

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN
GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*)
ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Veysel ÇOMAKLI

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIK ERİTROSİTLERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Veysel ÇOMAKLI tarafından hazırlanan bu çalışma 27/09/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. Münir OKTAY

İmza

Üye : Doç.Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum
Enstitü Müdürü
Prof.Dr.Ömer AKBULUT

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

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*) ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASALLARIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Veysel ÇOMAKLI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Bu çalışmada, gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden glutatyon S-transferaz (E.C 1.8.1.7.; GST) enzimi glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 16,54 EÜ x mg⁻¹ protein spesifik aktiviteyle ve %59 verimle 11.026 kat saflaştırıldı.

Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini belirlemek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant elde edildi. Alt birim molekül kütlesi yaklaşık 23 kDa olarak belirlendi. Eritrosit GST enziminin tabii halinin molekül kütlesi Sephadex-G 100 jel filtrasyon kolonu kullanılarak yaklaşık 47 kDa olduğu tespit edildi. Eritrositlerden saflaştırılan GST için optimum iyonik şiddet 10 mM K-fosfat tamponu olarak belirlendi. Enzim için optimum pH, stabil pH ve optimum sıcaklık sırasıyla 7,3, 7,3, 30°C olarak bulundu. Saf enzimin K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak GSH substratı için K_M 0,0395, V_{max} 0,0328 EÜ/ml; CDNB substratı için K_M 0,259, V_{max} 0,0655 EÜ/ml olarak hesaplandı. Saflaştırılan GST enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisi gösteren sefuroksim sodyum, gentamisin sülfat, amikasin sülfat antibiyotikleri ve Ag⁺, Cd⁺², Cr⁺² ve Mg⁺² metal iyonları için IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlendi.

2011, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-transferaz, karakterizasyon, gökkuşuğu alabalığı, ağır metal

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-
TRANSFERASE FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)
ERYTHROCYTE AND EFFECTS OF
SOME CHEMICALS ON ENZYME ACTIVITY

Veysel ÇOMAKLI

Atatürk University
Graduate School of Science and Arts Faculty
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

In the present study, Glutathione S-transferase (E.C 1.8.1.7.; GST) enzyme was purified from rainbow trout (RT) erythrocyte a specific activity of 16,54 and a yield of 38% and 11026-fold respectively using glutathione-agarose affinity gel chromatography. To check the purity of the purified enzyme and to determine the subunit molecular masses of the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed and a single band was obtained and Mw of approx. 23 kDa for erythrocyte. The molecular weight of native of erythrocyte GST enzyme was estimated to be approx. 47 kDa by Sephadex-G 100 gel filtration chromatography, respectively. Optimum ionic strengths for the GST from erythrocyte were obtained as 10 mM K-Phosphate buffer. Optimal pH, stable pH, optimal temperature were determined as 7,3, 7,3, 30°C respectively, Also K_M and V_{max} values were determined for enzyme; K_M for GSH substrate: K_M 0,0395, V_{max} for GSH substrate: 0,0328 EÜ/ml; K_M for CDNB substrate: 0,259, V_{max} for CDNB substrate: 0,0655 EÜ/ml. After that, *in vitro* inhibitory effects of some antibiotics, including cefuroxime sodium, gentamicine sulfate, amikacin sulfate and some metal ions, incorporating Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} and Mg^{+2} were evaluated. IC_{50} values and K_i constants of corresponding antibiotics and metal ions were calculated, and inhibition types were determined.

2011, 88

pages

Keywords: Glutathione S-transferase; characterization; rainbow trout; heavy metal

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof.Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca değerli katkılarından dolayı Sayın Prof.Dr. Münir OKTAY'a ayrıca biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Doç.Dr. şükrü BEYDEMİR ve Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Sayın Ebru AKKEMİK'e sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü desteği sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof Dr. Nurullah SARAÇOĐLU'na, Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında alışan arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı babama, anneme, eşime ve kızım AFRA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Veysel ÇOMAKLI

Eylül, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	23
3.1.3. GST enziminin afinite kolonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları.....	24
3.1.4. Eritrositlerin yıkanması sırasında kullanılan çözeltiler.....	25
3.1.5. GST Enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	26
3.1.6. Elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Protein tayini.....	27
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini.....	27
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	28
3.2.2. Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini.....	28
3.2.3. GST Enzimi için afinite jelinin hazırlanması.....	30
3.2.4. Gökkuşuğu alabalık eritrositlerinden GST'nin saflaştırılması.....	30
3.2.4.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması.....	30
3.2.4.b. Hemolizattaki enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	31
3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	31
3.2.6. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin molekül kütlesi tayini.....	32

3.2.7. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşığı alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin doğal halinin molekül kütesinin tayini	33
3.3. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Saflaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları.....	35
3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	35
3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	35
3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	35
3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi.....	35
3.3.5. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına ait çalışmalar	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	47
4.2. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar	47
4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile GST Enzim Saflığının Kontrolü.....	48
4.4. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Saflaştırılan GST Enziminin SDS-PAGE İle Alt Birimlerinin Mol Kütesinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar	49
4.5. Gökkuşığı Alabalığı Eritrositlerinden Saflaştırılan GST Enziminin Molekül Kütesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Belirlenmesi .	49
4.6. Gökkuşığı Alabalık Eritrosit GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları	51
4.6.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	51
4.6.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları	52
4.6.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları.....	54
4.6.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları.....	55
4.6.5. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	56
4.7. Gökkuşığı Alabalık Eritrosit GST Enzimi Üzerine Bazı Antibiyotik Ve Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	57

4.7.1. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve metal iyonları için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	57
4.7.2. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Afinite kromatografisi gösterimi	4
Şekil 1.2.	Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi.....	9
Şekil 1.3.	Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü.....	13
Şekil 1.4.	Amikasin sülfatın molekülünün yapısal formülü.....	13
Şekil 1.5.	Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü.....	14
Şekil 1.6.	Ornidazol molekülünün yapısal formülü	14
Şekil 1.7.	Metronidazol molekülünün yapısal formülü.....	15
Şekil 1.8.	Ampisilin sodyum / sulbactam sodyum molekülünün yapısal formülü	15
Şekil 3.1.	Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması	29
Şekil 4.1.	Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	47
Şekil 4.2.	Glutasyon-agaroz afinite kolonuyla saflaştırılan gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	48
Şekil 4.3.	Saflaştırılan GST enzimi için LogM_K/R_f grafiği	49
Şekil 4.4.	Jel filtrasyon kolonundan geçirilen standart proteinlerin elüsyon grafiği	50
Şekil 4.5.	Gökkuşığı alabalığı eritrosit GST enziminin molekül kütlelerini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği	50
Şekil 4.6.	Gökkuşığı alabalığı eritrosit enziminin molekül kütlelerini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik.....	51
Şekil 4.7.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin K-fosfat tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği.....	52
Şekil 4.8.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için yapılan aktivite-K-fosfat (mM) grafiği.....	53
Şekil 4.9.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite-sıcaklık grafiği.....	54
Şekil 4.10.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için KH_2PO_4 tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik.....	55

Şekil 4.11. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	56
Şekil 4.12. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	57
Şekil 4.13. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine gentamisin sülfat kimyasalının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	58
Şekil 4.14. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine sefuroksim sodyum kimyasalının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	59
Şekil 4.15. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine amikasin sülfatın inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	60
Şekil 4.16. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Ag^+ metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	60
Şekil 4.17. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Cd^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	61
Şekil 4.18. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Cr^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	62
Şekil 4.19. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Mg^{+2} metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	62
Şekil 4.20. Gentamisin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.21. Sefuroksim sodyumun gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.22. Amikasin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.23. Ag^+ metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.24. Cd^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.25. Cr^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.26. Mg^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	GST enziminin aminoasit analizi	9
Çizelge 1.2.	Sitozolik GST sınıfları, alt birimleri ve bulunduğu dokular	11
Çizelge 3.1.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde amikasin sülfatın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	37
Çizelge 3.2.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde sefuroksim sodyumun IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	37
Çizelge 3.3.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde gentamisin sülfatın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	38
Çizelge 3.4.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Mg ⁺² metal iyonunun IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	38
Çizelge 3.5.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cr ⁺² metal iyonunun IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	39
Çizelge 3.6.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Ag ⁺ metal iyonunun IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	39

Çizelge 3.7.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cd^{+2} metal iyonunun IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	40
Çizelge 3.8.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde amikasin sülfatın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	40
Çizelge 3.9.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde sefuroksim sodyumun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	41
Çizelge 3.10.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde gentamisin sülfatın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	42
Çizelge 3.11.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Mg^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	43
Çizelge 3.12.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cr^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	44
Çizelge 3.13.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Ag^+ metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	45
Çizelge 3.14.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cd^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	46

Çizelge 4.1.	Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden GST enziminin saflaştırma sonuçları	48
Çizelge 4.2.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum pH' sı için 0,1M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	52
Çizelge 4.3.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum iyonik şiddetini KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	53
Çizelge 4.4.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	54
Çizelge 4.5.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin stabil pH' sının belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	55
Çizelge 4.6.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri.....	57
Çizelge 4.7.	Gentamisin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi	58
Çizelge 4.8.	Sefuroksim sodyumun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.9.	Amikasin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi	59
Çizelge 4.10.	Ag^+ metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi	60
Çizelge 4.11.	Cd^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.12.	Cr^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.13.	Mg^{+2} metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	62
Çizelge.4.14.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi için antibiyotiklere ait IC_{50} ve K_i değerleri.....	67
Çizelge.4.15.	Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi için metal iyonlarına ait IC_{50} ve K_i değerleri.....	67

1. GİRİŞ

1835 yılında Jöns Jacob Berzelius, katalizörleri kimyasal tepkimeleri daha hızlı ve aktif hale getiren maddeler olarak tanımlamıştır (Ann-Sofie 2002). Enzimlerin etki ettiği maddeler substrat olarak adlandırılır. Substratlar ürüne dönüştükten sonra ürün ve enzim ayrılır. Enzimler reaksiyon süresince değişime uğrayabilir fakat tepkime tamamlandıktan sonra ilk hallerine dönerler. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarının yanı sıra hücrede metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenleme mekanizmasında da görev alırlar (Dawn *et al.* 1996).

Hücreler, yaşamın devamı için gerekli olan kimyasal olayların meydana geldiği birimlerdir. Gerçekte hücre içerisindeki bütün tepkimeler katalize edilmiştir. Biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşebilmeleri için mevcut hücre sınırları içerisinde katalizörlerin varlığı kaçınılmazdır. Hücre içinde bulunan enzim grupları meydana gelecek olan kimyasal reaksiyonları belirler. Enzimlerin birden çok hücresel fonksiyonları olduğu ve genelde toksin moleküllere karşı vücut savunmasında etkili oldukları bilinmektedir.

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olduklarından dolayı kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler ve bu yüzden bir hücrede oluşabilecek olan tüm kimyasal tepkimeler enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları ise protein yapısında olmayan kofaktör olarak adlandırılan gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , vb.) olabildiği gibi koenzim denilen kompleks bir organik bileşik de (NAD^+ , FAD^+ , Koenzim A) olabilir. Bazen enzim aktivitesini gösterebilmesi için her ikisine de ihtiyaç duyabilir (Onat 1996).

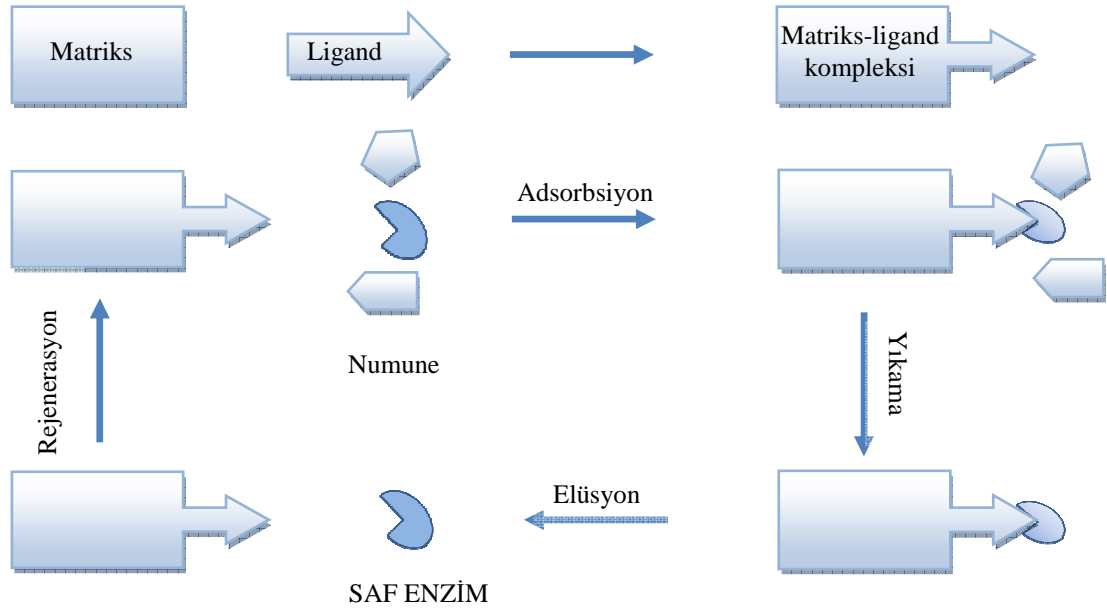
Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksine haloenzim denir. Kofaktörsüz proteine apoprotein, enzime ise apoenzim denir (Onat 1996). Apoenzim katalitik olarak inaktiftir. Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri vardır. Çok defa bu kofaktörler diyaliz yoluyla uzaklaştırılabilir. Fakat bazı enzim kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak şekilde sıkı bağlıdır. Bunlara prostetik grup denir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim aktivitesini kaybeder (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik fonksiyonlarını ancak uygun pH ve sıcaklık aralığında gerçekleştirebilirler. Bu sebeplerden dolayı herhangi bir hücre veya dokudan bir proteini izole etmek oldukça zor bir iştir. Bu zorluklara rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH ve yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
2. Çözünürlükleri farklılıkları,
3. Elektriksel yük,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Bu tez çalışmasında, saflaştırma işlemi için spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisi kullanılmıştır. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çoğu kez bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Şekil 1.1. Afinite kromatografisi gösterimi

Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler. İkinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara 1989).

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitör” denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlelerine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

Dönüşümsüz inhibisyonunda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur. V_{max} azalırken, K_M değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge tepkimesi şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması engellenmiş olur. Fakat substrat derişimi artırılarak inhibisyon olayı ortadan kaldırılabılır. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar.

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

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdaki sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve K_M değeri küçülür.

Bir hücredeki bütün kimyasal olaylardan sorumlu olan enzimlerin şüphesiz eritrosit hücrelerinde de birçok önemli görevleri vardır. Eritrosit hücreleri dıştan bir membranla sarılı, iç kısmında bulunan ağ şeklindeki stroma ile hemoglobin örtülür. Bu hücrelerin %50-60'ı protein, %10-12'si lipid ve geri kalan kısmı da sudur. Eritrosit membranı, üre,

HCO_3^- ve OH^- gibi bazı metabolitler için geçirgen olup, Na^+ , Ca^{+2} ve K^+ gibi bazı iyonlar ile inorganik fosfat aktif transportla taşınmaktadır (Shohet and Beutler 1986).

Eritrositlerin ana işlevleri, oksijenin dokulara dağıtılması ve doku metabolizması tarafından üretilen karbondioksit ile protonların uzaklaştırılmasına yardım etmektir. Bu görevi yerine getirebilmeleri için şekillerini, içyapılarını ve membran aktivitelerini koruyacak enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerji eritrositlerin tek yakıtı olan glukozun aerobik ve anaerobik glikolizi ile gerçekleşmektedir. Eritrositlerdeki glukozun %90'ı anaerobik glikoliz ile harcanır (Robert 2004).

Glutasyon (GSH) hemen hemen bütün canlılarda mevcut olduğu bilinen bir tripeptiddir. Glutasyon iki peptid bağı, iki karboksil grubu, bir amino grubu ve bir tiyol grubu içermektedir. Hidrofilik grupların fazla olması ve molekül kütesinin küçük olması glutasyonun sudaki çözünürlüğünün artmasını sağlar (Kosower 1976).

Bitki, hayvan ve mikroorganizmalarının hücre sitozolünde bol miktarda bulunan glutasyonun iki önemli işlevi vardır bunlardan birincisi hücreden toksik metabolitleri uzaklaştırmak diğeri ise indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlamaktır (Liebman and Greenberg 1988).

Alyuvarlarda glutasyonun indirgenmiş şekli (GSH), hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Kırmızı kan hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutasyon, glutasyon peroksidaz enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidant etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

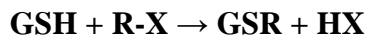
Her ne kadar sakin bir yaşam sürüyormuşuz gibi gözüksek de yaşamımız süresince potansiyel toksik bileşiklere ya direk ya da besin zinciri yoluyla dolaylı olarak maruz kalmaktayız. Endüstriyel yaşam, doğal yaşamla birlikte birçok zehirli molekül oluşturmaktadır. Örneğin reaktif oksijen vücudumuzda normal oksijen metabolizması

içerisinde üretilmektedir. Bu tarz toksik çevresel şartlar altında yaşamın devamı için vücudumuzda detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Toksik moleküller DNA ve proteinleri yok ederek sonuçta hücrenin ve metabolizmanın ölümüne sebep olur. Bu detoksifikasyon reaksiyonları faz I ve faz II olmak üzere ikiye ayrılmışlardır. Faz I reaksiyonları yükseltgenme, indirgenme, hidroliz gibi reaksiyonlar ile substrata aktif gruplar ekleyerek, faz II konjugasyon reaksiyonlarına substrat hazırlar (Lee 2003). Faz II konjugasyon sisteminde yer alan en önemli enzimlerden biri glutatyon *S*-transferazlardır.

Glutatyon *S*-transferaz (EC 2.5.1.18) metabolizmada, endojen ve ekzojen kaynaklı oluşan ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasında çok önemli bir role sahiptir (Booth *et al.* 1961). Ksenobiyotiklerin çoğu lipofiliktir ve kolayca absorbe edilebilirler. GST izoenzimleri ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve dokuların oksidatif zarardan korunması için önemlidir. Bu enzimler; kemoterapik ilaçlar, çevresel karsinojenler, endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş bir spektrumunu detoksifiye ederler. Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu III farklı fazda gerçekleşmektedir. Faz I ve II lipofilik değişimi içerir. Faz III'de daha fazla suda eriyebilen nonpolar ksenobiyotikler ve dolayısıyla daha az toksik olan metabolitlerin hücreler tarafından daha kolay elemine edilmesini sağlar. Genel olarak Faz I, sitokrom P450 sistemi tarafından katalizlenir. Faz II enzimleri, aktif hale getirilen ksenobiyotiklerin indirgenmiş glutatyon, UDP-glukuronik asit veya glisin gibi endojen olarak suda eriyebilir substrata konjugasyonunu katalizler.

Çoğunlukla detoksifikasyonla sonuçlanan faz II reaksiyonları arasında glutatyonla (GSH) konjugasyon, organizmayı son derece reaktif elektrofilik maddelerin ataklarından korur ve bu glutatyonun konjugasyon reaksiyonlarının büyük kısmı GST enzimleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Awasthi *et al.* 1980).

GST'in katalizlediği temel reaksiyon:



şeklindedir.

Enzimin ana fonksiyonu, glutatyon (GSH) ve substratı aktif bölgesine bağlayarak birbirlerine yakınlaştırmak (Eaton and Bammler 1999) ve GSH üzerindeki sülfidril grubunu aktive ederek GSH'un elektrofilik substratla reaksiyona girmesini sağlamaktır (Armstrong 1997). Epoksit halka açılmaları, nükleofilik aromatik geçiş reaksiyonları α , β -doymamış aldehit ve ketonlara geri dönüşlü miçel eklenmeleri ve bazı peroksidaz reaksiyonları GST enzimlerince katalizlenen reaksiyonlardır (Eaton and Bammler 1999).

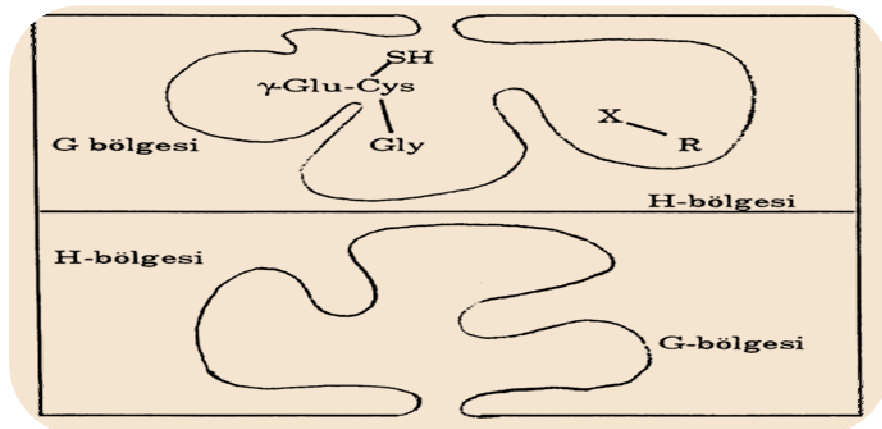
GST'ler her bir altbirim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23 kDa-29 kDa molekül kütesine sahiptirler. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. Her bir GST alt biriminin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşur. N-terminal domain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

Enzimlerin yapısını oluşturan aminoasitlerin içeriği oldukça önemlidir. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde, en fazla bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit ve lösindir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise, sıçanda çok düşük miktarlarda bulunurken, insanda hiç bulunmamaktadır (Fleischn *et al.* 1976; Baş 2006).

Çizelge 1.1. GST enziminin aminoasit analizi (mol başına) (Fleischn *et al.* 1976; Baş 2006).

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

GSH'nin elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu enzim üzerindeki G ve H olmak üzere iki farklı bölge ile katalizlenmektedir. G bölgesi GSH'nin, H bölgesi ise elektrofilik bileşiklerin bağlanma bölgesidir (Şekil 1.2) (Aliya *et al.* 2003). G bölgesi yüksek GSH spesifitesi ile tüm GST'lerde oldukça benzerdir. H bölgesi ise GST'ler arasında oldukça farklıdır. Enzimin substrat bağlama kapasitesi ve çeşitliliği bu bölgenin farklılığından kaynaklanmaktadır (Armstrong 1997).



Şekil 1.2. Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi.

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

Elektrofilik atağa karşı organizmanın savunucusu durumunda olan GST'lerin organizma açısından son derece faydalı bu fonksiyonlarına karşın aynı mekanizmayla biyoaktivasyonun yanı sıra yol açtıkları bir başka sorun vardır. Bu sorun GST'lerin klinikte çoklu ilaç rezistansı (Multidrug Resistance) olarak bilinen durumla olan ilişkileridir. Çoklu ilaç rezistansı günümüzde kanser tedavisinde en büyük engeli oluşturmaktadır. GST'nin kazanılmış rezistansla ilişkisinin düşünülmesi tümör hücrelerinde GST Pi'nin aşırı artmasından kaynaklanmaktadır (Aliya *et al.* 2003). GST'yi baskılayan maddelerin çoklu ilaç direncinde kullanılabileceği öne sürülmektedir. Sonuçta GST'ler kanser gelişiminde iki farklı role sahiptir. Birincisi epoksitler gibi başlatıcı ajanları inaktive ederek tümör oluşumunu önlemek, ikincisi kanser hücresinin kemoterapötiklere karşı rezistan hale gelmesine yardımcı olarak istenmeyen bir şekilde kanser hücresine koruma sağlamasıdır (Hayes and Pulford 1995).

Memeli GST'leri yedi sınıfa ayrılır. Bu enzim sınıflarından beş tanesi sitozolik, iki tanesi ise membrana bağlıdır. Sitozolik enzim sınıflarınının 13 adet alt birimi bulunmaktadır (Wormhadt *et al.* 1989; Carver and Hines 2002). Aynı GST sınıfından olan alt birimler kendi aralarında dimer oluşturabilirken farklı sınıfta bulunan alt birimlerle dimer oluşturamazlar (Carver and Hines 2002). Sitozolik GST'ler dimerik proteinlerdir ve her bir alt birimin tahmini molekül kütlesi 25 kDa'dur. GST proteinlerinin büyük bir kısmı karaciğerde bulunur ve toplam çözünür proteinin %3-5'ini teşkil eder (Seidegard and Ekström 1997).

Çizelge 1.2. Sitozolik GST sınıfları, alt birimleri ve bulunduğu dokular

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

Oksidasyon sisteminde yer alan pek çok metabolik enzimde olduğu gibi GST’de de bireyler arası çeşitlilik (polimorfizm) mevcuttur. Bu gen ailesindeki genetik polimorfizm vücuda alınan zararlı kimyasalların farklı metabolize edilmesinin en önemli nedenidir. Gstm1 polimorfik olarak eksprese olur ve üç alleli vardır (Gstm1- 0, Gstm1a, Gstm1b). Gstt1 lokusunda ise fonksiyonel olarak iki farklı genotip tanımlanmıştır. Birincisi homozigot bir delesyon sonucu meydana gelen Gstt1- 0’dır, ikincisi ise bir ya da iki fonksiyonel alleli bulunan genotiplerle uyuşan Gstt1- 1 dir. Bunların dışında Gstp1’inde üç değişik alleli vardır. Gstt veya Gstm’nin homozigot delesyonu (null genotip) bulunan bireylerde GST aktivitesi ya azalmıştır ya da hiç yoktur, bu yüzden bu bireylerde elektrofilik karsinogenlerin etkin olarak elimine edilmesi mümkün değildir (Coughlin and Hall 2002).

Bu tez kapsamında GST enzimi gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve enzim aktivitesi üzerine Ag^+ , Cr^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+3} metal iyonları ile sefuroksim sodyum, ornidazol, amikasin sülfat, gentamisin sülfat, metronidazol ve ampisilin sodyum antibiyotik ilaçlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Metaller doğada bol miktarda bulunan ve doğal bozulmaya dirençli elementlerdir. Metaller jeolojik ve biyolojik yollarla doğada hareket ederler. Yağmur suları ile kayalar ve maden yataklarından çözülerek akıntılar ile toprağa, nehirlere, denizlere ve sedimente ulaşır. Biyolojik döngü ise bitki ve hayvanlar tarafından metallerin biriktirilip

besin zincirine katılmalarını kapsar. Ölü canlıların çürümesi ile tekrar çevreye katılırlar (Donkin *et al.* 2000; Goyer and Clarkson 2001).

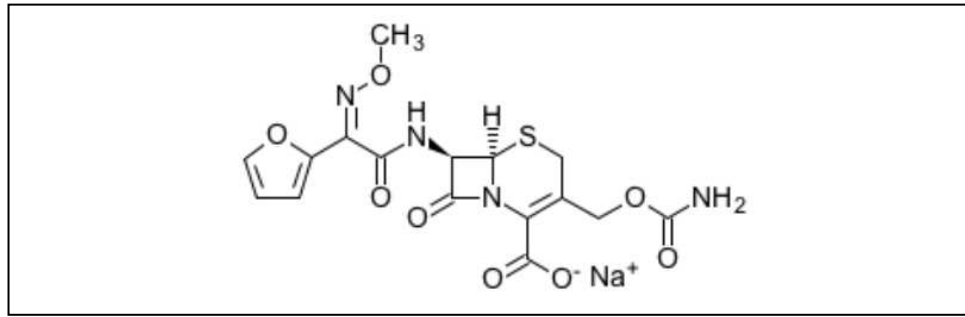
Canlılar için hayati önemi sahip olan metallerin aşırı düzeyleri oldukça zararlıdır. İnsan metabolizması için gerekli olmayan metaller başta besinler olmak üzere su veya hava gibi yollarla vücuda alınarak bir "metal yükü" oluşumuna sebep olmaktadır. Bu metallerden bazıları (alüminyum, titanyum, krom,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

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

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

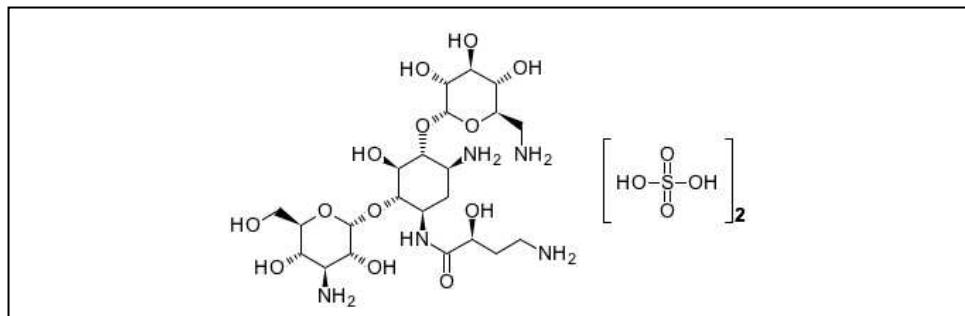
Fe, Ni, Cu, Zn, Co, gibi metaller iz metaller olarak bilinir ve akuatik organizmaların yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmeleri için düşük miktarlarda mutlaka alınmaları gerekir. Hg, Cd, Pb, Ag gibi metaller ise akuatik organizmaların yaşamında veya metabolizmalarında önemli bir rol oynamayan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

1. Sefuroksim sodyum: İkinci kuşak sefalosporinlerdendir (Şekil 1.3). Bu antibiyotikler esas olarak solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. Sefuroksim önemli hedef proteinlere bağlanarak bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eder ve bu yolla bakterisid etki gösterir. Sefuroksim, β -laktamaz üretenler dâhil birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakterisid etkiye sahiptir. Özellikle plazmid aracılığıyla transfer edilen β -laktamaz enzimine karşı dirençlidir (Kayaalp 2000).



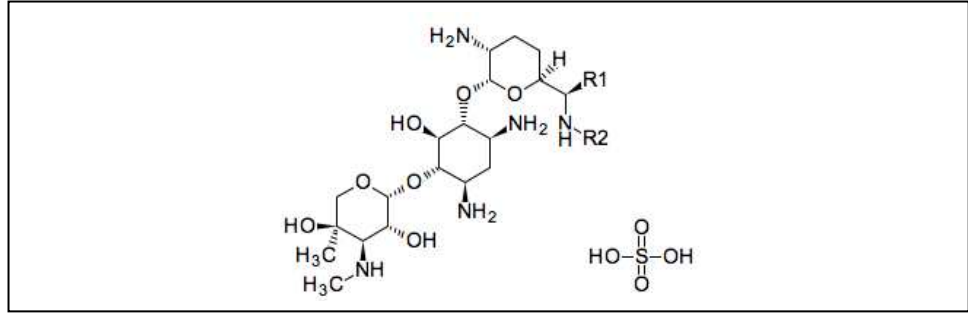
Şekil 1.3. Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü

2. Amikasin Sülfat: Aminoglikozid grubu yarı sentetik bir antibiyotiktir (Şekil 1.4). Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan açilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili bu özelliği nedeniyle; gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklıdır ve bundan dolayı en geniş spektrumlu aminoglikoziddir. Gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaların çoğuna bakterisid etki gösteren bir antibiyotiktir (Kayaalp 2000).



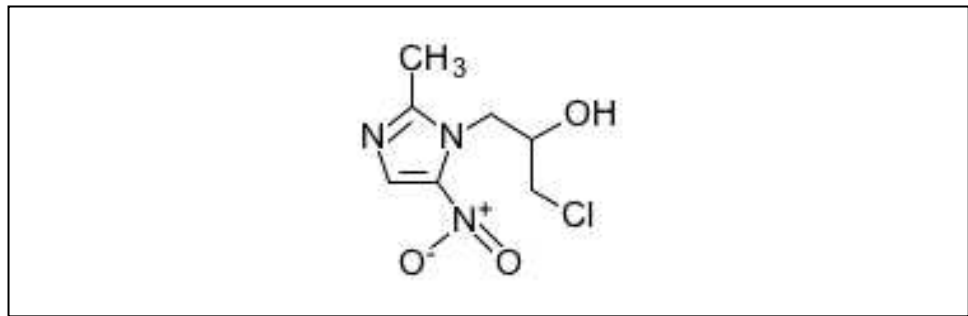
Şekil 1.4. Amikasin sülfatın molekülünün yapısal formülü

3. Gentamisin Sülfat: Mikromonospora purpurea'dan elde edilir. Gerçekte birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün karışımından oluşan bir antibiyotiktir (Şekil 1.5). Aminoglikozid ilaçlar içinde, amikasinden sonra spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en fazla olanıdır. Bakterisid etki yapar. Özellikle E.coli ve Aerobacter gibi bakteriler ile Pseudomonas aeruginosa gibi gram negatif basiller ve penisiline ve metisiline dayanıklı staph aureusları üzerine etkilidir. Kanda yaklaşık %10 oranında alyuvarlara bağlanır; bu nedenle anemik hastalarda kandaki serbest gentamisin konsantrasyonu biraz daha yüksek olur (Kayaalp 2000).



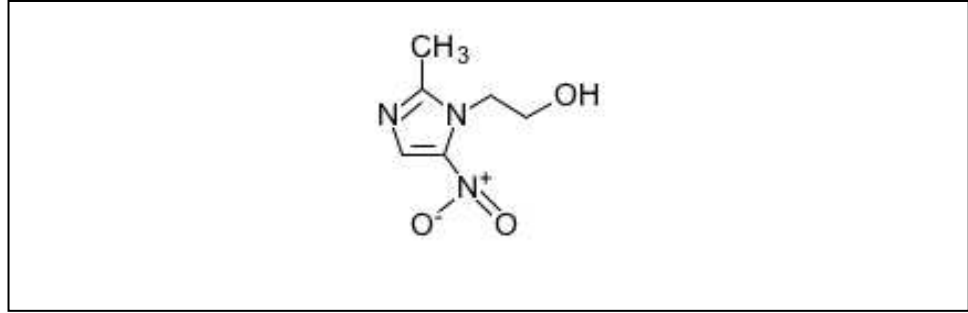
Şekil 1.5. Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü

4. Ornidazol: Metronidazol gibi nitroimidazol türevidir (Şekil 1.6). Kimyasal yapılarının özelliği nedeniyle metronidazoldan daha lipofiliktirler ve karaciğerde enzimatik inaktivasyonları daha yavaştır. Bakteri ve diğer mikroorganizma hücrelerine pasif difüzyonla girerek duyarlı bakteri DNA'sına bağlanıp DNA sentezini inhibe ederek mikrobiyal hücre ölümüne neden olur (Kayaalp 2000).



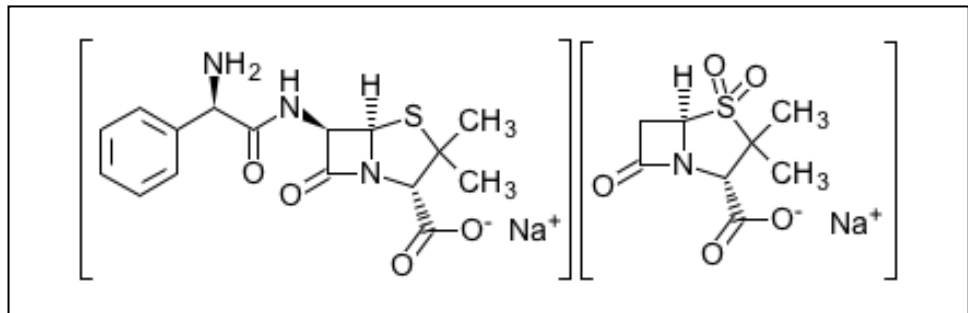
Şekil 1.6. Ornidazol molekülünün yapısal formülü

5. Metronidazol: Metronidazol bir nitroimidazol türevidir (Şekil 1.7). *Bacteroides fragilis* ve *Gardnerella vaginalis* dahil anaerob bakterilere ve *Campylobacter fetus*'a karşı güçlü antibakteriyel etki gösterir. Sayılan protozoonlara veya anaerob bakterilere bağlı infeksiyonların tedavisinde kullanılır (Kayaalp 2000).



Şekil 1.7. Metronidazol molekülünün yapısal formülü

6. Ampisilin sodyum: Penisilin çekirdeği olan 6-amino penisilanik asitten türemiştir (Şekil 1.8). Kimyasal olarak, D(-)- α -aminobenzil penisilin sodyum tuzudur. Ampisilin sodyum geniş spektrum aralığındaki β -laktamaz üretenler dahil birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakterisid etkiye sahiptir. Bu bakterilere bağlı otit, sinüzit ve diğer yukarı solunum yolu infeksiyonları, akciğer infeksiyonları, gonokokal uretrit, pelvis inflamatuvar hastalığı tedavisinde kullanılır (Kayaalp 2000).



Şekil 1.8. Ampisilin sodyum / sulbactam sodyum molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Şimdiye kadar suda yaşayan birçok canlı türünde ve bitki dokularında farklı enzimlerin aktivitelerine bakılmış ve bazı enzimler için de saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilmiştir. Örneğin, multikatalitik proteinaz enzimi (MCP) kurbağa gibi ses çıkaran balık manasına gelen ve literatürde croaker fish olarak bilinen balığın iskelet kasından saflaştırılmış ve enzimin özellikleri incelenmiştir (Busconi *et al.* 1992). Bunun yanı sıra, karagöz balığının iskelet kasından mitokondrial kreatin kinaz enzimi (MtCK) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Grzyb and Skorkowski 2005). Ek olarak, birçok balık türünün belirli dokularında proteaz enzimleri, gökkuşuğu alabalığı karaciğerinden glutatyon S-transferaz, yengeç mitokondriyal aldehit dehidrogenaz enzimi saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir (Fong and Ka-Fai Choy 2001; Riol *et al.* 2001; El-Beltagy *et al.* 2004; Ohkubo *et al.* 2004).

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

Glutatyon S-transferaz enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST karsinogenik bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat

olarak kullanılmaktadır. GST, her biri, elektrofilik substrat için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahiptir (Cnubben *et al.* 2001).

GST'ler ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmış ve daha sonra GST'nin farklı substrat spesifitelerine göre sınıflandırılması yapılmıştır. GST'leri epoksit transferaz, aril transferaz, alkil transferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz şeklinde beş grup altında sınıflandırmışlardır (Both *et al.* 1961; Boyland and Chasseaud 1969). Enzimin birçok formunun saflaştırılması ve bu formların yapısal özelliklerinin incelenmesiyle, iç içe geçmiş substrat spesifitelerinin olduğu anlaşılmıştır (Pabst *et al.* 1973; Askelöf *et al.* 1975). Bu sonuçlar ışığında enzimin sınıflandırılmasında proteinin enzimatik özellikleri yerine fiziksel ve yapısal özellikleri esas alınmıştır.

GST alt birimleri birbirinden bağımsız alfa, mü, pi, teta, sigma olarak beş alt sınıfa ayrılmıştır (Ketterer *et al.* 1993; Neufiend 1997). Ancak daha sonra yapılan araştırmalar bu enzim ailesinin delta, beta, tau, zeta formlarının da olduğunu göstermiştir (Dixon *et al.* 2002). GST'nin alfa, pi ve mü formları ilaç metabolizmasında, sigma alt birimi ise prostoglandin sentezinde önemli rol oynar (Rowsey *et al.* 2001). Zeta ve teta formları hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunurken tau ve pi formları bitkiye spesifiktir (Dixon *et al.* 2002).

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

Sonraki yapılan çalışmalarda GST enzimi, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid, mollusk ve birçok mikroorganizmada bulunmuştur. En sık rastlandığı dokular, başta karaciğer olmak üzere, ince bağırsak, kalın bağırsak, böbrek, akciğer,

meme, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok organın sitozolü ve membranında bulunduğu rapor edilmiştir (Habig *et al.* 1974).

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

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

Yapılan literatür araştırmalarında GST enzimi birçok organizmada saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Örneğin, Gadagbui *et al.* (2000) kedi balığının bağırsak mukozasından GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, glutasyon-agaroz afinite kolonuyla 107 μ mol/ mg spesifik aktiviteye sahip %87 verimle 100 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül kütlesi 26,7 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu (homodimer) belirlemişlerdir. Yaptıkları kinetik çalışmalarda ise enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M değerleri sırasıyla 0,19 mM ve 0,43 mM olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir.

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

Glutasyon S-transferaz enzimi E.coli ekstraktlarından %7,5 verimle yaklaşık olarak 2.300 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi 45 kDa ve iki eş alt birimden

oluştugu görülmüştür. Enzimin substratları olan CDNB ve GSH için K_M sabitleri sırasıyla 1,43 mM-0,33 mM olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri 7,0, optimum sıcaklık değeri 50⁰C ve stabil olduğu pH değeri 5 ten 11 e kadar olan geniş bir pH aralığı olarak belirlenmiştir (Iizuka *et al.* 1989).

Huang *et al.* (2008) bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, glutatyon- sepharoz 6B afinite kolonuyla 13,07 µmol/ mg spesifik aktiviteye sahip %14 verimle 300 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS - PAGE ile molekül kütlesi 26 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu (homodimer) belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH' sını 7,0-7,5 arasında, optimum sıcaklığını 45⁰C olarak bulmuşlardır. Yaptıkları kinetik çalışmalarda ise enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 µmol/ mg, 15,68 µmol/ mg olarak belirlemişlerdir.

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

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

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

İnsan kan serumdan GST saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada GST enziminin optimum iyonik şiddeti 2mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH sı 5,5, optimum sıcaklığı 65⁰C olarak belirlenmiştir. Ayrıca aktivite ölçümünde kullanılan substratları CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/min.mg; 4,11 mM ve 0,23 nmol/min.mg protein olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007).

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

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

Izuka *et al.* (1989) *E.coli* GST enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerini incelemek için yaptıkları bir çalışmada, demir ve çinko iyonlarının çok düşük konsantrasyonları bile enzimi inhibe ederken, kalsiyum, magnezyum, kobalt, mangan ve nikel iyonlarının ise inhibisyon etkisi yapmadığını gözlemlemişlerdir.

Plasental glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi zamanında doğum yapmış hastanın plasentasından alınarak glutatyon-agaroz affinite kolonu yardımıyla saflaştırılmıştır. GST- π 2.628 μ mol/mg dk spesifik aktivite ve % 0,5 verimle 16 kat saflaştırılmıştır. Enzimin substratı olan glutatyon (GSH) için K_M değeri 2 mM, V_{max} değeri 11,1 EÜ/mg dk; kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) için K_M değeri 0,55 mM, V_{max} değeri 35 EÜ/mg dk olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine ilaçların etkisinin

incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda antibakteriyel bir ilaç olan Ampisilinin, enzim aktivitesini *in vitro* olarak %50-55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Çelik *et al.* 2003).

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

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

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

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

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

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

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

Bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri GST aktivitesini artırabilir ya da azaltabilir. Yapılan bir çalışmada Brombenzen ve karbontetraklorür ratlara uygulanarak GST aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Uygulama sonrası karaciğer GST aktivitesinin azaldığı, serum GST aktivitesinin ise arttığı belirtilmiştir. (Çetinkaya vd 1993). Başka bir çalışmada, şifalı bir bitki olan Thonningia sanguinea'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA), *in vitro* olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir (Gyamfi *et al.* 2004).

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

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

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Sephadex G-100 Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), 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), agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat, β -merkaptotetanol; çalışmada kullanılan antibiyotikler ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whırlılı-mixer
Hassas terazi	: Gecavery (UK)

Kar makinesi : Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları : Arçelik
Derin dondurucu (-20⁰C'ye kadar): Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85⁰C'ye kadar): Sanyo Ultra Low
Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur.

3.1.3. GST enziminin afinite kolonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

- 1.** 10 mM KH₂PO₄ ve 150 mM NaCl, pH:7,4 (Kolonun dengelenmesi ve paketlenmesi için kullanılan tampon): 0,4 g KH₂PO₄ (3 mmol) ve 2,61 g NaCl (45 mmol) alınarak 250 ml suda çözülüp pH:7,4'e getirildikten sonra destile su ile 300 ml'ye tamamlandı.
- 2.** 10 mM KH₂PO₄/0,1 M KCl, pH:8,0 (Numune kolona uygulandıktan sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 1,36 g KH₂PO₄ (0,01 mol) ve 7,45 g KCl (0,1 mol) karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlanıp ve pH:8,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 3.** 10 mM KH₂PO₄/0,1 M KCl, pH:5,0 (Numune kolona uygulandıktan sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 1,36 g KH₂PO₄ (0,1 mol) ve 7,45 g KCl (0,1 mol) karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlanıp ve pH:5,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 4.** 50 mM Tris-HCl Çözeltisi, pH:9,5: 9,082 g Tris (74 mmol) alınarak 1,450 L saf suda çözülüp ve pH:9,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1,5 L'ye tamamlandı.

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

6. 1,4 mM 2- merkaptoetanol içeren 50 mM Tris-HCl ve 1,25 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi, pH:9,5 (Afinite jeline tutunan glutatyon *S*-transferaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon) 50 mM Tris- HCl çözeltisi içerisinde katı olarak GSH çözülerek 10 mM' lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 3 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulanıp elüatlar alındı.

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

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

9. %0,02 NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak saf suda çözülüp ve hacmi yine destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.4. Eritrositlerin yıkanması sırasında kullanılan çözeltiler

1. 0,154 M NaCl: 9,009 g NaCl (0,154 mol) alınarak hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2. 0,16 M KCl: 11,92 g KCl (0,16 mol) alınarak destile su ile hacmi 1 L'ye tamamlandı.

3.1.5. GST Enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,5 M KH_2PO_4 (pH:7,4): 13,61 g KH_2PO_4 (0,1 mol) tartılarak 180 ml saf su içerisinde çözülerek pH:7,4'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı.
2. 20 mM GSH Çözeltisi: 122,9 mg indirgenmiş glutatyon (0,4 mmol) alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim su ile 20 ml'ye tamamlandı.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 101,3 mg 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (0,5mmol) alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 20 ml'ye tamamlandı.

3.1.6. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH:8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) alınarak 80 ml suda çözülüp pH:8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) alınarak 80 ml suda çözüldü pH:6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid, 34,6 ml saf su içerisinde çözülerek toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. %10'luk SDS çözeltisi: 1 g sodyum dodesil sülfat 9 ml saf su içerisinde çözülerek 10 ml hazırlandı.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1g amonyum persülfat alınarak, 9 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözülecektir. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edilerek pH:8,3'e ayarlanıp son hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH:6,8)'den 0,65 ml, %10'luk SDS'den 1 ml%100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlanacaktır. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numuneye karşılık 50 µl β-merkaptan etanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel de yürütülen proteinleri sabitleştirmek amacıyla %50 izopropanol, %40 su ve %10 TCA içeren bir karışım hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 çözülerek hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

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

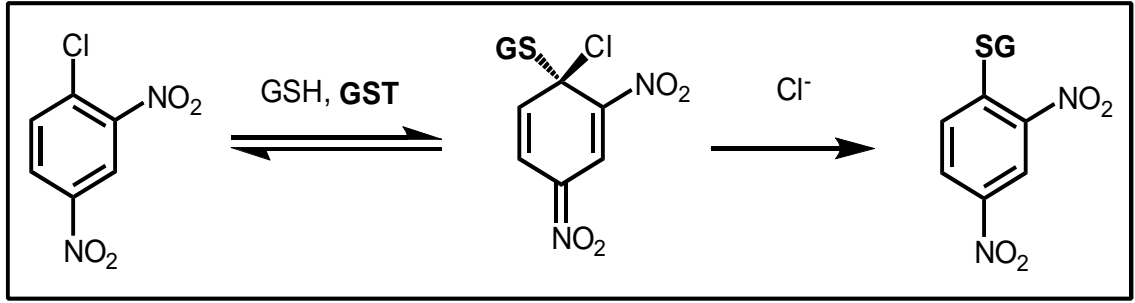
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle bulundu. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.2.2. Glutatyon S-transferaz aktivitesi tayini

Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutatyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen S-glutatyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbans gösterir (Şekil 3.1). Böylece bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Biz de bu ölçüm metoduna göre çalışmalarımızda aktivite ölçümünü gerçekleştirdik.



Şekil 3.1. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous *et al.* 2002)

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

Aktivite ölçümü için toplam hacim 1ml olacak şekilde karışım hazırlandı. Bunun için kör olarak hazırlanan küvete 0,5 M 200 µl fosfat tamponu (K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH:7,4) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde), 20 mM 50 µl GSH ve 730 µl saf su ilave edildi. Aktivite ölçümü yapılan küvetlere ise 0,5 M 200 µl (K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH:7,4) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde). Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 20 mM 50 µl GSH katılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 50 µl 'lik enzim numunesi hızlı bir şekilde ilave edildikten sonra küvet spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig *et al.* 1974).

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

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U} = (\Delta OD/9,6) \times (V_T/V_E) \times SF$$

EÜ: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

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

V_T : Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

V_E : Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.2.3. GST Enzimi için afinite jelinin hazırlanması

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

3.2.4. Gökkuşuğu alabalık eritrositlerinden GST'nin saflaştırılması

3.2.4.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması

Gökkuşuğu alabalık kanı, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü alabalık üretim tesislerindeki sağlıklı balıklardan alındı ve yeterince antikoagulant madde ihtiva eden kan torbasına koyuldu. Buz içerisine yerleştirilerek laboratuara getirilen kanlar hemen çalışıldı. Alınan taze balık kanı santrifüj tüplerine koyularak, 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında bulunan plazma ve lökosit tabakası damlalıklı dikkatli bir şekilde alınarak atıldı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti ise 0,154 M NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı ve her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 katı kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit peleti hücre zarlarını uzaklaştırmak amacıyla +4°C'de 15 000xg'de 30 dakika

santrifüj edildi. Üst kısımda bulunan hemolizat, sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla damlalık ile dikkatli bir biçimde alındıktan sonra çöken kısım uzaklaştırıldı. Sonuçta hemolizat hazırlanmış oldu. (Hunaiti and Soud 2000).

3.2.4.b. Hemolizattaki enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Önceden hazırlanmış olan hemolizat doğrudan glutatyon-agaroz afinite kolonuna uygulandı. Bunu takiben kolondan 10 mM KH_2PO_4 ve 0,1M KCl, pH:8 geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon dengelendikten sonra gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Elüsyon çözeltisi 50 mM Tris-HCl ve (1,25-10 mM GSH, pH:9,5) içeren çözeltinin gradientinden oluşturuldu. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5 ml halinde tüplere alındı ve 340 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı (Toribio *et al.* 1996).

3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

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

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla

yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra gerilim 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve 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 4.2)

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

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

3.2.6. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak, tavşan fosforilazı B 97 kDa, sığır serum albumini 66 kDa, ovalbumini 45 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidrazı 29 kDa kullanıldı. Gökkuşığı alabalık eritrosit için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log M_K-R_f standart grafikleri çizildi. Daha sonra balık eritrositlerinden

elde edilen GST enziminin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak gökkuşağı alabalık eritrosit GST enziminin $\log M_K$ 'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi tespit edildi.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.7. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için 40 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-100, 150 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM'lık Tris-HCl/100 mM KCl (pH:7,5) olan tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorban değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10-15 ml/saat olarak ayarlandı.

Gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2.000 kDa, β -amilaz; 200 kDa, maya alkol dehidrogenaz; 150 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidraz; 29 kDa, sitokrom c; 12 kDa standart proteinler ayrı ayrı kolona uygulandı. Daha sonra numune jel filtrasyon kolonuna uygulandı (Keha and Küfrevioğlu 2004).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu %10'luk gliserinli 50 mM'lık Tris-HCl/100 mM KCl (pH:7,5) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 1'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri sıfırlanıncaya kadar devam edildi. 280nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve $\text{Log } M_K$ değerleri hesaplandı. $\text{Log } M_K$ - K_{av} grafiği bilgisayarda excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden elde edilen glutasyon S-transferaz enziminin K_{av} değerleri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütesi hesaplandı.

Aşağıdaki formül kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı ve $\text{Log } M_K$ - K_{av} grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_o = Void hacim, V_e = Elüsyon hacmi, V_t = Kolon yatak hacmi

3.3. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Safılaştırılan GST Enzimiyle İlgili Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5,0, 5,5 6,0, 6,5, 7,0, 7,3, 7,5 ve 8,0 olan fosfat tamponları hazırlandı. Her bir tampon ile enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için 0,01M, 0,02M, 0,04M, 0,06M, 0,08M, 0,1M, 0,12M, 0,14M, 0,16M, 0,18M ve 0,2M fosfat tamponları hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri optimal pH olan 7,3'e ayarlanarak her bir çözelti için aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için elektronik ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklık belirlenirken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda bekletildi. Çıkarıldığında enzim pipetlenerek hemen okuma yapıldı ve su banyosuna tekrar konuldu. 0°C ile 70°C arasında ve her 10°C de bir bu şekilde aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.4. Stabil pH'nın belirlenmesi

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin stabil olduğu pH'nın belirlenmesi için uygun fosfat tamponununun pH değerleri 5,3, 5,8, 6,3, 6,8 7,3 ve 7,8 olan çözeltileri

hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 400 µl alınarak üzerine yine 400 µl enzim çözeltisi ilave edilerek ependorf tüplerine konulup ilk okuma yapıldıktan sonra +4°C 'de korunarak her gün bir okuma yapıldı. Aktivite ölçümlerinde optimum pH ve iyonik şiddete sahip tamponlar kullanıldı.

3.3.5. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına ait çalışmalar

Gökkuşığı alabalık eritrosit glutatyon *S*-transferaz enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerini tespit etmek için (1mM) sabit GSH konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonu (0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM ve 0,125 mM) ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre $1/V-1/[CDNB]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik yardımı ile CDNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Yine aynı şekilde (0,5 mM) sabit CDNB konsantrasyonunda GSH'ın 5 farklı konsantrasyonu (0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1mM) ile aktivite ölçümleri yapılarak ve $1/[GSH]-1/V$ grafiği çizildi. Bu grafikten de GSH için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.4. Gökkuşığı Alabalık Eritrosit GST Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotik Ve Metal İyonlarının *In Vitro* Etkilerinin İncelenmesi

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

Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için

$K_M^I = K_M / (1 + [I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max} = V_{max}^I / (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Çizelge 3.1. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde amikasin sülfatın IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	50	680	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	50	674	6,25	0,5	1	2	1000
200	20	50	50	668	12,5	0,5	1	4	1000
200	20	50	50	655	25	0,5	1	8	1000
200	20	50	50	630	50	0,5	1	16	1000
200	20	50	50	605	75	0,5	1	24	1000

Çizelge 3.2. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde sefuroksim sodyumun IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	50	680	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	50	679	1,5	0,5	1	0,35	1000
200	20	50	50	678	2,5	0,5	1	0,70	1000
200	20	50	50	675	5	0,5	1	1,4	1000
200	20	50	50	673	7,5	0,5	1	2,1	1000
200	20	50	50	670	10	0,5	1	2,8	1000

Çizelge 3.3. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde gentamisin sülfatın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (µl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	50	680	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	50	678	2,5	0,5	1	174x10 ⁻³	1000
200	20	50	50	675	5	0,5	1	348 x10 ⁻³	1000
200	20	50	50	673	7,5	0,5	1	522 x10 ⁻³	1000
200	20	50	50	670	10	0,5	1	696 x10 ⁻³	1000
200	20	50	50	665	15	0,5	1	1044x10 ⁻³	1000

Çizelge 3.4. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Mg⁺² metal iyonunun IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (µl)	Substrat (µl)		Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (µl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	50	680	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	50	480	200	0,5	1	20	1000
200	20	50	50	380	300	0,5	1	30	1000
200	20	50	50	280	400	0,5	1	40	1000
200	20	50	50	180	500	0,5	1	50	1000
200	20	50	50	-	680	0,5	1	68	1000

Çizelge 3.5. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cr^{+2} metal iyonunun IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH_2PO_4 (10mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	30	700	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	30	650	50	0,5	1	0,25	1000
200	20	50	30	600	100	0,5	1	0,5	1000
200	20	50	30	500	200	0,5	1	1	1000
200	20	50	30	450	250	0,5	1	1,25	1000
200	20	50	30	400	300	0,5	1	1,5	1000

Çizelge 3.6. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Ag^+ metal iyonunun IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH_2PO_4 (10mM) (μl)	Substrat (μl)		Enzim (μl)	Saf su (μl)	İnhibitör (μl)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (μl)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	30	700	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	30	650	50	0,5	1	5×10^{-3}	1000
200	20	50	30	600	100	0,5	1	1×10^{-2}	1000
200	20	50	30	500	200	0,5	1	2×10^{-2}	1000
200	20	50	30	300	400	0,5	1	4×10^{-2}	1000
200	20	50	30	100	600	0,5	1	6×10^{-2}	1000

Çizelge 3.7. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cd^{+2} metal iyonunun IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (μ l)
	CDNB (25mM)	GSH (20mM)				CDNB	GSH		
200	20	50	30	700	-	0,5	1	-	1000
200	20	50	30	698	2,5	0,5	1	0,025	1000
200	20	50	30	695	5	0,5	1	0,05	1000
200	20	50	30	690	10	0,5	1	0,1	1000
200	20	50	30	675	25	0,5	1	0,25	1000
200	20	50	30	650	50	0,5	1	0,5	1000

Çizelge 3.8. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde amikasin sülfatın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	10	50	720	-	0,5	0,02	-	1
200	20	20	50	710	-	0,5	0,04	-	1
200	20	30	50	700	-	0,5	0,06	-	1
200	20	40	50	690	-	0,5	0,08	-	1
200	20	50	50	680	-	0,5	0,1	-	1
200	20	10	50	714	6,25	0,5	0,02	2	1
200	20	20	50	704	6,25	0,5	0,04	2	1
200	20	30	50	694	6,25	0,5	0,06	2	1
200	20	40	50	684	6,25	0,5	0,08	2	1
200	20	50	50	674	6,25	0,5	0,1	2	1
200	20	10	50	695	25	0,5	0,02	8	1
200	20	20	50	685	25	0,5	0,04	8	1
200	20	30	50	675	25	0,5	0,06	8	1
200	20	40	50	665	25	0,5	0,08	8	1
200	20	50	50	655	25	0,5	0,1	8	1
200	20	10	50	670	50	0,5	0,02	16	1

Çizelge 3.8. Devamı

200	20	20	50	660	50	0,5	0,04	16	1
200	20	30	50	650	50	0,5	0,06	16	1
200	20	40	50	640	50	0,5	0,08	16	1
200	20	50	50	630	50	0,5	0,1	16	1

Çizelge 3.9. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde sefuroksim sodyumun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	10	50	720	-	0,5	0,02	-	1
200	20	20	50	710	-	0,5	0,04	-	1
200	20	30	50	700	-	0,5	0,06	-	1
200	20	40	50	690	-	0,5	0,08	-	1
200	20	50	50	680	-	0,5	0,1	-	1
200	20	10	50	719	1,5	0,5	0,02	0,35	1
200	20	20	50	709	1,5	0,5	0,04	0,35	1
200	20	30	50	699	1,5	0,5	0,06	0,35	1
200	20	40	50	689	1,5	0,5	0,08	0,35	1
200	20	50	50	679	1,5	0,5	0,1	0,35	1
200	20	10	50	718	2,5	0,5	0,02	0,70	1
200	20	20	50	708	2,5	0,5	0,04	0,70	1
200	20	30	50	698	2,5	0,5	0,06	0,70	1
200	20	40	50	688	2,5	0,5	0,08	0,70	1
200	20	50	50	678	2,5	0,5	0,1	0,70	1
200	20	10	50	715	5	0,5	0,02	1,4	1
200	20	20	50	705	5	0,5	0,04	1,4	1
200	20	30	50	695	5	0,5	0,06	1,4	1
200	20	40	50	685	5	0,5	0,08	1,4	1
200	20	50	50	675	5	0,5	0,1	1,4	1

Çizelge 3.10. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde gentamisin sülfatın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	10	50	720	-	0,5	0,02	-	1
200	20	20	50	710	-	0,5	0,04	-	1
200	20	30	50	700	-	0,5	0,06	-	1
200	20	40	50	690	-	0,5	0,08	-	1
200	20	50	50	680	-	0,5	0,1	-	1
200	20	10	50	715	5	0,5	0,02	0,348	1
200	20	20	50	705	5	0,5	0,04	0,348	1
200	20	30	50	695	5	0,5	0,06	0,348	1
200	20	40	50	685	5	0,5	0,08	0,348	1
200	20	50	50	675	5	0,5	0,1	0,348	1
200	20	10	50	710	10	0,5	0,02	0,696	1
200	20	20	50	700	10	0,5	0,04	0,696	1
200	20	30	50	690	10	0,5	0,06	0,696	1
200	20	40	50	680	10	0,5	0,08	0,696	1
200	20	50	50	670	10	0,5	0,1	0,696	1
200	20	10	50	705	15	0,5	0,02	1,044	1
200	20	20	50	695	15	0,5	0,04	1,044	1
200	20	30	50	685	15	0,5	0,06	1,044	1
200	20	40	50	675	15	0,5	0,08	1,044	1
200	20	50	50	665	15	0,5	0,1	1,044	1

Çizelge 3.11. Gökkuşuğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Mg^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	20	30	730	-	0,5	0,04	-	1
200	20	50	30	700	-	0,5	0,1	-	1
200	20	90	30	660	-	0,5	0,18	-	1
200	20	125	30	625	-	0,5	0,25	-	1
200	20	200	30	550	-	0,5	0,4	-	1
200	20	20	30	530	200	0,5	0,04	20	1
200	20	50	30	500	200	0,5	0,1	20	1
200	20	90	30	460	200	0,5	0,18	20	1
200	20	125	30	425	200	0,5	0,25	20	1
200	20	200	30	350	200	0,5	0,4	20	1
200	20	20	30	330	400	0,5	0,04	40	1
200	20	50	30	300	400	0,5	0,1	40	1
200	20	90	30	260	400	0,5	0,18	40	1
200	20	125	30	225	400	0,5	0,25	40	1
200	20	200	30	150	400	0,5	0,4	40	1
200	20	20	30	230	500	0,5	0,04	50	1
200	20	50	30	200	500	0,5	0,1	50	1
200	20	90	30	160	500	0,5	0,18	50	1
200	20	125	30	125	500	0,5	0,25	50	1
200	20	200	30	50	500	0,5	0,4	50	1

Çizelge 3.12. Gökkuşuğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cr^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	20	30	730	-	0,5	0,04	-	1
200	20	50	30	700	-	0,5	0,1	-	1
200	20	90	30	660	-	0,5	0,18	-	1
200	20	125	30	625	-	0,5	0,25	-	1
200	20	200	30	550	-	0,5	0,4	-	1
200	20	20	30	630	100	0,5	0,04	0,5	1
200	20	50	30	600	100	0,5	0,1	0,5	1
200	20	90	30	560	100	0,5	0,18	0,5	1
200	20	125	30	525	100	0,5	0,25	0,5	1
200	20	200	30	450	100	0,5	0,4	0,5	1
200	20	20	30	530	200	0,5	0,04	1	1
200	20	50	30	500	200	0,5	0,1	1	1
200	20	90	30	460	200	0,5	0,18	1	1
200	20	125	30	425	200	0,5	0,25	1	1
200	20	200	30	350	200	0,5	0,4	1	1
200	20	20	30	480	250	0,5	0,04	1,25	1
200	20	50	30	450	250	0,5	0,1	1,25	1
200	20	90	30	410	250	0,5	0,18	1,25	1
200	20	125	30	375	250	0,5	0,25	1,25	1
200	20	200	30	300	250	0,5	0,4	1,25	1

Çizelge 3.13. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Ag^+ metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	20	30	730	-	0,5	0,04	-	1
200	20	50	30	700	-	0,5	0,1	-	1
200	20	90	30	660	-	0,5	0,18	-	1
200	20	125	30	625	-	0,5	0,25	-	1
200	20	200	30	550	-	0,5	0,4	-	1
200	20	20	30	630	100	0,5	0,04	0,01	1
200	20	50	30	600	100	0,5	0,1	0,01	1
200	20	90	30	560	100	0,5	0,18	0,01	1
200	20	125	30	525	100	0,5	0,25	0,01	1
200	20	200	30	450	100	0,5	0,4	0,01	1
200	20	20	30	530	200	0,5	0,04	0,02	1
200	20	50	30	500	200	0,5	0,1	0,02	1
200	20	90	30	460	200	0,5	0,18	0,02	1
200	20	125	30	425	200	0,5	0,25	0,02	1
200	20	200	30	350	200	0,5	0,4	0,02	1
200	20	20	30	330	400	0,5	0,04	0,04	1
200	20	50	30	300	400	0,5	0,1	0,04	1
200	20	90	30	260	400	0,5	0,18	0,04	1
200	20	125	30	225	400	0,5	0,25	0,04	1
200	20	200	30	150	400	0,5	0,4	0,04	1

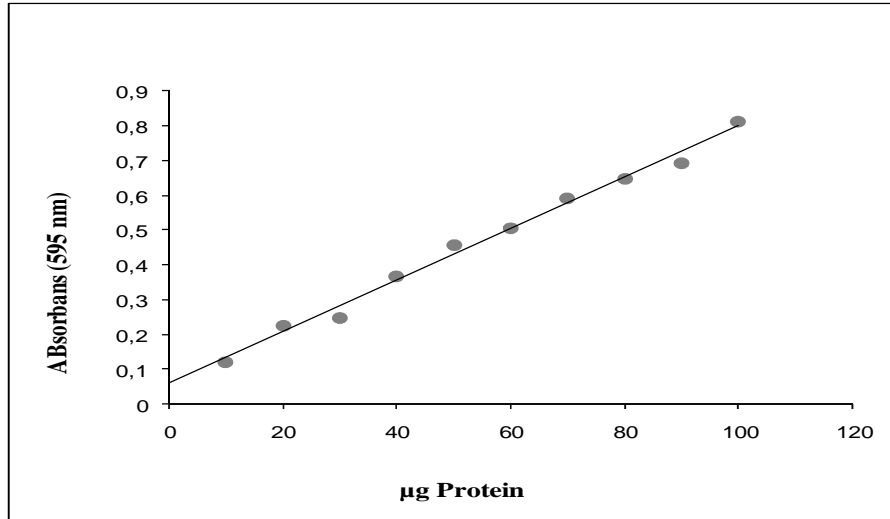
Çizelge 3.14. Gökkuşuğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerinde Cd^{+2} metal iyonunun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

KH ₂ PO ₄ (10mM) (μ l)	Substrat (μ l)		Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (mM)		Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (ml)
	CDNB (25mM)	GSH (2mM)				CDNB	GSH		
200	20	20	30	730	-	0,5	0,04	-	1
200	20	50	30	700	-	0,5	0,1	-	1
200	20	90	30	660	-	0,5	0,18	-	1
200	20	125	30	625	-	0,5	0,25	-	1
200	20	200	30	550	-	0,5	0,4	-	1
200	20	20	30	728	2,5	0,5	0,04	0,025	1
200	20	50	30	698	2,5	0,5	0,1	0,025	1
200	20	90	30	658	2,5	0,5	0,18	0,025	1
200	20	125	30	623	2,5	0,5	0,25	0,025	1
200	20	200	30	548	2,5	0,5	0,4	0,025	1
200	20	20	30	720	10	0,5	0,04	0,1	1
200	20	50	30	690	10	0,5	0,1	0,1	1
200	20	90	30	650	10	0,5	0,18	0,1	1
200	20	125	30	615	10	0,5	0,25	0,1	1
200	20	200	30	540	10	0,5	0,4	0,1	1
200	20	20	30	705	25	0,5	0,04	0,25	1
200	20	50	30	675	25	0,5	0,1	0,25	1
200	20	90	30	635	25	0,5	0,18	0,25	1
200	20	125	30	600	25	0,5	0,25	0,25	1
200	20	200	30	525	25	0,5	0,4	0,25	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

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



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

4.2. Gökkuşluğu Alabalık Eritrositlerinden GST Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar

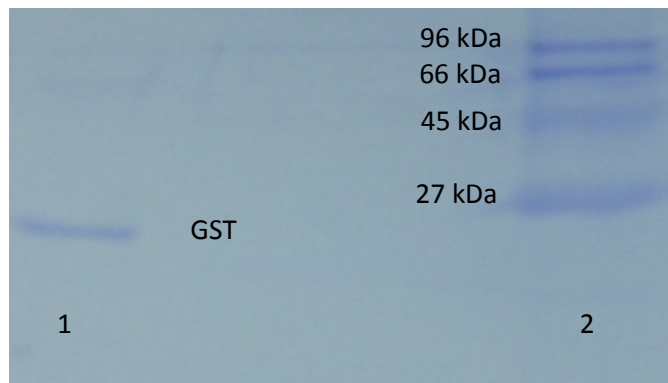
Gökkuşluğu alabalık hemolizati, afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden GST enziminin saflaştırma sonuçları

Numune türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	35	0,073	48.86	1710	2,555	0,0015	100	1,0
Afinite	7	0,215	0,013	0,091	1,505	16,54	59	11.026

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

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden afinite sonrası elde edilen elüatlardaki GST enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.5' de izah edilen elektrofrez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.2' de verildi.

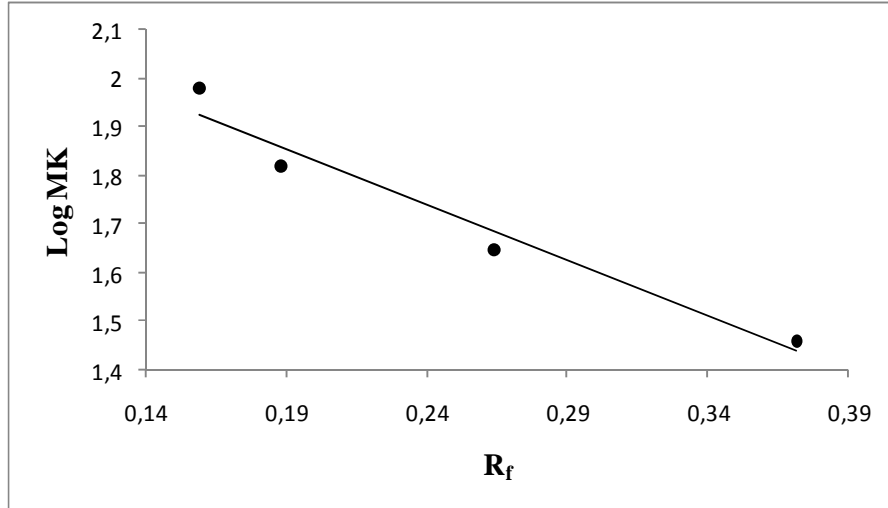


Şekil 4.2. Glutasyon-agaroz afinite kolonuyla saflaştırılan gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu Glutasyon-agaroz afinite kolonuyla saflaştırılan gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi, 2. kuyu standart proteinler (tavşan kası fosforilaz b, 97 kDa, sığır albümin; 66 kDa; ovalbümin; 45 kDa, sığır eritrosit CA; 29 kDa)

4.4. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Saflaştırılan GST Enziminin SDS-PAGE İle Alt Birimlerinin Mol Kütlesinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin mol kütlesinin belirlenmesi için bölüm 3.2.6'da izah edildiği gibi enzim kesikli SDS-PAGE'de yürütüldü ve sonuçta elde edilen bantların fotoğrafı Şekil 4.2'de gösterildi. Yürütülen standartların ve enzimin R_f değeri ölçülüp $\log M_K - R_f$ standart grafiği çizildi (Şekil 4.3). Gökkuşığı alabalık eritrosit glutatyon *S*-transferaz enziminin alt birimlerinin mol kütlesi 23 kDa olarak tespit edildi.

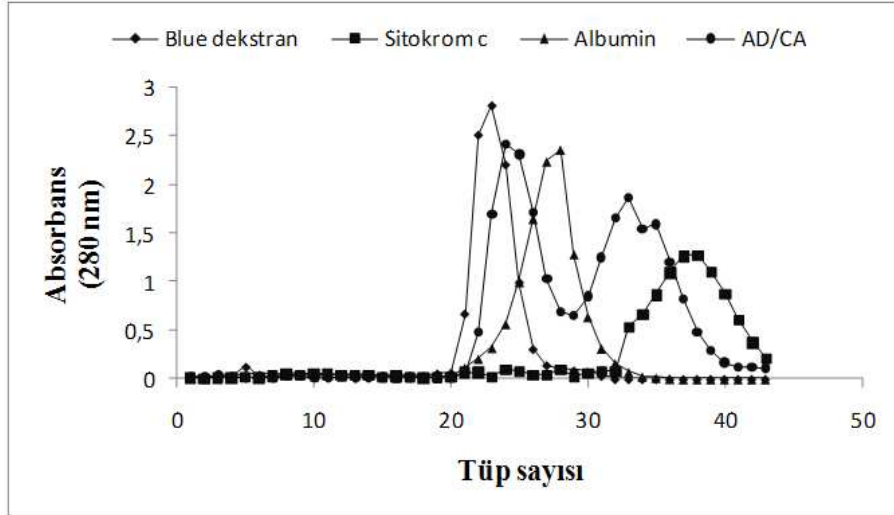


Şekil 4.3. Saflaştırılan GST enzimi için $\log M_K/R_f$ grafiği

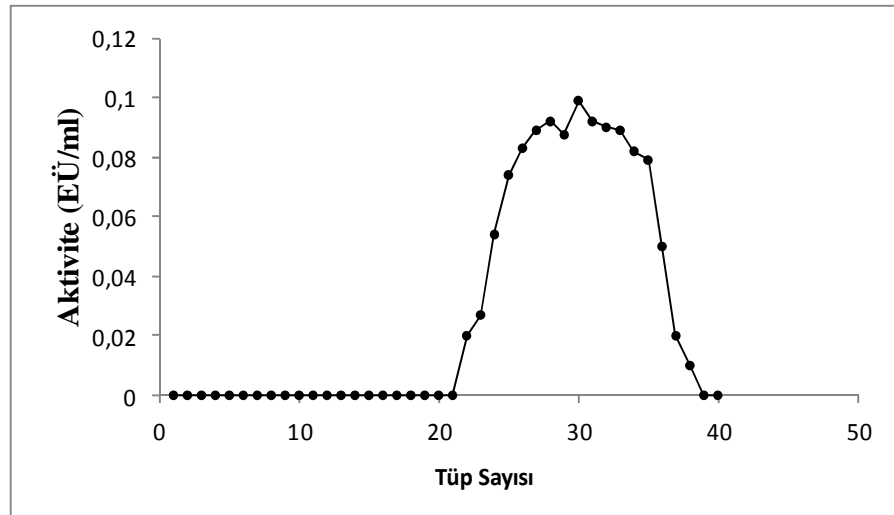
4.5. Gökkuşığı Alabalığı Eritrositlerinden Saflaştırılan GST Enziminin Molekül Kütlesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Belirlenmesi

Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde kolon materyali olarak Sephadex G-100 jeli ile jel filtrasyon kromatografisi yapıldı ve sonuçlar Şekil 4.4 ve 4.5'de verildi. Bu işlem esnasında; Blue dextran (2000 kDa) kolona uygulandı. Daha sonra alkol dehidrogenaz (150 kDa)/ sığır eritrosit CA (29 kDa), bovin serum albumin (66 kDa), sitokrom c (12,4 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Standart proteinler kolondan geçtikten sonra

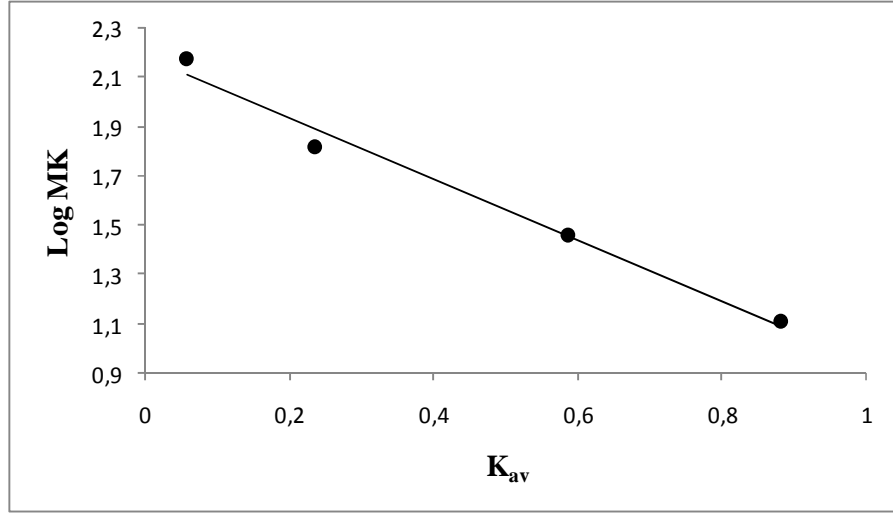
numune jel filtrasyon kolonundan geçirildi. Daha sonra $\log M_K-K_{av}$ grafiği çizilerek, eritrosit GST enziminin moleköl kütlesi 47 kDa olarak tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.4. Jel filtrasyon kolonundan geçirilen standart proteinlerin elüsyon grafiği



Şekil 4.5. Gökkuşaağı alabalığı eritrosit GST enziminin moleköl kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği



Şekil 4.6. Gökkuşığı alabalığı eritrosit enziminin molekül kütesini tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik

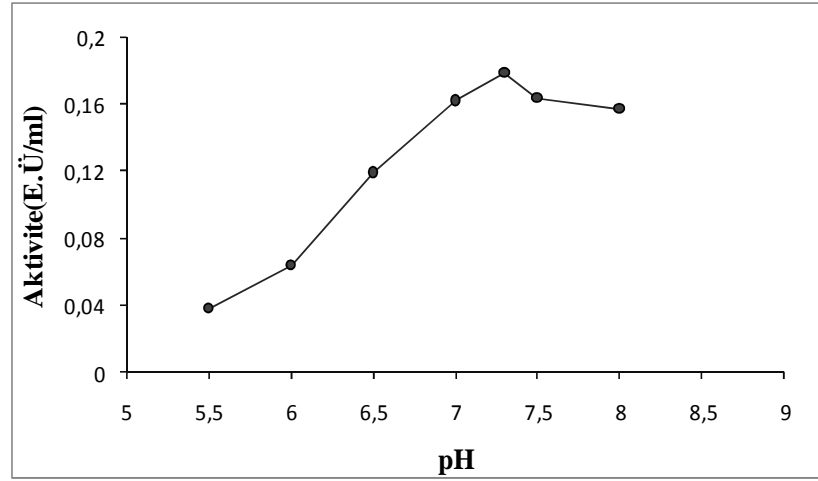
4.6. Gökkuşığı Alabalık Eritrosit GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

4.6.1. Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sını tespit etmek için bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi pH değeri 5,5 ile 8,0 arasında değişen, uygun tamponlardan oluşan 7 adet çözelti kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı. Alabalık eritrosit GST enziminin optimum pH değeri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7'de gösterildiği gibi pH 7,3 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

0,1M KH_2PO_4	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,5	0,0382
6,0	0,0636
6,5	0,119
7,0	0,162
7,3	0,179
7,5	0,164
8,0	0,157



Şekil 4.7. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin K-fosfat tamponu ile elde edilen Aktivite-pH grafiği

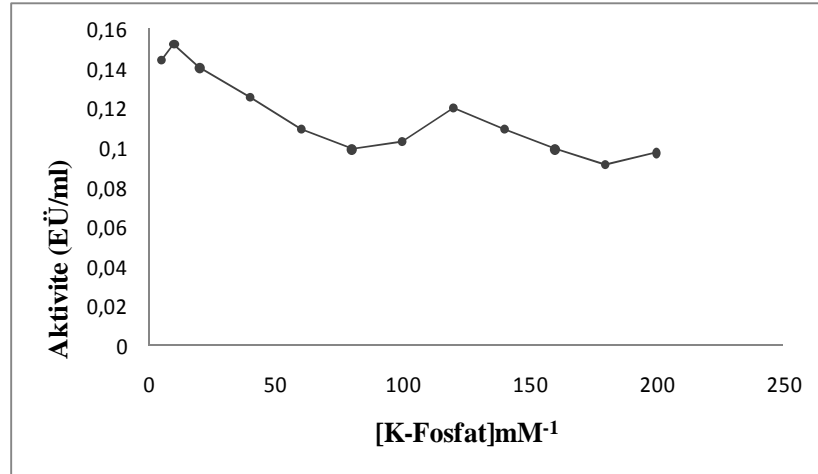
4.6.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin aktivite ölçümünde en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi için önceki çalışmalar sayesinde uygunluğu tespit edilen optimum pH' ya sahip fosfat tamponuyla değişik konsantrasyonlardaki çözeltiler bölüm 3.3.2'de bahsedildiği gibi hazırlandı ve farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları kullanılarak enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra her bir

tampondaki enzim aktiviteleri hesaplandı. Alabalık eritrosit GST enziminin iyonik şiddet değeri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8’de gösterildiği gibi 10 mM olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin optimum iyonik şiddetini KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

KH_2PO_4	
İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
10	0,1520
20	0,1400
40	0,1250
60	0,1090
80	0,0990
100	0,1030
120	0,1200
140	0,1090
160	0,0990
180	0,0914
200	0,0972



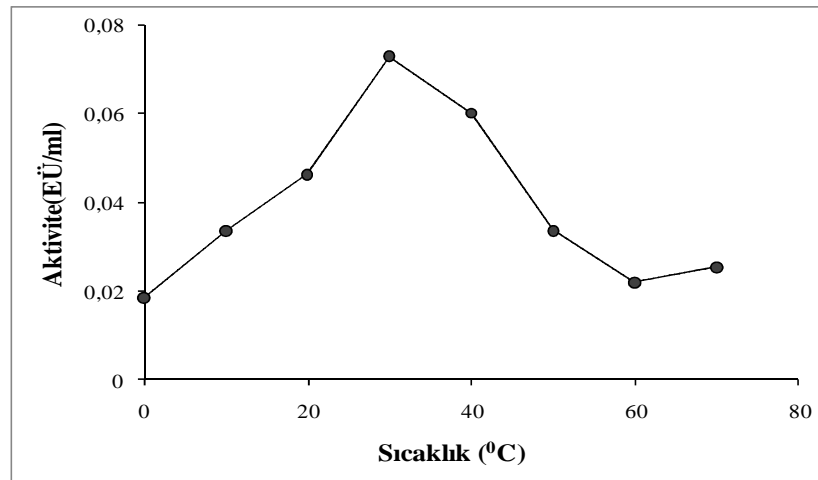
Şekil 4.8. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için yapılan aktivite-K-fosfat (mM) grafiği

4.6.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tampon çözelti kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında bölüm 3.3.3’de belirtildiği gibi her 10°C de bir enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra enzim aktiviteleri hesaplandı. Alabalık eritrosit GST enziminin optimum sıcaklık değeri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.9’da gösterildiği gibi 30°C olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,0185
10	0,0335
20	0,0463
30	0,0729
40	0,06
50	0,0335
60	0,022
70	0,0254



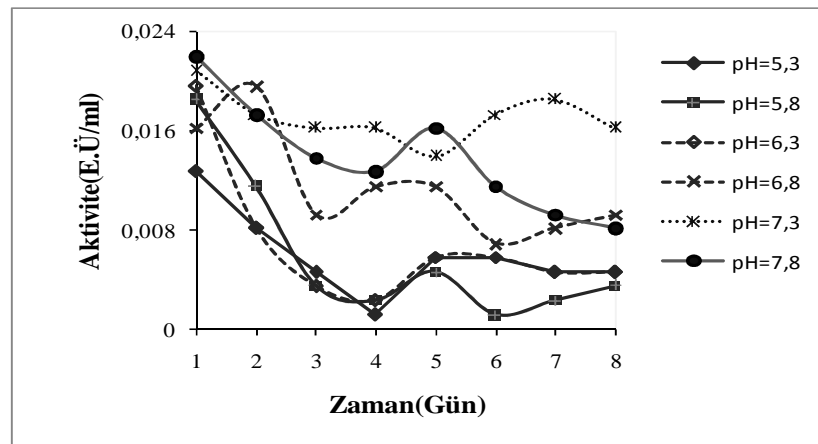
Şekil 4.9. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite-sıcaklık grafiği

4.6.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçları

Gökkuşacağı alabalık eritrosit GST enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için uygun iyonik şiddete sahip değişik pH değerlerinde tampon çözeltileri bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi hazırlandı. 1/1 oranında saf enzim ile tampon karıştırılarak her gün olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi. Gökkuşacağı alabalık eritrosit GST enziminin stabil pH değeri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.10'de gösterildiği gibi pH 7,3 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Gökkuşacağı alabalık eritrosit GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

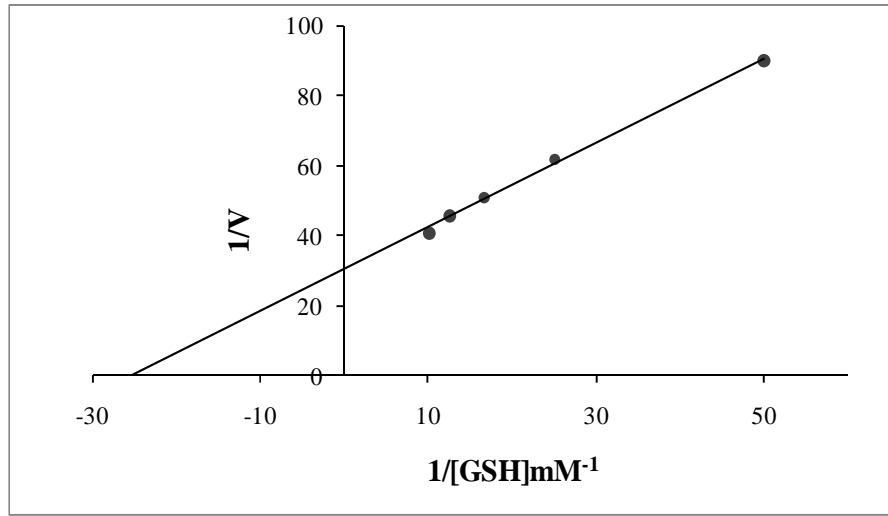
pH	5,3	5,8	6,3	6,8	7,3	7,8
Zaman (Gün)	Aktivite (EÜ/ml)					
1	0,0127	0,0185	0,0196	0,0162	0,0208	0,022
2	0,0081	0,0115	0,0081	0,0196	0,0173	0,0173
3	0,0115	0,0035	0,0035	0,0092	0,0162	0,0138
4	0,0012	0,0023	0,0023	0,0115	0,0162	0,0127
5	0,0058	0,0046	0,0058	0,0115	0,0139	0,0162
6	0,0058	0,0012	0,0058	0,0069	0,0173	0,0115
7	0,0046	0,0023	0,0046	0,0081	0,0185	0,0092
8	0,0046	0,0035	0,0046	0,0092	0,0162	0,0081



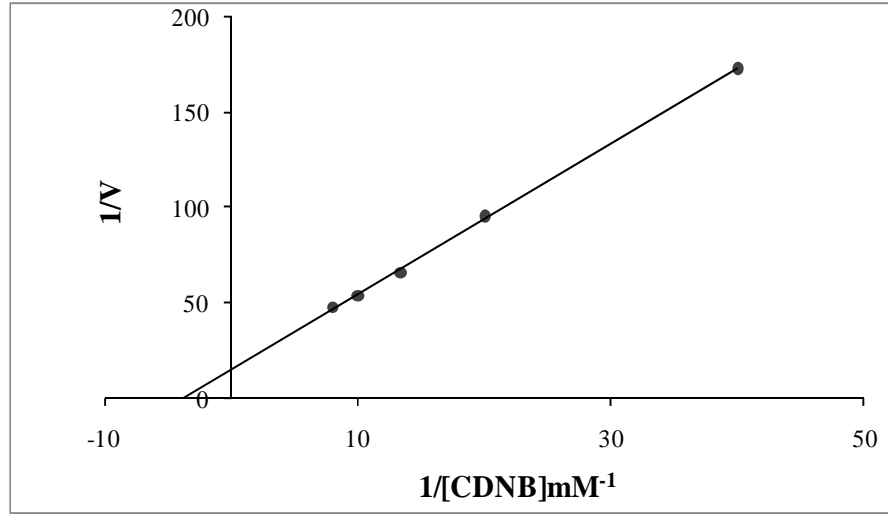
Şekil 4.10. Gökkuşacağı alabalık eritrosit GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için KH_2PO_4 tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen grafik

4.6.5. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminin substratı olan GSH için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5’de anlatıldığı gibi CDNB’nin 0,5mM’lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı GSH konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Sonuçta elde edilen değerler ile $1/[GSH]-1/V$ grafiği çizilerek reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.6). Enzimin bir diğer substratı olan CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini hesaplamak için bölüm 3.3.5’de anlatıldığı gibi GSH’ın 1mM’lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/[CDNB]-1/V$ grafiği çizildi ve reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.6).



Şekil 4.11. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda (0,5 mM) GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği



Şekil 4.12. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda (1 mM) CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Çizelge 4.6. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
GSH	0,0395	0,0328
CDNB	0,2590	0,0655

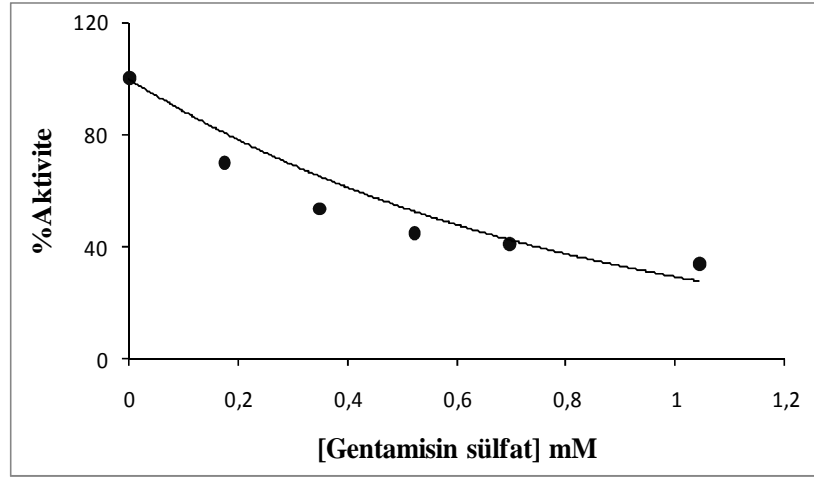
4.7. Gökkuşuğu Alabalık Eritrosit GST Enzimi Üzerine Bazı Antibiyotik Ve Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

4.7.1. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve metal iyonları için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

Çalışılan antibiyotik ve ağır metallerin alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenler için bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteler bulunarak % Aktivite-[I] değerleri hesaplanarak (Çizelge 4.7-4.13) grafikleri çizildi (Şekil 4.13-4.19) ve bu grafiklerden IC_{50} değerleri hesaplanarak Çizelge 4.14-4.15' de verildi.

Çizelge 4.7. Gentamisin sülfatın gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

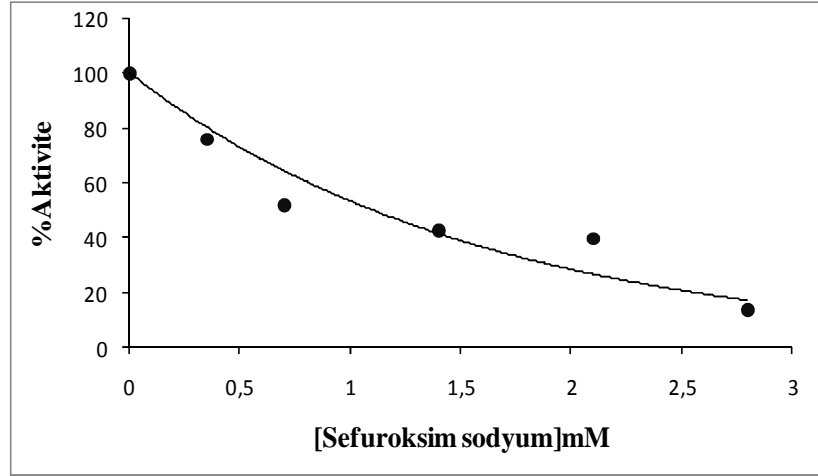
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,174	70
0,348	53,5
0,522	45
0,696	41
1,044	34



Şekil 4.13. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Gentamisin sülfat kimyasalının inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.8. Sefuroksim sodyumun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

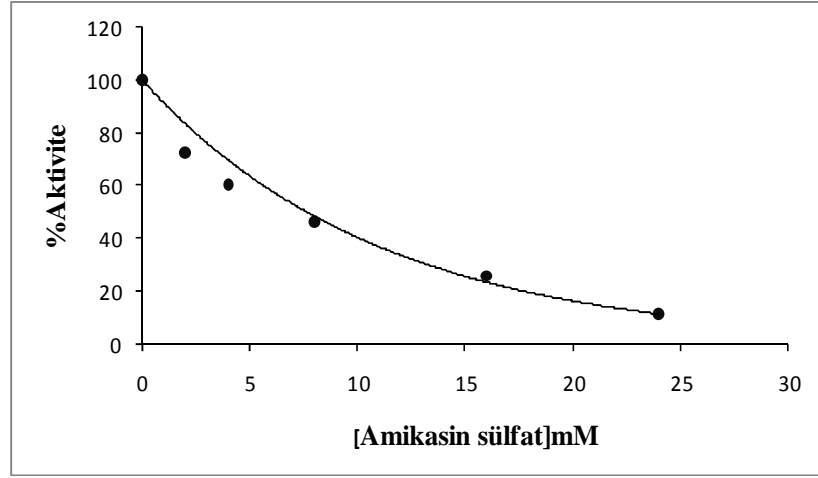
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,35	75,8
0,70	51,6
1,40	42,7
2,10	39,5
2,80	13,4



Şekil 4.14. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Sefuroksim sodyum kimyasalının inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.9. Amikasin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

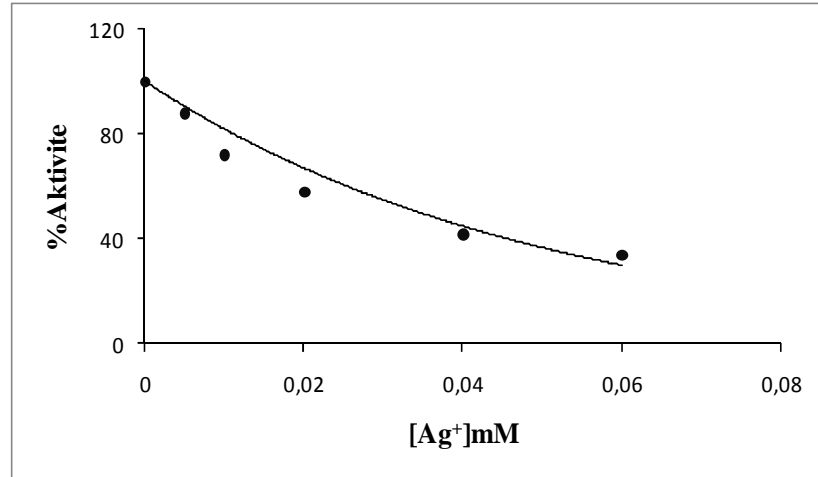
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
2	72,58
4	60,5
8	46
16	25,8
24	11,2



Şekil 4.15. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine amikasin sülfatın inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.10. Ag^+ metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

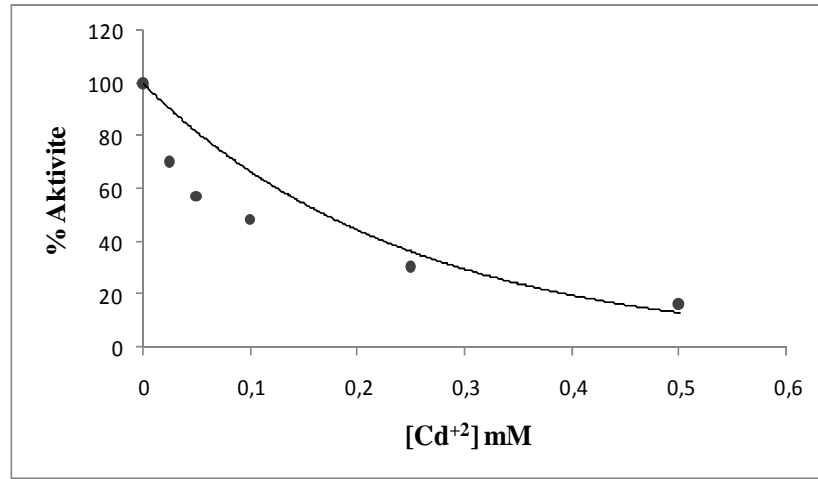
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,005	88
0,01	72
0,02	58
0,04	42
0,06	34



Şekil 4.16. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Ag^+ metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.11. Cd²⁺ metal iyonunun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

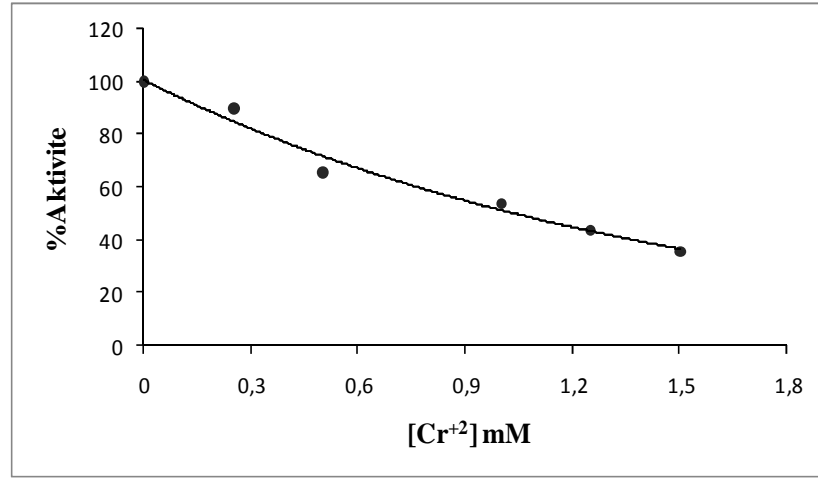
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,025	70
0,05	57,1
0,1	48,3
0,25	30,4
0,5	16,13



Şekil 4.17. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Cd²⁺ metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.12. Cr²⁺ metal iyonunun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

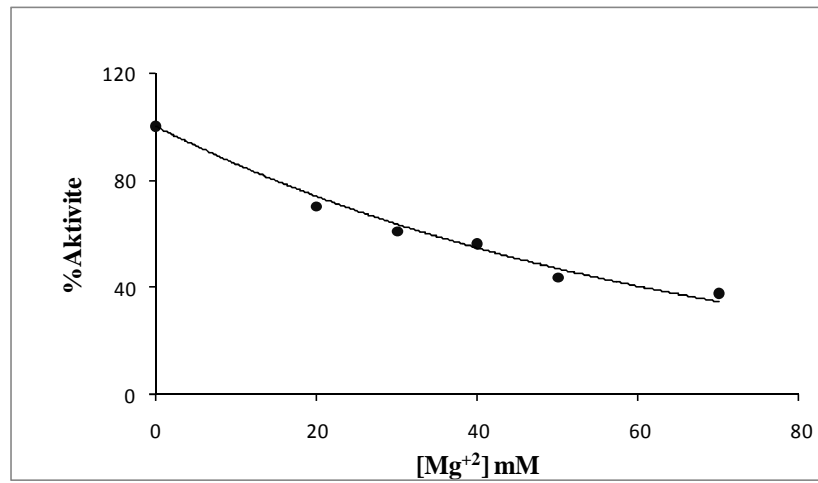
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,25	90
0,5	66
1	54
1,25	44
1,5	35,8



Şekil 4.18. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Cr⁺² metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.13. Mg⁺² metal iyonunun gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi

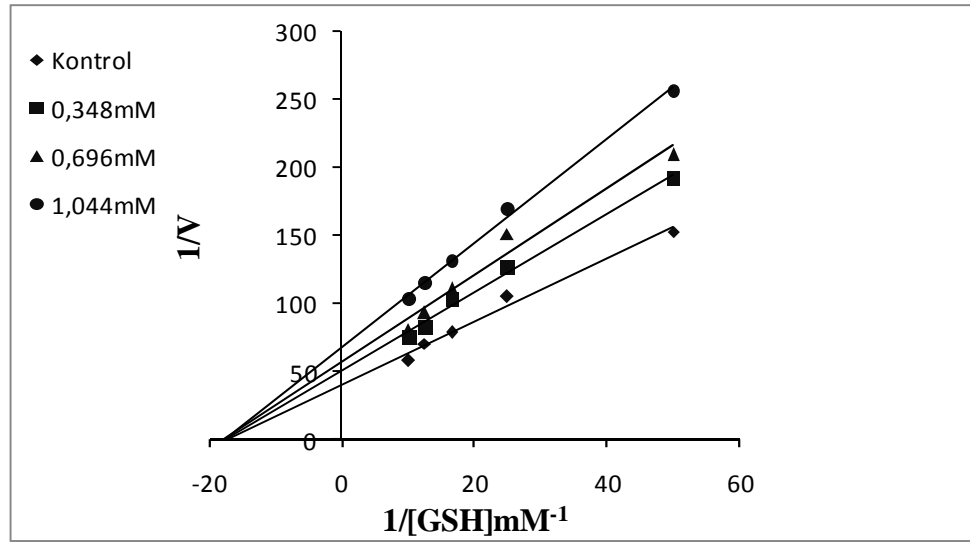
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100
20	70,1
30	60,7
40	56
50	43,6
70	37,6



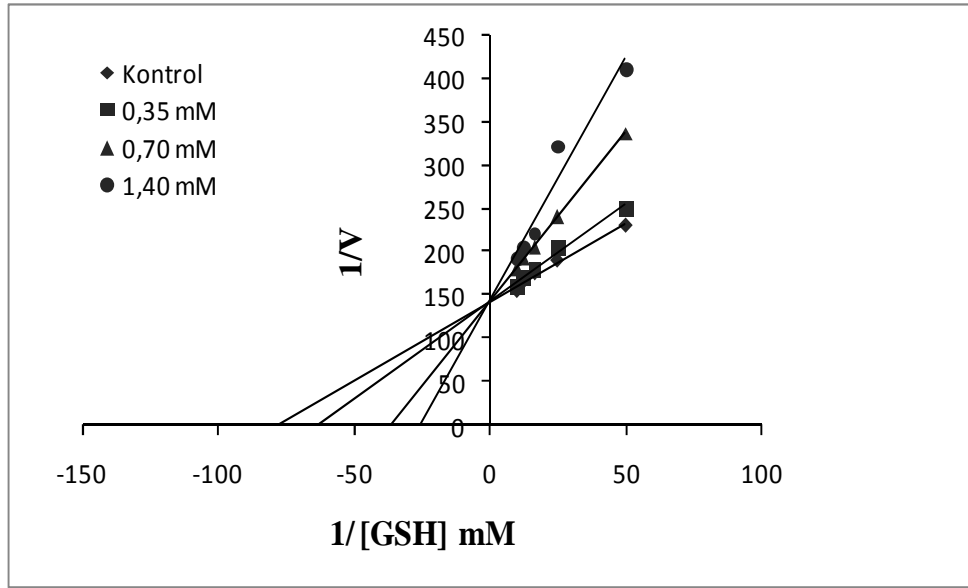
Şekil 4.19. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine Mg⁺² metal iyonunun inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.7.2. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

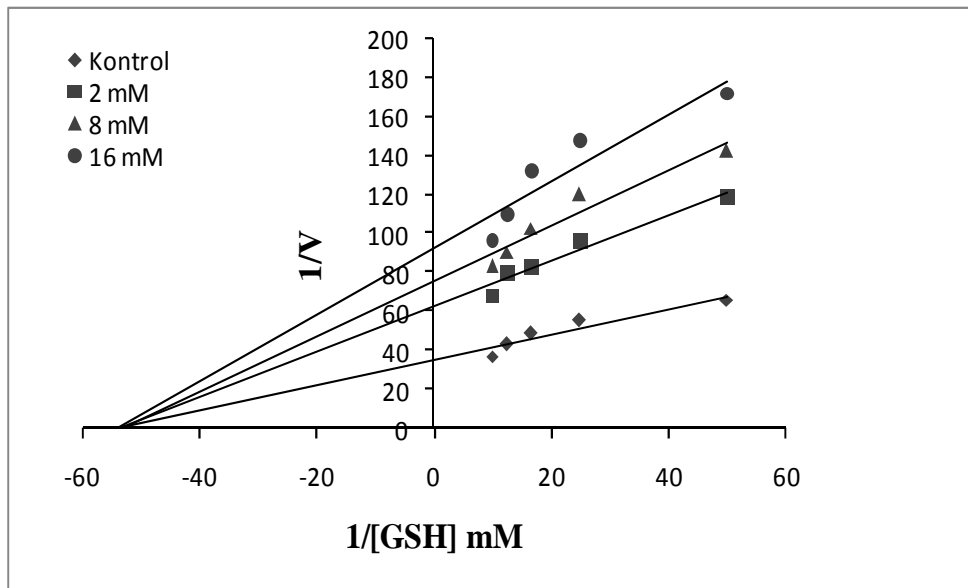
Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat, sefuroksim sodyum, amikasin sülfat antibiyotikleri ile Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} ve Mg^{+2} metal iyonları için K_i değerlerini belirlemek amacıyla sabit 3 uygun inhibitör konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. İlgili denklemler kullanılarak K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.20-4.26 ile Çizelge 4.14-4.15’de verildi.



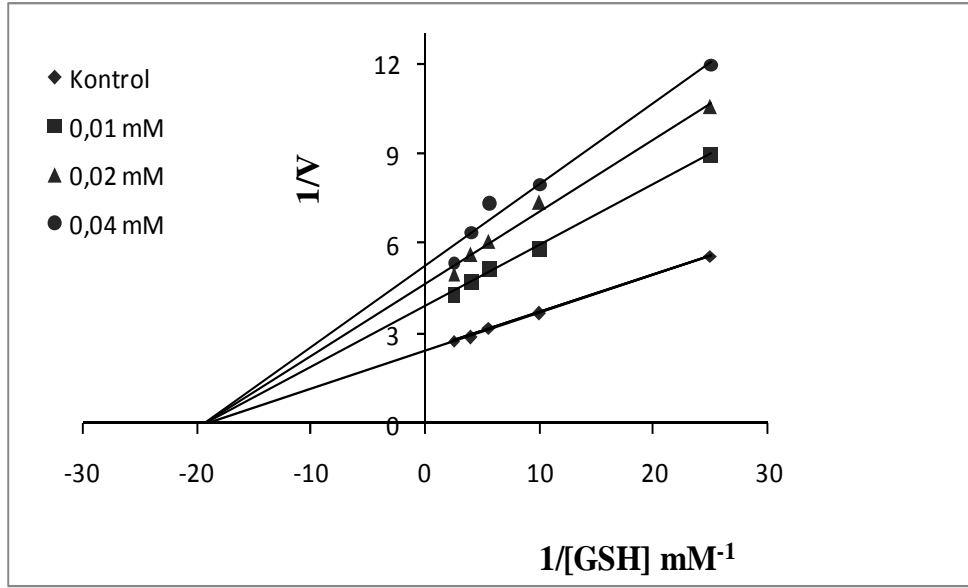
Şekil 4.20. Gentamisin sülfatın gökkuşığı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



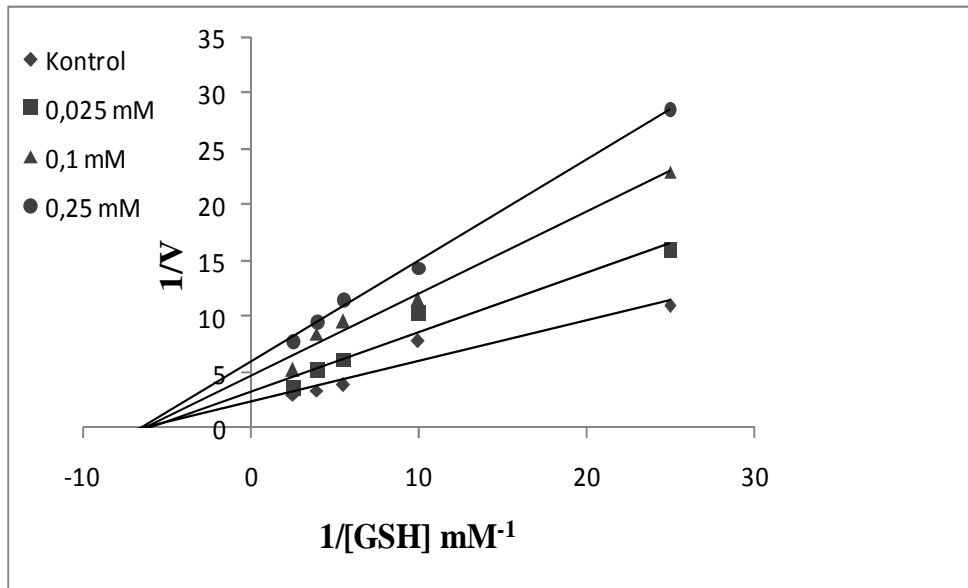
Şekil 4.21. Sefuroksim sodyumun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



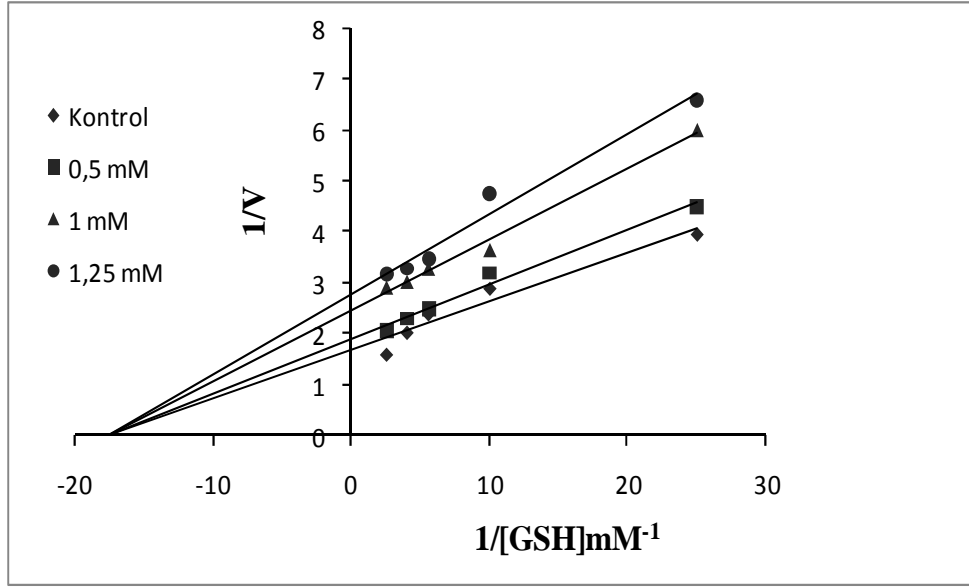
Şekil 4.22. Amikasin sülfatın gökkuşuğu alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



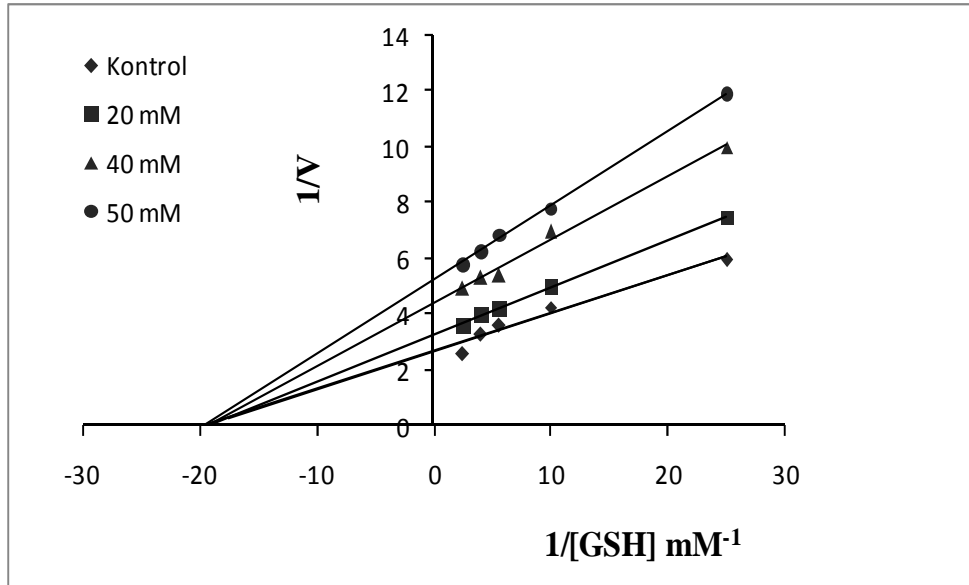
Şekil 4.23. Ag^+ metal iyonunun gökkuşaağı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.24. Cd^{+2} metal iyonunun gökkuşaağı alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.25. Cr^{+2} metal iyonunun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.26. Mg^{+2} metal iyonunun gökkuşuğu alabalık eritrosit GST aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge.4.14. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi için antibiyotiklere ait IC₅₀ ve K_i değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	K _i Ortalama	İnhibisyon Tipi
Gentamisin Sülfat	0,568	1,338	1,506 ± 0,176	Yarışmasız
		1,69		
		1,49		
Sefuroksim Sodyum	1,104	1,48	0,915 ± 0,490	Yarışmalı
		0,600		
		0,666		
Amikasin Sülfat	7,637	2,56	6,43 ± 3,627	Yarışmasız
		6,99		
		9,75		

Çizelge.4.15. Gökkuşuğu alabalık eritrosit GST enzimi için metal iyonlarına ait IC₅₀ ve K_i değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	K _i Ortalama	İnhibisyon Tipi
Ag ⁺	0,0348	0,0164	0,0243 ± 0,009	Yarışmasız
		0,0220		
		0,0347		
Cd ⁺²	0,171	0,0642	0,1114 ± 0,052	Yarışmasız
		0,1020		
		0,1680		
Cr ⁺²	1,042	3,7	2,506 ± 1,104	Yarışmasız
		2,3		
		1,52		
Mg ⁺²	46,33	85,1	65,73 ± 17,378	Yarışmasız
		60,6		
		51,5		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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

Glutatyon *S*-transferaz metabolizmada birkaç mekanizmayla beraber ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasını sağlayan çok önemli bir role sahiptir. Bu enzim elektrofilik ksenobiyotiklerin, indirgenmiş glutatyonla (GSH) konjugasyonunu gerçekleştirerek inaktif hale getirdikten sonra vücuttan atılmalarını sağlamaktadır (Güvercin *et al.* 2008) Glutatyon *S*-transferaz izoenzimleri çok sayıda gen lokosundan sentezlenen ve molekül kütlesi 25 kDa civarında olan homodimerik ve heterodimerik proteinlerdir. Her bir alt ünite, iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif konuma sahiptir. Bu fonksiyonel bölgeler, fizyolojik substratı bağlayan G bölgesi ile yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlayan hidrofobik H bölgesidir. GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir. Glutatyon *S*-transferazlar canlıların, istemli ya da istemsiz olarak maruz kaldığı ksenobiyotiklerin glutatyonla konjugasyonunu sağlayarak daha az toksik metabolitlere dönüşümünü gerçekleştiren faz-II detoksifikasyon enzim ailesinin üyesidirler (Armstrong 1997; Strange *et al.* 2001; Hayes *et al.* 2005)

Canlılar için bu kadar önemli olan glutatyon *S*-transferaz enzimi ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmıştır (Boyland and Chasseaud 1969). Daha sonra GST'ler insan, fare, sığır ve sıçanların değişik dokularından saflaştırılarak yapıları, fonksiyonları ve metabolik özellikleri kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Hee-Joong *et al.* 2005).

Bu çalışmada gökkuşığı alabalık eritrositlerinden glutatyon *S*-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin

belirlenmesi, bazı metal iyonları ve antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Erzurum Atatürk Üniversitesi Alabalık Çiftliğindeki balıklardan hemen kan alınıp antikoagulant madde ihtiva eden tüplere konularak soğuk zincir kuralına uygun olarak laboratuvarımıza getirilmiştir.

Saflaştırma işlemi, Toribo *et al.* (1996) ile Güvercin *et al.* (2008) uyguladığı prosedüre göre hemolizatin hazırlanması ve glutatyon-agaroz afinite jel kromatografisi olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi. Glutatyon-agaroz afinite kolonu GST'lerin saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanıldığından saflaştırma sırasında bu afinite kolonu kullanıldı. Bu yöntem, saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlara sahiptir. Bu saflaştırma prosedürü sayesinde GST enzimi 3-4 saat gibi kısa bir sürede 16,54 EÜ/ mg protein spesifik aktiviteye sahip %59 verimle 11.026 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1). Enzimi saflaştırmak için hemolizata önce nötral tuz (Amonyum sülfat) çöktürmesi uygulandı. Ancak her bir aralıktaki tuz konsantrasyonunda hem çökelekteki hem de süpernatanttaki enzim aktivitelerinin tutarsızlığı ve bu işlem sırasında enzim aktivitesinin çok büyük bir kısmını kaybetmesi nedeniyle saflaştırma işleminde bu aşama uygulanmadı. Literatürde de bizim karşılaştığımız bu duruma benzer sorunla karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Tamaki *et al.*1989; Güvercin *et al.* 2008). Huang *et al.* (2008) bir balık türünün olan (*monopterus albus*) karaciğerinden GST enzimini glutatyon-sepharose 6B afinite kolonuyla ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, 13,07 µmol/ mg spesifik aktiviteye sahip %14 verimle 300 kat saflaştırmışlardır. Yine benzer bir çalışmada, kedi balığının bağırsak mukozasından GST enzimini glutatyon-agaroz afinite kolonuyla 107 µmol/ mg spesifik aktiviteye sahip %87 verimle 100 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir (Bernard *et al.* 2000). Saflaştırmadan sonra enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant elde edildi (Şekil 4.2). Elde edilen tek bant, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısına bakılarak, uygulanan metodun araştırmacılar için uygun bir metot olduğu görüldü.

Glutatyon S-transferaz enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında enzim optimum pH'sı 0,5 M potasyum fosfat tamponuyla 7,3 olarak belirlendi (Şekil 4.7).

Optimum pH belirleme çalışmalarında artan pH'nın (7,5-9,0) GSH ile CDNB'nin enzimatik olmayan konjugasyonlarını artırdığı düşündüğümüz için yüksek pH daki ölçümlerin faydalı olmayacağı kanaatine vardık.

Huang *et al.* (2008) bir balık türü olan (*monopterus albus*) karaciğerinden elde ettikleri GST enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH'yı 7,0-7,5 olarak gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Hamed *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada glutatyon S-transferaz enzimini Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden saflaştırılıp enzimin optimum pH'sını 8 olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. E.coli ekstraktlarından GST enziminin saflaştırıldığı bir çalışmada enzimin optimum pH'sı 7,0 olarak belirlenmiştir (Izuka *et al.* 1989). Görüldüğü gibi farklı kaynaklardan saflaştırılan glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH'ı 7,0-8,0 arasında olabilmektedir.

Gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerine optimum iyonik şiddetin etkisi, enzim aktivitesinin optimum olduğu potasyum fosfat tamponunda 10 mM olarak belirlendi (Şekil 4.8).

Gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden elde ettiğimiz GST enziminin stabil pH'sını belirlemek amacıyla, optimum iyonik şiddete sahip potasyum fosfat tampon (pH: 5,3-7,8) çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler, 12 saatte bir spektrofotometrik olarak ölçüldü ve enzimin stabil olduğu pH değerinin 7,3 olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

Enzim aktivitelerinin maksimum olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın dışında enzimin aktivitesi azalmaya başlar ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Çalışmamızda gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için 0°C ile 70°C arasında her 10°C' de bir enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve optimum sıcaklığı Şekil 4.9'da görüldüğü gibi 30°C olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda Huang *et al.* (2008) *monopterus albus* balık karaciğerinden saflaştırdığı GST enziminin optimum sıcaklığını 45°C, Türkanoglu (2007) insan kan serumdan saflaştırdığı enzimin optimum sıcaklığını 65°C olarak rapor etmişlerdir. Şekil 4.9' da görüldüğü gibi enzim 70°C gibi yüksek bir sıcaklıkta bile

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

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırdığımız GST enziminin alt birimlerinin molekül kütesini belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Şekil 4.2’de verildiği gibi eritrosit numunesi ile standart proteinler SDS-PAGE’de aynı anda yürütüldü. Hem enzim numunesinin hem de standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak $\log M_K - R_f$ standart grafiği çizildi ve Şekil 4.3’de verildi. Daha sonra standart grafikten faydalanarak alabalık eritrosit GST enziminin alt birimlerinin molekül kütesi 23 kDa olarak belirlendi. Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinden elde edilen GST enziminin tabii halinin molekül kütelelerini belirlemek için Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler ve enzim numunesi birer birer geçirildi (Şekil 4.4-4.5). Daha sonra $\log M_K - K_{av}$ standart grafiği çizildi ve Şekil 4.6’da verildi. Bu grafikten faydalanarak enzimin tabii halinin molekül kütesi 47 kDa olarak belirlendi. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenen molekül kütesi, SDS-PAGE yöntemi ile belirlenen molekül kütesi değerleri ve SDS-PAGE fotoğrafı birlikte yorumlanarak enzimin homodimer olduğu sonucuna varılmış oldu.

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen GST enziminin molekül kütesinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütesi 23 kDa (homodimer) olarak belirlenmiştir (Riol *et al.* 2001). Buna ek olarak E.coli’den izole edilen GST enziminin molekül kütesi yaklaşık olarak 22,5 kDa olduğu bildirilmiştir (Izuka *et al.* 1989). Başka bir çalışmada kefal balığı karaciğeri GST enziminin molekül kütesi 23 kDa (homodimer) olarak bulunmuştur (Barcena *et al.* 1997). Hiratsuka *et al.* (1990) yaptıkları bir çalışmada rat karaciğerinden saflaştırdıkları GST enziminin molekül kütesini 26 kDa olarak bulmuşlardır. Bunun yanı sıra yılan balığı karaciğerinden elde edilen GST enziminin molekül kütesi 22,3 kDa (homodimer) olduğu görülmüştür (Novoa *et al.* 2004). Sığır eritrositlerinden ve sığır beyninden saflaştırılan GST enziminin molekül kütelelerinin sırasıyla 27 kDa (homodimer) ve 24 kDa (homodimer) oldukları rapor edilmiştir (Young *et al.* 1989; Güvercin *et al.* 2008). Ayrıca, insan

böbreğinden elde edilen ve molekül kütlesi 26,5 ile 24,5kDa civarında olan farklı iki alt birimden oluşan GST izoenzimlerinin varlığına da rastlanmıştır (Singh *et al.* 1987).

Enzim kinetiğinde K_M değeri enzimin subsrata olan ilgisinin bir göstergesidir. Araştırmamızda gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırdığımız GST enzimi için kullandığımız GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit CDNB konsantrasyonunda, 5 farklı GSH konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.11., Çizelge 4.6). Enzimin diğer substratı olan CDNB için ise sabit GSH konsantrasyonunda, 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.12., Çizelge 4.6). GSH için K_M sabiti 0,0395 mM, V_{max} değeri ise 0,0328 EÜ/ml olarak hesaplandı (Çizelge 4.6). CDNB için K_M sabiti 0,2590 mM, V_{max} değeri ise 0,0655 EÜ/ml olarak belirlendi (Çizelge 4.6). Elde edilen sonuçlara göre gökkuşağı alabalık eritrosit GST enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu görüldü.

Bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi üzerine yapılan kinetik çalışmada enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak belirlenmiştir (Huang *et al.* 2008). Hamed *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada GST enzimi tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığı karaciğerinden saflaştırılmış ve enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde, yukarıdaki çalışmalara ek olarak birçok çalışmada GST enziminin GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Izuka *et al.* 1989; Gadagbui *et al.* 2000; Güvercin *et al.* 2008).

Proteinlerin yapısını oluşturan amino asitler, R gruplarında ihtiva ettikleri fonksiyonel gruplar üzerinden reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Örneğin sistein -SH ve tirozin -OH

grupları üzerinden tepkime verirler. Sistein eser miktarda da olsa ağır metal iyonlarına maruz bırakıldığı zaman merkaptanlar teşekkül eder. Sistein birçok enzimin aktif ve katalitik bölgelerinin çok önemli bir bileşenidir. Bu tip enzimler Ag^+ ve Hg^{+2} gibi ağır metal iyonlarıyla etkileşirse -SH üzerinden merkaptanlar meydana gelir ve enzimin katalitik fonksiyonunda azalma olur hatta bu özelliğini kaybedebilir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

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

Çok az miktarları bile zararlı olan maddeler sayıldığında belki ilk sıraları alacak olan ağır metallerdir. Krom (Cr), kadmiyum (Cd) gibi ağır metaller besin zinciriyle girdikleri canlı bünyelerinden atılamadıkları için balıklarda fizyolojik olarak birikime neden olurlar. Bünyede belirli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yapar ve hatta ölüme neden olabilirler. Bu birikim balıkların kan parametrelerine de etki eder ve fizyolojik bozukluklara neden olur (Sehgal and Saxena 1986). Balıkların oksidatif toksisite mekanizmaları ve oksidatif strese karşı oluşturdukları yanıtlar memelilerle benzer olduğundan oksidatif stres çalışmalarında uygun model organizmalar olarak kullanılmaktadır (Almeida 2002).

Bütün organizmalar ağır metallere maruz kalmaya oldukça duyarlıdır. Çünkü ağır metaller endüstriyel ve tüketici atıkları vasıtasıyla su kaynaklarına kolaylıkla girebilir. Suda bulunan metal iyonu besin zinciri yoluyla birçok canlı için toksiktir. Özellikle ağır metaller insanların protein kaynağı olarak en fazla tükettikleri balıklar vasıtasıyla

vücudumuza girmekte ve atılmayarak biyobirikime sebep olmaktadır. Bunun sonuçları ise günümüzde tartışılmaz boyuttadır. Bu yüzden, ağır metal iyonlarının enzim aktiviteleri üzerine etkilerini anlamak oldukça önem kazanmaktadır.

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine gümüş, krom, magnezyum, kadmiyum, nikel, alüminyum ve mangan tuzlarının inhibitör etkileri incelendi.

Çalışmamızda Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} ve Mg^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edildi. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu göstergesi olan IC_{50} değerlerini belirlemek için %aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.16-4.19). Bu grafiklerdeki denklemler yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplandı. Metal iyonlarının IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandığında $Ag^+ < Cd^{+2} < Cr^{+2} < Mg^{+2}$ şeklinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.15).

Araştırmacılar, geçmiş yıllarda farklı enzimler üzerine ağır metal iyonlarının istenmeyen etkilerini sıklıkla rapor etmişlerdir. Örneğin Ekinci ve arkadaşları (2007) kurşun, bakır, kobalt ağır metallerinin sitozolik insan karbonik anhidraz I ve II enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinden bahsetmişlerdir. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+3} ve Al^{+3} metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla 0,011; 0,020; 0,0252; 0,0373; 0,209 ve 0,229 mM olarak belirlenmiştir (Çoban *et al.* 2007). Tekman *et al.* (2008) gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+3} ve Al^{+3} metal iyonlarının etkilerini incelemiş ve bu iyonların enzimi inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir.

Izuka *et al.* (1989) E.coli GST enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada Fe^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının 1mM'lık konsantrasyonlarının enzim aktivitesini yaklaşık olarak %47 ile %61 oranında inhibe ettiğini Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının ise inhibisyon etkisi yapmadığını

gözlemlemişlerdir. İnsan kan serumundan saflaştırılan GST aktivitesi üzerine Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Ni^{+2} ağır metal iyonlarının etkileri incelenmiş ve bu metal iyonlarının enzimi 30 μM , 73 μM , 42 μM konsantrasyonlarında enzimi inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Türkanoglu 2007).

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan bazı enzimler üzerine Cr^{+6} metal iyonunun *in vitro* etkisinin incelendiği bir çalışmada, Cr^{+6} metal iyonunu glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini anlamlı bir şekilde artırırken, glutasyon redüktaz aktivitesini azaltmakta, glutasyon S-transferaz ve katalaz enzim aktivitelerinde ise bir etki yapmadığını belirlenmiştir (Al-Mustafa 2006). Pandey *et al.* (2008) Cu, Cd, Fe ve Ni metallerinin *Channa punctata*'nın solungaçlarının CAT, SOD ve GST gibi antioksidant enzim aktivitelerini zamanla azalttıklarını gözlemlemişlerdir.

Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} ve Mg^{+2} metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanıldı. Sonuçların hassas bulunabilmesi amacıyla her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.23-4.26). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisinin fazla olduğu düşünüldüğünde bu tür inhibitörlerin enzimi çok daha fazla inhibe edeceği açıktır. Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının (K_i)_{ort} sabitleri küçükten büyüğe doğru Ag^+ için 0,0243; Cd^{+2} için 0,111; Cr^{+2} için 1,042; Mg^{+2} için 65,73 olarak hesaplandı. Görüldüğü gibi enzim için bu maddeler oldukça küçük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi göstermişlerdir ve böylece bu metal iyonlarının GST enzimi için potansiyel inhibitör oldukları görülmektedir. Ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla inhibitörlerin inhibisyon tiplerinin yarışmasız olduğu belirlendi (Çizelge 4.15).

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

Bilindiği gibi tedavide kullanılan ilaçların metabolizmayı olumsuz etkileyen çok sayıda yan etkileri mevcuttur. Metabolizma bu yan etkileri ortadan kaldıran veya minimize eden enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerini içerir. Enzimatik savunma; glutatyon *S*-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi birçok enzim sistemi tarafından sağlanır (Şentürk *et al.* 2008). Özellikle antibiyotik, analjezik ve antikanser ilaçlarının bulunduğu çok geniş elektrofilik substrat grubunun metabolizmasında rol oynayan glutatyon *S*-transferazlar, (Smith *et al.* 1977; Morgenstren *et al.* 1988; Hodgson and Levi 1994) endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik bileşiklerin indirgenmiş glutatyonla (GSH) konjugasyonunu sağlayarak daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen çok işlevli bir enzim grubudur (Ketterer 1986; Vermeulen 1990; Çelik 2003).

Metabolizma için hayati öneme sahip olan glutatyon *S*-transferaz enziminin saflaştırılması, üç boyutlu yapısının belirlenmesi, kinetik ve karakteristik özelliklerinin incelenmesi ile ilgili bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır (Bucciarelli *et al.* 1999; Mannervik and Danielson 1988). Ancak yapılan literatür araştırması sonucu enzimin gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırılması ve enzim aktivitesi üzerine gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum, ampicilin, ornidazol ve metranidazol antibiyotiklerinin etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmaya rastlanmadı. Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan birçok ilaç ve antibiyotiğin organizma üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Çiftçi *et al.* 2007). Besin zincirinin son halkasında yer alan insanoğlunun da bu durumdan doğrudan ya da dolaylı olarak etkileneceği birçok araştırmacı tarafından kabul edilen bir gerçektir. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışma oldukça önemlidir.

Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda inhibisyon etkisi gösteren gentamisin, sefuroksim, amikasin ilaçları için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,568, 1,104 ve 7,637 mM olarak hesaplandı (Şekil 4.13-4.15; Çizelge 4.14). Gentamisin, sefuroksim ve amikasin inhibitörleri için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek (Şekil 4.20-4.22) K_i sabitleri, 1,506 ± 0,176 (yarışmasız), 0,915 ± 0,490 (yarışmalı), 6,43 ± 3,627 (yarışmasız) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Buna benzer çalışmalar literatürde de mevcuttur. Örneğin, yeni doğum yapmış insan plesantasında klinik kullanımı yaygın olan ilaçlar (Analjezik, antipretik, antimikrobiyal vb.) ile GST'nin *in vitro* etkileşimi incelenmiş, kullanılan ilaçlardan ampisilin antibiyotiğinin GST enzim aktivitesini %45 oranında, novalgin ağrı kesicisinin ise %70 oranında azalttığı bildirilmiştir (Çelik *et al.* 2003). Ancak bu çalışmada ampisilin gökkuşağı alabalık eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisinin olmadığı tespit edildi.

Bu çalışmada GST üzerine etkileri incelenen antibiyotiklerin antioksidan savunma sisteminde yer alan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri incelenerek rapor edilmiştir (Erat *et al.* 2005., Şentürk *et al.* 2008., Erat *et al.* 2003., Erdoğan *et al.* 2004). Örneğin; İnsan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine gentamisin sulfat ve ampisilin *in vitro* etkileri incelenmiş ve inhibisyon etkisi göstermedikleri belirtilmiştir (Erat *et al.* 2005). Oysa yapmış olduğumuz bu çalışmada gentamisin'in gökkuşağı alabalık eritrosit GST enziminde inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Koyun karaciğerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine içlerinde gentamisin sülfatında bulunduğu altı tane antibiyotiğin *in vitro* etkileri incelenmiş, gentamisinin inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Erat *et al.* 2003). Çalışmamızda gentamisin'in gökkuşağı alabalık eritrosit GST enziminde inhibisyona sebep olduğu tespit edildi.

Sefuroksim ve amikasinin de içinde bulunduğu bir seri antibiyotiğin insan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiş çalışma sonucunda sefuroksimin inhibisyon etkisi gösterdiği,

amikasinin ise inhibisyon etkisi göstermediği belirtilmiştir (Şentürk *et al.* 2008). Araştırmalarımızda ise her iki antibiyotiğin gökkuşığı alabalık eritrosit GST enziminde inhibisyona sebep olduğu belirlendi. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi aktivitesi üzerine tiamfenikol, amikasin, gentamisin ve netilmisin antibiyotiklerinin etkileri incelenerek inhibisyona sebep olduğu bildirilmiştir (Erdoğan *et al.* 2004).

Herhangi bir inhibitörün, inhibisyon etkisini gösteren en etkili parametre K_i sabiti ile IC_{50} değerleridir (Akyüz *et al.* 2004). Gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçların K_i değerlerine bakıldığında (Çizelge 4.14) hepsinin de GST'nin güçlü inhibitörleri olduğu, ancak en yüksek inhibisyon etkisi gösteren ilacın sefuroksim sodyum olduğu tespit edildi. Gerek bizim çalışma sonuçlarımız gerekse belirttiğimiz literatür çalışmalarının sonuçları, bu araştırmada kullanılan antibiyotiklerin metabolizmadaki enzimler için potansiyel inhibitörler olduklarını göstermektedir. Bu tür ilaçların GST enzimini inhibe etmesi kadar GST'nin substratı olan glutatyonu üreten enzimleri (glutatyon redüktaz) de inhibe etmesi, detoksifikasyon reaksiyonlarının ciddi manada aksamasına yol açacaktır.

Yaptığımız çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, detoksifikasyon sisteminde çok önemli rolü olan GST enziminin, gerek metal toksisitesi ile gerekse tedavide kullanılan antibiyotiklerin belirli dozajlarında, aktivitesinde azalma meydana geldiği görülmektedir. Bunun sonucunda ise canlı savunma sisteminin büyük ölçüde zarar göreceği açıktır. Dolayısıyla kinetik çalışmalar sonucu elde edilen IC_{50} değerlerinin göz önüne alınması özellikle metabolizmadaki savunma sistemleri için çok önemli olacaktır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden GST enziminin saflaştırılması glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemi önerilmiştir.
2. Önerilen yöntemle enzim saf olarak elde edilmiş ve saflaştırma sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu yapılan literatür araştırmalarında görülmüştür.
3. Çalışma sonucunda gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi 16,54 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip %59 verimle 11.026 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforezde bulunan tek bant ile tespit edilmiştir.
4. Saflaştırılan gökkuşığı alabalık eritrosit GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum ve stabil pH 7,3; optimum iyonik şiddet 10 mM K-fosfat; optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir.
5. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerine bazı antibiyotik ve metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sefuroksim sodyum, gentamisin sülfat, amikasin sülfat, ampisilin, metronidazol ve ornidazol antibiyotikleri ile Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Al^{+3} metal iyonları ile çalışılmıştır.
6. Bu antibiyotik ve metal iyonları için IC_{50} ve K_i sabitleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu antibiyotik ve metal iyonlarının düşük dozlarda GST enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. GST enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilir.
7. Bu nedenle bu enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir.

Özellikle çevre kirliliğinde çok büyük bir pay sahibi olan ağır metallerin ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin düşük dozlarda bile enzimi inhibe etmelerine dair elde edilen bulgulara bakıldığında bu çalışmanın literatüre önemli katkılarda bulunacağı ve GST enzimi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı açıkça görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akyüz, M., Erat, M., Çiftçi, M., Gümüştekin, K., Bakan, N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 19, 361-365.
- Aliya, S., Reddanna, P and Thyagaraju, K., 2003. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Molecular and Cellular Biochemistry* 253, 319–327.
- Almeida, J.A., Dınoz, Y.S., Marques, S. F. G., Faine, L. A., Rıbas, B. O., Burneiko, R. C., Novelli, E. L. B., 2002. The Use of Oxidative Stress Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to *In Vivo* Cadmium Contamination. *Environment International*, 27, 673-679.
- Al-Mustafa, A.H., 2006. In vitro Study Involving the Comparative Effect of Heavy Metal Ions on Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxide Levels in Human Erythrocytes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2, 9 (14), 2586-2592.
- Altınpınar, Ş.E., 2005. N-Nitrozopirolidin İle *İn Vivo* Etkileştirilen Sıçanların Karaciğer ve Böbrek Sitoplazmik GlutatyonS-Transferaz Özgül Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi
- Ann-Sofie. Johansson., 2002. Exploring the functional plasticity of human glutathione transferases. *Biyokimya Programı Doktora Tezi. Acta Universitatus Upsaliensis. Uppsala.* 1-56.
- Aras, S., 2001 GSTM1 geninin normal bireylerde ve akciğer kanserli hastalarda RFLP analizi ile incelenmesi. T.C. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi Kesin Raporu.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* Jan, 10, 2-18.
- Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., ve Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of two glutathione S- aryltransferase activities from rat liver, *Biochem. J.*, 147, 513
- Autrup., H., 2000. Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Matebolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research*, 464, 65-76
- Awasthi, Y. C., Dao, D. D., Saneto, R. P., 1980. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem J*, 191, 1-10.
- Barcena, J. A. E., Martinez-Lara, S. G., George, J. Lopez-Barea. 1997. Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver. *CMLS, Cell. mol. life sci.*, 53, 759–768.
- Baş, O., 2006. Dinitrocresol'ün (*Rat Rattus Norvegicus*) Sıçan Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi Yüksek Lisans Tezi.
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P., 1961. *Biochem. J.*, 79, 516-524.

- Boyer, T.D., Kenney, W.C., 1985. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes. New York: John Wiley&Sons Inc. P 297-363.
- Boyer, T.D., Kenney, W.C., 1985. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes. New York: John Wiley&Sons Inc., 297-363.
- Boylard, E. and Chasseaud, L.F., 1969. The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol.*, 32,173-219.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.
- Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Pennelli, A., Cornelio, L., Romagnoli, R., Melino, S., Petruzzelli, R., Di Ilio, C., 1999. Characterization Of Toad Liver Glutathine Transferase. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1431, 189.
- Busconi, L., Folco, E. J., Studdert, C. and Sanchez, J. J., 1992. Purification and characterization of a latent form of multicatalytic proteinase from fish muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 303-309.
- Carrillo, M. C., Monti, J.A., Favre, C., Carnovale, C. E., 1995. Acute Regulation of Hepatic Glutathione S-transferase by Insulin and Glukagon. *Toxicol. Lett.*, 76(2), 105-111.
- Carver, D.G., Hines, R.N., 2002. The Ontogeny of Human Drug-Metabolizin Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET*, 300, 361-366.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V. ., Calzaretti, G., Landriscina. C., 2004. Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200, 29-38.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Coughlin, S. S, Hall, I. J. 2002. Glutathione-s-transferase Polymorphisms and Risk of Ovarian Cancer. *Modifications in Genetics in Medicine* 4(4), 250-257 .
- Çelik , V.K., Armutcu, F., Aker, A., 2003 Human Placental Glutathione-S-Transferase : Isolation, Kinetic Properties and in vitro Interactions with Several Drugs. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 25(4), 187 - 192.
- Çetinkaya, S., Pınarbaşı, H., Pınarbaşı, E., Çetinkaya, Ö., Atalay, A., 1993. Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon S-transferaz aktiviteleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 15(2).
- Çiftçi, M., Türkoğlu, V., Çoban, T.A., 2007. Effects of some drugs on hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in Lake Van Fish (*Chalcalburnus Tarischii Pallas, 1811*). *Journal of Hazardous Materials*, 143, 415-418.
- Çoban, T. A., Senturk, M., Ciftci, M., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Protein Pept Lett*, 14, 1027-1030.

- Dawn, B. Marks, Allan, D. Marks and Colleen, M. Smith, **1996**. Basic Medical Biochemistry a clinical approach. A Wawely Company.
- Denizli, A., Ağır metal toksikolojisi; su ürünleride uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri 2008
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione S-transferases. *Genome Biology*, 3(3) reviews 3004.1-3004.10
- Donkın, S. G., Ohlson, D. L., Teaf, C. M., 2000. Principle of Toxicology, Environmental and Industrial Applications. Second Edition. (P. L. Williams, Ph.D. R. C. James, S. M. Roberts, Edts.). John Wiley & Sons, Inc, New York, 325 s.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci. Jun*; 49 (Suppl 2),156-64.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu Ö. İ., 2007. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 22, 745-750
- El-Beltagy, A. E., El-Adawy, T. A., Rahma E. H. and El-Bedawey A. A., 2004. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86, 33-39.
- Erat, M and Çiftçi, M., 2003. *In Vitro* Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase from Sheep Liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18 (6), 545-550.
- Erat, M., Şakiroğlu, H., Çiftçi, M., 2005. Effects of some antibiotics on glutathione reductase activities from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *J.Enzyme Inhib Med Chem*. 20(1), 69-74.
- Erdoğan, O., Çiftci, M., Çiltaş, A., Hisar, O., 2004. Inhibition Effects of Some Antibiotics on the Activity of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Erythrocytes *Turk J Vet Anim Sci*. 28, 675-681.
- Fleischn, G., K. Kamisaka, I.M. Arias., 1976. Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function*. 229
- Fong, W.P. and Choy, K.F., 2001. Purification and characterization of grass carp mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 161-171.
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49, 27-37.
- Goyer, R. A., Clarkson, T.W., 2001. Toxic Effects of Metals. (Klaassen, C. D., Edts.) Casarett & Doull's Toxicology-the Basic Science of Poisons; 6th Edition. New York: McGraw-Hill. s. 827-844.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. Şti., 572-576, Ankara.
- Grzyb, K. and Skorkowski, E.F., 2005. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (*Clupea harengus*) skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 629-634.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination of Some Kinetic and Characteristic Properties of Glutathione S-transferase from Bovine Erythrocytes. *Protein & Peptide Letters*, 15, 000-000.

- Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., 2004. Inhibition of glutathione-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 42(9), 1401-1418.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G., 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326, 131-142
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S- transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 246, 7130-7139
- Hamed, R.R., Maharem, T. M. and .Guinidi, R.A.M., 2004. Glutathione and its Related Enzymes in the Nile Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol.30, No.3-4, 189-199.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600
- Hee-Joong, P., Hyun-Young, C. and Kwang-Hoon, K*, 2005. Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 2, 232-237.
- Hiratsuka, A., Sebata, N., Kawashima, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., Satoh, K., Hatayama, I., Tsuchida, S Ann Ishikawa, T. A., 1990. New class of rat glutathione S-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *THE Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265, No. 20, 188, 11973-11981.
- Hodgson, E., Levi, P.E., 1994. *Introduction to Biochemical Toxicology*. Connecticut: Appleton&Lange.
- Hou, S.M., Falt, S., Nyberg, F., 2001. Glutathione-s-transferase T1-null genotype interacts synergistically with heavy smoking on lung cancer risk. *Environ Mol. Mutagen*, 38(1), 83-86.
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q.Y., 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 147, 96-100.
- Hunaiti, A.A. and Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *The Science of The Total Environment*, 248, 45-50.
- Izuka, M., Inoue, Y., Murata, K And Kimura, A., 1989. Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, Nov., 6039-6042
- Ioannides, C., 2002. *Xenobiotic metabolism: An overview* (C. Ioannides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 1-32.
- Kakkar, P., Jaffery, F. N., 2005. Biological Markers for Metal Toxicity. 137 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 335-349.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı.
- Keha, .E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.

- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., (2009) *Biyokimya, Aktif Yayinevi, Sirkeci/İstanbul*
- Ketterer, B., 1986. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16, 957-973
- Kosower, E.M., 1976. Chemical properties of glutathione. In *Glutathione metabolism and function*, ed. Irwin M. Arias and William B. Jakoky. Raven Press, New York.
- La Creis, R., Woodson, K., Taylor, P.R., Albanes, D., Virtamo, J., Tangrea, J.A., 2003. Polimorphisms in Glutathione-s-transferase genes (GST-M1, GST-T1 and GSTP1) and susceptibility to prostate cancer among male smokers of the ATBC cancer prevention study. *European Journal of Cancer Prevention* 12, 317-320.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.*, 349, 474-485.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth ,Publishers Inc, 2000
- Liebman, J.F. and Greenberg, A., 1988. *Mechanistic principles of enzyme activity*. VCH Publishers, New York.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 658-666.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases- structure and catalytic activity. *Dep. of Biochemistry*. 23(3), 283.
- Melgar -Riol, M.J., Novoa - Valinas, M.C., Garcia Fernandez, M.A., Perez - Lopez, M., 2001. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 128, 227-235
- Menegon, A., Board, P.G., Blackburn, A.C., Mellick, G.D., Lecourter, D.G., 1998. Parkinson's Disease, Pesticides, And Glutathione S-Transferase Polymorphisms. *Lancet*, 352 (9137), 1344-1346.
- Morgenstren, R., Lundqvist, G., Hancock, V., De Pierre, J.W., 1988. Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem*, 263, 6671-6675.
- Morgenstren, R., Lundqvist, G., Hancock, V., De Pierre, J.W., 1988. Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem*, 263, 6671-75.
- Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996. *Su kimyası*, Beta basım yayım dağıtım AŞ, s: 83-84, İstanbul.
- Neuefiend, T., Reinemer, P., Bieseler, B., 1997. Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification. *Biological Chemistry*, 378, 199-205.
- Nicholls, F.A., Ahokas, J.T., 1984., Inhibition of purified glutathione S-transferases by indomethacin. *Biochem Biophys Res Commun*, 119, 1034-8.
- Novoa - Valinas, M.C., Melgar - Riol, M.J., Perez - Lopez, M., 2004. Hepatic glutathione S transferases from lamprey (*Petromyzom marinus*): purification and characterization *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 169-178
- Ohkubo, M., Miyagawa, K., Osatomi, K., Hara, K., Nozaki, Y. and Ishihara, T., 2004 Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from lizard fish (*Saurida undosquamis*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 139-150.

- Onat T. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya Izmir, Saray medikal yayincilik, 1996: 865-8797
- Orhan, H. and Şahin, G., 1995. Clinical and Toxicological Importance Of Glutathione S-Transferases. T Klin J Med Sci, 15, 303-315
- Orhan, H., 1994. Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi. Ankara Bilim Uzmanlığı Tezi
- Pabst, M., Habig, W. H. and Jakoby, W. B., 1973. Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver, Biochem. Biophys. Res. Commun, 52, 1123
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R.A., Alı, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2008. Effects of Exposure to Multiple Trace Metals on Biochemical, Histological and Ultrastructural Features of Gills of a Freshwater Fish, *Channa punctata* Bloch. Chemico-Biological Interactions, 174, 183-192.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G. and López, M.P., 2001. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 128, (2) p: 227-235.
- Robert, K.M., Daryl, K.G., Peter, A.M. and Wictor, W.R., 2004. Harper'ın Biyokimyası, Çeviri Editörleri: Prof. Dr. Nurten Dikmen, Prof. Dr. Tuncay Özgünen, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti..
- Rowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B.T., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D., 2001. Mammalian class sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D₂ synthases. *Biochem J.*, 359, 507-516.
- Sayitoğlu, M.A., Hatırnaz, Ö., Özbek, U., 2003. Detoksifikasyon enzim gen polimorfizmlerinin akut lösemi etiyolojisindeki rolleri. Turkish Journal of Haematology 20(3)
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations, Inc, New York, p: 403
- Sehgal, R. and Saxena, A.B., 1986. Toxicity of zinc to a viviparous fish *Lebistes reticulatus* (Peters). Bull. Environm. Contam. Toxicol., 36, 888-894.
- Seidegard, J., Ekström, G., 1997. The Role of Human Glutathione-S-Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. Environmental Health Perspectives, 105, 791-799.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.*, 360, 1-16
- Shohet, S.B. and Beutler, E., 1986. Glutathione metabolism of the erythrocyte. Williams Hematology. The Erythrocyte, Part Four.
- Singh, S.V., Leal,T., Ansari, G.A.S and Awasthi, Y.C., 1987. Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochem. J.*, 246, 179-186.
- Smith, G.J., Ohl, V.S, Litwack, G., 1977. Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 37, 8-14.

- Smith, G.J., Ohl, V.S., Litwack, G., 1977. Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 37, 8-14.
- Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A., 2001. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Research* 482, 21-26.
- Şah, D. *Oreochromis niloticus*'un doku ve organlarında kadmiyum birikimi üzerine çinkonun etkisi. Yüksek lisans tezi 2007.
- Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi, M., 2008. Effects of some antibiotics on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(1), 144-148.
- Tamaki, H., Kumagai, H. and Tochikura, T., 1989. Purification and Properties of Glutathione Transferase from *Issatchenia orientalis*. *Journal of Bacteriology*. 171 (2), 1173-1177
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comp Biochem Physiol C*, 148, 117-121.
- Temellini. A., Castiglioni, M., Giuliani, L., Mussi, A., Giulianotti, P.C., Pietrabissa, A., Angeletti, C.A., Mosca, F., Pacifici, G.M., 1995. Glutathione Conjugation with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB): Interindividual Variability in Human Liver, Lung, Kidney and Intestine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 33(9), 495-503
- Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97.
- Tuna, Gamze., 2008. Sıçan ince bağırsak glutatyon S-transferaz enziminin saflaştırılması ve izozimlerinin hiperisin bileşiği ile bağlanma özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Hacettepe üniversitesi.H.Ü.B.A.B. 06. D06. 101. 1001
- Tüken, F., 1993. Bazı nitrozaminlerin glutatyon s- transferaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. Doktora tezi.
- Türkanoglu, Aysun., 2007. Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University.
- Vermeulen, N.P.E., 1990. Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies. "Glutathione S-transferases and Drug Resistance" Taylor and Francis London, 1,141-153.
- Vessey, D.A., Boyer, T.D. 1988., Characterization of the activation of rat liver glutathione S transferases by nonsubstrate ligands. *Toxicol Appl Pharmacol*, 93, 275-280.
- Wormhaudt, L.W., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E., 1999. Genetic polymorphisms of human N-acetyl-transferase, cytochrome p450, GST and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 29, 59-124.
- Wu, C., Mathews, K.P., 1983. Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun*, 112, 980-985.

Young, P. R. and Briedis A. V., 1989. Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. *Biochem. J.*, 257, 541-548.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’ da tamamladıktan sonra 1998 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde başladığı lisans eğitimini 2002 yılında tamamladı. 2002 yılında Atatürk üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde başladığı yüksek lisans eğitimini 2005 yılında tamamladı. Vatani görevi olan askerlik hizmetini 2006 da İzmir’ de tamamladı. Aynı yıl Atatürk üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2006-2007 yılında özel bir eğitim kurumu olan Güven Dersanesi’nde Kimya Öğretmeni olarak çalıştı. Halen, kurucusu olduğu Erzurum Eksen Dersanesi’nde Kimya Öğretmeni olarak çalışmaktadır. Evli ve 1 çocuk babasıdır.