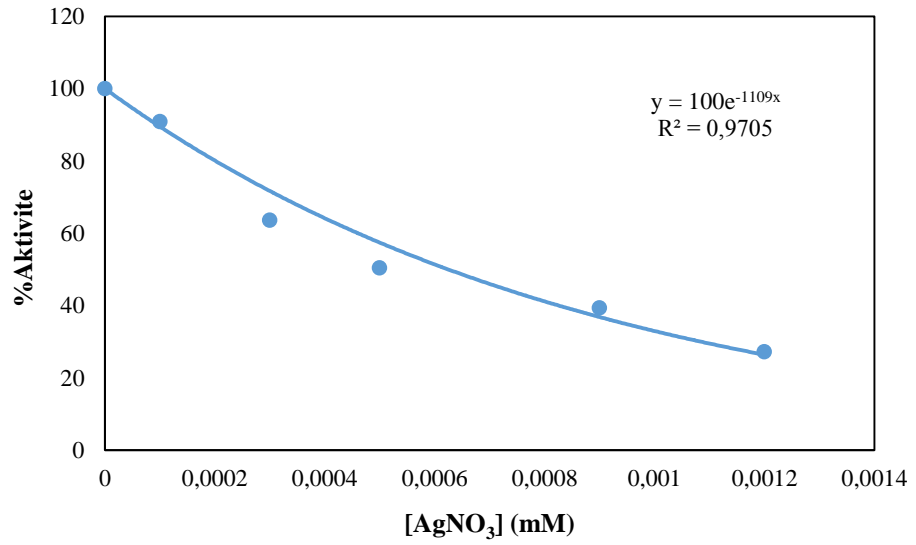
**Şekil 4.81.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



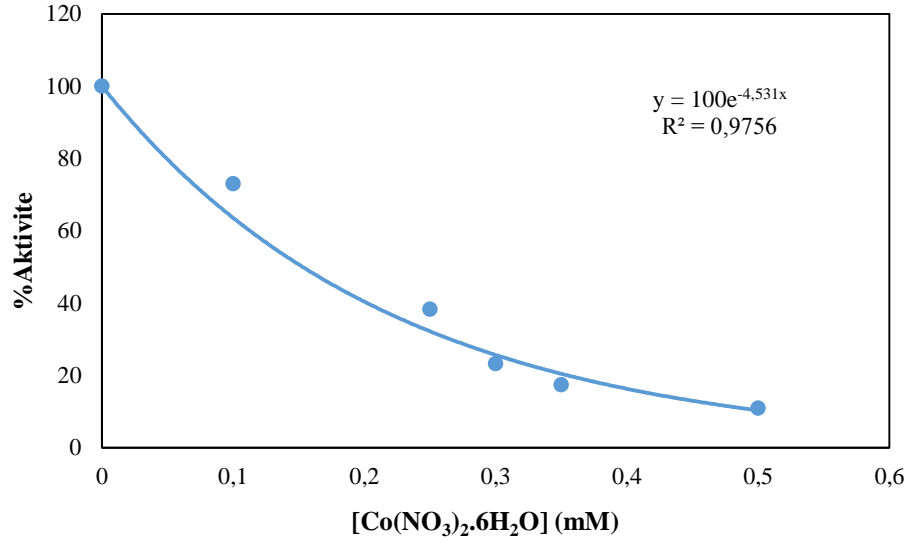
**Şekil 4.82.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



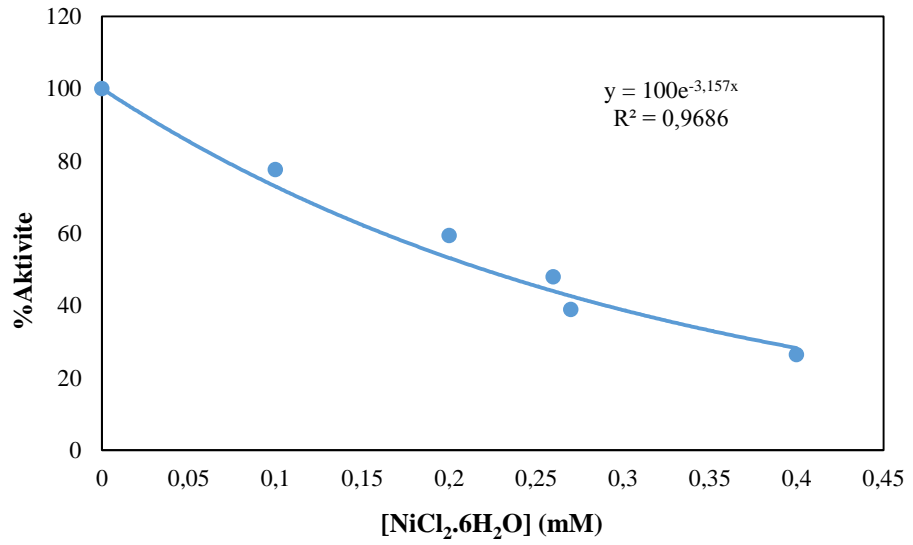
**Şekil 4.83.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



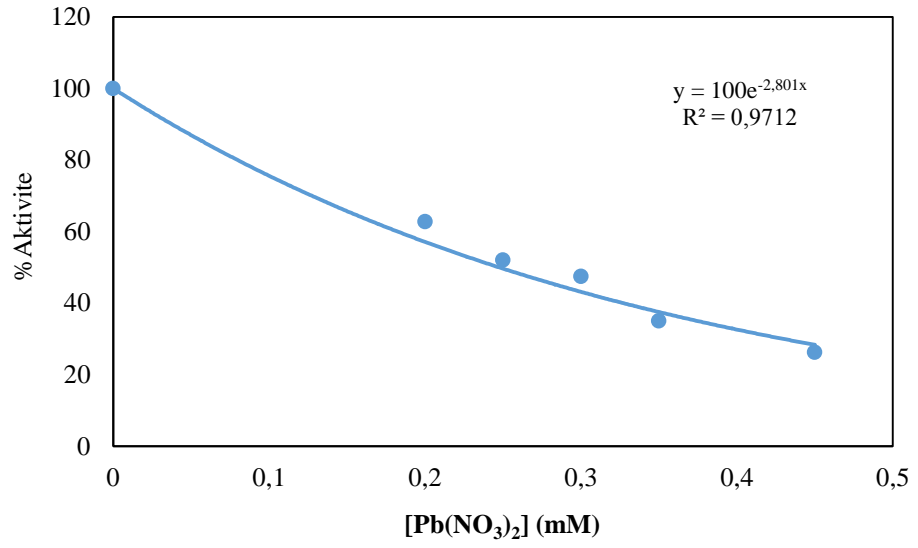
**Şekil 4.84.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



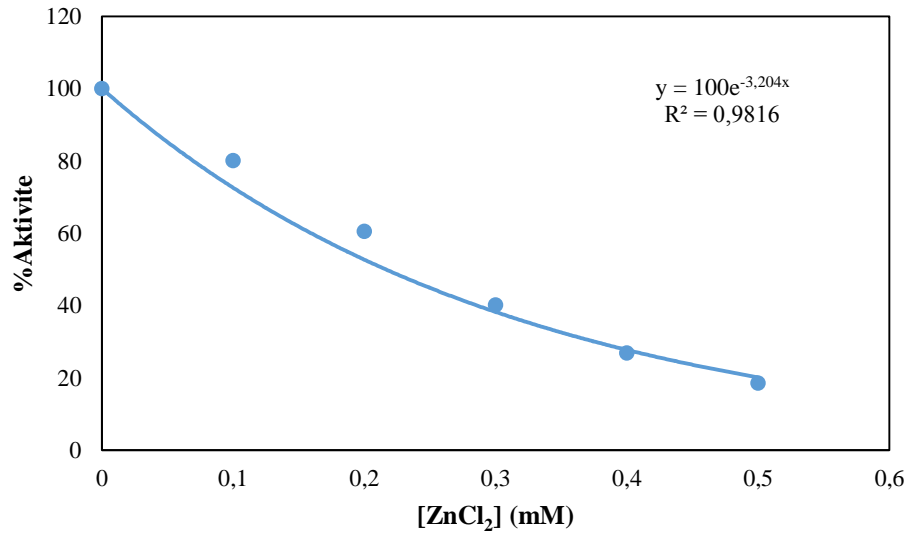
**Şekil 4.85.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 5 farklı  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



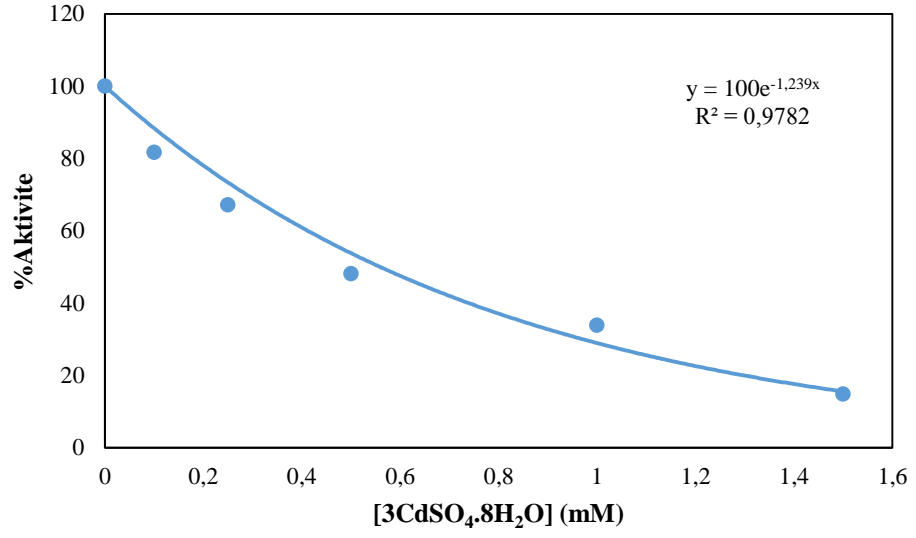
**Şekil 4.86.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 5 farklı  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



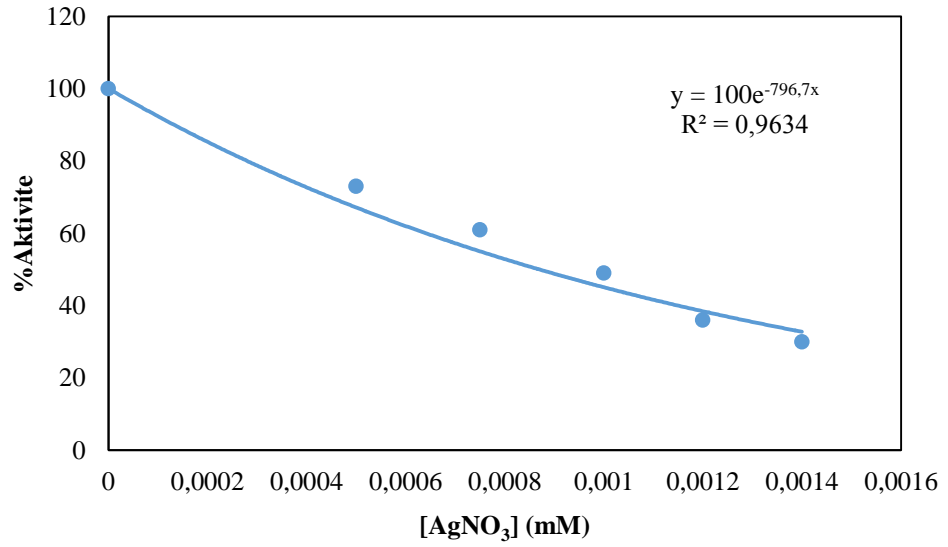
**Şekil 4.87.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



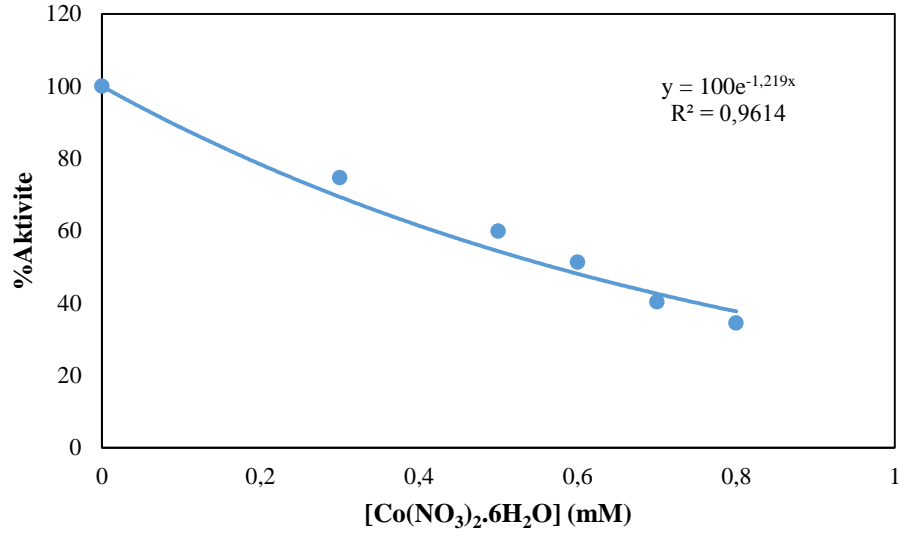
**Şekil 4.88.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 5 farklı ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



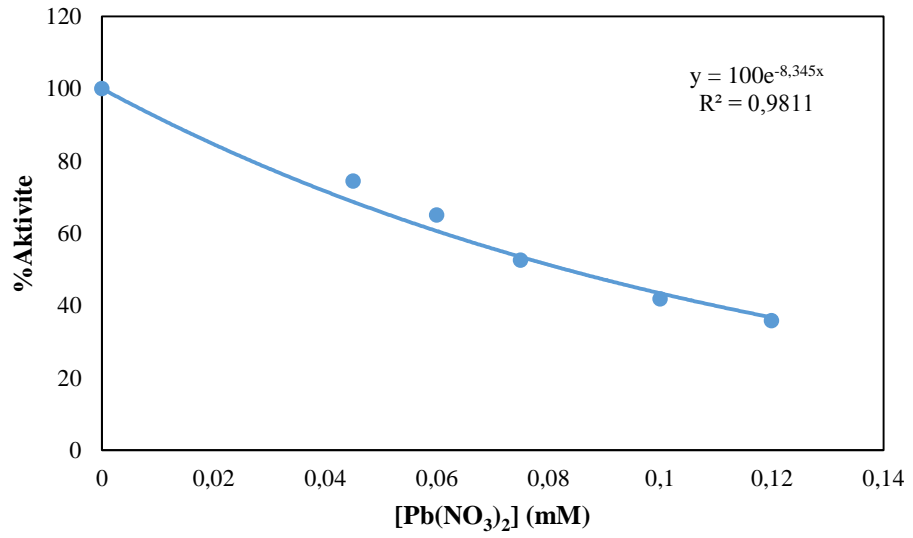
**Şekil 4.89.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 5 farklı 3CdSO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



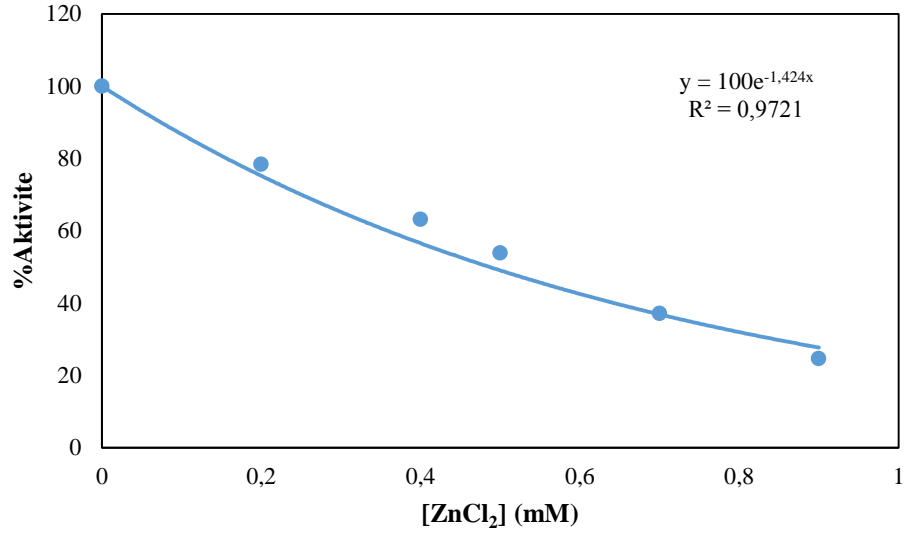
**Şekil 4.90.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



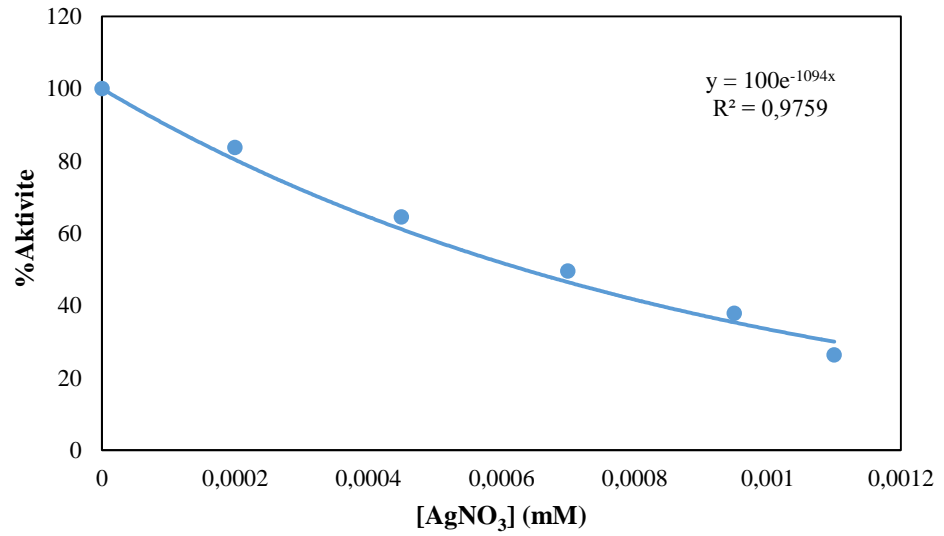
**Şekil 4.91.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 5 farklı  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



**Şekil 4.92.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 5 farklı  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

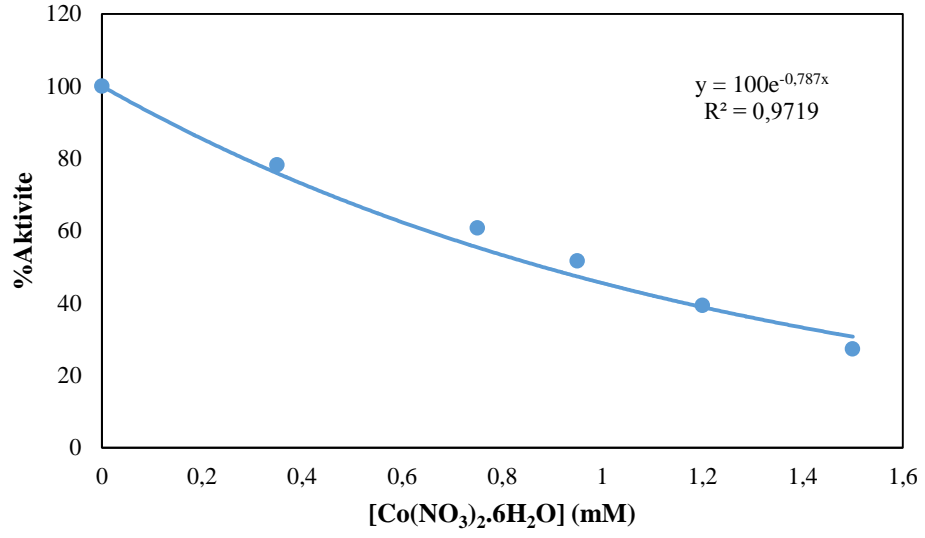


**Şekil 4.93.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 5 farklı ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

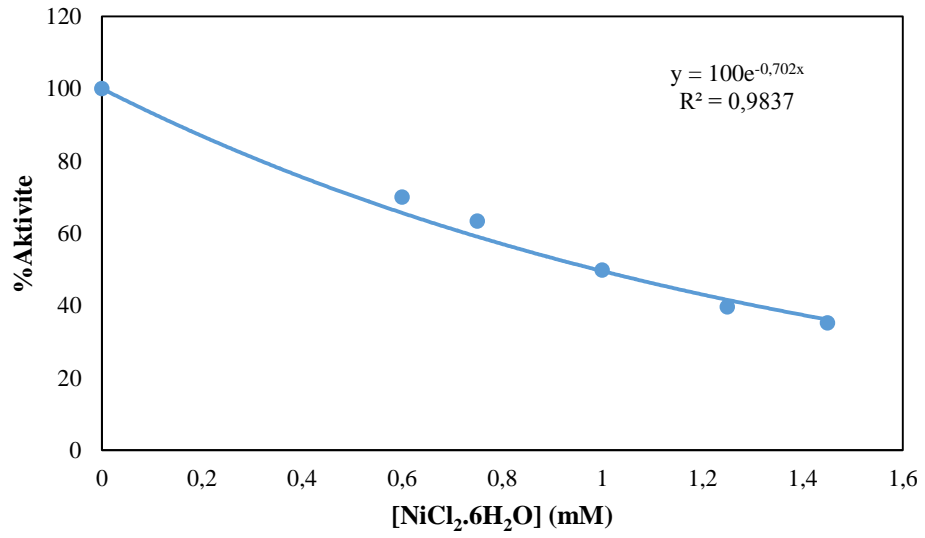


**Şekil 4.94.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

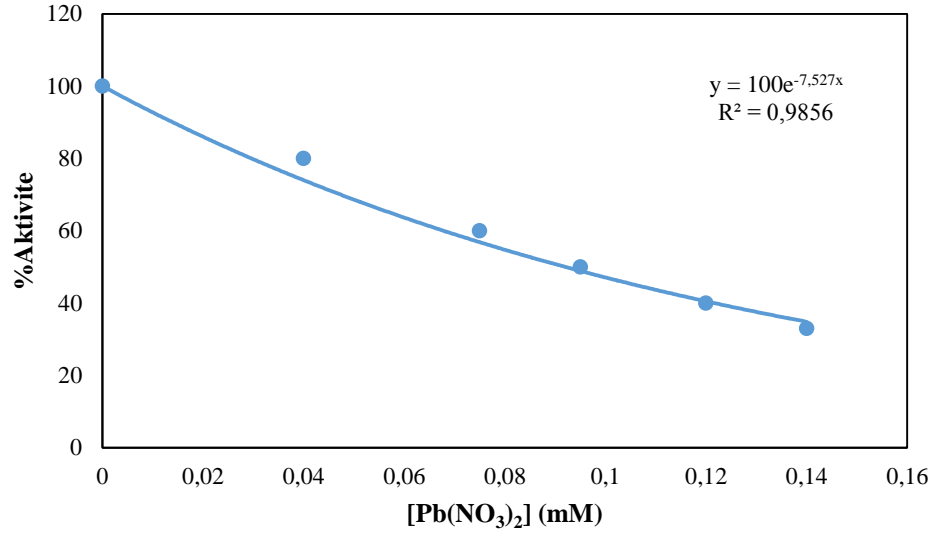




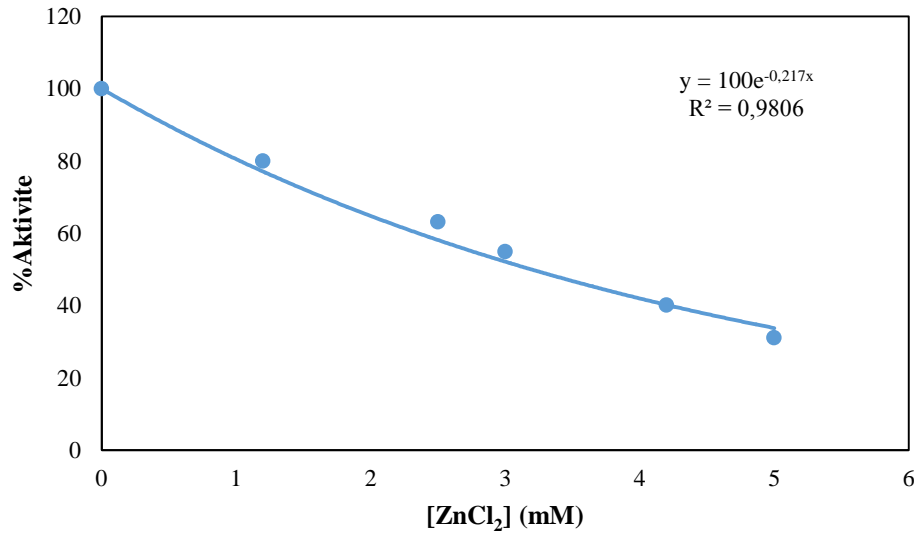
**Şekil 4.95.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 5 farklı Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



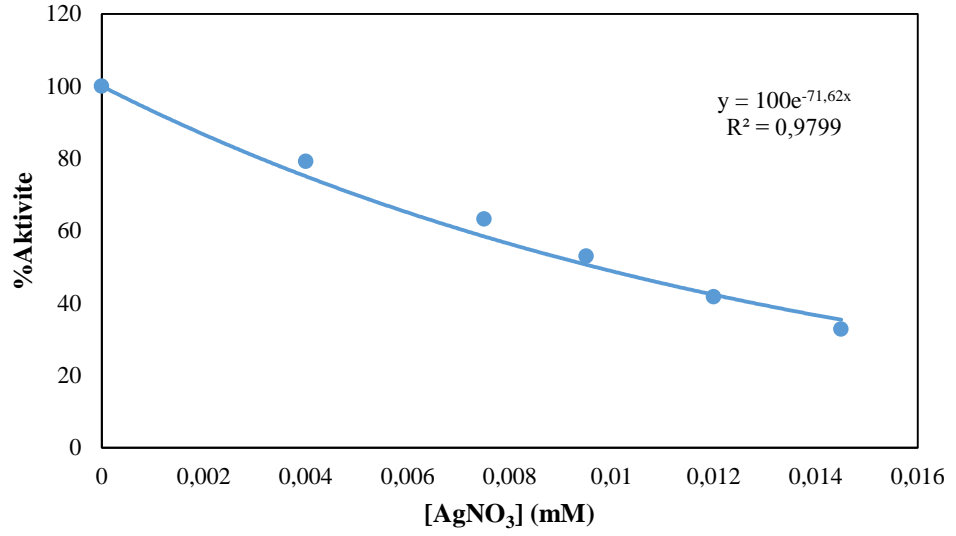
**Şekil 4.96.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 5 farklı NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



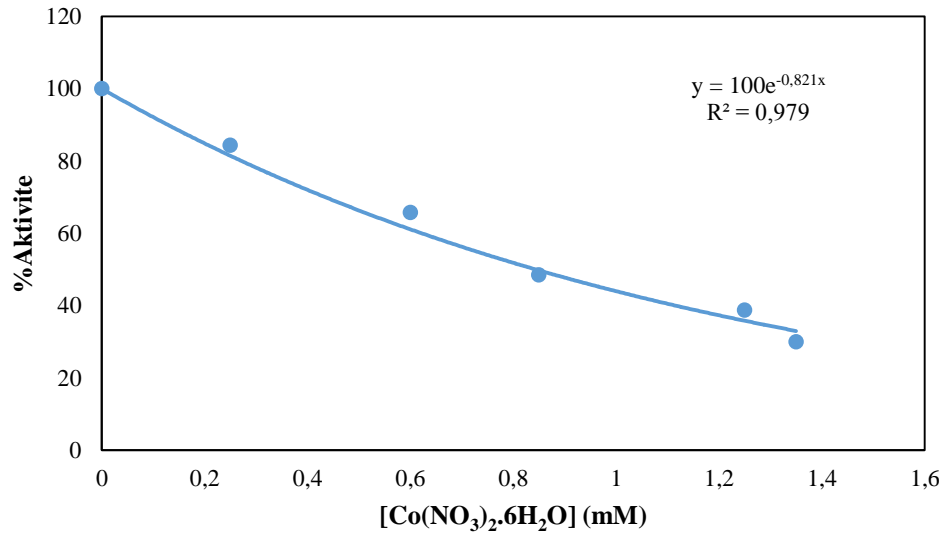
**Şekil 4.97.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



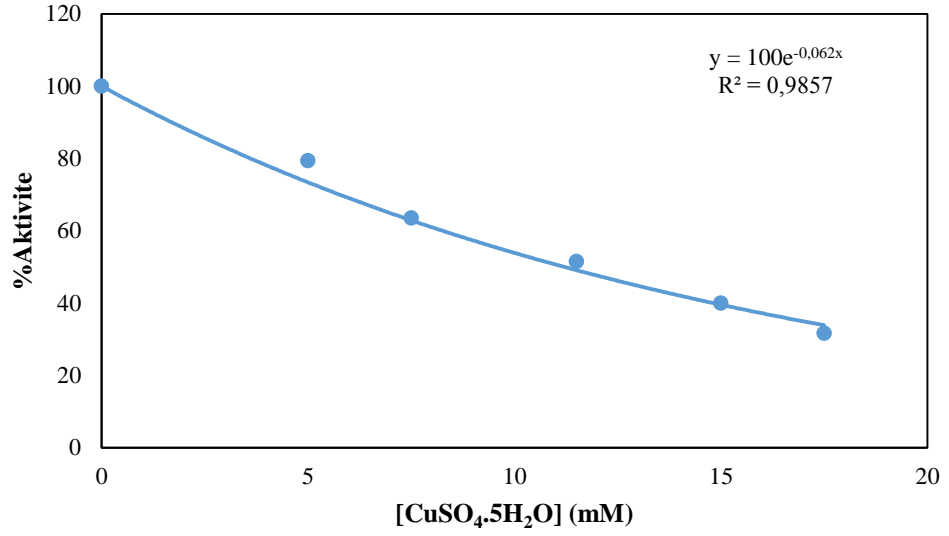
**Şekil 4.98.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 5 farklı ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



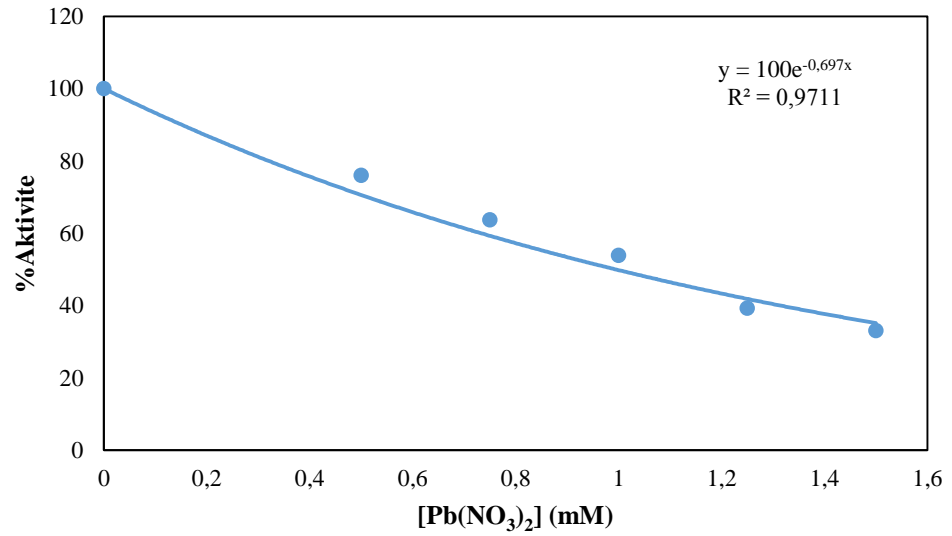
**Şekil 4.99.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 5 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



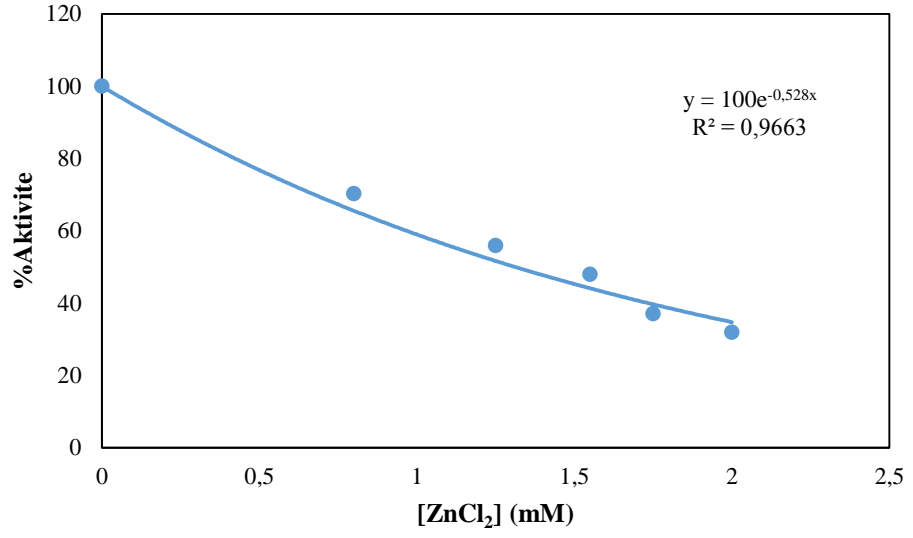
**Şekil 4.100.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 5 farklı Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



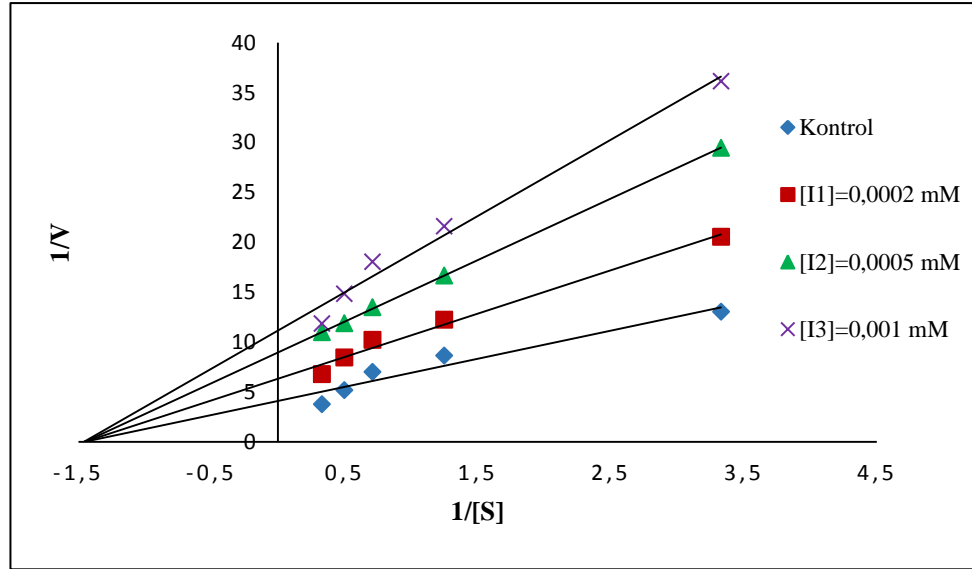
**Şekil 4.101.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 5 farklı CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



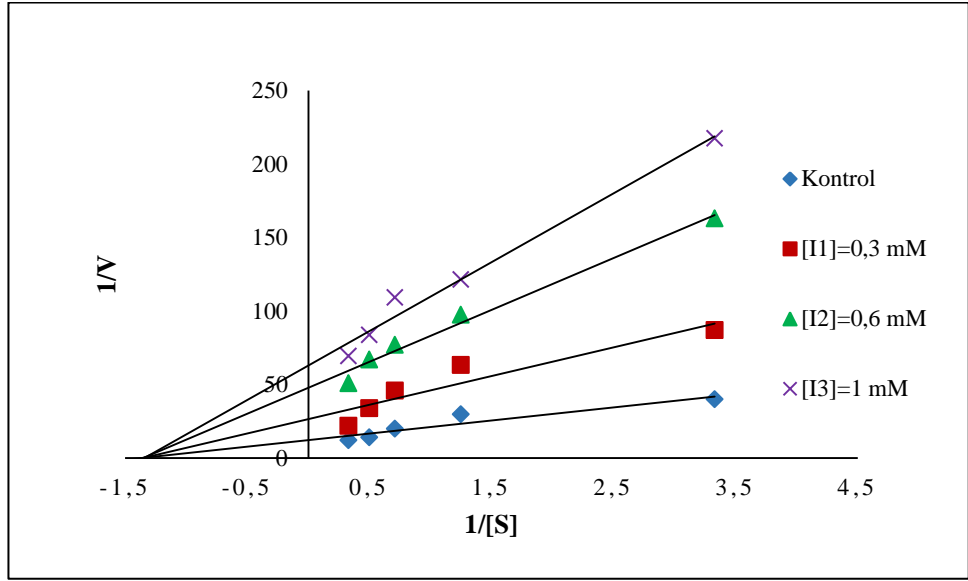
**Şekil 4.102.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 5 farklı Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



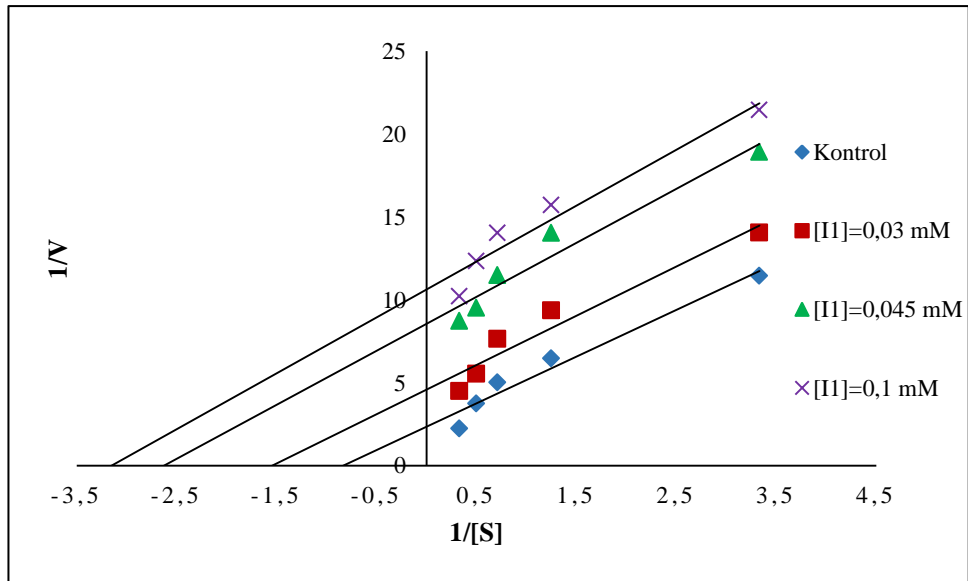
Şekil 4.103. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 5 farklı  $ZnCl_2$  konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği



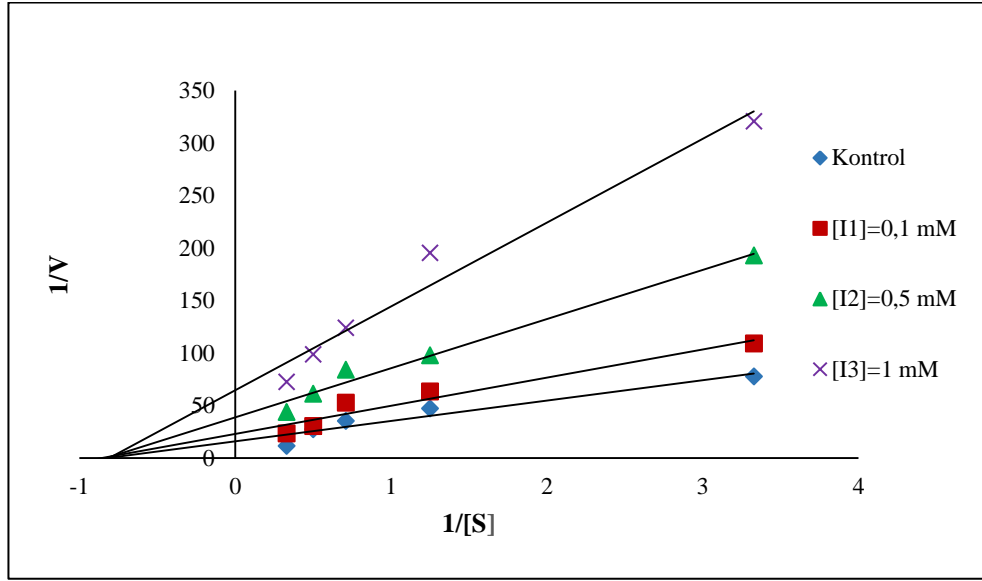
Şekil 4.104. *C. trutta* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $AgNO_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



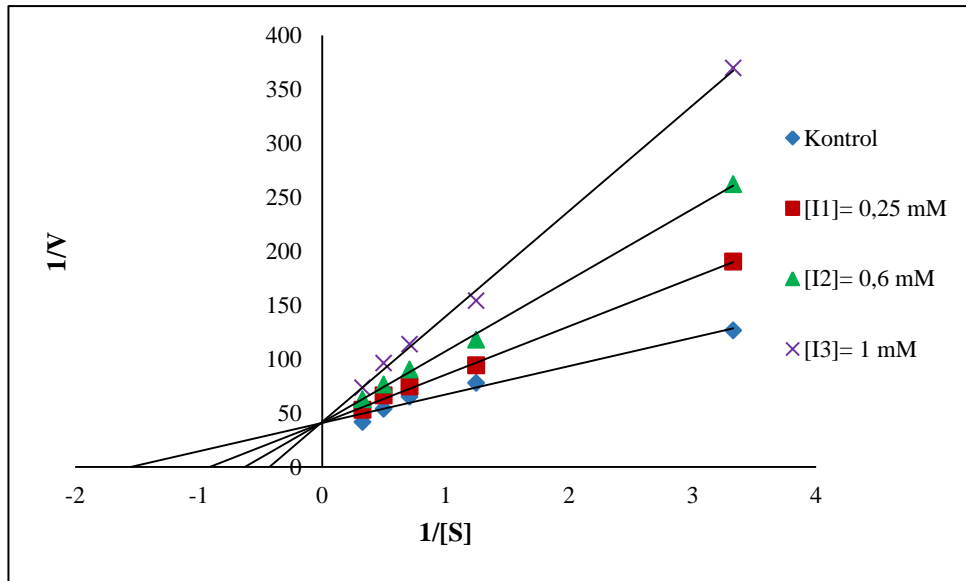
**Şekil 4.105.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



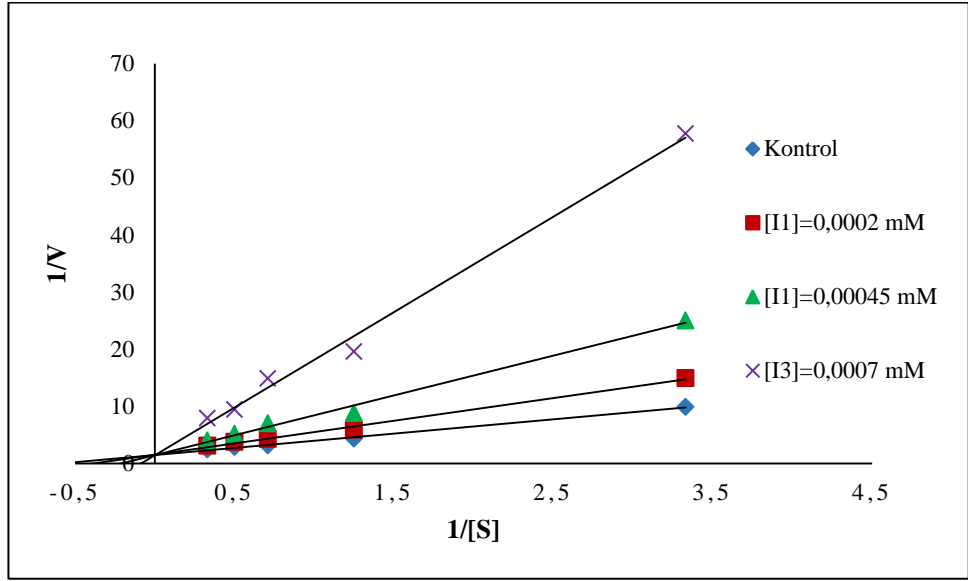
**Şekil 4.106.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



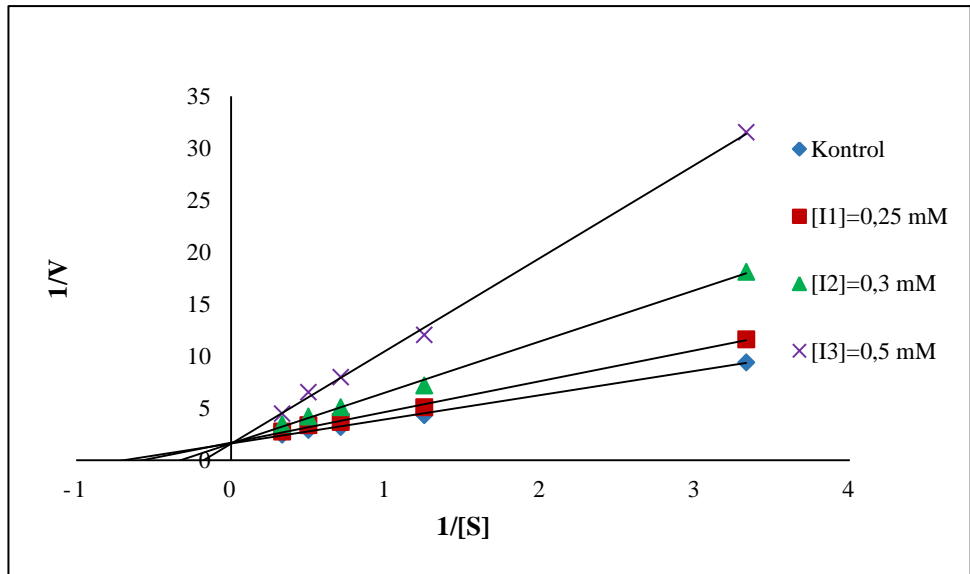
**Şekil 4.107.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



**Şekil 4.108.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{ZnCl}_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

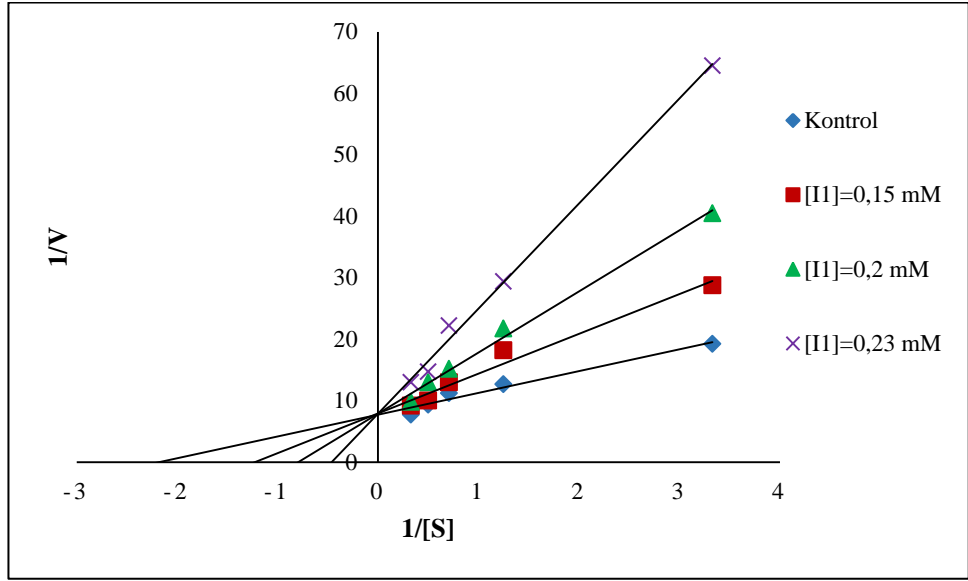


**Şekil 4.109.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 3 sabit AgNO<sub>3</sub> için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

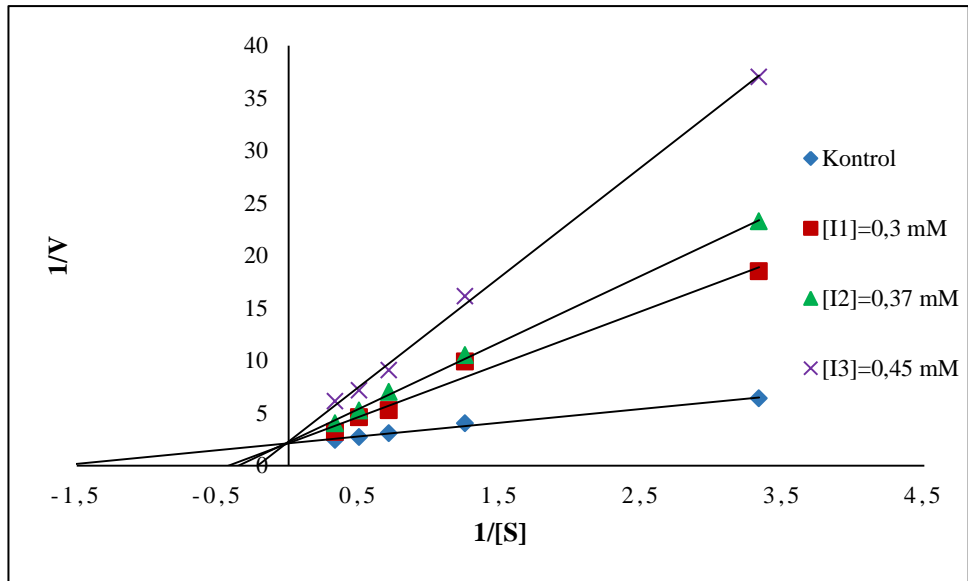


**Şekil 4.110.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 3 sabit Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

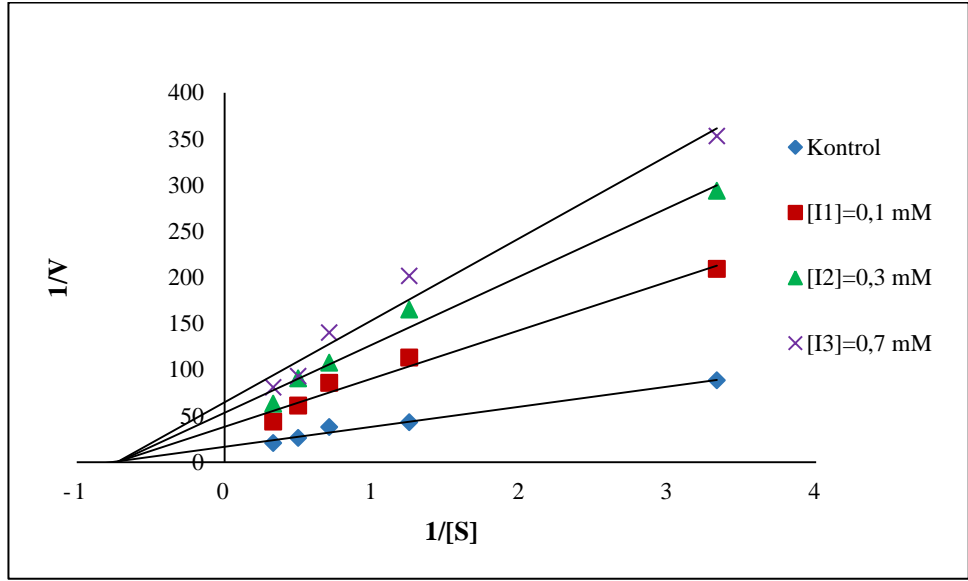




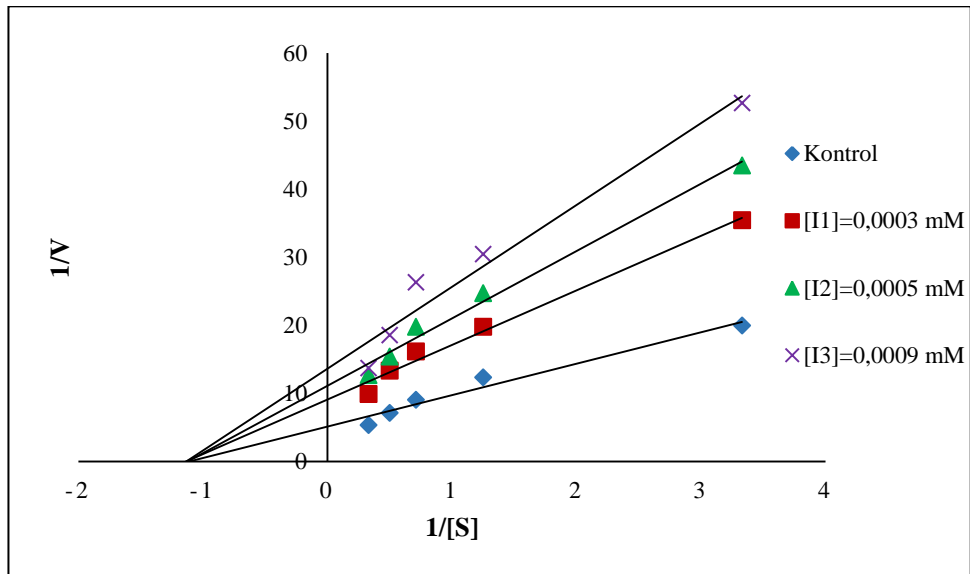
Şekil 4.111. *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



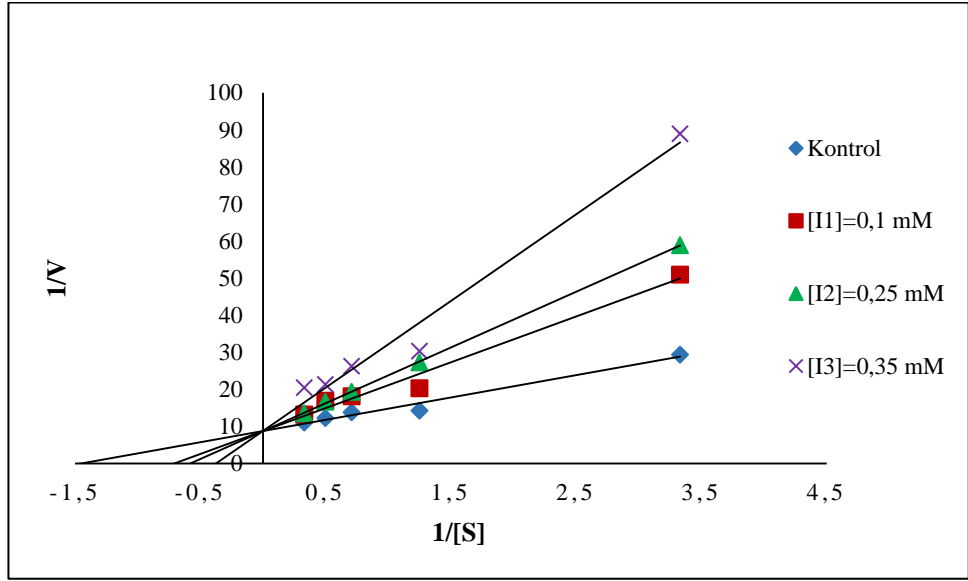
Şekil 4.112. *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



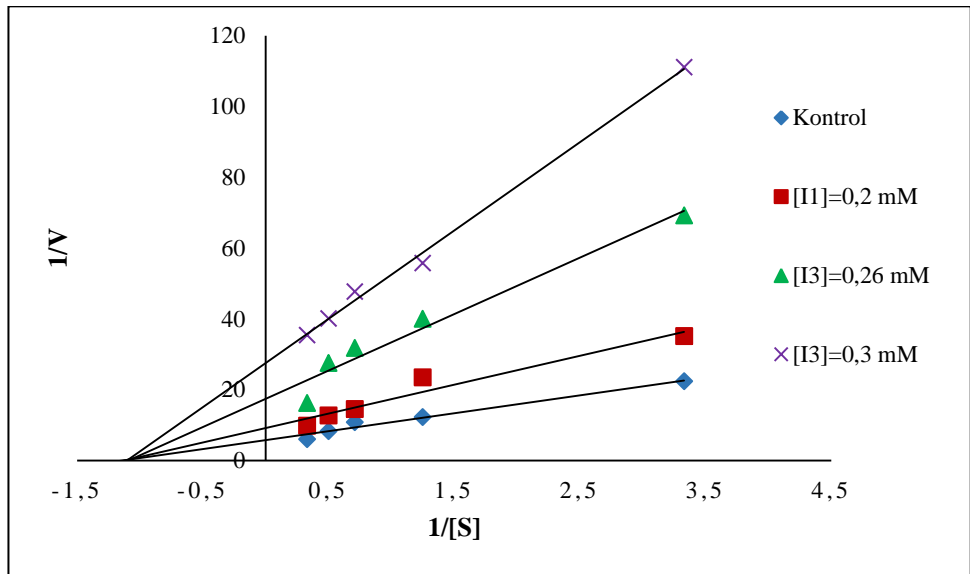
**Şekil 4.113.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $Pb(NO_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



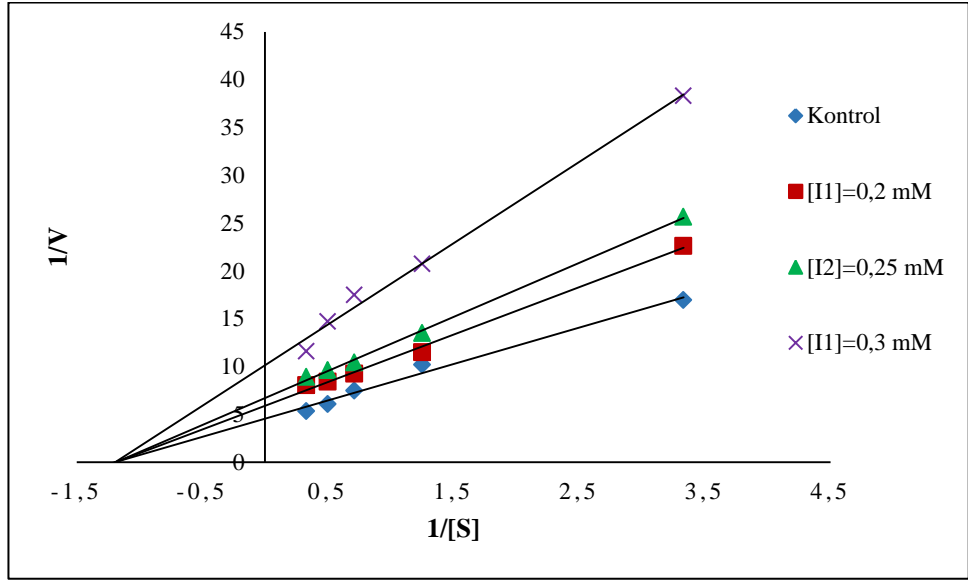
**Şekil 4.114.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $AgNO_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



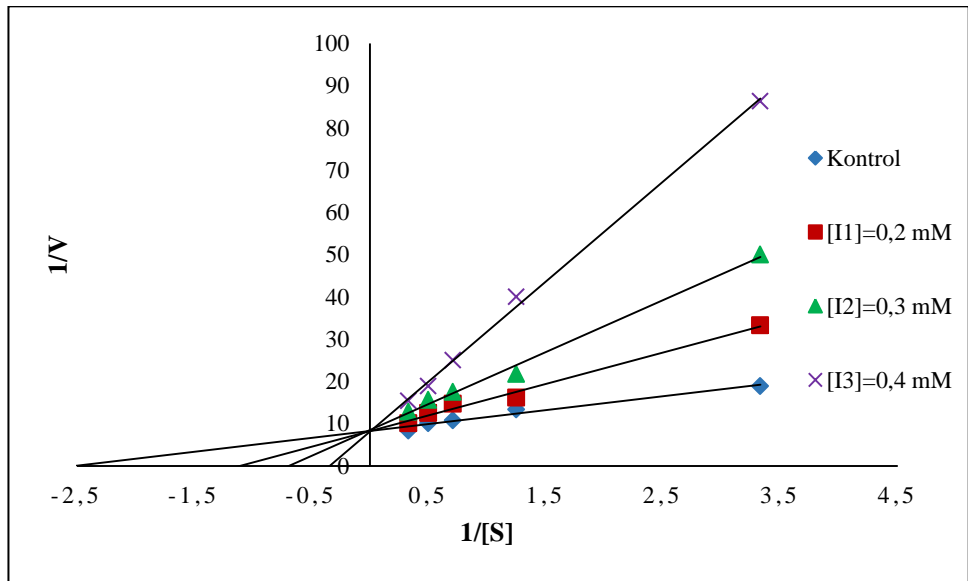
Şekil 4.115. *C. trutta* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



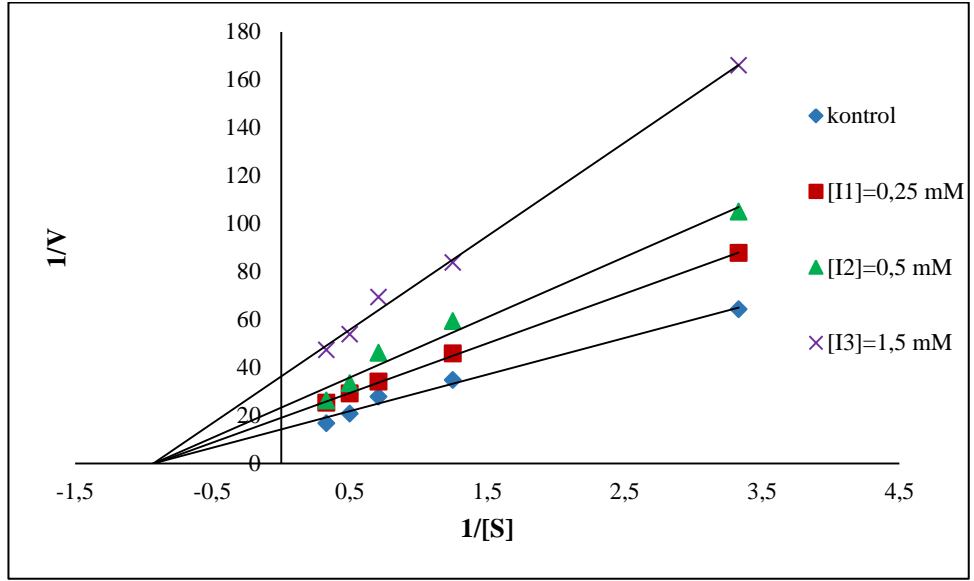
Şekil 4.116. *C. trutta* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



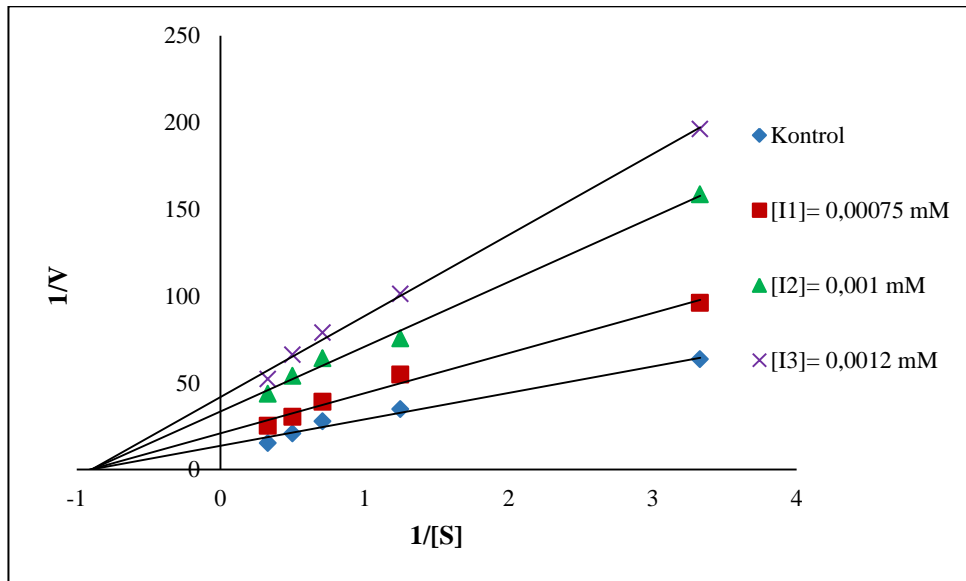
Şekil 4.117. *C. trutta* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $Pb(NO_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



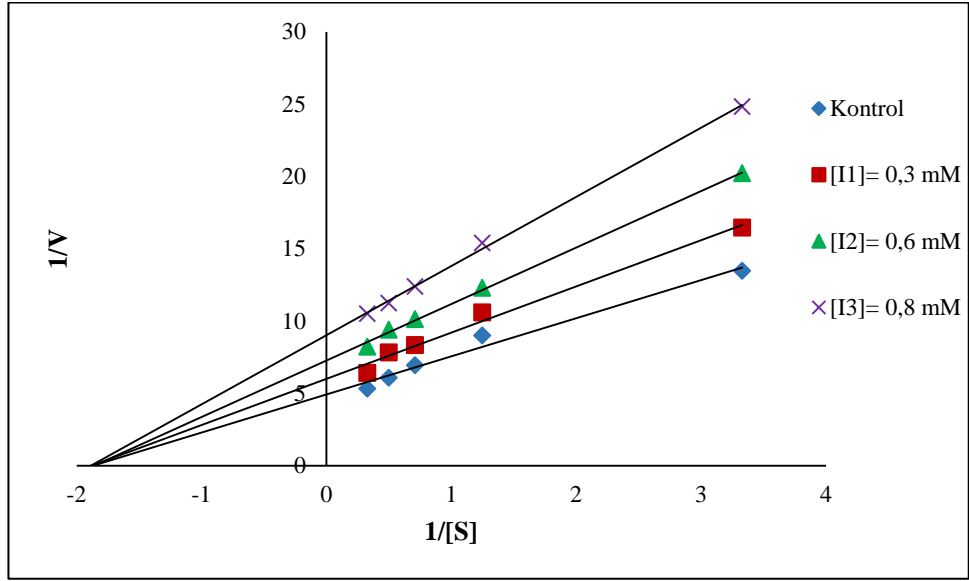
Şekil 4.118. *C. trutta* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $ZnCl_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



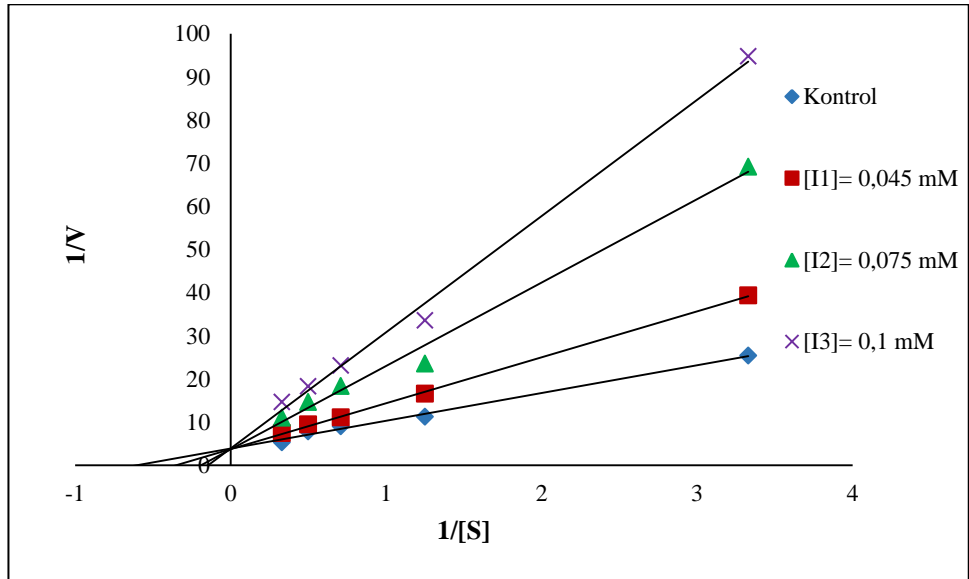
Şekil 4.119. *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



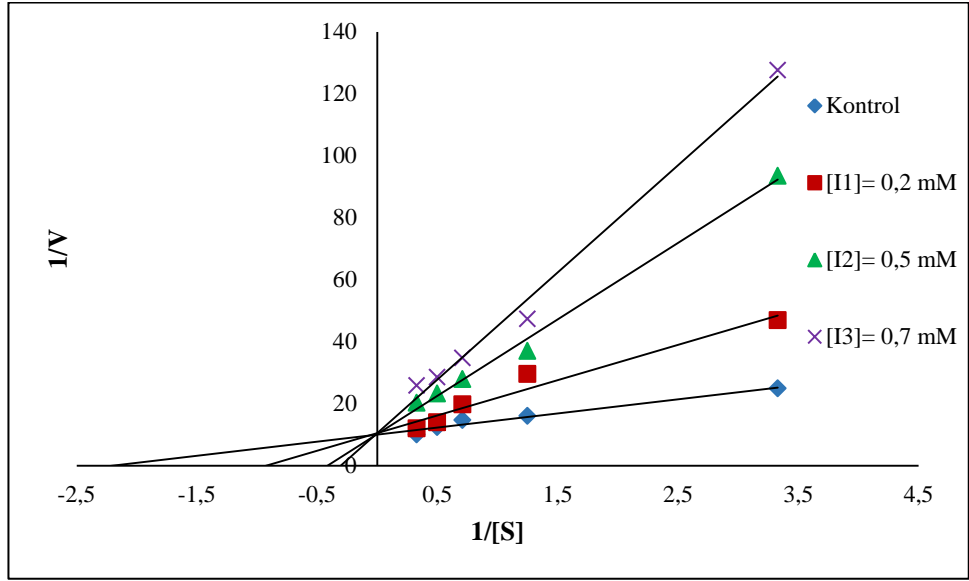
Şekil 4.120. *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



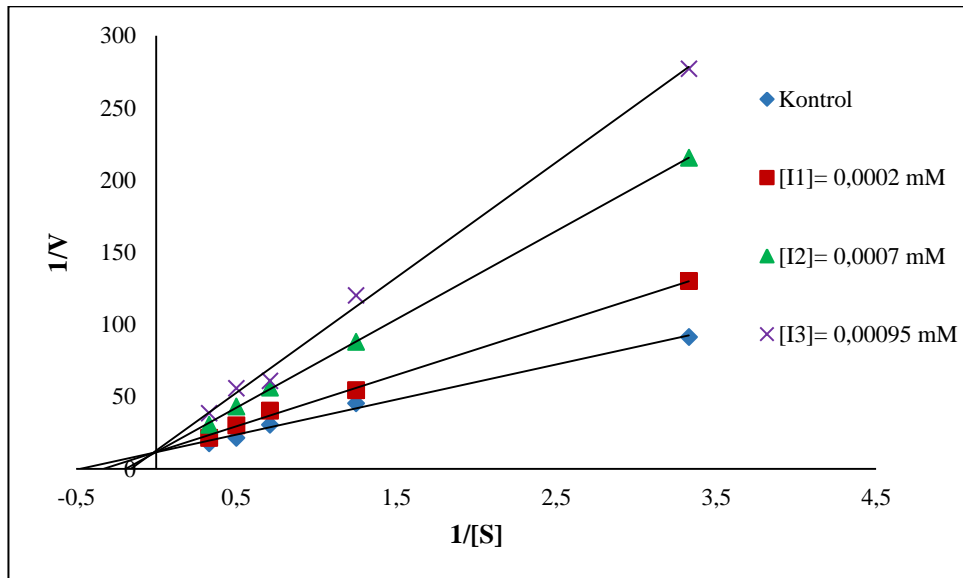
Şekil 4.121. *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



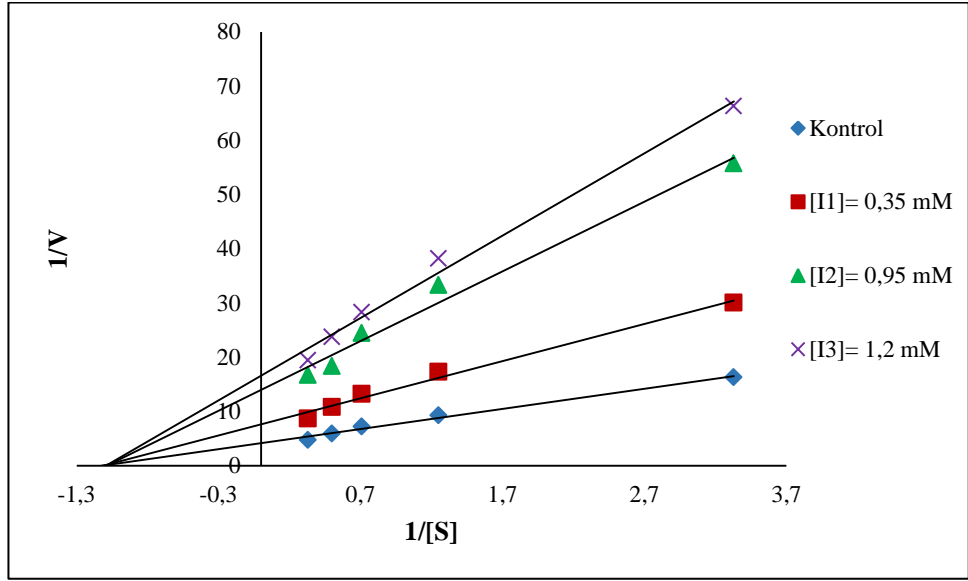
Şekil 4.122. *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 3 sabit  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



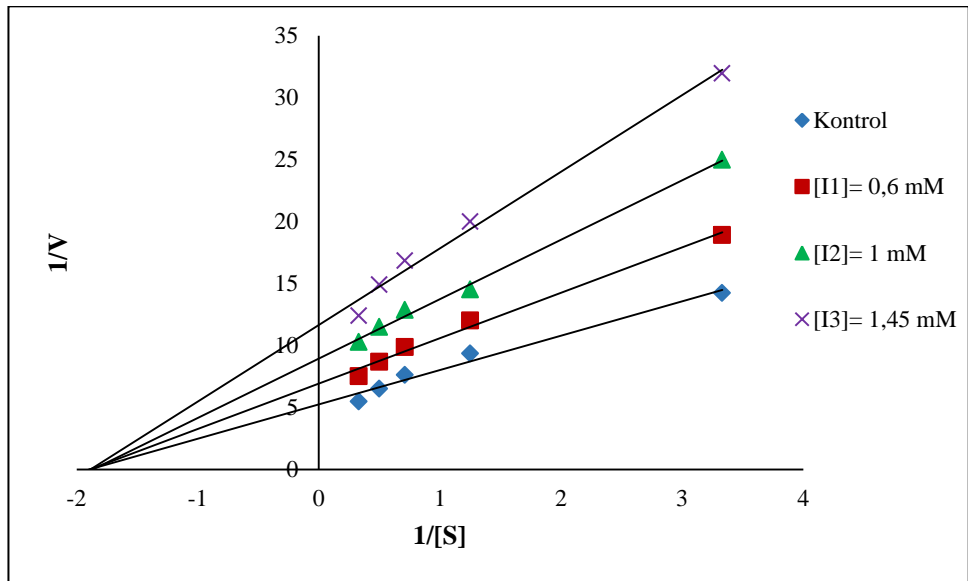
Şekil 4.123. *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için 3 sabit ZnCl<sub>2</sub> için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.124. *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 3 sabit AgNO<sub>3</sub> için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

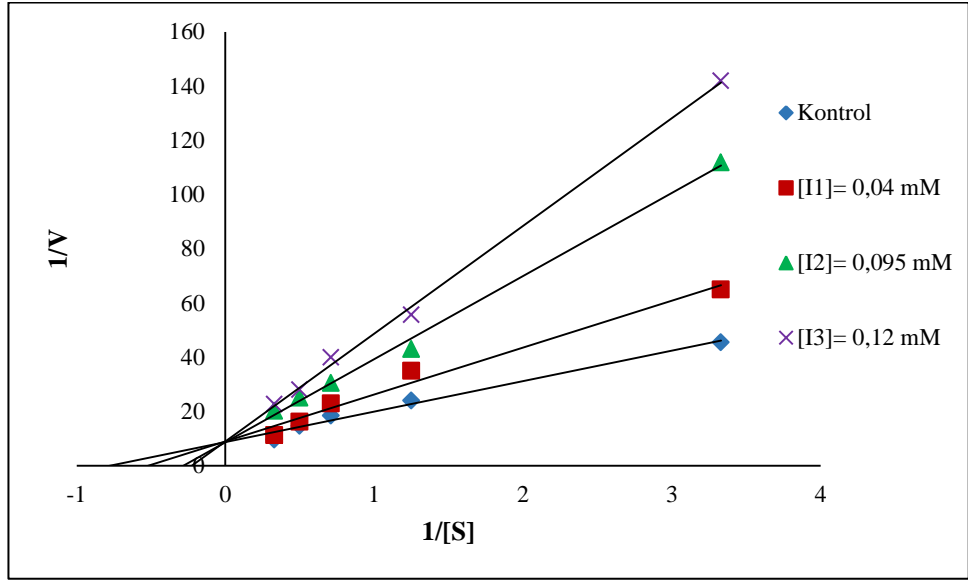


Şekil 4.125. *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

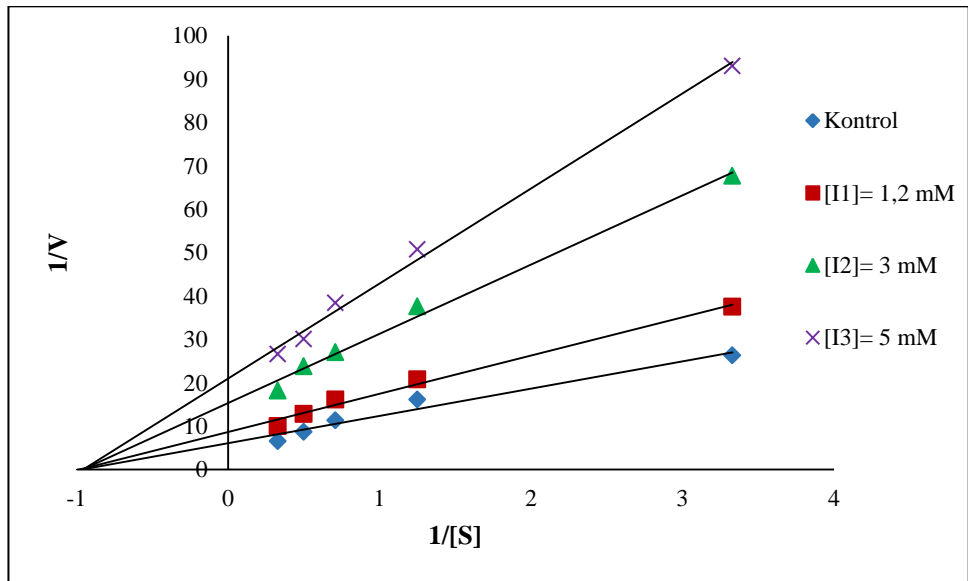


Şekil 4.126. *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

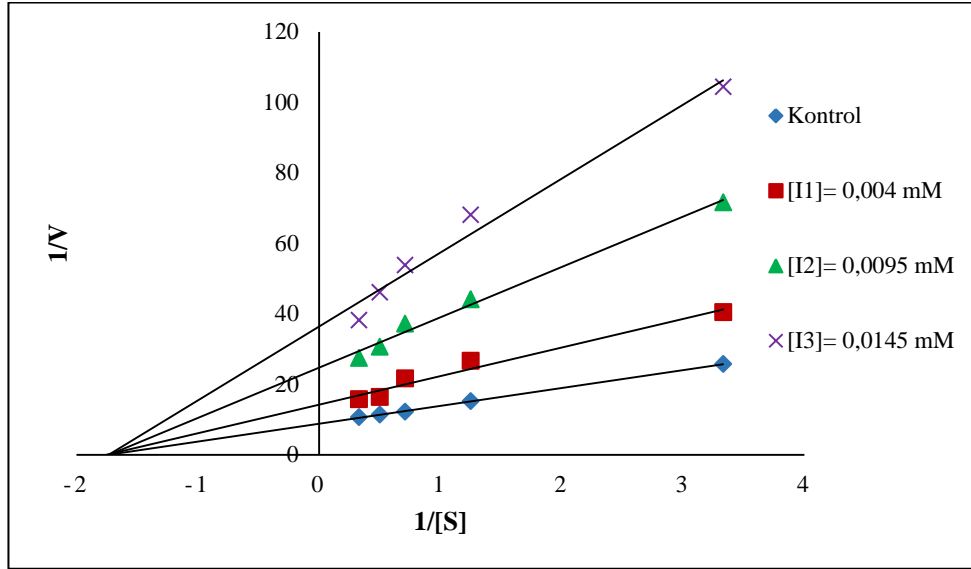




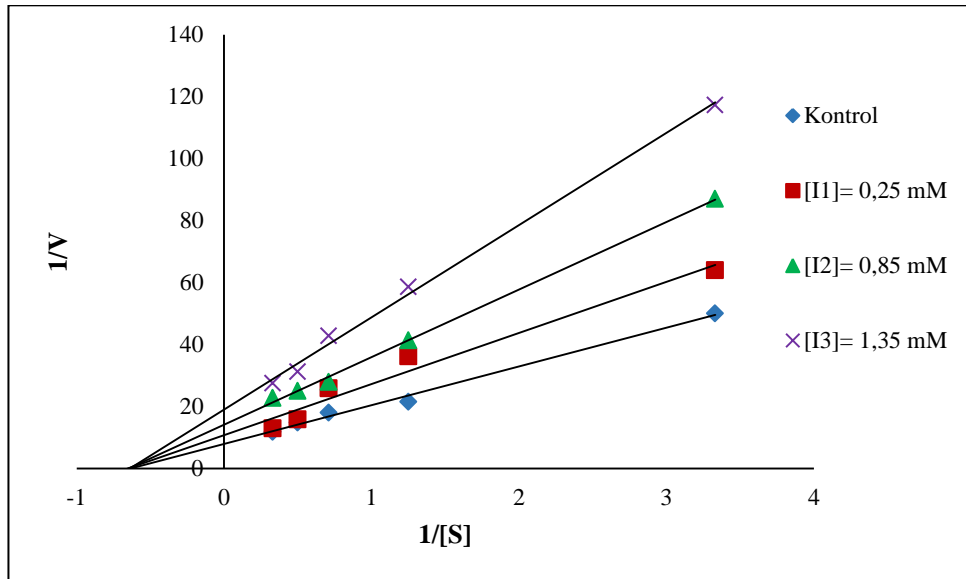
**Şekil 4.127.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $Pb(NO_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



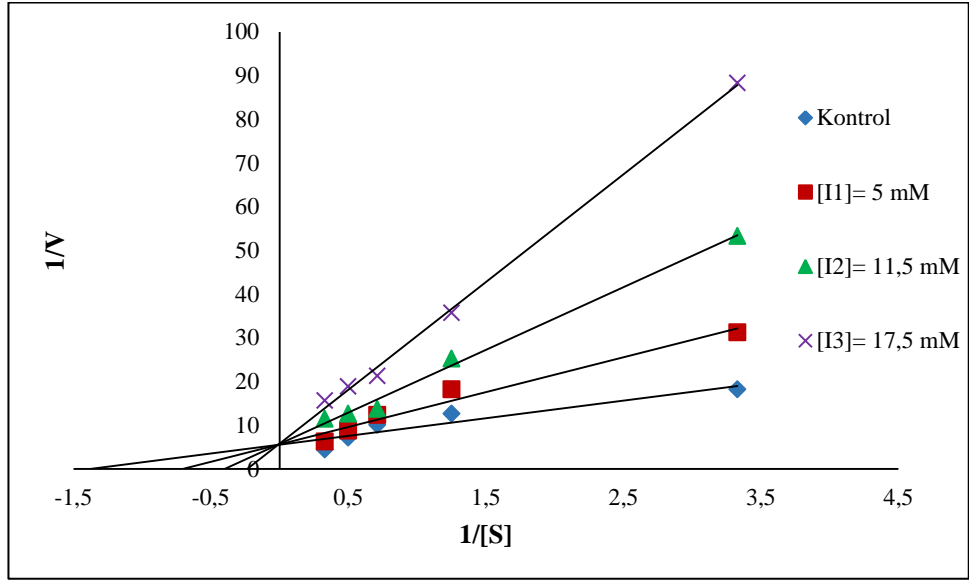
**Şekil 4.128.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için 3 sabit  $ZnCl_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



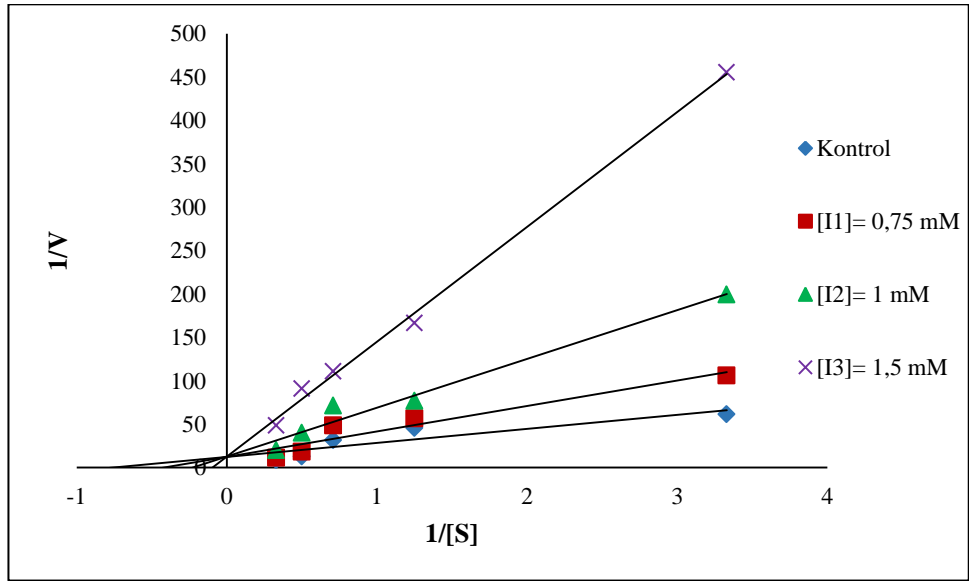
Şekil 4.129. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{AgNO}_3$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



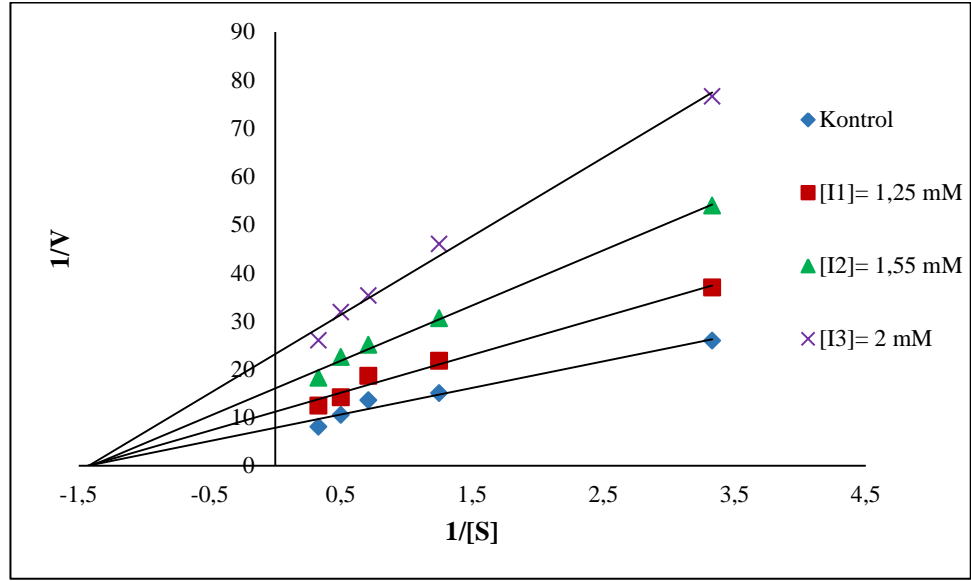
Şekil 4.130. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.131. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 4.132. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



**Şekil 4.133.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için 3 sabit  $ZnCl_2$  için 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

**Çizelge 4.31.** *C. trutta* böbrek GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $IC_{50}$  değerleri,  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	$IC_{50}$ (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon Tipi
$AgNO_3$	0,00078	$0,000394 \pm 0,0002$	Yarışmasız
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,622	$0,235 \pm 0,027$	Yarışmasız
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,722	$0,279 \pm 0,048$	Yarışmasız
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,073	$0,026 \pm 0,008$	Yarı Yarışmalı
$ZnCl_2$	0,519	$0,382 \pm 0,024$	Yarışmalı

**Çizelge 4.32.** *C. trutta* karaciğer GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $IC_{50}$  değerleri,  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	$IC_{50}$ (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon Tipi
$AgNO_3$	0,000437	$0,00025 \pm 0,000128$	Yarışmalı
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,185	$0,123 \pm 0,066$	Yarışmalı
$Pb(NO_3)_2$	0,349	$0,151 \pm 0,084$	Yarışmasız
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,355	$0,093 \pm 0,020$	Yarışmalı
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,217	$0,532 \pm 0,546$	Yarışmalı

**Çizelge 4.33.** *C. trutta* solungaç GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
ZnCl <sub>2</sub>	0,216	0,112± 0,047	Yarışmalı
AgNO <sub>3</sub>	0,000625	0,00045± 0,00008	Yarışmasız
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,247	0,482± 0,219	Yarışmasız
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,220	0,182± 0,138	Yarışmasız
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,153	0,128± 0,036	Yarışmalı

**Çizelge 4.34.** *C. c. umbla* böbrek GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
AgNO <sub>3</sub>	0,00087	0,000924 0,000481	Yarışmasız
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,569	1,203± 0,210	Yarışmasız
3CdSO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	0,559	0,824± 0,124	Yarışmasız
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,083	0,043± 0,017	Yarışmalı
ZnCl <sub>2</sub>	0,487	0,124± 0,018	Yarışmalı

**Çizelge 4.35.** *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
AgNO <sub>3</sub>	0,00063	0,00048± 0,00016	Yarışmalı
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,881	0,408± 0,009	Yarışmasız
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,987	1,506± 0,359	Yarışmasız
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,092	0,061± 0,016	Yarışmalı
ZnCl <sub>2</sub>	3,194	2,304± 0,486	Yarışmasız

**Çizelge 4.36.** *C. c. umbla* solungaç GR enzimi için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC <sub>50</sub> (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi
AgNO <sub>3</sub>	0,00968	0,0055± 0,00096	Yarışmasız
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,844	0,921± 0,196	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	11,180	4,493± 0,806	Yarışmalı
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,944	0,533± 0,377	Yarışmalı
ZnCl <sub>2</sub>	1,313	1,850± 1,034	Yarışmasız

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağır metaller sucul ortama girdikten sonra balıklar tarafından sudan, solungaç, deri ve ağız yoluyla doğrudan alınabilmekte ve besin zincirine dahil olarak (Vighi 1981) ekosistemi ve dolaylı olarak insanları tehdit edebilmektedir. Balıklar, çevresel kirleticiler için biyoindikatör olarak su ekosistemlerinin kalitesinin belirlenmesinde geniş çapta kullanılan organizmalardır (Kock *et al.* 1996; Alak vd 2013). Ağır metaller balıkların vücutlarına kolayca girmekte ve çeşitli dokularda özellikle spesifik dokularda (böbrek, karaciğer, solungaç gibi) birikebilmektedir (Varshney 1991; Kargın 1998; Uçar ve Atamanalp 2008).

Genellikle canlı organizmaların uzun dönemli ağır metalleri de içeren toksik maddelere maruz kalması, önce organ ve dokularda birikime sonrada bu kirleticilerin zararlı etkilerinin bir sonucu olarak moleküler düzeyde dönüşümsüz değişikliklerin oluşmasına neden olmaktadır. Kirleticilerin olumsuz etkilerinden biri de organizmalardaki biyolojik makro moleküllere (protein, lipid, DNA gibi) zarar vererek oksidatif strese neden olan ROT'ları oluşturmalarıdır. Biyolojik sistemler oluşan bu strese karşı antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Balık kanındaki antioksidan parametreler akuatik organizmalar üzerine kirleticilerin etkilerinin belirlenmesi ve çevresel izleme çalışmaları için önemli biyomarkırlar olarak kabul edilmektedir (Hageman *et al.* 1992; Adams *et al.* 1994). Antioksidant enzimler metallerin neden olduğu oksidatif strese karşı hayvanların önemli bir savunma sistemidir ve hücrelerdeki hasar antioksidan enzimlerin yüksek aktivitesi ile kontrol edilmektedir (Fırat 2007).

Bu çalışmada içsularımızda doğal olarak bulunan, et kalitesi yüksek, ekonomik olarak değerli ve bölge halkı tarafından severek tüketilen Karabalık (*C. trutta*) ve Siraz (*C. c. umbla*) balıklarının böbrek, karaciğer ve solungaçlarından saflaştırılan antioksidan enzimler olan G6PD ve GR enzimleri üzerine bazı metallerin ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) etkileri incelenmiştir.

Literatürde çeşitli kaynaklardan G6PD ve GR enzimlerinin saflaştırılması ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Tekman 2007; Altun 2010; Adem 2011; Çam 2011; Çomaklı *et al.* 2013; Hu *et al.* 2013). Bu çalışmalarda en çok kullanılan saflaştırma yöntemi, afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Saflaştırılmak istenen molekül veya biyolojik ünitenin, “matriks” adı verilen çözülme-yen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand), spesifik ve tersinir olarak bağlanması yolunu kullanan bir tekniktir. Bu sayede, çok yorucu ve zor olan birçok ayırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilmekte ve yüksek verimle saflaştırılan enzimler elde edilmektedir (Keha ve Küfrelioğlu 2004). Bu özelliklerinden dolayı çalışmada, enzimlerinin saflaştırılması için afinite kromatografisi ve afinite kromatografisi kolon materyali olarak 2',5'-ADP Sepharose-4B kullanılmıştır. Ayrıca afinite kromatografisinden önce homojenatın hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi işlemleride uygulanmıştır.

Balıkların böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD ve GR enzimlerini saflaştırmak için homojenat tamponu yardımıyla homojenat hazırlandı. Elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak çökeltme aralıkları belirlendi. Çökeltme aralıkları belirlenen numuneler diyaliz torbasına konularak, diyaliz tamponuna karşı bir süre bekletildi. Diyaliz sonucu elde edilen numune 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kolonuna tatbik edildi. Bu saflaştırma işlemleri yapılırken sıcaklığın kontrol altında tutulması çok önemlidir. Bu nedenle saflaştırma işlemleri +4°C'de gerçekleştirildi. Böylece mümkün olduğu kadar aktivite kaybı önlenmeye çalışıldı (Tekman 2007; Çam 2011).

Yapılan çalışmada, *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD ve GR enziminin saflaştırma sonuçları şunlardır:

*C. trutta* böbrek G6PD enzimi, %20,38 verimlilikle, spesifik aktivitesi 120,52 EÜ/mg protein olarak ve 576,65 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.7). *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi, %31,15 verimlilikle, spesifik aktivitesi 15,34 EÜ/mg protein olarak ve 568,27 kat

saflaştırıldı (Çizelge 4.8). *C. trutta* solungaç G6PD enzimi, %34,43 verimlilikle, spesifik aktivitesi 53,06 EÜ/mg protein olarak ve 803,9 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.9).

*C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi, %22,7 verimlilikle, spesifik aktivitesi 11,26 EÜ/mg protein olarak ve 402,14 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.10). *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi, %19,28 verimlilikle, spesifik aktivitesi 31,52 EÜ/mg protein olarak ve 3353,19 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.11). *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi, %23,15 verimlilikle, spesifik aktivitesi 22,83 EÜ/mg protein olarak ve 736,5 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.12).

*C. trutta* böbrek GR enzimi, %35,4 verimlilikle, spesifik aktivitesi 11,91 EÜ/mg protein olarak ve 794 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.25). *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi, %21,07 verimlilikle, spesifik aktivitesi 16,167 EÜ/mg protein olarak ve 734,86 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.26). *C. trutta* solungaç G6PD enzimi, %38,8 verimlilikle, spesifik aktivitesi 19,11 EÜ/mg protein olarak ve 910,05 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.27).

*C. c. umbla* böbrek GR enzimi, %23,09 verimlilikle, spesifik aktivitesi 14,75 EÜ/mg protein olarak ve 389,18 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.28). *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi, %17,24 verimlilikle, spesifik aktivitesi 16,84 EÜ/mg protein olarak ve 925,11 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.29). *C. c. umbla* solungaç GR enzimi, %48,74 verimlilikle, spesifik aktivitesi 13,54 EÜ/mg protein olarak ve 1166,98 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.30).

Enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapıp fotoğrafı çekildi (Şekil 3.4, 3.5, 3.6, 3.7). Elektroforez fotoğraflarından da anlaşılacağı gibi saflaştırılan enzimler elektroforez jelinde tek bant olarak görülmektedir. Bu da saflaştırma işleminin başarıyla yapıldığını ispatlamaktadır. SDS-PAGE sonucunda elde edilen tek bandın ise mol kütlesi çizilen  $R_f\text{-log}M_K$  grafiğinden hesaplandı. Enzimlerin molekül ağırlıkları yaklaşık olarak hesaplanarak Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2'de başka canlı dokularıyla kıyaslanarak verilmiştir.



**Çizelge 5.1.** Farklı türlere ait G6PD enziminin molekül kütleleri

<b>Enzim kaynağı</b>	<b>Molekül kütlesi kDa</b>	<b>Kaynak</b>
<i>C. trutta</i> böbrek	76	
<i>C. trutta</i> karaciğer	78	
<i>C. trutta</i> solungaç	73	
<i>C. c. umbla</i> böbrek	75	
<i>C. c. umbla</i> karaciğer	79	
<i>C. c. umbla</i> solungaç	75	
<i>Ctenopharyngodon idella</i> hematopankreas	72	(Hu <i>et al.</i> 2013)
Hindi eritrositi	75	(Yılmaz <i>et al.</i> 2003)
Sıçan kalbi	67	(Adem 2011)
Sıçan akciğeri	64	(Adem 2011)
Sıçan eritrositleri	131	(David <i>et al.</i> 1977)
Sıçan karaciğeri	130	(David <i>et al.</i> 1977)
Sıçan meme bezleri	120	(David <i>et al.</i> 1977)
Fare karaciğeri	121	(David <i>et al.</i> 1977)
Tavşan karaciğeri	90	(Ozols 1993)
Köpek karaciğeri	52,5	(Özer <i>et al.</i> 2002)
Koyun eritrositi	67	(Beydemir 2002)
Koyun lens	55	(Beydemir 2002)
Koyun beyni	61,2	(Sengezer 2010)
Sığır alyuvarı	114	(Levy 1979)
Buffalo eritrositleri	64,5	(Ciftci <i>et al.</i> 2003)
Domuz karaciğeri	133	(David <i>et al.</i> 1977)
Sığır eritrositi	114	(David <i>et al.</i> 1977)
İnsan karaciğeri	118	(David <i>et al.</i> 1977)
İnsan adrenali	113	(Levy 1979)
İnsan trombosit	120	(Levy 1979)
İnsan alyuvarı	120	(Levy 1979)
İnsan plasentası	54	(Levy 1979)

**Çizelge 5.2.** Farklı türlere ait GR enziminin molekül kütleleri

<b>Enzim kaynağı</b>	<b>Molekül kütlesi kDa</b>	<b>Kaynak</b>
<i>C. trutta</i> böbrek	55	
<i>C. trutta</i> karaciğer	55	
<i>C. trutta</i> solungaç	50	
<i>C. c. umbla</i> böbrek	53	
<i>C. c. umbla</i> karaciğer	55	
<i>C. c. umbla</i> solungaç	50	
Gökkuşuğu alabalığı karaciğer	52	(Tekman 2007)
İnci kefali karaciğeri	55	(Altun 2010)
İnci kefali eritrositi	55	(Altun 2010)
Sıçan akciğeri	63	(Adem 2011)
Sıçan kalbi	62	(Adem 2011)
Sıçan karaciğeri	60	(Carlberg and Mannervik 1975)
Sıçan böbreği	53	(Can 2010)
Hindi karaciğeri	65	(Taşer 2010)
Sığır karaciğeri	55	(Ulus ve Tandoğan 2007)
Sığır böbreği	56	(Ulus ve Tandoğan 2007)
Sığır beyni	55	(Gutterer <i>et al.</i> 1999)
Fare karaciğeri	55	(López-Barea and Lee 1979)
Kablumbağa karaciğeri	55	(Willmore and Storey 2007)
Koyun beyni	64	(Açan 1990)
İnsan jejunumu	56	(Öğüş and Özer 1991)
İnsan alyuvarı	58	(Öğüş and Özer 1998)

Metaller, önemli bir ekosistem bileşeni olan ve aynı zamanda besin kaynağı olarak kullanılan balıklarda, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand *et al.* 1999; Basha and Rani 2003). Bu bilgiler göz önüne alınarak çalışmamızda *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından saflaştırılan ve canlı metabolizması için son derece önemli olan G6PD ve GR enzimleri üzerine  $AgNO_3$ ,  $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $FeCl_3$ ,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Pb(NO_3)_2$  ve  $ZnCl_2$  metallerinin *in vitro* etkileri araştırıldı.

Genel olarak kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC<sub>50</sub> (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalarımız sırasında enzim aktivitesini inhibe eden metallerin IC<sub>50</sub> değerleri de belirtilmiştir. Bilindiği gibi IC<sub>50</sub> değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre *C. trutta* böbrek G6PD enzimi üzerine Cu<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 14,146, 0,0023, 2,033, 2,656 ve 1,220 mM olarak belirlendi. *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi üzerine Pb<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,0814, 0,00871, 0,660, 1,947 ve 0,421 mM olarak belirlendi. *C. trutta* solungaç G6PD enzimi üzerine Cu<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 10,046, 0,024, 1,773, 1,674 ve 1,456 mM olarak belirlendi.

*C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi üzerine Zn<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 1,992, 0,00257, 0,507, 1,650 ve 13,863 mM olarak belirlendi. *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi üzerine Pb<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,118, 0,000377, 0,423, 1,819 ve 8,887 mM olarak belirlendi. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi üzerine Pb<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,096, 0,0353, 0,376, 1,487 ve 0,755 mM olarak belirlendi.

*C. trutta* böbrek GR enzimi üzerine Ni<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,722, 0,00078, 0,731, 0,622 ve 0,519 mM olarak belirlendi. *C. trutta* karaciğer GR enzimi üzerine Pb<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,349, 0,000437, 0,355, 0,217 ve 0,185 mM olarak belirlendi. *C. trutta* solungaç GR enzimi üzerine Pb<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,247, 0,000625, 0,220, 0,153 ve 0,216 mM olarak belirlendi.

*C. c. umbla* böbrek GR enzimi üzerine  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla  $IC_{50}$  değerleri 0,0831, 0,00087, 0,559, 0,569 ve 0,487 mM olarak belirlendi. *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi üzerine  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla  $IC_{50}$  değerlerinin 0,0921, 0,000634, 0,987, 0,881 ve 3,194 mM olarak belirlendi. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi üzerine  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği ve sırasıyla  $IC_{50}$  değerlerinin 0,944, 0,00968, 11,180, 0,844 ve 1,313 mM olarak belirlendi.

*C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından saflaştırılan G6PD ve GR enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için  $K_i$  sabitlerinin belirlenmesi işlemine Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975; Telefoncu 1986). Bu deney sonucunda her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri elde edilmiştir. Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır. Ayrıca  $K_i$  sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir.

*C. trutta* böbrek G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Cu^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $22,116 \pm 4,875$ ,  $0,00202 \pm 0,00048$ ,  $0,394 \pm 0,253$ ,  $1,751 \pm 0,610$  ve  $0,171 \pm 0,0336$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Cu^{+2}$ ,  $Ag^+$  ve  $Cd^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $Ni^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. trutta* karaciğer G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,0647 \pm 0,0221$ ,  $0,00523 \pm 0,00168$ ,  $1,113 \pm 0,731$ ,  $1,955 \pm 0,650$  ve  $0,203 \pm 0,060$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Ag^+$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. trutta* solungaç G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,669 \pm 0,168$ ,  $0,0185 \pm 0,00272$ ,  $7,099 \pm 1,655$ ,  $1,003 \pm 0,35$  ve  $0,528 \pm 0,116$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $Fe^{+3}$  metalinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi.

*C. c. umbla* böbrek G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,969\pm 0,189$ ,  $0,000929\pm 0,00044$ ,  $0,526\pm 0,0806$ ,  $0,932\pm 0,0689$  ve  $0,146\pm 0,0396$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Zn^{+2}$  ve  $Ag^+$  metalleri yarışmalı,  $Cd^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin yarışmasız ve  $Cu^{+2}$  metalinin yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. c. umbla* karaciğer G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,327\pm 0,0536$ ,  $0,00014\pm 0,0000423$ ,  $0,335\pm 0,167$ ,  $1,828\pm 1,142$  ve  $4,287\pm 0,197$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Ag^+$  ve  $Cd^{+2}$  metalleri yarışmalı,  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metalleri yarışmasız inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. c. umbla* solungaç G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Fe^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Pb^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,402\pm 0,102$ ,  $0,019\pm 0,00308$ ,  $0,318\pm 0,00612$ ,  $0,152\pm 0,0481$  ve  $0,036\pm 0,0099$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Fe^{+2}$  ve  $Pb^{+2}$  metalleri yarışmalı,  $Cd^{+2}$  ve  $Ag^+$  metallerinin yarışmasız ve  $Ni^{+2}$  metalinin yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi.

*C. trutta* böbrek GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Co^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,235\pm 0,0267$ ,  $0,000394\pm 0,0002$ ,  $0,0255\pm 0,00755$ ,  $0,279\pm 0,0484$  ve  $0,382\pm 0,024$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Co^{+2}$ ,  $Ag^+$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $Zn^{+2}$  metalinin yarışmalı ve  $Cu^{+2}$  metalinin ise yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. trutta* karaciğer GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,151\pm 0,0841$ ,  $0,00025\pm 0,000128$ ,  $0,532\pm 0,546$ ,  $0,0931\pm 0,0202$  ve  $0,123\pm 0,0658$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Pb^{+2}$  metalinin yarışmasız,  $Ag^+$   $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. trutta* solungaç GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Pb^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $0,112\pm 0,0472$ ,  $0,00045\pm 0,00008$ ,  $0,182\pm 0,138$ ,  $0,128\pm 0,0363$  ve  $0,482\pm 0,219$  mM şeklindedir. Bununla beraber  $Ni^{+2}$ ,  $Ag^+$  ve  $Pb^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $Co^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi.

*C. c. umbla* böbrek GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla 1,203±0,210, 0,000924±0,000481, 0,824±0,124, 0,0428±0,0168 ve 0,124±0,0178 mM şeklindedir. Bununla beraber  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$  ve  $\text{Cd}^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. c. umbla* karaciğer GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla 0,0613±0,0163, 0,000476±0,000156, 0,408±0,00911, 1,506±0,359 ve 2,304±0,486 mM şeklindedir. Bununla beraber  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Ag}^+$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi. *C. c. umbla* solungaç GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Pb}^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri sırasıyla 1,850±1,034, 0,00550±0,00096, 4,493±0,806, 0,921±0,196 ve 0,533±0,377 mM şeklindedir. Bununla beraber  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$  ve  $\text{Co}^{+2}$  metallerinin yarışmasız,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Pb}^{+2}$  metallerinin ise yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği belirlendi.

Enzimler üzerine çevresel faktörlerden ısı, ışık, ağır metaller, pestisitler, ilaçlar ve diğer modülatörlerin çok değişik etkileri mevcuttur (Anderson and Duggan 1976). Sucul ekosistemin kirliliğine neden olan bu çevresel faktörlerin, özellikle ağır metallerin, balık dokularında bulunan enzimlerde meydana getirdiği değişimler birçok bilim insanı tarafından *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılmıştır. Örneğin;

Tatlı su balığı Kızılgöz (*Rutilus rutilus*) balıklarında yapılan çalışmada, araştırmacılar balığın solungacında  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz aktivitesi üzerine  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının etkilerini incelemiş ve 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının etkisinde enzimin yüksek oranda aktive olduğunu,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonları tarafından enzim aktivitesinin etkilenmediğini göstermişlerdir. Ayrıca *in vitro* şartlarda 10  $\mu\text{M}$  derişiminin altında  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Hg}^{+2}$  iyonlarının enzimi inhibe ettiğini, *in vivo* şartlarda 0,2  $\mu\text{M}$  derişiminin altındaki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun solungaç  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz enzimini aktive ettiğini kaydetmişlerdir (Shephard and Simkiss 1978). Sastry and Shukla (1994), Cd'un etkisine uzun bir süre bıraktıkları Benekli Kedi Balığı *Corydoras punctatus*'un karaciğerinde G6PD aktivitesi azalırken, GPT enzim aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Sridevi *et al.* (1998), Cr'a maruz kalmış *B. guerini*'nin hepatopankreas ve solungaç dokularında G6PD ve SOD enzim

aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Alkan (2005) yaptığı çalışmada gökkuşuğu alabalıklarının 7 gün boyunca Cd, Cr, Se, Cd+Se ve Cr+Se maruz bırakmıştır. Çalışmada balıkların karaciğer ve solungaç dokularında selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GSHPx), SOD ve CAT aktivitelerini incelenmiştir. Çalışma sonucunda Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde kontrole göre düşüşlerin olduğunu belirlemiştir. Se meteline maruz kalmış grupta ise enzim aktivitelerinde önemli bir değişim belirlememiştir.

Ahmad *et al.* (2006), yılan balıklarına (*Anguilla anguilla*) krom uygulamışlar ve solungaç ve böbrek dokularında CAT aktivitelerinde düşüşler olduğunu bildirmişlerdir. Atlı *et al.* (2006) yapmış oldukları çalışmada Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) balıklarının 96 saat farklı konsantrasyonlarda  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cr^{+6}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarına maruz bırakmışlar ve karaciğer, böbrek, solungaç, bağırsak ve beyin dokularında *in vivo* CAT aktivitesine bakmışlardır. Çalışma sonucunda karaciğerde metal iyonları CAT aktivitesini artırırken, sadece 0,5 mg/L konsantrasyonundaki  $Ag^+$  iyonu %44 oranında inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir.  $Cd^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının solungaç CAT aktivitesine her hangi bir etki yapmadığı gözlenirken yine  $Ag^+$  ve  $Cr^{+6}$  metal iyonları %50'nin üzerinde CAT aktivitesini inhibisyona uğrattıkları belirlenmiştir. Böbrek, bağırsak ve beyin dokuları için de yaklaşık benzer sonuçlar alınmıştır. Vijayavel *et al.* (2006), 96 saat süreyle 1 ppm, 2.5 ppm, ve 4 ppm bakırın etkisine bırakılmış *Terapon jarbua*'nın solungaç, karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kas dokularında SOD ve CAT aktivitelerinde azalma olduğunu gözlemişlerdir. Bhattacharya and Bhattacharya (2007) Kedi balığı türü olan *Clarias batrachus* 'u arseniğe maruz bırakmışlardır. Çalışma sonucunda karaciğer SOD enzim aktivitesinin arttığını, CAT enzim aktivitesinin azaldığını belirlemişlerdir. Atabeyoğlu (2011) gökkuşuğu alabalıklarında belirli dozlarda uygulanan Cu, Zn, Ni ve Cd metallерinin balık karaciğer, kas ve böbrek dokularındaki CAT, SOD ve GSH-Px antioksidan enzimlerinin aktivitelerini incelemiştir. Çalışmada, gökkusağı alabalıklarında CAT aktivitesi için bakır uygulanmış karaciğer dokusu hariç diğer karaciğer dokularının CAT aktivitelerinde farklılık tespit etmiştir. CAT enzim aktiviteleri Cu ve Zn uygulanmış böbrek dokularında herhangi bir farklılık

bulamamıştır. Benzer şekilde Zn uygulanmış kas dokusu hariç diğer kas dokularının CAT aktivitelerinde herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Cu, Zn, Ni ve Cd metallerine maruz kalmış gökkuşığı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularının SOD aktivitelerinde farklılık tespit edilememiştir. Cu ve Zn meteline maruz kalmış alabalıkların SOD aktiviteleri böbrek dokularında önemli bulunmuştur. GSH-Px aktivitesi Cu, Zn, Ni ve Cd'a maruz kalmış alabalıkların karaciğer dokularında farklı, kas dokularında ise farksız bulunmuştur. Ni meteline maruz kalmış alabalıkların böbrek dokularında GSH-Px aktivitesi önemli bulunmuştur.

Çiltaş *et al.* (2003) yaptıkları çalışmada 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodunu kullanarak gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimini saflaştırmışlar ve *in vitro* ve *in vivo* olarak Kloramin-T ve CuSO<sub>4</sub>'ün alabalık eritrositindeki G6PD enzimi üzerine etkilerine bakmışlardır. Çalışma sonucunda *In vitro* olarak yapılan çalışmada Kloramin-T ve CuSO<sub>4</sub> enzimi inhibe ederken, *in vivo* çalışmada, CuSO<sub>4</sub> enzimi inhibe etmiş, kloramin-T enzimi ise inhibe etmemiştir. Çiltaş *et al.* (2004) gökkuşığı alabalığı eritrositinden G6PD enzimi saflaştırarak, hipotermia, tranquil ve MS 222 maddelerinin G6PD enzimini inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca gökkuşığı alabalığı eritrositinden saflaştırılan G6PD enzimini; thiamphenicol, amikacin, gentamicin ve netilmicin antibiyotiklerinin inhibite ettikleri (Erdoğan *et al.* 2004), hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışma sonucunda amonyak ve ürenin enzimi inhibe ettikleri (Erdoğan *et al.* 2005), melatoninin *in vivo* ve *in vitro* olarak enzimi inhibe ettiği (Beydemir *et al.* 2005), deltamethrin, cypermethrin ve propoxur'un *in vitro* olarak enzimi inhibe ettikleri (Şentürk *et al.* 2009) belirlenmiştir.

Çam (2011), çipura (*Sparus aurata*) balığı karaciğer ve solungaç dokularından G6PD enzimini saflaştırmıştır. Saflaştırmayı, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada; çipura karaciğer G6PD enzimi üzerinde Ag<sup>+</sup> ve Ni<sup>+2</sup> metallerin inhibisyon etkisi gösterdiği, Co<sup>+2</sup>, Al<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metallerinin ise çipura karaciğer G6PD enzimi aktive ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte solungaç G6PD enzimi üzerine Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup> metallerinin inhibisyon etkisi gösterdiği



$Fe^{+3}$  metalinin ise enzimi aktive ettiği belirlenmiştir. Çomaklı *et al.* (2013), gökkuşuğu alabalığı karaciğerinden G6PD enzimini %77 verimlilikle, 1444 kat saflaştırmışlardır. Ayrıca çalışmada,  $Ag^{+}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $As^{+5}$  metal iyonlarının enzime *in vitro* olarak etkisine bakılmıştır. Çalışma sonucunda,  $Ag^{+}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $As^{+5}$  metal iyonlarının  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla, 0,0044, 0,084 ve 4,058 mM olarak belirlenirken, Ki değerleri sırasıyla  $0,0052 \pm 0,00042$ ,  $0,087 \pm 0,0157$  ve  $4,833 \pm 1,753$  mM olarak tespit edilmiştir. Hu *et al.* (2013), Ot Sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) hepatopankreasından G6PD enzimini 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografisi metodlarını kullanarak saflaştırmıştır. Çalışmada bazı metallerin enzim üzerine  $IC_{50}$  ve Ki değerleride incelenmiştir.  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  metallerinin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 0,42, 0,54, 0,94, 1,20 ve 4,17 mM olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber çalışmada  $Zn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  metallerinin Ki değerleri sırasıyla 0,52, 1,12, 0,26 ve 4,8 mM olarak belirlenmiştir.

Tekman (2007), gökkuşuğu alabalık karaciğerinden GR enzimini saflaştırmıştır, karakterizasyonunu belirlemiş ve GR enzimi üzerine  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Saflaştırma sonucunda, 13,957 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan GR enzimini %47,28 verimle elde etmiştir. Ayrıca karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  metal iyonlarının  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla; 0,509 mM, 0,082 mM, 0,797 mM, 0,804 mM, 0,122 mM, 0,0655 mM olarak bulmuştur. Bununla beraber  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$ 'nin enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Altun (2010), İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) karaciğer ve eritrositlerinden GR enzimini, 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi metodunu kullanarak saflaştırmış ve enzimin karakterizasyonunu belirlemiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimlerinin saflaştırılması sırasıyla 4552 ve 7619 kat olarak gerçekleştirmiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimleri için optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkisini tespit etmiştir. SDS-PAGE ile enzimlerin alt birimlerinin molekül ağırlıklarını 55 kDa olarak hesaplamıştır. Ayrıca İnci Kefali karaciğer ve eritrosit GR enzim aktiviteleri için amikasin, sefazolin, ivermektin ve kanamisin ilaçlarının etkilerini incelemiştir. Yarışmasız inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için Ki sabitleri ve  $I_{50}$  değerlerini hesaplamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yoğun şekilde avcılığı yapılan ve ekonomik öneme sahip olan *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD ve GR enzimi, homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Enzimlerin saflığını ve alt biriminin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. SDS-PAGE uygulamasında enzimler tek bant olarak elde edildi. Ayrıca *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularında G6PD ve GR enzimi aktivitesi üzerine bazı metallerin ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) inhibisyon etkisi araştırıldı ve düşük konsantrasyonlarda bile bu metallerin enzimi inhibisyona uğrattıkları tespit edildi. G6PD ve GR aktivitesinin inhibisyonu, Pentoz Fosfat Yolu'nda önemli rollere sahip olması ve antioksidan etkileri düşünüldüğünde tüm organizmalar için fizyolojik ve biyokimyasal olarak birçok anahtar fonksiyona sahiptir. Organizmalardaki bu doğal ürünlerin patofizyolojik etkilerini ve bu etkilerin tesirlerini açıklamak için toksikolojik ve klinik çalışmalar yapılmalıdır. G6PD ve GR eksikliğinin, en genel enzimopati olduğu gerçeği bu noktada unutulmamalıdır. Bu çalışmanın diğer bir önemi de, ülkemiz içsularında bulunan balıklar üzerine sadece gökkuşağı alabalıklarında enzim saflaştırma üzerine çalışmalar yapılırken diğer türler üzerine enzim saflaştırma çalışmaları yetersizdir. Bu çalışma ülkemiz içsularında doğal olarak bulunan ve insanlar tarafından severek tüketilen *C. trutta* ve *C. c. umbla* böbrek, karaciğer ve solungaç dokularından G6PD ve GR enzimi saflaştırılması bakımından ilk çalışmadır. Çalışmamızın, bundan sonra yapılacak özellikle farklı türdeki tatlısu balıklarında başta G6PD ve GR enzimi ile ilgili olmak üzere diğer enzim çalışmalarına temel oluşturacağı düşüncesindeyiz. Çalışmamızın bu anlamda literatüre de önemli bir katkı yapacağı ve toksikolojik alanda bu enzimler üzerine yapılacak çalışmalara temel teşkil edeceği kanaatindeyiz. Diğer bir husus ise enzim inhibisyonu gibi biyokimyasal değişiklikler çevresel sağlığın indikatörleri olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu biyokimyasal değişiklikler suda yaşayan organizmalar üzerine kimyasalların zararlı etkilerinin gözlemlenmesinde hızlı ve hasas araçlardır. Bu nedenle G6PD ve GR enzimi çevresel kirliliğin kalitatif tayininde biyomarker olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Ağır metaller biyobirikime yatkın oldukları ve vücuda alınıp depolanmaları metabolize edilmelerinden daha hızlı olduğu göz önünde bulundurulursa bu çalışmanın litartüre

kattığı değer ortaya çıkmaktadır. Çünkü sucul ortamlarda yaşayan organizmalar bünyelerinde biriken ağır metalleri besin zinciri içerisinde, birbirlerine taşıyabildikleri gibi biriken bu ağır metaller ortamda yok olmayıp, çeşitli yollarla insanlara ulaşabilmekte ve bunun sonucu olarak insan sağlığını tehdit edip, bazen tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler, günümüzde gelişen sanayiden dolayı su ve toprağa karışan metal iyonlarının canlılarda bulunan savunma sistemleri üzerinde olumsuz etki yaptıklarını göstermektedir. Dolayısıyla bu durum insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. Bu konuda ilgili kuruluşların denetimlerini gerektiği gibi yapmaları hususu önem arz etmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Açan, N.L., 1990. Koyun Beyni Glutatyon Redüktazının Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Açan, N.L., Tezcan, E.F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. 250 (1), 72-74.
- Adams, S.M., Brawn, A.M. and Goede, R.W., 1994. A Quatitative health asesment index for rapid evaluation of fish condition in the field. Trans. Am. Fish. Soc., 122, 63-71.
- Adem, Ş., 2011. Sıçan Kalp ve Akciğer Dokularından Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Glutatyon Redüktaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Kotinin ve Bazı İlaçların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adem, Ş., Çiftçi, M., 2012. Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. Protein Expression and Purification, 81, 1-4.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M. and Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch.) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Biophys., Acta. 1523, 37-48.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Pacheco, M. and Santos, M.A., 2006. Oxidative stres and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. Mutation Research, 608, 16-28.
- Akahori, A., Jozwiak, Z., Gabryelak, T. and Gondko, R., 1999. Effect of zinc on carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocytes. Comp. Biochem. And Physiol. C., 123, 209-215.
- Akkemik, E., Şentürk, M., Özgeriş, F.B., Taşer, P. and Çiftçi, M., 2011. In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. Turk J Med Sci, 41 (2), 235-241.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, 1-123.
- Aksoy, Y., 1992. Glukoz-6-fosfat Dehidrojenaz Enziminin İnsan Plasentasından Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akyurt, İ., Tarım, S. ve Yanık, T., 1990. Doğu Anadolu'nun Su Kaynakları Ve Balık Potansiyeli Yönünden Degerlendirilmesi. Milli Produktivite Merkezi Yayınları, 431, 41-50, Ankara.
- Alak, G., Atamanalp, M., Kocaman, E.M. ve Uçar, A., 2013. Karboksinin gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) gulutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. SAÜ. Fen Bil. Der. 17 (1), 71-74.

- Alam, M.G.M., Allinson, G, Stagnitti, F, Tanaka, A. and Westbrooke, M., 2002. Arsenic contamination in Bangladesh groundwater: a great environmental and social disaster. *Int J Environ Health Res.* 12 (3), 235 –253.
- Alkan, A., 2005. Bazı Ağır Metal ve Selenyum Bileşiklerine Maruz Kalan Alabalıklarda Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Malatya.
- Altun, M., 2010. Van Gölü Balığından (*Chalcalburnus Tarichi*, P-1811) Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaç ve Kimyasal Maddelerin Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Altun, Z., 2008. Keban Baraj Gölü'nde Yaşayan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'da Kan Glikoz Seviyesinin Mevsimsel Değişimi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Anderson, L.E., and Duggan, J.X., 1976. Light Modulation of Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol.* 58, 135-139.
- Anonim, 2009. <http://duzce.cevreorman.gov.tr/Duzce/AnaSayfa/CYCEDSubeMudurlugu/suKirliligi.aspx?sflang=tr>
- Anonymous 2011. <http://www.lenntech.com/heavymetals.html>
- Arellano, J.M., Storch, V. and Sarasquete, C., 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 62-72.
- Arias, D.G., Marquez, V.E., Beccaria, A.J., Guerrero, S.E. and Iglesias, A.A., 2010. Purification and characterization of a glutathione reductase from *phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 161, 91–101.
- Asnis, R.E., 1955. A glutathione reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 213(1), 77-85.
- Atabeyoğlu, K., 2011. Bazı Ağır Metallerin Subletal Dozlarının Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Katalaz, Süperoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktiviteleri ve mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Atay, D., 1987, İçsu Balıkları ve Üretim Tekniği. AÜ. Zir. Fak. Yayınları: 1035, Ders Kitapları: 300, s. 467, Ankara.
- Athar, M., Hasan, S.K. and Srivastava, R.C., 1987. Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: implications for nickel carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 1276–1281.
- Atli G., Alptekin O., Tükel S. and Canlı M., 2006. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol* 143, 218–224.
- Basha, P.S. and Rani, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 218–221.
- Beğenirbeş, C.A.S., 2002. Porsuk Çayı (Kütahya Bölümü)'ndeki Tatlısu Midyesi (*Unio sp.*)'nde Bazı Ağır Metallerin Araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, 47 s. Eskişehir.

- Benzie, I.F.F., 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eu. J. Nut.*, 39 (2), 53–61.
- Berman, E., 1980. Copper in “Toxic Metals and Their Analysis”. Chapter 12: 88- 100., Heyden&Son LTD, London.
- Beutler, E., 1969. Effect of flavin compound on glutathione reductase activity; *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Invest.* 48 (10), 1957-66.
- Beutler, E., 1971. Red cell metabolism. *Manual of biochemical methods.* 12: 68-70, Academic pres, London.
- Beydemir, S., Gulcin, I., Hisar, O., Küfrevioglu, I.O. ve Yanik T., 2005. Effect of melatonin on glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Animal Research*, 28, 65–68.
- Beydemir, S., 2002. Koyun Eritrositleri ve Göz Lensinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı İlaç ve Kimyasal Maddelerin İnhibisyon veya Aktivasyon Kinetiklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Beydemir, S., Yilmaz, H., Ciftci, M. and Kufrevioglu, O. I., 2003. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from goose erythrocytes and kinetic properties. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 27, 1179-1185.
- Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S., 2007. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 178-187.
- Bielawski, W. and Joy, K.W., 1986. Properties of glutathione reductase from chloroplast and roots of pea. *Phytochemistry*, 25, 2261-2265.
- Bishop, G.M., Dringen, R. and Robinson, S.R., 2007. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1222-30.
- Boggaram, V., Brobjer, K.L. and Mannervik, B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340.
- Borghesi, L.A. and Lynes, M.A., 1996. Nonprotective effects of extracellular methallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139, 6–14.
- Bowman, J.E., Brubaker, R.R., Frischer, H. and Carson, P.E., 1967. Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 94 (3), 544-551.
- 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.
- Buckley, J.T., Roch, M., McCarter, J.A., Rendell, C.A. and Matherson, A.T., 1982. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper. effects of growth, on accumulation and distribution of copper and on copper tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 72 (1), 15-19.
- Burden, V.M., Sandheinrich, M.B. and Caldwell, C.A., 1998. Effects of lead on the growth and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution*, 101, 285-289.

- Bülbül, M. and Erat, M., 2008. Investigation of the effects of some sulfonamide derivatives on the activities of glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23 (3), 418-423.
- Büyükokuroğlu, M. E. ve Süleyman, H., 2001. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 21, 415-9.
- Campana, O., Sarasquete, C. and Blasco, J., 2003. Effect of lead on ala-d activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 116-125.
- Can, B., 2010. Glutasyon Redüktaz Enziminin Sıçan Böbreğinden Saflaştırılması, Substrat ve İnhibitör Kinetiğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Canpolat, Ö., 2007. Ağır Metal Kirlilik Kaynaklarının Keban Baraj Gölü'nün Su Kalitesi ve *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'nın Üremesi ve Gelişimi Üzerindeki Etkileri. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ.
- Capellaci, S., Aluigi, G., Tabellini, L. and Ninfali, P., 2001. One step purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from brain areas by immunoaffinity chromatography. *Biotechnology Letters*, 23, 353-357.
- Carino, V.S., Vidal, M.N. and Puzon, A.G., 1987. An Electron microscope study on gills of *Tilapia nilotica* L. larvae exposed to zinc sulphate. *Nat. Appl. Sci. Bull.*, 39, 281-292.
- Carlberg, C. and Mannervik B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Pres, Orlando, FL.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 250, 5475-5480.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose-4B. *Analytical Biochemistry*, 116, 531-536.
- Celayir, Y., 2007. Siraz (*Capoeta capoeta umbla* Heckel, 1843) 'dan Tam Kontrollü Döl Alımı. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A., 2007. Lipincott. Tercüme: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E., *Biyokimya*, s. 117, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Chilla, R., Doering, K.M., Domagk, G.F. and Rippa, M., 1973. A simplified procedure for the isolation of a highly active crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159, 235-239.
- Cho, S.W. and Joshi, J.G., 1990. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain. *Neuroscience*, 38 (3), 819-828.
- Chowdhury, M.J., Pane, E.F. and Wood, C.M., 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium change in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comp. Biochem. Physiol., C*. 139, 163-173.

- Cicik, B. and Engin, K., 2005, The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758), Turk. J. Vet. Anim. Sci, 29, 113-117.
- Ciftci, M., Beydemir, S., Yılmaz, H. and Altıkat, S., 2003. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. Protein Expression and Purification, 29, 304-310.
- Ciftci, M., Kufreviöglu, O.I., Gundogdu, M. and Ozmen, I., 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. Pharmacol Res., 41 (1), 109-113.
- Ciltas, A., Erdogan, O., Hisar, O. and Ciftci M., 2003. Effects of chloramine-T and CuSO<sub>4</sub> on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 55, 187–196.
- Ciltas, A., Erdogan, O., Hisar, O. and Kocaman, E.M., 2004. Inhibition effect of some chemical anesthetics and hypothermia on the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vivo*. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 28, 813–817.
- Cinier, C.C., Ramel, M.P., Faure, R., Garin, D. and Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in Carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem. Physiol., 122, 345–352.
- Coban, T.A.K., Çiftçi, M. and Küfreviöglü, Ö.İ., 2002. Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 32 (2), 173-187.
- Coban, T.A., Senturk, M., Ciftci, M. and Kufreviöglu, O.I., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an *in vitro* study. Protein and Peptide Letters, 14 (10), 1027-1030.
- Coleman, J.E., 1992. Zinc protein: enzymes, storage protein, transcription factor and replication protein. Annu. Rev. Biochem., 61, 879–946.
- Comaklı, V., Akkemik, E., Ciftci, M. and Kufreviöglu, O.I., 2013. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and investigation of the effects of some metal ions on enzyme activity. Toxicology and Industrial Health, 1-9.
- Cope, W.G., Wiener, J., Steingraeber, M.T. and Atchison, G.J., 1994. Cadmium, metal-binding proteins and growth in bluegill (*Lepomis macrochirrus*) exposed to contaminated sediments from the upper mississippi river basin. Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences, 51, 1356–1367.
- Corpas, F.J., García-Salguero, L., Peragón, J. and Lupiáñez, J. A., 1995. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. Life Science, 56 (3), 179-189.
- Costa, M., Davidson, T.L., Chen, H., Ke, Q., Zhang, P., Yan, Y., Huang, C. and Kluz, T., 2005. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. Mutat. Res. 592, 79-88.
- Cousins, R.J., 1998. A Role of zinc in the regulation of gene expression. Proc. Nutr. Soc., 57, 307–311.



- Criss, W.E. and Mckerns, K.W., 1968. Purification and partial characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex. *Biochemistry*, 7 (1), 125-134.
- Çam, M., 2011. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Çipura Karaciğer ve Solungaç Dokularından Saflaştırılması ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çelikkale, M.S., 1988. İç Su Balıkları ve Yetistirciliği (Cilt II). K. T. Ü. Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Genel Yayın No: 128, Fakülte Yayın No: 3, Trabzon.
- Çelikkale, M.S., 1991. Balık Biyolojisi. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Yayınları, Yayın no:1, s.387, Trabzon.
- Çiftçi, M., Akkemik, E. ve Aydın, S., 2012. Gökkuşluğu Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. TÜBİTAK projesi, Proje No: 111T040, Erzurum.
- Çoban, M.Z., 2010. *Capoeta Capoeta Umbla* (Heckel, 1843)'nın Elazığ Hazar Gölü ve Keban Baraj Gölü Populasyonlarının Kanda Glikoz ile Kas ve Karaciğerde Glikojen Seviyelerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Dağlı, M. and Erdemli, A.Ü., 2009. An investigation on the fish fauna of Balıksuyu Stream (Kilis, Turkey). *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3 (1), 18-23.
- Danner, J., Lenhoff, H.M. and Heagy, W., 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH. *Analytical Biochemistry*, 82, 586-590.
- David, S., Shreve, H. and Richard, L., 1977, On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 1369-1375.
- De La Torre, F.R., Salibian, A., and Ferrari, L., 2000. Biomarker assessment in juvenile *cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*, 109, 277-282.
- Doi, R., Chowdhury, P., Nishikawa, M. and Rayford, P.L., 1993. Tissue distribution of cadmium after tracheal and gastric administration in Rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 619-624.
- Dökmeci, İ., 1988. Toksikoloji. s: 488-489, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Drastichova, J., Svobodova, Z., Lusova, V. and Machova, J., 2004. Effect of cadmium on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 725-732.
- Eisler, R., 1993. Zinc Hazards to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. US Department of the Interior, USA.
- Ekinci, D. and Şentürk, M., 2013. Assessment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28 (1), 11-15.
- Ekingen, G., 1988. Balık Sistematiği. 225 s., Tolga Ofset, Elazığ.

- Erat, M. and Çiftçi, M., 2006. Effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *European Journal of Pharmacology* 537, 59–63.
- Erat, M., 2004. Purification of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 20,50-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. *Protein Expression and Purification*, 34, 257–260.
- Erat, M., 2005. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of some kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 53-69.
- Erat, M., Demir, H. and Şakiroğlu, H., 2005. Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125, 127- 138.
- Erat, M., Şakiroğlu, H. and Çiftçi, M., 2003. Effects of some antibiotics on glutathione reductase from bovine erythrocytes. *Vet. Med. – Czech*, 48 (11), 305–312.
- Erdogan, O., Ciftci, M., Ciltas, A. and Hisar, O., 2004. Inhibition effects of some antibiotics on the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 28, 675–681.
- Erdogan, O., Hisar, O., Koroglu, G. and Ciftci, M., 2005. Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.*, 141, 145–150.
- Ereser, B.T., 2010. Sığır Böbrek Korteksinden Glutasyon Redüktazın Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Saptanması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Eroğlu, M., 2011. Karakaya Baraj Gölü’nde Yaşayan *Capoeta Trutta* (Heckel, 1843)’nın Serumunda Testosteron, Estradiol ve Kolesterol Miktarlarının Mevsimsel Değişimi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Esposito, S., Guarriero, G., Vona, V., Di Martino Rigano, V., Carfagna, S. and Rigano, C., 2005. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: The dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 409, 55-64.
- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martino, R. V. and Carfagna, S., 2003. Glutamate synthesis in barley roots: The role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, 216, 639-647.
- Faroon, O. M., Williams, M. and O’Connor, R., 1994. A Review of the carcinogenicity of chemical most frequently found at national priorities list sites. *Toxicology Industrial Health*, 10, 203–230.
- Fırat, Ö., 2007. *Oreochromis niloticus*’ta Metal (Zn, Cd) ve Metal Karışımının (Zn+Cd) Kan Dokusunda Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Fickenser, K. and Schiebe, R., 1986. Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247, 393-402.

- Filho, D.W., 1996. Fish antioxidant defences a comparative approach. *Br. J. Med. Biol. Res.*, 29, 1735–1742.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 (6809), 239-247.
- Ganguly, R., Ganguly, N. and Manning, J. E., 1985. Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 35, 91-101.
- Garner, L.A., 2004. Contact dermatitis to metals. *Dermatol. Ther.* 17, 321– 327
- Geldiy, R. ve Balık, S., 1996. Türkiye Tatlı Su Balıkları. Ege Üniv. Su Ürünleri Fak. Yayınları No: 46 Ders Kitabı dizisi No: 16, s. 357-362, Bornova, İzmir.
- Geldiy, R. ve Balık, S., 2007. Türkiye Tatlısu Balıkları, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova–İzmir.
- Gerhard, I., Monga, B., Waldbrenner, A. and Runnenbaum, B., 1998. Heavy metals and fertility. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54, 593–611.
- Gossling, P.G. and Ross, J.O., 1979. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconicacid dehydrogenase from hazel cotyledons. *Phytochemistry*, 18, 1441-1445.
- Grober-Van Heerden, E., Van Vuren, J.H.J. and Du Preez, H.H., 1991. Bioconcentration of atrazin, zinc and iron in the blood of *Tilapia sparmani* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 100, 629–633.
- Gutterer, J., Dringen, R., Hirrlinger, J. and Hamprecht, B., 1999. Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *Journal of Neurochemistry*, 73, 1422-1430.
- Gül, A., Yılmaz, M. ve Selvi, M., 2004. Civa-II-Klorürün tatlısu kefali *Leuciscus cephalus* (L., 1758) üzerindeki akut toksik etkilerinin araştırılması, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 17 (4), 53-58.
- Gül, M., Kutay F.Z., Temocin S. and Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp.Biol.* 38, 625-634.
- Güneş, M., 2007. Tercan Baraj Gölü ve Tuzla Çayı'nda Yaşayan *Capoeta capoeta umbla* Heckel, 1843 Populasyonlarının Bazı Biyo-Ekolojik Özellikleri, Total Yağ ve Yağ Asidi Kompozisyonlarının Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hageman, J.J., Bast, A. and Vermeulen, N.P.E., 1992. Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo*: analytical aspect. *Chem. Biol. Interact.*, 82, 243-293.
- Hai, D.Q., Varga, S.I. and Matkovics, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 117 (1), 83–88.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501- 514.
- Hauschild, R. and Von Schaewen A., 2003. Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiology*, 133, 47-62.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press. 24 pp. Florida USA.

- Heath, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology. Levis, CRC Press. Boca Raton, FL.
- Heise, N. and Oppendoerfer, F. R., 1999. Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, 99, 21-32.
- Henczova, M., Deer, A.K., Filla, A., Komlosi, V. and Mink, J., 2008. Effects of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> on different fish species: liver cytochrome p450 dependent monooxygenase activities and FTIR spectra. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 148, 53-60.
- Hilmy, A.M., Shabana, M.B. and Daabees, A.Y., 1985. Bioaccumulation of cadmium: toxicity in *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol. C, 81 (1): 139-143.
- Hogstrand, C. and Wood, C.M., 1996. The Physiology and Toxicology of Zinc in Fish. In: Taylor, E.W. (Ed.), Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches. Society for Experimental Biology Seminar Series, Vol. 57., pp. 61-84, Cambridge University Press, Great Britain.
- Hogstrand, C., Ferguson, E.A., Galvez, F., Shaw, R., Webb, N.A. and Wood, C.M., 1999. Physiology of acute silver toxicity in the starry flounder (*Platichthys Stellatus*) in seawater. Journal of Comparative Physiology B., 169, 461-473.
- Hu, W., Zhi, L., Zhuo, M., Zhu, Q., Zheng, J., Chen, Q., Gong, Y. and Liu, C., 2013. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and inhibition effects of several metal ions on G6PD activity *in vitro*. Fish Physiol. Biochem., 39, 637-647.
- Hutchings, D., Rawsthorne, S. and Emes, M. J., 2005. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Journal of Experimental Botany, 56, 577-585.
- Ibraheem, O., Adewale, I. O. and Afolayan, A., 2005. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38 (5), 584-590.
- Ikem, A. and Egiebor, N.O., 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). Journal of Food Composition and Analysis 18, 771-787.
- Jeffery, Y.J., Barros-Söderling, J., Murray, L., Wood, I., Hansen, R., Szepesi, B. and Jörnvall, H., 1989. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Characteristics revealed by the liver enzyme structure. Journal of Biochemistry, 186, 551-556.
- Jen Chen, C., Yu Huang, C., Huang, J.K., Yi Lin., C. and Tsai Lin., C. 2009. Cloning, expression, and purification of a functional glutathione reductase from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): kinetic studies and characterization. J. Agric. Food Chem., 57 (10), 4403-4408.
- Jiang, F., Hellmans, U., Stroga, E., Bergman, B. and Mannervik, B., 1995. Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the *Cyanobacterium anabaena* PCC 7120. The Journal of Biological Chemistry, 270 (39), 22882-22889.
- Kahler, S.G. and Kirkman, H.N., 1983. Intracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase does not monomerize in human erythrocytes. The Journal of Biological Chemistry, 258 (2), 717-718.

- Kalkan, E., 2008. Growth and reproduction properties of *Capoeta trutta* (Heckel,1843) in Karakaya Dam Lake. Turkish Journal of Zoology, 32, 1-10.
- Karahalil, F.Y., 2009. Mersin Balığı (*Acipenser gueldenstaedti*) Eritrositlerinden Elde Edilen Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kargın, F., 1998. Metal concentrations in tissues of the freshwater fish *Capoeta barroisi* from the Seyhan River (Turkey). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60, 822-828.
- Kargın, F., Donmez, A. and Cogun, H.Y., 2001. Distribution of heavy metals in different tissues of the shrimp *Penaeus semiculatus* and *Metapenaeus monocerus* from the Iskenderun Gulf, Turkey: Seasonal variations. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 66, 102-109.
- Kayhan, F.E., Muslu, M.N. and Koç, N.D., 2009. Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar. Journal of Fisheries Science, 3(2), 153-162.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Biyokimya. 3. baskı.s. 642, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Kellogg, R.M. and Hof, R.P., 1996. Nonracemic thiols and Zn II. structural and catalytic aspects of natural and non-natural zinc thiolates. J. Chem. Soc., 1, 1651-1657.
- KIRICI, M., KIRICI, M., Beydemir, Ş., and Atamanalp, M., 2012. Purification of carbonic anhydrase from *Capoeta capoeta umbla* ( Heckel, 1843) gills and toxicological effects of some metals on enzyme activity. The 9th International Conference on Carbonic Anhydrase, April 11-15, Antalya-TURKEY.
- KIRICI, M., Taysı, M.R., Bengü, A.Ş. ve İspir, Ü., 2013a. Murat nehri'nde yakalanan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'nın kas dokusunda bazı metallerin birikim konsantrasyonlarının belirlenmesi. EÜFBED - Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6 (1), 115-124.
- KIRICI, M., Taysı, M.R., Bengü, A.Ş. ve İspir, Ü., 2013b. Murat nehri'nden yakalanan *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'da bazı metal düzeylerinin belirlenmesi. Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der., 3(1), 85-90.
- Knight, J. S., Emes, M. J. and Debnam, P. M., 2001. Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose-6- phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*. Planta, 212, 499-507.
- Kock, G., Triendl, M. and Hofer, R., 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) from an Oligotrophic Alpine Lake related top temperature. Can. J. Fish Aquat. Sci., 53, 780-786.
- Köprücü, K. ve Özdemir, Y., 2003. *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'nın keban baraj gölü ve hazar gölünde (Elazığ) yaşayan populasyonlarının et verimi ve bazı büyüme özelliklerinin karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 20 (3-4), 337-343.
- Kuru, M., 1975a. Doğu Anadolu Balık Faunası. Atatürk Üniv. Yayınları No.348 Araştırma Serisi No.36. s. 22, Erzurum.
- Kuru, M., 1975b. Dicle-Fırat, Kura-Aras, Van Gölü ve Karadeniz Havzası Tatlısularında Yaşayan Balıkların (Pisces) Sistematik ve Zoocoğrafik Yönden İncelenmesi, Doçentlik Tezi, A. Ü. Fen Fakültesi, Ankara.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, 227,680, London.

- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M.P. and Korehel, K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4978-4983.
- Le Trang, N., Bhargava, K.K. and Cerami, A., 1983. Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Anal. Biochem.*, 133, 94-99.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M., 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Lendzian, K. J., 1980. Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP<sup>+</sup> and dithiothreitol at variable NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta*, 148, 1-6.
- Lessie, T. and Neidhart, F.C., 1967. Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 93 (4), 1337-1345.
- Levy, H. R. and Cook, C., 1991. Purification and properties of NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 291 (1), 161-167.
- Levy, H. R., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Advances in Enzymology*, 48, 97-192.
- Liaghati, T., Preda, M. and Cox, M., 2003. Heavy metal distribution and controlling factors within coastal plain sediments, Bells Creek Catchment, southeast Queensland, Australia. *Environment International*, 29, 935-948.
- Lloyd, R., 1992. *Pollution and Freshwater Fish*. 176 s., Marston Book Services Ltd, USA.
- Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M., Collarespereira, M.J. and Viegas-Crespo, A.M., 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish population (*Leuciscus alburnoides* Complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Total. Environ.*, 280, 153- 163.
- Lopez-Barea, J., and Lee C.Y., 1979. Mouse-liver glutathione reductase. *European Journal of Biochemistry*, 98, 487-499.
- Lovegrove, S. M. and Eddy, B., 1982. Uptake and acculmulation of zinc in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Biol. Fish*, 7, 285-289.
- Mahan, J.R. and Burke, J.J., 1987. Purification and characterization of glutathione reductase from corn mesophyll chloroplast. *Physiol. Plant.*, 71, 352-358.
- Mahmoudi, A., Nazari, K., Mohammadian, N. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2003. Effect of Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> on horseradish peroxidase: activation, inhibition, and denaturation studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 104, 81-94.
- Mannervik, B., Jacobsson, K. and Boggaram, V., 1976. Purification of glutathione reductase from erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4-B. *FEBS Letters.*, 66, 221-224.
- Mcgeer, J.C., Szebedinszky, C., Mcdonald, D.G. and Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout, I. iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.*, 50, 231-243.
- Meldrum, N.U. and Tarr, H.L. 1935. The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. *Biochem. J.*, 29, 108-15.
- Mirfakhrai, M. and Auleb, L., 1989. Partial purification and kinetic characterization of wheat germ glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Plant Physiology*, 135, 191-196.

- Misra, M., Rodriguez, R.E. and Kasprzak, K.S., 1990. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64, 1–17.
- Mize, C.E. and Langdon, R.G. 1962. Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, 237, 1589-95.
- Montgomery, R., Dryer, R., Conway, T. and Spector, A., 2000. *Biyokimya-Olgu Sunumlu Yaklaşım*. 6. Baskıdan Çeviri (Ç. Editörü: Atlan, N.). s. 112, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Moore, J.W. and Ramamoorthy, S., 1984. *Heavy Metal in Naturel Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment*. 268 pp., Springer, New York.
- Mullineaux, P., Enard, C., Hellens, R. and Creissen, G., 1996. Characterization of glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 200, 186-194.
- Murphy, C.B. and Spiegel, S.J., 1983. Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements. *Water Pollution*, 55 (6), 816-821.
- Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996. *Su Kimyası*, Beta basım yayım dağıtım A.Ş, s:83-84, İstanbul.
- Müller, F., 1992. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*; Williams C.H., Ed.; CRC Pres, pp 121-211, Boca Raton, Florida.
- Ninfali, P. and Palma, F., 1990. Comparative study of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues. *The Journal of Experimental Zoology*, 254, 6-12.
- Noltmann, E.A., Gubler, C.J. and Kuby, S.A., 1961. Glucose-6- phosphate dehydrogenase (Zwischenferment) I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 236 (5), 1125-1230.
- Nordberg, J. and Arner, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (11), 1287-1312.
- Oertel, G.W. and Benes, P., 1972. The effects of steroids on glucose-6- phosphate dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry*, 3, 493-496.
- Ozols J., 1993. Isolation and the complete amino acid sequece of lumenal endoplasmic reticulum glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 5302-5306.
- Öğüş, H. and Özer, N., 1991. Human jejunal glutathione reductase: purification and evaluation of the NADPH and glutathione-induced changes in redox state. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 45 (1), 65-73.
- Öğüş, I.H. and Özer, N., 1998. Purification of NADPH-free glutathione disulfide reductase from human erythrocytes. *Protein Expression and Purification*, 13 (1), 41-44.
- Özer, N., Bilgi, C. and Ögüs, İ. H., 2002. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34, 253–262.
- Özmen, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Gül, M., 2005. Effects of some antibiotics on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes *in vitro* and effect of isepamicin sulfate on activities of antioxidant enzymes in rat erythrocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 28, 443-445.

- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *Sci. Tot. Environ.*, 309, 105–115.
- Patır, B., Emir Çoban, Ö. ve Düşükcan, M., 2009. Atatürk Baraj Gölü'nde yaşayan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'nin bazı büyüme özellikleri ile et verimi ve kimyasal bileşimi. *e-Journal of New World Sciences Academy*, 4, (2), Article number: 5A0005.
- Patra, M., Bhowmik, N. and Bandyopadhyay, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany.*, 52, 199-223.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie (Hydrochemistry)*. Vydavatelství VSCHT, Praha.
- Prasad, A., 1995. Zinc: an overview. *Nutrition*, 11, 93-99.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 183-192.
- Reed, D.J., 2001. Mechanisms of Chemically Induced Cell Injury and Cellular Protection Mechanisms. *Introduction to Biochemical Toxicology*. pp. 697, Third edition, Wiley-Interscience, New York, USA.
- Reilly, K.E. and Allred, J.B., 1995. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* is a glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216 (3), 993-998.
- Robinson, M.J., 2000. Dark and daylight activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the leaves of nitrogen-limited spinach and soybean plants. *International Journal of Plant Science*, 161 (4), 651-657.
- Roche, H. and Boge, G., 1993. Effects of Cu, Zn and Cr on antioxidant enzyme activities *in vitro* of red blood cells of a *Dicentrarchus labrax*. *Toxicol. In Vitro*, 7, 623–629.
- Roesijadi, G. and Robinson, W.E., 1994. Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanism of Uptake, Accumulation, and Release. In: Mullins, D. C. and Ostrander, G. K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. pp. 387–419, Lewis Publishers, Florida.
- Roger, J.T., Richards, J.G. and Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 64 (2), 215-234.
- Ruparelia, S.G., Verma, Y., Mehta, N.S. and Salyed, S.R., 1989. Lead-induced biochemical changes in freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43, 310-314.
- Sanwal, B.D., 1970. Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors. III. Control of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (7), 1626-1631.
- Sarıeyyüpoğlu, M. ve Say, H., 1991. Elazığ şehir kanalizasyonunun baraj gölüne döküldüğü bölgeden yakalanan *Barbus capito pectoralis*'te ağır metal birikimlerinin araştırılması, II. Su Ürünleri Sempozyumu, 121-130.
- Sastry, K.V. and Shukla, V., 1994. Acute and chronic toxic effects of cadmium on some haematological, biochemical, and enzymological parameters in the freshwater



- teleost fish *Channa punctatus*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 22, 171-176.
- Saxena, M.P., Gopal, K., Jones, W. and Ray, P.K., 1992. Immune response to *Aeromonas hydrophila* in Catfish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 194–201.
- Schnarrenberger, C., Oeser, A. and Tolbert, N. E., 1973. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6- phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 154, 438-448.
- Segel, I. H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Seghal, R. and Saxena, A.B., 1986. Toxicity of zinc to a viviparous fish, *Lebistes reticulatus* (Peters). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 888–894.
- Semenihina, A., Popova, T., Schnarrenberger, C. and Pinheiro De Carvalho, M.A.A., 2001. Purification and some catalytic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms from barley leaves. *Photosynthetica*, 39 (2), 299-304.
- Sengezer, C., 2010. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazın Koyun Beyninden Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Serrano, A. and Rivas, J., 1984. Purification and properties of glutathione reductase from the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain 7119. *J. Bacteriol.*, 158, 17–324.
- Shah, H.N. and Andrews, D.M.A., 1994. Malate dehydrogenase and glucose- 6-phosphate dehydrogenase, key markers for studying the genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiology Letters*, 122, 69-74.
- Shainkin-Kestenbaum, R., Caruso, C. and Berlyne, G.M., 1991. Effect of nickel on oxygen free radical metabolism. Inhibition of superoxide dismutase and enhancement of hydroxydopamine autoxidation. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 28, 213- 21.
- Shephard, K. and Simkiss, K., 1978. The Effects of heavy metal ions on Ca<sup>+2</sup>-ATPase extracted from fish gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 61, 69-72.
- Shuilleabhain, S.N., Mothersill, C., Sheehan, D., O'Brien, N.M., Halloran, J.O., Van Pelt, F.N.A.M. and Davoren, M., 2004. *In Vitro* cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines. *Toxicology in vitro*, 18, 365–376.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Smith, C., Marks A. D. and Lieberman M. 2007. *Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım (2. bs.)* (M. E. İnal, U. Atik, N. Aksoy ve A. Haşimi, Çev.), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Smith, L.L., 1987. Cholesterol autoxidation. *Chem. Phys. Lipids.*, 44, 87-125.
- Sorensen, E.M., 1991. *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press, Florida.
- Sridev, B., Reddy, K.V., and Reddy, S.L.N., 1998. Effect of trivalent and hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 384-390.
- Suresh, A., Sivaramakrishna, B. and Radhakrishnaiah, K., 1995. Cadmium induced changes in ion levels and atpase activities in the muscle of the fry and

- fingerlings of the freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 30 (2), 365-375.
- Şentürk, M, Ceyhun, S.B, Erdogan, O. and Kufrevioğlu, O.I. 2009. *In vitro* and *in vivo* effects of some pesticides on glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95, 95–99.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Çiftçi, M. and Küfrevioğlu, Ö.İ. 2008. Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(11), 2036—2039.
- Tappia, P. S., Jones, C. J. P. and Connock, M. J., 1998. Purification of guinea pig small intestinal peroxisomes and the subcellular localization of glucose-6- phosphate dehydrogenase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179, 13-20.
- Taşer, P. and Çiftçi, M., 2012. Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36(5), 546-553.
- Taşer, P., 2010. Glutasyon Redüktaz Enziminin Hindi Karaciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taylan, Z.S. ve Özkoç, H.B., 2007. Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. *BAÜ FBE Dergisi*, 9 (2), 17-33.
- Tekman, B., 2007. Gökkuşluğu Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Karaciğer Dokusundan Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der), 59 s, İzmir.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 57(3-4), 145-55.
- Tumantozlu, H., 2010. Karacaören II Baraj Gölü'ndeki Su, Sediment Ve Sazan (*Cyprinus carpio L.*, 1758) Örneklerinde Bazı Ağır Metal Birikiminin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Uçar, A. Ve Atamanalp, M., 2008. Balıklarda Toksikopatolojik Lezyonlar I. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 39 (2), 255-261.
- Ulus, N.N. and Tandoğan, B. 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 303, 45–51.
- Ulus, N.N., Kuş, M.S., Acan, N.L. and Tezcan, E.F., 1999. A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31, 787-796.
- Valenti, V., Stanghellini, M.A. and Pupillo, P., 1984. Glucose-6- phosphate dehydrogenase isozymes of maize leaves. *Plant Physiology*, 75, 521-526.
- Vallae, B.L., 1959. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. *An. Int. Med.*, 50, 1077-1091.
- Vallee, B.L. and Falchuk, K.H., 1993. The Biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73, 79–118.
- Varshney, C.K., 1991. Effects of Heavy Metals on Aquatic Organisms. In: *Water Pollution and Management*,(ed. Varshney, C.K.), p: 88-89, Wiley Eastern Ltd. Publication, New Delhi.

- Velasco, P., Barcia, R., Ibarguren, I., Sieiro, A.M. and Ramosmartinez, J.I., 1994. Purification, characterization and kinetic mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse liver. *International Journal of Biochemistry*, 26 (2), 195-200.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bull.*, 16 (4), 153-158.
- Vighi, M., 1981. Lead uptake and release in an experimental trophic chain. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, 5, 177-193.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., and Balasubramanian, M.P., 2006. Dietary ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. *Science of the Total Environment*, 372, 157-163.
- Walther, U.I., Wilhelm, B., Walther, S.C., Muckter, H. and Forth, W., 2000. Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines. *In Vitro. Mol. Toxicol.*, 13(2), 145-52.
- Warburg, O. and Christian, W., 1931. Aktivierung von kohlehydrat in roten blut zellen. *Biochemische Zeitschrift.*, 238, 131.
- Wei-Fu, K., Jian-Ye, C., Zhi-Xia, H., Peng-Fei, W., Ji-Cheng, Z., Quihong, P. and Wei-Dong, H., 2007. Activity and subcellular localization of glucose 6-phosphate dehydrogenase in peach fruits. *Journal of Plant Physiology*, 164, 934-944.
- Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A. and Von Schaewen, A., 2000. Molecular characterisation of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal*, 23, 723-733.
- Wennekes, L.M.J., Goosen, T., Van Den Broek, P.J.M. and Van Den Broek, H.W.J., 1993. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 139, 2793-2800.
- Willmore, W.G. and Storey, K.B., 2007. Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 297, 139-149.
- Wood, C.M., 2001. Toxic Responses of the Gill. In: Schlenk, D., Benson, W. H. (Eds), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost*. pp. 1-87, Taylor and Francis, London.
- Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A., 1976. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *European Journal of Biochemistry*, 67, 231-238.
- Wu, G., Fang, Y.Z, Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134, 489-492,
- Wyk, J.C.V. and Lessie, T.G., 1974. Purification and characterization of the *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate dehydrogenase active with nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of Bacteriology*, 120 (3), 1033-1042.
- Yadav, S.S., Srikanth, E., Singh, N. and Rathaur, S., 2013. Identification of GR and TrxR systems in *Setaria cervi*: Purification and characterization of glutathione reductase. *Parasitology International*, 62, 193-198.
- Yilmaz, H., Ciftci, M., Beydemir, S., Bakan, E. and Kufrevioglu, O.I., 2003. Purification and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase from turkey erythrocytes. *Indian journal of biochemistry and biophysics*, 40, 62-65.

- Yoshida, A., 1966. Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes. I. Purification and characterization of normal (B+) enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 4966-4976.
- Yoshida, A., 1970. Enzyme purification by selective elution with substrate analog from ion-exchange columns: Application to glucose-6-phosphate dehydrogenase, pseudocholineesterase, lactate dehydrogenase, and alanine dehydrogenase. *Analytical Biochemistry*, 37, 357-367.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 7.
- Yue, R.H., Noltmann, E.A. and Kuby, S.A., 1969. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwischenferment) III. Studies on the subunit structure and on the molecular association phenomenon induced by triphosphopyridine nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (5), 1353-1364.
- Yüreğir, T.G., Aksoy, K., Dikmen, N. and Ünlükurt, İ., 1988. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliğinin incelenmesi. IX.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji, Nümerik Taksonami ve Kantitatif Ekoloji Paneli bildirileri, 1, 125-130.
- Zalups, R. K. and Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186, 163-188.

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Antalya'nın Gazipaşa ilçesinde doğdu. İlköğretimi ve Ortaöğretimi Gazipaşa'da tamamladı. 2001 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği'den 2005 yılında mezun oldu. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'de başladığı Yüksek Lisans öğrenimini 2009 yılında tamamladı. 2009 yılında başladı doktora eğitimini 2014 yılında bitirdi.

2009 yılından beri Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.