

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK
KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI KARAKTERİZASYONU VE
BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAKAN YILMAZ**

**KİMYA ANABİLİM DALI
TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MEHMET ÇİFTÇİ**

BİNGÖL-2022



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI KARAKTERİZASYONU VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Hakan YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 04/11/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı-Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (...3/...0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Yusuf TEMEL	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Ebru AKKEMİK	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/ nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-FEF-2022-001

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.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca kendi bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan, tüm desteklerini sunan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ başta olmak üzere; Eğitim hayatımın en önemli ve ilk aşaması olan ilköğretim zamanlarımda, manen yetişmemize büyük katkılar sağlayan kıymetli öğretmenim Sayın Neval BUDAK'tan başlamak üzere sırasıyla tüm ortaokul, lise öğretmenlerime, yüksek lisans eğitimim boyunca teorik dersler ve tez çalışmalarım da emeği bulunan Sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL'e ve ismini zikredemediğim nice emektar hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tez çalışmama desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje no: BÜBAP PROJESİ (BAP-FEF-2022-001) teşekkürlerimi sunarım.

Hakan YILMAZ

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Glutasyon.....	4
2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimi.....	4
2.3. Pestisitler.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	7
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	7
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	7
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	8
3.3.1. Homojenat Hazırlanmasında Kullanılan Çözelti.....	8
3.3.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	8
3.3.3. Saflaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler	8
3.3.4. Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	9
3.3.5. Elektroforez İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	9
3.4. Protein Tayini.....	10
3.4.1. Kalitatif Protein Tayini.....	10
3.4.2. Bradford Metodu Kullanılarak Gerçekleştirilen Protein Tayini işlemi	11
3.5. GST Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	11
3.6. Tavuk Karaciğerinin Temini ve Homojenatın Hazırlanması.....	12
3.7. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz İşlemleri.....	12
3.8. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	13

3.9. SDS-PAGE Aracılığıyla GST Enzimi Saflığının Kontrolü.....	13
3.10. Karakterizasyon Çalışmaları.....	14
3.10.1. Optimum pH Tayini.....	14
3.10.2. Stabil pH Tayini.....	14
3.10.3. Optimum İyonik Şiddet Tayini.....	15
3.10.4. Optimum Sıcaklık Tayini.....	15
3.10.5. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması Amacıyla Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	15
3.10.6. İnhibisyon Çalışmaları.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Bulgular.....	16
4.1.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	16
4.1.2. Amonyum Sülfat Çöktürme Sonuçları.....	16
4.1.3. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	17
4.1.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Saflığının Kontrolü.....	18
4.1.5. Optimum pH Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	20
4.1.6. Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	21
4.1.7. Optimum İyonik Şiddetin Tayinine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	22
4.1.8. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları	23
4.1.9. K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları	24
4.1.10. İnhibisyon Çalışmalarının Sonuçları.....	26
4.2. Tartışma.....	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GST	: Glutatyon S-transferaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
μL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin
EU	: Enzim Ünitesi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfonat poliakrilamit jel elektroforezi
DTT	: Ditiyotreitöl
E	: Enzim
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetraasetikasit
ES	: Enzim substrat kompleksi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Mevcut enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitor konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	: Michaelis-Menten sabiti
V _{max}	: Maksimum hız

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	Kantitatif protein tayini için oluşturulan standart grafik.....	16
Şekil 4.2.	Amonyum sülfat çökme aralığı sütun grafiği.....	17
Şekil 4.3.	Saflaştırma işleminde elde edilen elüsyon grafiği.....	18
Şekil 4.4.	SDS-PAGE fotoğrafı	19
Şekil 4.5.	Enzim alt biriminin M_A 'larının belirlenmesi için çizilen R_f -Log M_k grafiği.....	19
Şekil 4.6.	HCl ve K-Fosfat tamponları kullanılarak elde edilen pH-aktivite grafiği.....	20
Şekil 4.7.	K-Fosfat için çizilen stabil pH grafiği.....	21
Şekil 4.8.	Tris-HCl için çizilen stabil pH grafiği.....	22
Şekil 4.9.	Tris-HCl optimum iyonik şiddet grafiği.....	23
Şekil4.10.	Optimum sıcaklık grafiği.....	24
Şekil4.11.	CDNB substratı için elde edilen $1/V - 1/[CDNB]$ grafiği.....	25
Şekil4.12.	GSH substratı için elde edilen $1/V - 1/[GSH]$ grafiği.....	26
Şekil4.13.	Malathion WP için çizilen % Aktivite-[I] grafiği.....	29
Şekil4.14.	Deltametrin için çizilen % Aktivite-[I] grafiği.....	29
Şekil4.15.	Corvette için çizilen % Aktivite-[I] grafiği.....	30
Şekil4.16.	Deltametrin için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	30

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1.	GST enziminin aktivite ölçümünde yararlanılan çözelti miktarları.....	11
Tablo 3.2.	Ayırma ve yığma jellerinin kimyasal içeriği.....	14
Tablo 4.1.	Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	17
Tablo 4.2.	Glutasyon S-transferaz enzimi saflaştırma sonuçları.....	18
Tablo 4.3.	Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri.....	20
Tablo 4.4.	K-Fosfat tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri.....	20
Tablo 4.5.	K-Fosfat tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri.....	21
Tablo 4.6.	Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri.....	22
Tablo 4.7.	Optimum sıcaklık ve aktivite değerleri tablosu.....	23
Tablo 4.8.	CDNB substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için kullanılan CDNB derişimleri ve elde edilen aktiviteler.....	24
Tablo 4.9.	GSH substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için kullanılan CDNB derişimleri ve elde edilen aktiviteler.....	25
Tablo 4.10.	Malathion WP için IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözelti miktarları.....	27
Tablo 4.11.	Deltametrin için IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	27
Tablo 4.12.	Corvette için IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	27
Tablo 4.13.	Deltametrin için K_i sabitinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	28
Tablo 4.14.	İnhibisyon çalışmalarında malathion WP, deltametrin ve corvette için elde edilen IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri.....	31
Tablo 5.1.	Sonuçlarla ilgili sayısal değerler.....	36

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI KARAKTERİZASYONU VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Bu tez çalışmasında glutatyon S-transferaz enzimi (GST; EC 2.5.1.18) tavuk karaciğerinden amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisinden yararlanılarak 8,35 EÜ/mL spesifik aktivitesine sahip olan enzim, %8 verimle 24,56 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığının kontrol edilmesi amacıyla SDS-PAGE işlemi yapıldı ve tek bant elde edildi. Alt birimin molekül kütlesi yaklaşık olarak 30,9 kDa olarak hesaplandı. Ayrıca enzimin optimum pH değeri (Tris-HCl içinde 8,5); optimum iyonik şiddeti (Tris-HCl ile 150 mM); optimum sıcaklığı (70°C); stabil pH değeri (Tris-HCl ile 8,5) tespit edildi. Enzimin GSH substratı için K_M değeri 0,802 mM, V_{max} değeri 1,833 EÜ/mL; CDNB için de K_M değeri 3,6 mM ve V_{max} değeri 2,829 EÜ/mL olarak hesaplandı. Ayrıca malathion WP, deltametrin ve corvette pestisitleri için en az 5 farklı konsantrasyon kullanılarak % Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve bu grafiklerin yardımıyla malathion WP, deltametrin ve corvette pestisitleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,093, 0,669 ve 0,226 mM olarak bulundu. Daha sonra deltametrin için 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i sabiti $0,0258 \pm 0,044$ mM ve inhibisyon tipi yarışmasız olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-transferaz, tavuk karaciğeri, saflaştırma, pestisit.

PURIFICATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM CHICKEN LIVER CHARACTERIZATION AND EFFECT OF SOME PESTICIDES ON ENZYME ACTIVITY

ABSTRACT

In this thesis, glutathione S-transferase enzyme was purified with a specific activity of 8.35 EU/mL, 24.56 times 8% yield by using (GST; EC 2.5.1.18) ammonium sulfate precipitation and glutathione-agarose affinity chromatography from chicken liver. SDS-PAGE was performed to control the purity of the purified enzyme and a single band was obtained. The molecular mass of the subunit was calculated as approximately 30.9 kDa. In addition, the optimum pH value of the enzyme (8.5 in Tris-HCl); optimum ionic strength (150 mM with Tris-HCl); optimum temperature (70°C); stable pH value (8.5 with Tris HCl) was determined. The K_M value for the GSH substrate of the enzyme was 0.802 mM, the V_{max} value was 1.833 EU/mL; for CDNB, the K_M value was calculated as 3.6 mM and the V_{max} value was calculated as 2.829 EU/mL. In addition, % Activity-[I] graphs were drawn for malathion WP, deltamethrin and corvette pesticides using at least 5 different concentrations, and with the help of these graphs, IC_{50} values for malathion WP, deltamethrin and corvette pesticides were found as 0.093, 0.669 and 0.226 mM, respectively. Then, Lineweaver-Burk plot was drawn for deltamethrin at 5 different substrate and 3 fixed inhibitor concentrations, and K_i constant was determined as 0.0258 ± 0.044 mM and inhibition type was found to be non-competitive.

Keywords: Glutathione S-transferase, chicken liver, purification, pesticide.

1. GİRİŞ

Canlıların, büyüme, gelişme, onarılma gibi birçok hayati fonksiyonlarını yerine getirme görevini üstlenen reaksiyonları katalizleyen makro moleküller enzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimler, reaksiyon hızını verim kaybı olmadan arttıran biyolojik katalizörlerdir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, enzimlerin tümü protein yapısındadır [1,2,3].

Enzimler yapı olarak protein kökenli olduklarından, proteinlerin tüm özelliklerini de taşımaktadırlar. Bundan dolayıdır ki ortamın pH durumu, sıcaklık aralığı enzim aktivitesi üzerinde doğrudan rol oynamaktadır. Ortamın asit veya alkali oluşu, 40°C'nin üzerinde oluşu protein yapılı enzimleri denatüre edebilmektedir [4,5].

Enzimler, tarihsel olarak 1760'lı yıllarda besin maddesi olarak etin sindiriminin mide salgılarıyla nasıl gerçekleştiğinin araştırılması üzerine başlamış, 1825 yılında Jön Jacob Berzelius, nişastanın tahıllardan gelen bir özellik olarak çok hızlı bir şekilde şekere parçalanmasını keşfetmiştir. Enzimlerin etkilediği madde substrat olarak adlandırılır. Enzimler reaksiyonlarda katalitik görevi üstlenirken bazı etkileşimler gösterebilir; fakat reaksiyon tamamlandığında ilk hallerine geri dönerler. Substrat, ürüne dönüştükten sonra enzim ve ürün kompleksi birbirinden ayrılırlar [4,6].

Saflaştırılan ilk enzim türü 1926 yılında canavalia enformis adlı bitkiden elde edilen üreaz enzimi olmuştur. Cames B. Sumner adlı bilim insanının saf halde bulduğu bu enzim saf ve kristalize halde elde edilen ilk enzim olma özelliğini taşımaktadır. Bulduğu bu sonuçtan hareketle enzimlerin protein yapılı olduğu kanısına varılmıştır [4]. Ardından çalışmalara devam eden bilim insanları Northrop ve Stanley, sindirimde rol oynayan enzimlerden tripsin ve kimotripsin üzerinde birtakım deneyler sonucu saflaştırılan enzimlerin protein yapılı olduklarını kesin olarak kanıtlamış, bu çalışmaları sonucunda da 1946 yılın Nobel Ödülünü almaya layık bulunmuşlardır [7].

Enzimler, ilk bulundukları zamanlarda, nispeten sayılarının da az olması sebebiyle sistematik bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmamış, katalizledikleri substratlarının sonuna "az" eki getirilerek geleneksel sınıflandırma yoluna gidilmiştir [5]. Enzimler, zamanla keşfedilerek sayılarının artması sonucunda belli bir sistematığe göre sınıflandırılmak zorunda kalmış, substrat ve enzim spesifikliğine dayanarak dört haneli bir sayıdan oluşan EC numarası adı altında gruplandırılmıştır. İlk basamak 6 temel enzim grubunu, ikinci ve üçüncü basamakta ise alt ve alt-alt grupları belirtmekte olup, dördüncü basamakta ise alt gruptaki enzimler arasında kaçınıcı sırada olduğunu göstermektedir [8].

Enzimlerin bu 6 temel grubu ve özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

- a) Oksidoredüktazlar; kelime olarak oksidasyon ve redüksiyonun kısaltmalarıyla oluşan ilk grup, yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen sınıfı kapsar.
- b) Transferazlar; hidrojenen başka diğer grupların substratları arasında aktarım işlemini sağlayan gruptur. Glutasyon S-Transferaz enzimi bu gruba aittir.
- c) Hidrolazlar; su katılarak bileşik ve makro moleküller arasındaki bağların koparılmasını sağlayan gruptur.
- d) Liyazlar; enzim substratlarında hidrolizden farklı olarak yapılar arasında grupları uzaklaştırıp yerine çift bağlar oluşturan gruptur.
- e) İzomerazlar; enzimin, molekülün yapısında optik, geometrik ya da yapısal izomere dönüşümünü sağlayan gruptur.
- f) Ligazlar; bazen kinazların da dahil edildiği bu grup, yüksek enerjili ATP ve GTP gibi enerji birimlerinden fosfat kopararak oluşan enerjiden istifade ederek iki molekülün bağlanmasını sağlar [5].

Canlı bünyesinde aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen farklı moleküler yapıya sahip enzimler 'izoenzim' olarak adlandırılmaktadır. Farklı gen koduna sahip olmaları, farklı izoelektrik noktaları ve farklı immunolojik özellikler taşımaları izoenzimleri birbirinden farklı yapıya erdirmektedir. İzoenzimlere örnek olarak, ilgili tez çalışmasında yararlanılan glutayon s-transferaz, bunun dışında üç izoenzimi olan kreatin kinaz verilebilir [9].

Biyokimya içerisinde araştırma konusu bakımından enzimlerin kayda değer bir yeri vardır. Çünkü enzimler hastalıkların teşhisi ve çözüm yollarının geliştirilmesi açısından kilit rol

oynamaktadır. Bugün genlerin farklı diziliş ve sırada olmaları insanlar arasındaki farklılığın da bir işareti olması enzimleri bu açıda daha da önemli bir yere taşımaktadır. Kalıtsal hastalıkların çoğunun genlerle ilgili olması ve bu hastalıkların tespit ve çözümünde enzimlerden yararlanılması bunun bir göstergesidir [10].

Bugüne kadar bulunan enzim sayısı 2000'i geçmektedir ve gün geçtikçe keşfedilen enzim sayısı da artmaktadır [5]. Enzimlerin spesifik bir karakter taşımaları ve ortam şartlarına karşı oldukça hassas özelliğe sahip olmalarından dolayı enzim saflaştırma işlemi oldukça zahmetlidir. Enzim saflaştırma işlemi enzimin etkilediği substrat, oluşturduğu ürün ya da ilgili enzime ait diğer değişkenler üzerinden gerçekleştirilmektedir [11].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Glutasyon

Keşfedilişi 1888 yılına dayanan glutasyon, ilk kez maya hücrelerinde bulunmuştur. 1921 yılına gelindiğinde Hopkins saflaştırmayı başararak glutasyonun karakterizasyonu hakkında önemli bulgulara ulaşmıştır [12].

Glutasyon, içeriğinde glutamat, glisin ve sistein aminoasitlerini bulunduran, bağ olarak da iki karboksil, iki peptit, bir amin ve tiyol grubu barındıran bir tripeptittir. İki farklı formda öne çıkan glutasyon indirgenmiş formuyla GSH, yükseltgenmiş formuyla da GSSG olarak anılmaktadır. Suda çözünürlüğü oldukça yüksek olan bu molekülün, içerdiği hidrofil karakterdeki grupların sayısının hayli yüksek olması; öte yandan molekül kütlesinin de düşük olması onu özgün bir karakter taşımasına ve vücut savunmasında önemli rol üstlenmesini sağlamaktadır [13].

Hayvan ve bitki sitozollerinde çok miktarda bulunan glutasyonun en önemli görevi hücrelerin serbest radikal, ağır metal ve serbest oksijen gibi toksik etkili maddelere karşı özellikle de barsak epitelyumunu savunması, diğer bir görevi de indirgenmiş formuyla hücrelere devamlı -SH grubu sağlamasıdır [14,15,16,17].

İndirgenmiş glutasyon miktarı, vücuttaki stres ve radikalik toksisiteyle mücadele için oldukça önemlidir. Oksidatif stres varlığı halinde indirgenmiş glutasyon miktarında azalış söz konusu iken varlığının devamı durumunda GSH/GSSG düzeyi bu durumu kontrol altında tutmak amacıyla yükselebilmektedir, bu da GSH miktarının, olumsuz faktörlerin tespitinde kullanılan bir referans olduğunu göstermektedir [18,19].

2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimi

Enzimler, canlıların metabolik aktivitelerini gerçekleştirmek için vazgeçilmez makroproteinlerdir. Hayvan, bitki ve insan hücrelerinde birçok enzim tek başına ya da

türevleriyle birlikte önemli roller üstlenmektedir. Bunlardan biri de vücudun maruz kaldığı çevresel, kimyasal ve radyoaktif etkilere karşı vücudun geliştirdiği detoksifikasyon sistemlerinin son ürünü olarak karşımıza çıkan merkapturik asidin ilk aşamasını katalizleyerek vücudun iç dengesini sağlayan glutatyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18) enzimidir. Toplamda üç fazdan oluşan detoksifikasyon sisteminde glutatyon s-transferaz enzimi konjugasyon tepkimelerinin ürettiği Faz II aşamasında karşımıza çıkmaktadır [20,21,22,23,24,25].

Yaklaşık 27 kDa ağırlığa sahip ve 229 aminoasitten alt biriminden oluşan, keşfedilişi, Boyland ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen glutatyon s-transferaz enziminin saflaştırıldığı ilk yer sıçan karaciğer hücresidir [26].

Glutatyon S-transferaz enzim grubu, hücrede çoğunlukla sitozolik olmak üzere konumlarına göre mikrozomal, sitozolik ve mitokondriyal olarak adlandırılmaktadır [23]. Bu enzim, belirli şartlar altında uzun süre aktivitesini kaybetmemesi, çok sayıda izoenzim barındırması ve su ile substratları bağlayıcı kısımlara sahip olması, birçok araştırma konusuna dahil olmasını sağlamıştır. Bu özellikleriyle indirgenmiş glutatyonun birçok farklı bileşikle konjuge edilebilmesini ve farklı yapıya sahip substratların katalizlenmesine olanak sağlamaktadır [23,27].

Glutatyon S-transferaz enzimi, ancak indirgenmiş glutatyonun ortamda var olmasıyla aktivasyon gösterebilir. Substrat konusunda seçici davranan GST, bu davranışıyla kısmi özgüllük göstermektedir. GST enzimi, vücudun savunmasında homeostasisi sağlamaktan başka vücuttaki mikroparçaların vücuda giren zehirli yapılarla birleşip tehdit oluşturmasının önüne geçerek önleyici bir rol üstlenmektedir [26,28,29].

Enzimler protein yapılı olduklarından bileşenleri aminoasitlerden oluşmaktadır. Enzimlerde bulunan aminoasitlerin türü, enzim işlevine göre oldukça önemlidir. GST enzimi her canlıda aynı aminoasitleri barındırmamasına karşın birbirine en benzeyen bileşen türü insan ve sıçanda bulunmaktadır. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde, ortak bir şekilde bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit ve lösindir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise, insandan farklı olarak sadece sıçanda eser miktarlarda bulunur [29,30].

2.3. Pestisitler

Çalışmada kullanılan pestisitlerden malathion WP, $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ formülüne sahip olan bir insektisit olup molekül kütlesi 330,4 g/mol'dür. İnsektisit olarak pamuk, buğday, mısır, gül, süs bitkileri, tütün, sebze ve turunçgillerde kullanılan bir maddedir. Deltametrin, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ formülüne sahip olan bir insektisit olup molekül kütlesi 505,206 g/mol'dür. Sebzelerde, armut, antep fıstığı ve ay çiçeği tedavisinde kullanılır. Corvette, $C_{16}H_{22}Cl_2O_3$ formülüne sahip olup molekül kütlesi 333,2 g/mol'dür. Buğday, arpa ve mısır gibi ekinlerin yabancı ot mücadelesinde kullanılır [31].

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan indirgenmiş Glutasyon (GSH), 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB), Sephadex G-150, akrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodium dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, beta-merkaptoetanol, standart bovin serum albumin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), glutasyon agaroz, glutasyon asetat, glisin, gliserin, potasyum bisfosfat, potasyum fosfat, trihidroksimetilaminometan (Tris), NaOH, NaCl, HCl, H₃PO₄, C₂H₅OH, CH₃OH, CH₃COOH, NaCH₃COO, izopropanol, Sigma Chemical Comp.'den temin edildi.

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Buz Makinesi: Hoshizaki Ice Maker FM-80EE

Otomatik Pipet: Eppendorf

Hassas terazi: Denver Instrument SI-234

Çalkalayıcı: Stuart Orbital Incubator S1600

Karıştırıcı: SK-300

Peristaltik pompa: ATTA SJ-1220

Vorteks: Velp Scientifica SK-300

Elektroforez güç kaynağı: EC 300XL

Elektroforez tankı: Bio Rad

Homojenizatör: KA T25 Ultra-Turrax

pH metre: Thermo Orion 3 Star

Spektrofotometre: UV-1800, Shimadzu CC-10

Soğutmalı santrifüj: Universal 320 R, Hettich

Manyetik karıştırıcı: IKA C-MAG HS 7

Dondurucu/Buzdolabı: Vestel

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.3.1. Homojenat Hazırlanmasında Kullanılan Çözelti

1 mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF içeren toplamda 50 mM'lık Tris-HCl (pH: 7,2) Tamponu: 0,605g Tris suda çözüldü, daha sonra hazırlanan bu çözeltiye 0,015 g DTT, 0,027 g EDTA, ve 1 mL propanol'de hazırlanan 0,017 g PMSF çözeltisi eklenerek pH 7,2'ye ayarlanıp son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 20 mM GSH Çözeltisi: 0,06 g indirgenmiş glutatyon (GSH) alınarak, bir miktar saf su içerisinde çözülüp son hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
2. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,05 g CDNB alınarak konsantrasyonu %95 olan belli bir miktar etil alkol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etil alkolle 10 mL'ye tamamlandı.
3. KH_2PO_4 (0.1 M, pH:6,5): 0,68 g KH_2PO_4 ve 0,014 g EDTA hassas terazi ile tartılarak 30 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH 6,5'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL olacak şekilde ayarlandı.

3.3.3. Safılaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) (Afinite kolonunu paketlemek, dengelemek ve yıkamak amacıyla kullanılan çözelti): 0,4 g KH_2PO_4 ve 2,61 g NaCl alınarak 200 mL suda çözülüp pH 7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:9,5) (Afinite jeline tutunan GST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 50 mM Tris- HCl çözeltisinin (pH'I 9,5 olacak şekilde) içerisinde katı fazda GSH çözülüp 10 mM'lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonar 5 tüpten oluşan gradient oluşturulup ve düşük konsantrasyondan başlanıp afinite kolonuna uygulamaya geçildi.
3. 0,5 M NaCl ve 0,1 Borik Asit (pH: 8,5) (afinite kolonunun rejenerasyonunu sağlamak amacıyla hazırlanan tamponun ilki): 0,62 g H_3BO_3 ve 2,62 g NaCl alınarak 80 mL saf suda çözülüp, pH 8,5 e getirilerek çözelti hacmi saf su vasıtasıyla 100 mL'ye tamamlandı.
4. 0,1 M Sodyum Asetat ve 0,5 M NaCl (pH: 4,5)(afinite kolonunu rejenere etmek amacıyla hazırlanıp kullanılan Asetat tamponu): 0,82 g NaCH_3COO ve 2,92 g NaCl alınıp

80 mL saf suyla çözelti haline getirilerek pH'sı 4,5'e ayarlandıktan sonra hacmi su vasıtası ile 100 mL olacak şekilde hazırlandı.

3.3.4. Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

1. Boyama (Coommassie Brilliant Blue) Çözeltilisinin Hazırlanması: Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifini 100 mg alıp %95'lik 50 mL hacimdeki etil alkolün içerisinde çözülerek ayrıca hazırlanan %95'lik H_3PO_4 'ten 100 mL alınıp eklendi. Çözeltinin son hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti ışığa hassas olduğundan karanlık ortamda, tayinde kullanılma maksadıyla bekletildi.
2. Bovin sığır albümin çözeltisi: 10 mg sığır albüminden alınıp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.3.5. Elektroforez İçin Hazırlanan Çözeltiler

1. 1 M Tris HCl (pH'ı 6,8'e ayarlı): 12,11 g Tris tartılarak 70 mL suyla çözelti oluşturulup pH ayarlaması 6,8'e getirildikten sonra çözeltinin hacmi saf su vasıtasıyla 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH'ı 8,8'e ayarlı): 12,11 g Tris tartılarak 70 mL suyla çözelti oluşturulup pH ayarlaması 8,8'e getirildikten sonra çözeltinin hacmi saf su vasıtasıyla 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30'luk Akrilamid ve %0,8 lik Bisakrilamid çözeltisi hazırlanması: öncelikle 0,4 g bisakrilamid sonrasında ise 15 g akrilamid hassas terazide ölçülüp 34,6 mL saf suyla çözelti haline getirilip sonrasında yine saf su vasıtasıyla hacmi 50 mL olacak şekilde ayarlandı.
4. %10' luk SDS çözeltisi: 9 mL saf su içerisinde 1 g SDS çözeltisi hazırlanıp hacmi 10 mL olacak şekilde ayarlandı.
5. % 10'luk amonyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 8 mL' lik saf suyla 1 g amonyum persülfat çözeltisi hazırlanıp çözelti hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
6. Numune tampon hazırlanması: Öncelikle çözelti kullanılmadan önce 950 mikrolitre numuneye 50 mikrolitre β -merkapto etanol eklenerek kullanıldı. Tampon çözeltinin

hazırlanışı ise şu aşamalardan oluşmaktadır: 0,5 mL, 1M Tris-HCl (pH'ı 6,8'e ayarlı), 1 mL %10'luk sodyum dodesil sülfat, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL 0,1' lik bromtimol mavisinden oluşan çözeltinin hacmi saf su vasıtasıyla 10 mL olacak şekilde ayarlandı.

7. Jel yürütme tamponunun hazırlanması: 7,51 g glisin ve 1,51 g Tris' ten alınarak 450 mL su içerisinde çözelti haline getirildi. Bu çözeltiye 5 mL %10'luk sodyum dodesil sülfat eklenerek pH ayarlaması 8,5'e getirildi, oluşan bu çözeltinin hacmi su vasıtasıyla 500 mL'ye tamamlandı.

8. Sabitleştirme işlemi için hazırlanan çözelti: Jelde hareketli proteinleri sabit duruma getirmek için %10 TCA, %50 izopropanol ayrıca %40'ı saf sudan oluşan bir karışım hazırlandı.

9. Bromtimol mavisi çözeltisi hazırlanması (%0,1 derişime sahip): 16 mL, 0,01 M sodyum hidroksit içerisinde 0,1 g bromtimol mavisi çözülerek toplam hacminin saf su vasıtasıyla 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

10. Jel boyama işlemi için hazırlanan çözelti: 10 mL CH_3COOH içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 ilave edilerek çözünmesi sağlandı, oluşan çözelti üzerine 50 mL metil alkol ve 40 mL saf su eklenerek jel boyama çözeltisi hazırlandı.

11. Jelin yıkanması için hazırlanan çözelti: Yine 10 mL CH_3COOH içerisinde 50 mL metil alkol karıştırılıp üzerine 40 mL saf su eklenerek 100 mL' lik jel yıkama çözeltisi hazırlandı.

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif Protein Tayini

Proteinlerin kalitatif tayininde, proteinlerin yapısında var olan aminoasitlerden tirozin ve triptofan a.asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans değeri göstermesi esasına dayanmaktadır [32]. Eşit hacimli olarak numuneler alınıp kuartz küvetlere yüklenerek absorbans değerlerine spektrofotometrik olarak bakıldı.

3.4.2. Bradford Metodu Kullanılarak Gerçekleştirilen Protein Tayini İşlemi

Tez çalışması boyunca tüm aşamalarda protein miktarı (kantitatif) Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Bu metot, Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin hızlıca proteine

bağlanması esasına göre çalışmaktadır. Protein-boya kompleksinin bağlanması işlemi çok hızlı gelişip en yüksek absorbans gösterdiği değer 595 nm, hassasiyet aralığı ise 1 ile 100 mg arasındadır [33].

Kantitatif protein tayin işlemi için 10 tüp alınıp numaralandırıldı ve 1 mL’de 1 mg’lık sığır serum albümin içermesi istenen tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL eklendi ve saf su vasıtasıyla bütün tüplerdeki hacim 100 µL’ye eşitlendi. Renklendirme reaktifinden 4,9 mL alınarak tüplere eklendi ve vorteks vasıtasıyla karıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra tüpler 10 dakikalık inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla standart grafik çizimi gerçekleştirildi.

3.5. GST Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivitelerin tayini amacıyla Tablo 3.1 de verilen değerlere göre çözeltiler hazırlandı kör ve enzimin olduğu kuvvetler spektrofotometreye yerleştirilip başlangıç ile 180 sn. sonraki değerler ölçülüp değerleri not edildi [34].

Tablo 3.1. GST enziminin aktivite ölçümünde yararlanılan çözelti miktarları

Küvet İçeriği	Kör (µL)	Numune (µL)
500 mM aktivite tamponu	200	200
25 mM GSH	50	50
20 mM CDNB	20	20
Saf Su	730	715
Enzim örneği	-	15
Toplam	1000	1000

Enzim Ünitesi kavramı bir dakikada optimal şartlarda ve sıcaklıkta (25C°) 1 µmol substratın ürüne dönüşmesine 1 enzim ünitesi denmektedir. Aktivite hesaplamaları

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

Burada;

EÜ: Enzim Ünitesi

ΔOD: Spektrofotometrede meydana gelen 1 dk’lık absorbans değişim miktarı (Ekstinksiyon katsayısı olarak da ifade edilmektedir.)

9,6: 1mM dinitrobenzen-S glutatyon’un meydana getirdiği absorbans miktarı

V_T : Küvetin toplam hacmi

V_E : Kullanılan enzimin hacmi

SF: Seyreltme faktörünü göstermektedir.

3.6. Tavuk Karaciğerinin Temini ve Homojenatın Hazırlanması

Deney esnasında kullanılan tavuk karaciğerleri taze olarak Bingöl Et ve Süt Kurumundan soğuk zincir kurallarına göre temin edildi. Laboratuvara getirilen dokular küçük parçalara bölünerek 10 gramlık doku alındı ve havanda sıvı azot ile toz haline getirildi. Toz haline getirilen doku, 10 mL 50 mM Tris-HCl (pH: 7,5) tamponunda süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon daha sonra 13.000 rpm'de bir saat boyunca santrifüj edilerek doku ve hücre parçacıklarının çökmesi sağlandı. Süpernatant damlalıkla dikkatli bir şekilde alınıp çalışmada kullanıldı ve bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi [35].

3.7. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz İşlemleri

Elde edilen homojenata %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürme yapılarak enzimin hangi aralıkta çöktüğü belirlendi. Her aşamada 20 dakika süreyle 10.000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı. Her seferinde süpernatant ve çökeleğin aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ince şeffaf silindir şeklindeki diyaliz torbası açılıp alt tarafından düğümlenerek çöktürme sonucu elde edilen karışım içerisine dökülüp üstünde hava kalmayacak şekilde bir düğüm daha atıldı. Magnetik karıştırıcı üzerinde saatte bir suyu değiştirilerek yaklaşık 2 saat diyaliz tamponuna (10 mM K-Fosfat, 1 mM EDTA ve pH'ı 7,5 olan) karşı diyaliz işlemi gerçekleştirildi ve işlemler sırasında sıcaklık +4°C de tutuldu.

3.8. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Enzim saflaştırma teknikleri arasında popüler ve en verimli metotlardan biri olan afinite kromatografisi tekniği, bu çalışma için tercih edildi ve önceki sayfalarda zikredilen çözeltilerden istifade edilerek afinite kromatografisinden enzim saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle 1 g kuru glutasyon-agaroz katısı tartılıp 200 mL'lik suyla yıkandı ve küçük katı taneciklerin uzaklaşması sağlandı. Yıkamayla beraber jel şişirilip üzerine dengeleme, paketleme ve yıkama işlevi gören tampon çözelti (0,05 M K-fosfat, pH:

7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) eklenerek jelin süspansiyonu sağlandı. Glutatyon agaroz afinite kolonu peristaltik pompa vasıtasıyla saatte 60 mL akma hızına denk düşecek şekilde ayarlandı. Kolonun çatlama riskine karşı, jelin 1-2 cm üstüne kadar söz konusu tampon ilave edildi. Öncelikle kolon 0,5 M NaCl ve 0,1 Borik Asit (pH: 8,5) ve 0,1 M Sodyum Asetat ve 0,5 M NaCl (pH: 4,5) tamponları ile rejenere edilerek 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl (pH:7,4) tamponu ile dengelendi. Daha sonra amonyum sülfat ve diyaliz işlemleri sonrasında elde edilen enzim numunesi tatbik edilerek 0,05 M K-fosfat, pH: 7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra enzim numunesi 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH: 9,5) tamponuyla üçer mL'lik tüplere alınarak elüe edildi [36,37].

3.9. SDS-PAGE Aracılığıyla GST Enzimi Saflığının Kontrolü

Laemmli tarafından önerilen teknikte %3-8 aralığına sahip kesikli SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle GST enziminin saflığı kontrol edildi [38].

Elektroforez plakaları, kabini, cam ve kaset işlem öncesi alkol ve su aracılığıyla iyice temizlendi. Plakalar jel hazırlama kabinine dikkatlice yerleştirildi ayırma ve yığma jelleri hazırlanıp ilk olarak ayırma jeli konuldu. Ayırma jeli pipet yardımıyla iki cam arasına dikkatlice aktarıldı. Üzerinin düz olmasını sağlamak amacıyla jelle tepkime vermeyen 2-propanol eklendi ve beherde kalan jelin kuruması baz alınarak kabindeki jelin katılaşması beklendi. Daha sonra yığma jeli için de aynı işlemler yapıldı ve jelin katılaşmasından önce her iki tarafa da taraklar yerleştirilerek kuyuların oluşması sağlandı. Yığma ve ayırma jeli katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak numune kuyularının oluşumu sağlandı. Protein numunesi denatüre edildikten sonra standart proteinler kuyulara tatbik edildi. Jel plakaları elektroforez tankına dikkatlice konuldu ve daha önceden hazırlanan jel yürütme tamponu tabloda belirlenen miktarda eklendi. Güç kaynağına takılan elektroforez cihazı ilk olarak 80 voltta 20 dakika, sonra 120 voltta 120 dakikaya denk gelecek şekilde kuyulardaki numunelerin suya karışmasına gelen seviyeye kadar inmesi beklendi. Kuyulardaki enzim indikten sonra akım kesildi ve dikkatlice plakaların arasındaki jeller çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine bırakıldı. Çalkalayıcı yardımıyla 30 dk sabitleştirilmesi sağlandı ve sonra 3 saat boyama işlemine geçildi. Boyandıktan sonra yıkama çözeltisine yerleştirildi ve bantlar belirginleşince fotoğraflandı.

Tablo 3.2. Ayırma ve yığma jellerinin kimyasal içeriği

Ayırma Jeli	Yığma Jeli
1M Tris-HCl pH:8,8, 5mL	1M Tris-HCl pH: 6,8, 400 µL
%30'luk akrilamid ve % 0,8'lik bisakrilamid 4,4 mL	%30'luk akrilamid ve % 0,8'lik bisakrilamid 800 µL
%10'luk SDS 200 µL	%10'luk SDS 30 µL
Saf su 3,130 mL	Saf su 2,450 mL
%10'luk PER 100 µL	%10'luk PER 30-50 µL

3.10. Karakterizasyon Çalışmaları

3.10.1. Optimum pH Tayini

Tavuk Karaciğerinden elde edilen glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla potasyum fosfat tamponundan pH değeri 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0; Tris-HCl tamponundan pH 7,5, 8,0, 8,5, ve 9,0 aralıklarında tampon çözeltiler hazırlandı. Bu tamponların her biri ile ayrı ayrı enzimin aktivitesi hesaplandı ve optimum pH'nın belirlenebilmesi için sonuçlar ile ilgili pH-aktivite grafikleri çizildi.

3.10.2. Stabil pH Tayini

Enzimin en uygun stabilite gösterdiği pH değerinin tespiti amacıyla pH değerleri 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan KH_2PO_4 ve 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 pH değerlerine sahip olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Hazırlanan bu tamponlarla 3 gün boyunca 24 saatte bir olacak şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri neticesinde enzimin stabil pH'sının belirlenmesi için grafikler çizildi.

3.10.3. Optimum İyonik Şiddet Tayini

Enziminin optimum iyonik şiddetinin saptanması amacıyla 50,100,150,160,170,200 ve 250 mM'lık Tris-HCl çözeltileri ile aktivite ölçümleri yapıldı.

3.10.4. Optimum Sıcaklık Tayini

Enzimin optimum sıcaklık değerinin tespiti için optimum pH, optimum iyonik şiddet ve söz konusu tampon kullanılarak 0°C ile 90°C sıcaklıkları arasında her 10°C 'de bir aktivite ölçümü gerçekleştirildi.

3.10.5. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması Amacıyla Gerçekleştirilen Çalışmalar

Öncelikle GSH'ın sabit derişimi ve CDNB'nin 5 farklı uygun konsantrasyonunda aktiviteler ölçülerek $1/V-1/[S]$ grafiğı çizildi ve bu grafiklerden CDNB için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Daha sonra CDNB'nin sabit derişimi ve GSH'ın 5 farklı uygun konsantrasyonunda GSH substratı için aynı işlemler yapıldı [39].

3.10.6. İnhibisyon Çalışmaları

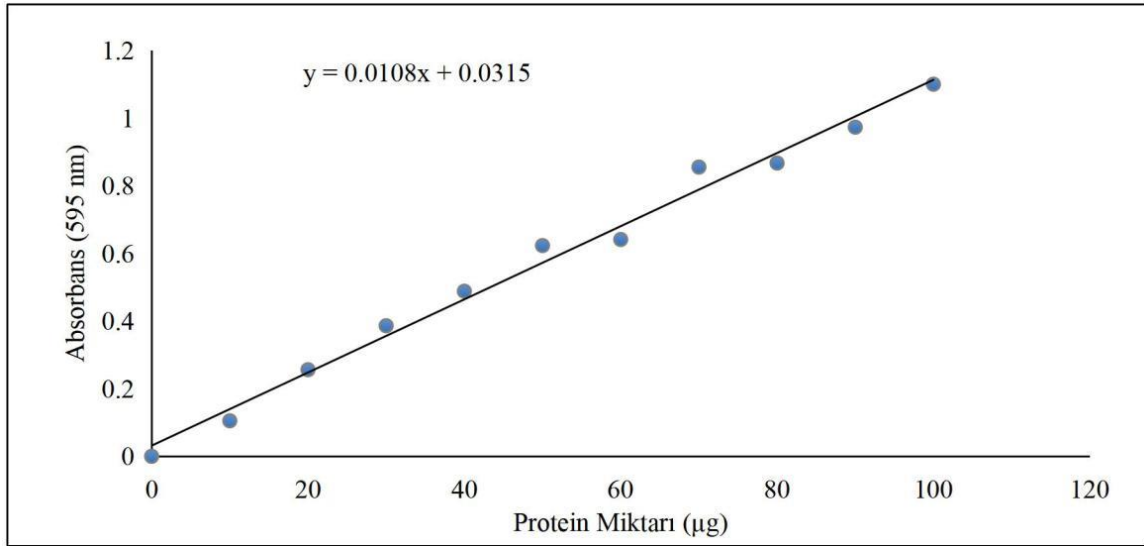
İnhibisyon çalışmalarında deltametrin, corvette ve malathion WP pestisitleri kullanıldı. Öncelikle her bir pestisit için uygun çözeltiler hazırlanarak aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri sonucu elde edilen aktivite değerleri ve tatbik edilen derişimler kullanılarak % Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve bu grafiklerin yardımıyla her bir pestisit için IC_{50} değerleri bulundu. Daha sonra deltametrin için 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiğı çizilerek K_i sabiti tespit edildi [39].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde homojenatta, amonyum sülfat çökeltisinde ve saflaştırılmış enzim çözeltisinde protein miktarlarının tespiti için standart grafik hazırlandı ve Şekil 4.1’de gösterildi.



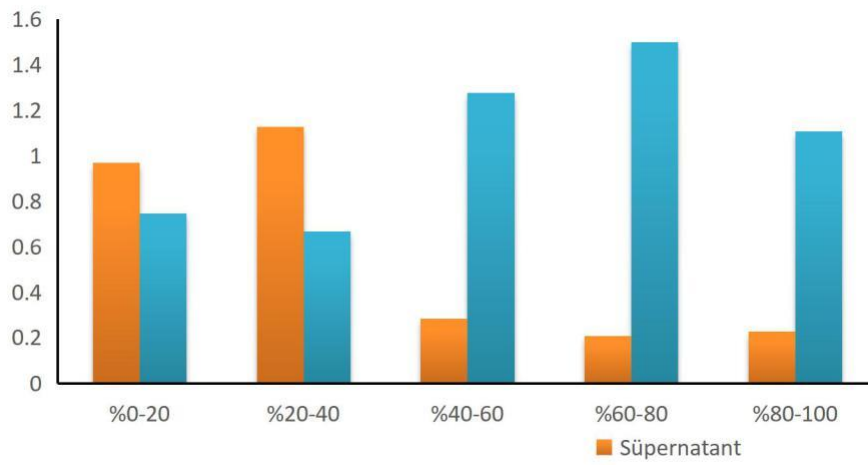
Şekil 4.1. Kantitatif protein tayini için oluşturulan standart grafik

4.1.2. Amonyum Sülfat Çöktürme Sonuçları

Çöktürme prosedürü Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterildi. Tablo 4.1 ve Şekil 4.2 incelenerek enzimin büyük kısmının %40-100 aralığında çöktüğü tespit edildi.

Tablo 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Amonyum Sülfat (%)	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelti (EÜ/mL)
0-20	0,969	0,747
20-40	1,127	0,668
40-60	0,284	1,275
60-80	0,208	1,5
80-100	0,226	1,106



Şekil 4.2. Amonyum sülfat çökme aralığı sütun grafiği

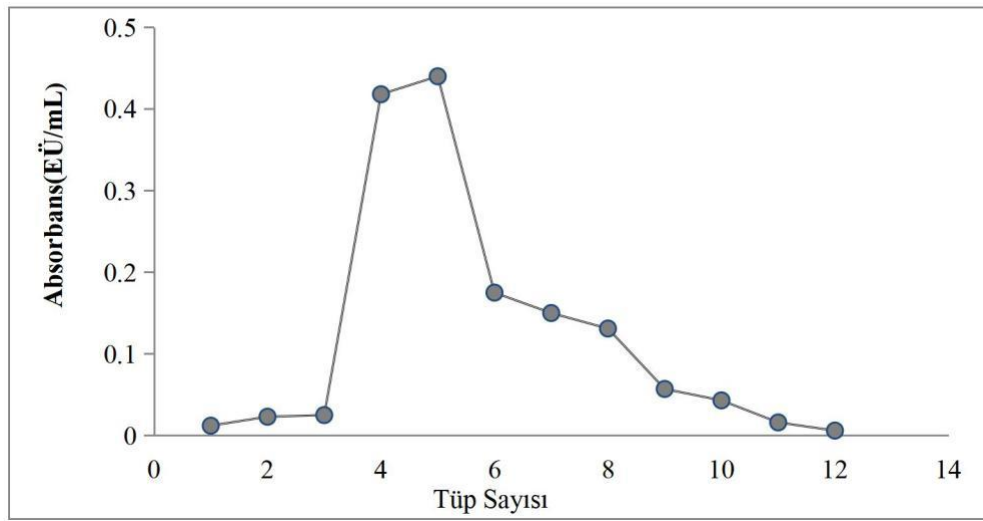
4.1.3. Glutatyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

Enzimin saflaştırılması işlemi Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi yapıldı ve spesifik aktivite, % verim, aktivite, toplam aktivite, protein, toplam protein ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanıp Tablo 4.2’de belirtildi. Tablodan görüldüğü gibi 8,35 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip olan GST enzimi %8 verimle 24,56 kat saflaştırıldı.

Tablo 4.2. Glutasyon S-transferaz enzimi saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Aktivite (EÜ)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg. protein)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	20	1,633	32,66	4,809	96,18	0,340	100	1
Amonyum Sülfat (%40-100)	8	2,470	19,76	5,735	45,88	0,430	60	1,26
Afinite	6	0,440	2,640	0,0527	0,316	8,350	8	24,56

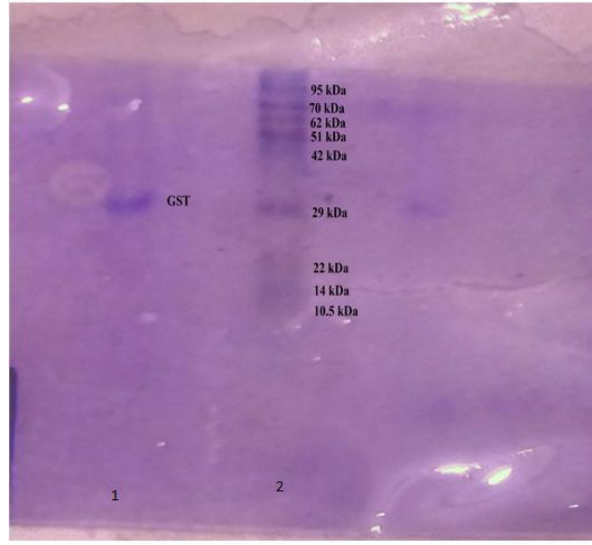
Bölüm 3.8’de bahsedildiği üzere gradientli elüsyon işlemi gerçekleştirip elüatlara ait oluşan aktivite değerleri Şekil 4.3’de gösterildi. Şekilden enzimin çoğunlukla 4-9. tüpler arasında elüe edildiği görülmektedir.



Şekil 4.3. Saflaştırma işleminde elde edilen elüsyon grafiği

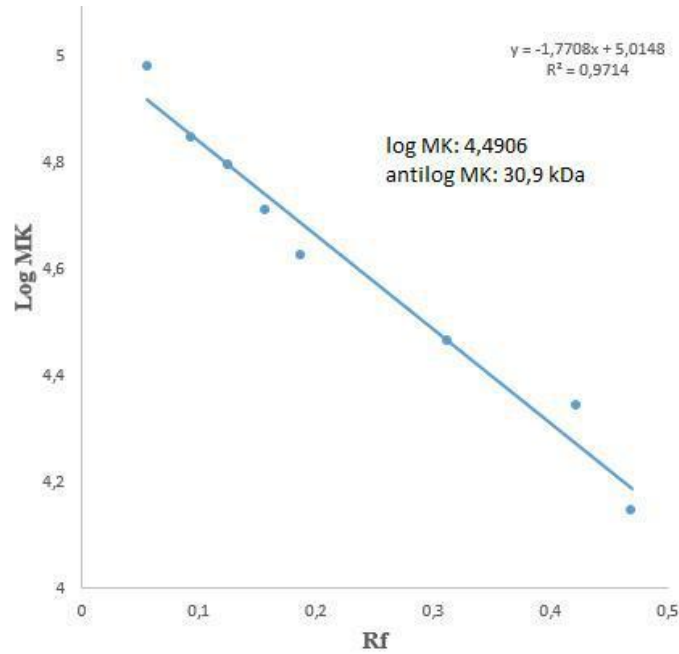
4.1.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Saflığının Kontrolü

Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapılarak fotoğraflandı ve Şekil 4.4’te gösterildi.



Şekil 4.4. SDS-PAGE fotoğrafı. 1. kuyu saf enzim, 2. kuyu standart proteinler

Ayrıca Şekil 4.4'teki SDS-PAGE fotoğrafından faydalanılarak enzimin alt birimlerinin molekül kütlesinin belirlenmesi amacı ile R_f -Log M_K grafiği çizildi ve Şekil 4.5'te gösterildi. Bu grafikten enzimin alt biriminin molekül kütlesi 30,9 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.5. Enzim alt biriminin M_A 'larının belirlenmesi için çizilen R_f -Log M_K grafiği

4.1.5. Optimum pH Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

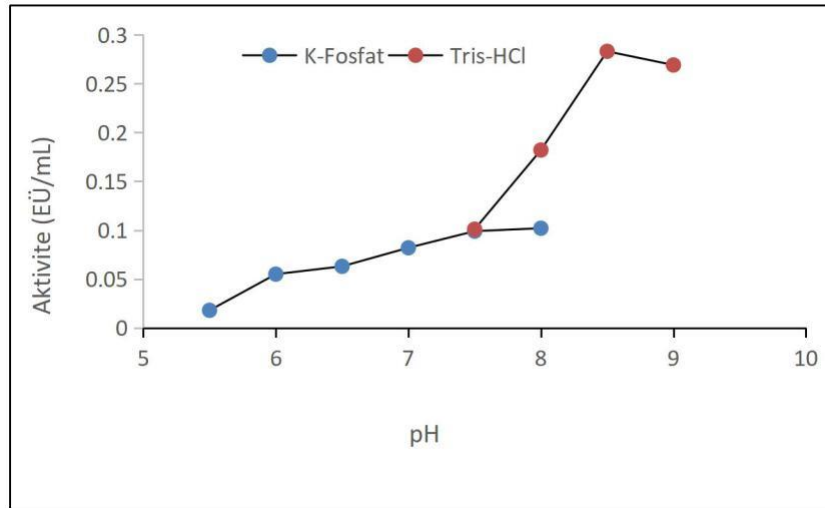
Bölüm 3.10.1.'de anlatıldığı gibi optimum pH çalışmaları yapılarak Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'da gösterildi. Söz konusu tablo ve şekillerden enzimin optimum pH değerinin 8,5 (Tris-HCl tamponu ile) olduğu hesaplandı.

Tablo 4.3. Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

Tris-HCl				
pH	7,5	8	8,5	9
Aktivite (EÜ/mL)	0,101	0,182	0,283	0,269

Tablo 4.4. K-fosfat tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

K-Fosfat						
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aktivite(EÜ/mL)	0,018	0,055	0,063	0,082	0,099	0,102



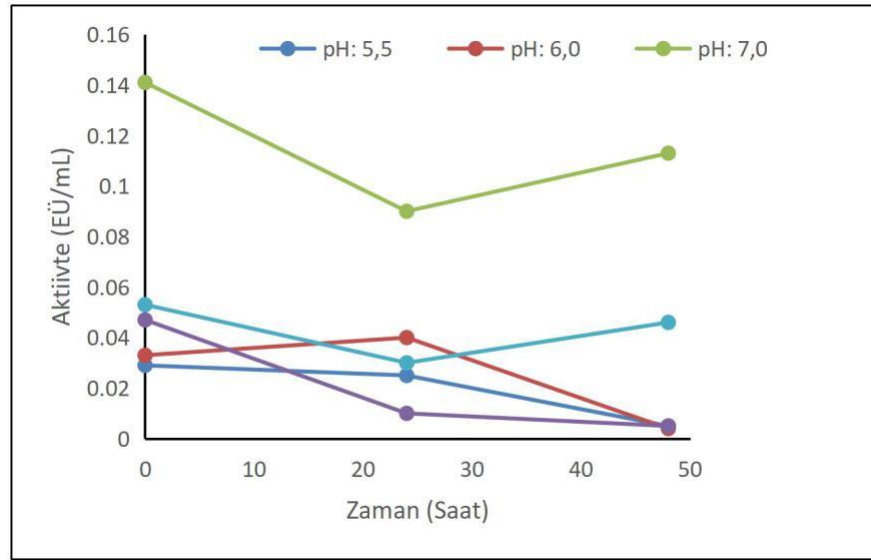
Şekil 4.6. Tris HCl ve K-Fosfat tamponları kullanılarak elde edilen pH-aktivite grafiği

4.1.6. Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.10.2’de anlatıldığı gibi K-fosfat tamponu ile stabil pH çalışmaları yapılarak Tablo 4.5, ve Şekil 4.7’de gösterildi. Söz konusu tablo ve şekillerden enzimin optimum pH değerinin 8,5 (Tris-HCl tamponu ile) olduğu hesaplandı.

Tablo 4.5. K-fosfat tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

pH	K-Fosfat				
	5,5	6	7	7,5	8
	Aktiviteler (EÜ/mL)				
1. gün	0,029	0,033	0,141	0,047	0,053
2. gün	0,025	0,04	0,09	0,01	0,03
3. gün	0,005	0,004	0,113	0,005	0,046

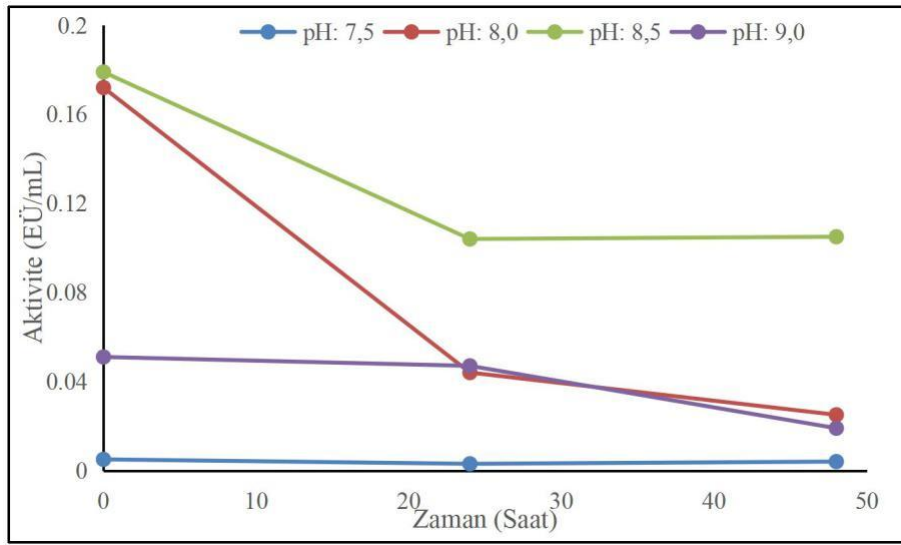


Şekil 4.7. K-Fosfat için çizilen stabil pH grafiği

Bölüm 3.10.2’de anlatıldığı gibi Tris-HCl tamponu ile stabil pH çalışmaları yapılarak Tablo 4.6, ve Şekil 4.8’de gösterildi.

Tablo 4.6. Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

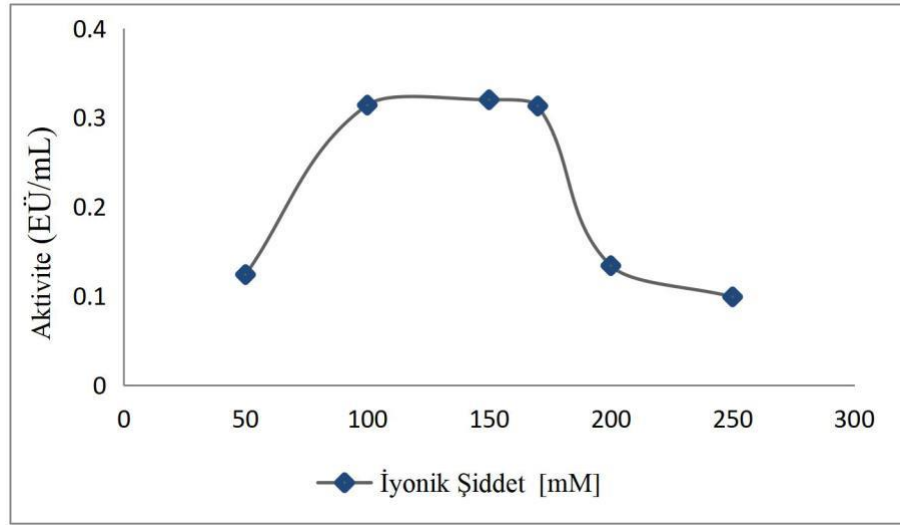
pH	Tris-HCl			
	7,5	8	8,5	9
	Aktiviteler (EÜ/mL)			
1. gün	0,005	0,172	0,179	0,011
2. gün	0,003	0,004	0,104	0,047
3. gün	0,137	0,025	0,105	0,079



Şekil 4.8. Tris-HCl için çizilen stabil pH grafiği

4.1.7. Optimum İyonik Şiddetin Tayinine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.10.3'te anlatıldığı şekilde optimum iyonik şiddet çalışmaları yapılarak sonuçlar Şekil 4.9'da gösterildi. Söz konusu şekilden enzimin optimum iyonik şiddet değerinin 150 mM (Tris-HCl tamponu ile) olduğu hesaplandı.



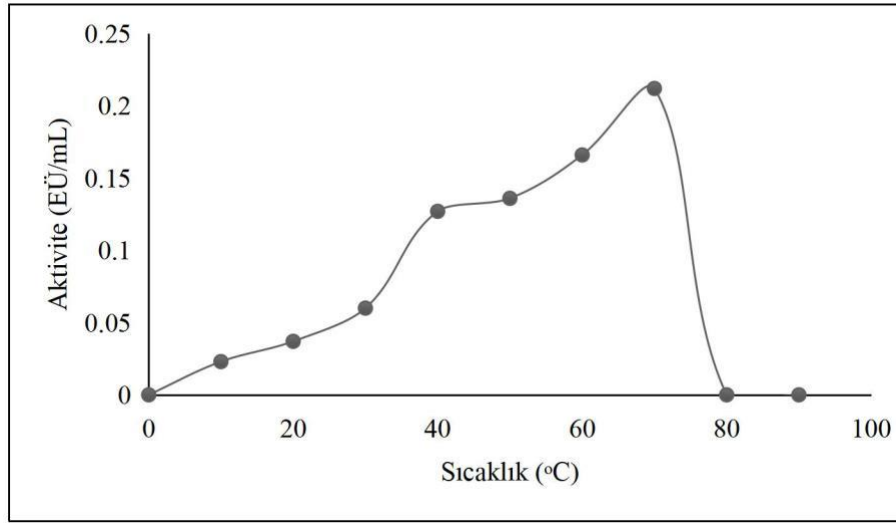
Şekil 4.9. Tris-HCl optimum iyonik şiddet grafiği

4.1.8. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.10.4'te anlatıldığı şekilde optimum sıcaklık çalışmaları yapılarak sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.10'da gösterildi. Söz konusu tablo ve şekilden enzimin optimum sıcaklık değerinin 70°C olduğu hesaplandı.

Tablo 4.7. Optimum sıcaklık ve aktivite değerleri tablosu

Sıcaklık (°C)	Aktivite(EÜ/mL)
0	0,000
10	0,023
20	0,037
30	0,060
40	0,127
50	0,136
60	0,166
70	0,212
80	0,000
90	0,000



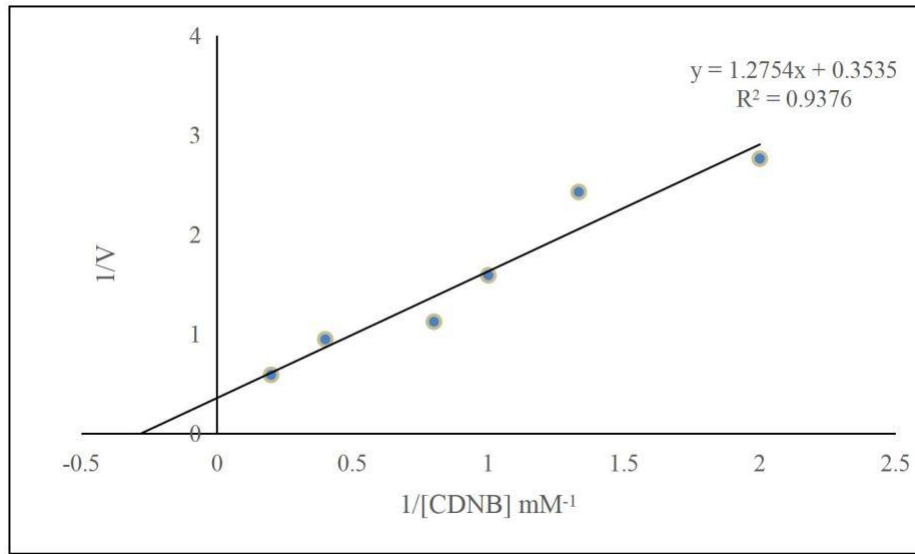
Şekil 4.10. Optimum sıcaklık grafiği.

4.1.9. K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.10.5'te anlatıldığı şekilde enzimin substratları olan CDNB ve GSH için gerekli aktivite hesaplamaları yapılarak Tablo 4.8 ve 4.9'da gösterildi ve $1/V-1/[S]$ grafikleri çizildi ve Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterildi. Bu grafiklerden GSH substratı için K_M değeri 0,802 mM, V_{max} değeri 1,833 EÜ/mL; CDNB için de K_M değeri 3,6 mM ve V_{max} değeri 2,829 EÜ/mL olarak hesaplandı.

Tablo 4.8. CDNB substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için kullanılan CDNB derişimleri ve elde edilen aktivite değerleri

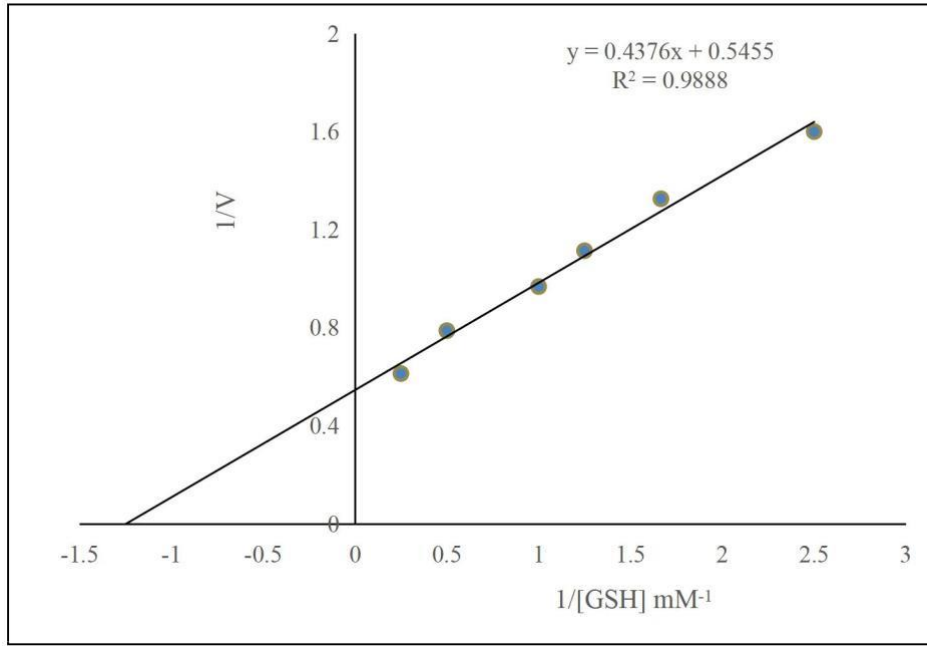
[CDNB] mM	Aktivite (EÜ/mL)
0,25	0,346
0,50	0,362
0,75	0,412
1,00	0,629
1,25	0,891
2,50	1,058
5,00	1,700



Şekil 4.11. CDNB substratı için elde edilen $1/V - 1/[CDNB]$ grafiği

Tablo 4.9. GSH substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için kullanılan GSH derişimleri ve elde edilen aktiviteler

[GSH] mM	Aktivite (EÜ/mL)
0,2	0,558
0,4	0,625
0,6	0,754
0,8	0,779
1,0	1,033
2,0	1,125
4,0	1,158



Şekil 4.12. GSH substratı için elde edilen $1/V-1/[GSH]$ grafiği

4.1.10. İnhibisyon Çalışmalarının Sonuçları

Bölüm 3.10.6’da anlatıldığı gibi malathion WP, deltamethrin ve corvette pestisitleri için Tablo 4.10, Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’de gösterildiği gibi en az 5 farklı konsantrasyon kullanılarak % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15) ve bu grafiklerin yardımıyla her bir pestisit için IC_{50} değerleri bulundu. Daha sonra deltametrin için Tablo 4.13’de gösterildiği gibi 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek (Şekil 4.16) K_i sabiti hesaplandı. IC_{50} değerleri ve K_i sabiti Tablo 4.8’de gösterildi.

Tablo 4.10. Malathion WP için IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

Saf su (μ L)	Fosfat tamponu (μ L)	CDNB (μ L)	GSH (μ L)	Enzim (μ L)	İnhibitör (μ L)	İnhibitör (mM)	Toplam hacim(μ L)
705	200	20	50	25	-	-	1000
700	200	20	50	25	5	0,015	1000
695	200	20	50	25	10	0,030	1000
685	200	20	50	25	20	0,060	1000
655	200	20	50	25	50	0,150	1000
630	200	20	50	25	75	0,225	1000
605	200	20	50	25	100	0,300	1000

Tablo 4.11. Deltametrin için IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

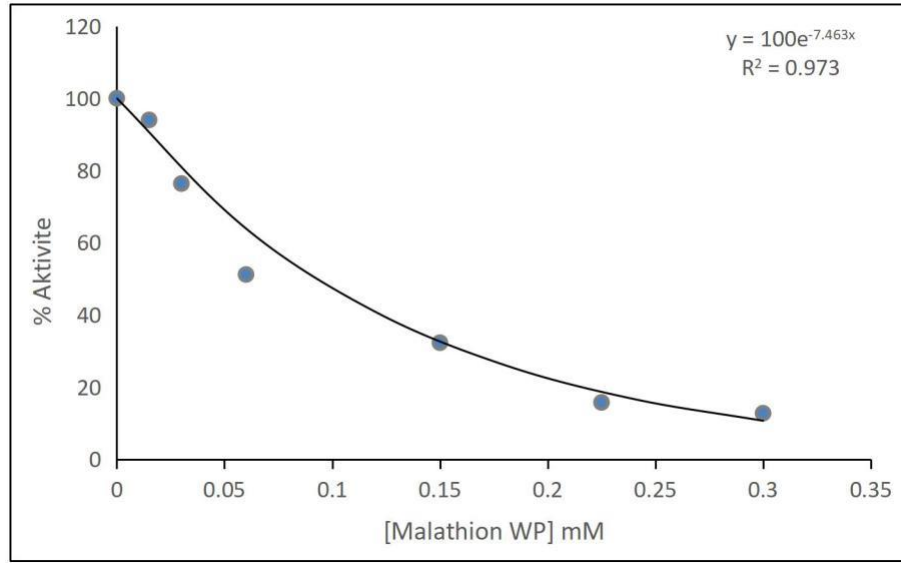
Saf su (μ L)	Fosfat tamponu (μ L)	CDNB (μ L)	GSH (μ L)	Enzim (μ L)	İnhibitör (μ L)	İnhibitör (mM)	Toplam hacim(μ L)
705	200	20	50	25	-	-	1000
700	200	20	50	25	5	0,074	1000
685	200	20	50	25	20	0,296	1000
655	200	20	50	25	50	0,740	1000
630	200	20	50	25	75	1,110	1000
605	200	20	50	25	100	1,480	1000

Tablo 4.12. Corvette için IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

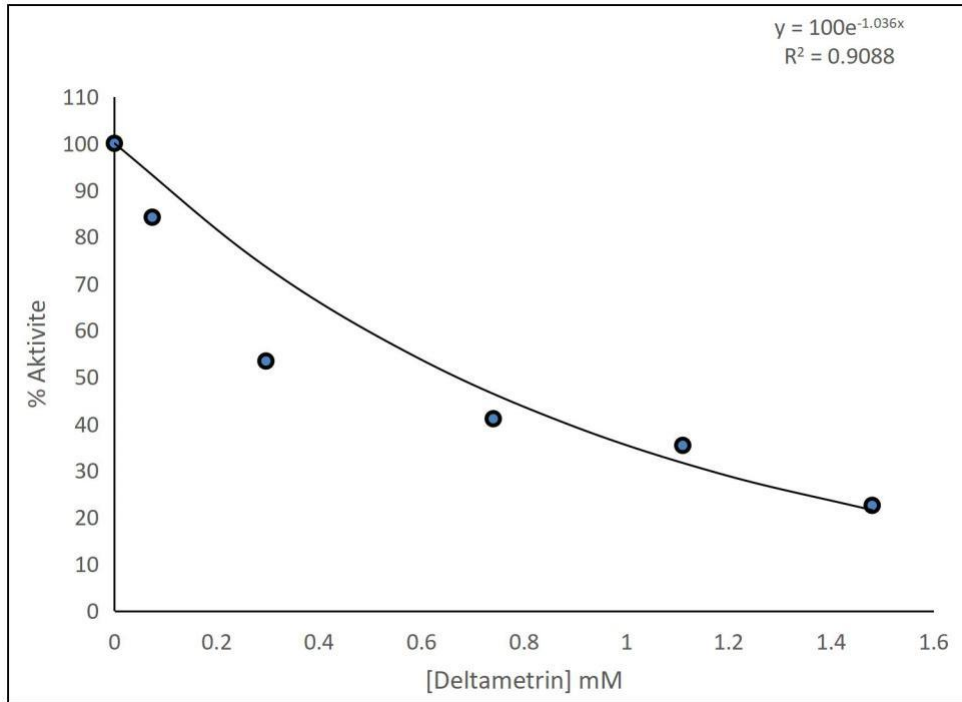
Saf su (μ L)	Fosfat tamponu (μ L)	CDNB (μ L)	GSH (μ L)	Enzim (μ L)	İnhibitör (μ L)	İnhibitör (mM)	Toplam hacim(μ L)
705	200	20	50	25	-	-	1000
703	200	20	50	25	2	0,060	1000
700	200	20	50	25	5	0,150	1000
697,5	200	20	50	25	7,5	0,225	1000
695	200	20	50	25	10	0,300	1000
685	200	20	50	25	20	0,600	1000

Tablo 4.13. Deltametrin için K_i sabitinin hesaplanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

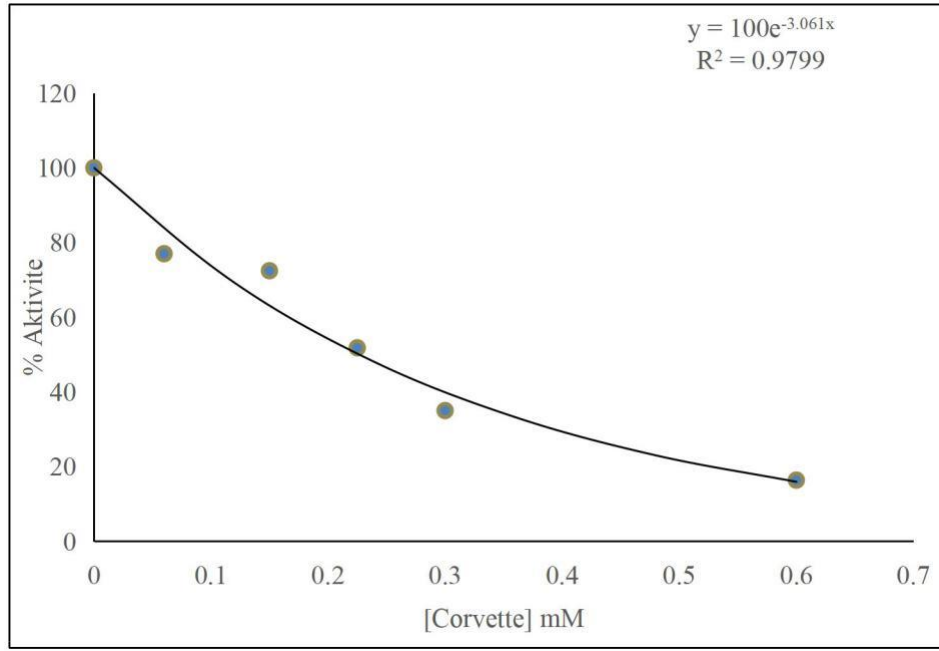
Fosfat tamponu (μ L)	CDNB (μ L)	GSH (μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	[CDNB] mM	[İnhibitör] mM	Toplam hacim (μ L)
200	10	20	25	745	0,25	-	1000
200	20	20	25	735	0,50	-	1000
200	40	20	25	715	1,00	-	1000
200	100	20	25	655	2,50	-	1000
200	200	20	25	555	5,00	-	1000
200	10	20	25	740	0,25	0,074	1000
200	20	20	25	730	0,50	0,074	1000
200	40	20	25	710	1,00	0,074	1000
200	100	20	25	655	2,50	0,074	1000
200	200	20	25	550	5,00	0,074	1000
200	10	20	25	725	0,25	0,296	1000
200	20	20	25	715	0,50	0,296	1000
200	40	20	25	695	1,00	0,296	1000
200	100	20	25	635	2,50	0,296	1000
200	200	20	25	535	5,00	0,296	1000
200	10	20	25	670	0,25	1,110	1000
200	20	20	25	660	0,50	1,110	1000
200	40	20	25	640	1,00	1,110	1000
200	100	20	25	580	2,50	1,110	1000
200	200	20	25	480	5,00	1,110	1000



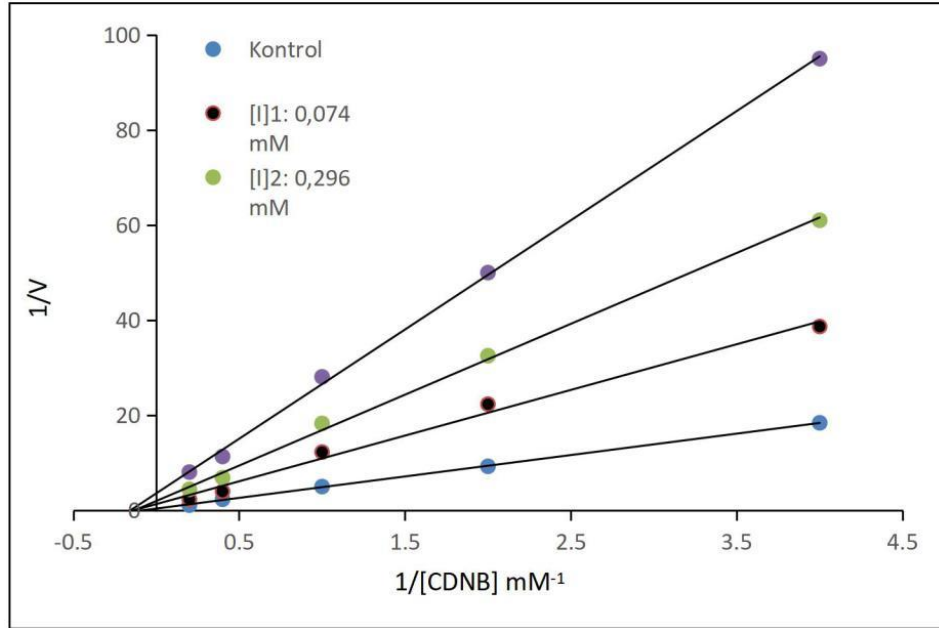
Şekil 4.13. Malathion WP için çizilen % Aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.14. Deltametrin için çizilen % Aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.15. Corvette için çizilen % Aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.16. Deltametrin için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.14. İnhibisyon çalışmalarında malathion WP, deltametrin ve corvette için elde edilen IC₅₀ değerleri ve deltametrin için bulunan K_i sabiti

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
Malathion WP	0,093	-	-
Deltametrin	0,669	0,0258±0,044	Yarışmasız
Corvette	0,226	-	-

4.2. Tartışma

Glutasyon S-Transferaz enzimleri özellikle faz-II detoksifikasyon enzimleri olarak görev yapmaktadır. Genelde fonksiyonlarını sitozolde gerçekleştirmekle beraber, elektrofilik substratların glutatyona konjugasyonu gibi fonksiyonlara da sahiptirler. Sitozolik memeli GST enzimleri karakterize edilmiş α , μ , π ve θ şeklinde sınıflandırılmıştır. Memeli olmayan canlılarda da birkaç yeni sınıflandırma yapılmıştır. Canlı organizmalar, beslenme esnasında çok sayıda kimyasal, ksenobiyotik, toksik ve kanserojen maddeye maruz kalır. Son yüzyılda çevreye atılan kimyasal maddeler sebebiyle bu tehdit daha da artmış vaziyettedir. Tüm bu tehditlere karşı canlıda yaratılmış olan sistemler otomatik olarak devreye girerek zararlı maddeleri bertaraf ederler. Tehditlerin bertaraf edilmemesi durumunda ise ciddi problemler ortaya çıkar. Metabolizmaya dâhil olmuş ksenobiyotiklerin bertaraf edilmesi için kullanılan maddelerin en önemlilerinden biri GSH molekülüdür. GSH, GST enzimleri katalizörlüğünde söz konusu maddelerle konjugat yaparak dönüşüm olmasını sağlar. Bu durum hidroperoksitlerin azalması ile sonuçlanır. GST enzimleri katalitik özellikleri yanında geniş ligand bağlama özelliklerine sahip enzimlerdir [1,2,3,4,5,6,7,9,10,12,4,3,14].

GST enziminin özellikleri göz önüne alındığında çok önemli bir metabolik enzim olduğu görülmektedir. Bundan dolayı bu tez kapsamında pestisitlere çokça maruz kalan bitkilerle beslenme durumundaki tavuk karaciğerinden GST enzimi saflaştırılarak bazı pestisitlerin enzim üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Saflaştırma çalışmaları boyunca numunelerdeki protein miktarının ölçülmesi çalışma için oldukça önemlidir. Protein tayinini Bradford metoduna göre yapıldı. Bu metodun

hassasiyetinin yüksek olması ve ortamdaki bozucu faktörlerden daha az etkilenmesi bakımından önemlidir [33].

Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’den görüldüğü gibi %0-20 ve %20-40 arasında yapılan çöktürme işleminde saflaştırmak istenen protein çoğunluğunun çökmediği görülmektedir. %40-60 aralığında çöken enzim miktarı artarken, çökme miktarının %60-80 aralığında maksimuma çıktığı görülmektedir. Bulunan bu aralıklar değerlendirilerek çöktürme aralığı %40-80 olarak kabul edildi. Bu çöktürme aralığı bıldırcın karaciğerinde %20-80 olarak bulunmuş ve yapılan bazı çalışmalarda ise amonyum sülfat çöktürmesi yapılmamıştır [2,3].

Literatür araştırmalarında GST enziminin birçok canlı dokudan bazı kromatografik yöntem kullanılarak saflaştırıldığı görülmektedir. Örneğin DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi [40], CM-selüloz G-75 afinite kromatografisi [41], bir başka çalışmada DEAE-sehajel ve glutatyon agaroz afinite kolonu [42] kullanılarak GST enzimi saflaştırılmıştır. Bu çalışmada ise saflaştırma süresinin kısa olması, verimin yüksek olması ve harcanan kimyasal maddelerin azlığı bakımından glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılmıştır. Tablo 4.3’ten görüldüğü gibi çalışmamızda 8,35 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip GST enzimi tavuk karaciğerinden %8 verimle 24,56 kat şeklinde saflaştırılmıştır. Benzer yöntemle söz konusu enzim (11344,83 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip) Van Gölü inci kefalı balığı solungaçlarından %82,25 verimle 1543,5 kat saflaştırılmıştır [2]. Bıldırcın karaciğeri ile yapılan başka bir çalışmada 15,86 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip GST enzimi %12,36 verimle 46,1 kat saflaştırılmıştır [2]. Çalışmamızda elde edilen spesifik aktivite, %verim ve saflaştırma katsayısı Zariç’in çalışmasına göre daha düşük iken Taysi’nin çalışma sonuçları ile benzerlik taşımaktadır.

Şekil 4.3’e bakıldığında enzimin 3. tüpten itibaren elüe edildiği görülmektedir. 3.tüpte kayda değer aktivitenin olmadığı ve enzim aktivitesinin en yüksek olduğu tüplerin 4.5.6.7. ve 8. tüpler olduğu görülmektedir. Dolayısıyla kinetik çalışmalarda 4.5.6.7. ve 8. tüpler birleştirilerek kullanıldı.

Şekil 4.4’ten görüldüğü gibi yapılan SDS-PAGE işleminden sonra elde edilen SDS-PAGE fotoğrafında 1.kuyuda tek bandın olması enzimin saf olarak elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca bu fotoğraftan yararlanılarak elde edilen ve Şekil 4.5’te gösterilen grafik yardımıyla

enzimin denatüre edici şartlarda edilen molekül kütlesi 30,9 kDa olarak bulundu. Literatür araştırmalarında bıldırcın karaciğeri için bu değer 25,1 kDa [3], E.coli GST enzimi için 22,5 kDa [43], sıçan karaciğeri GST enzimi için 26 kDa [44], kefal balığı karaciğeri için GST enzimi için 23 [45], yılan balığı karaciğeri GST enzimi için 22,3 [46], ve sığır beyni GST enzimi için ise 27 kDa [47] bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan molekül kütlesinin literatürde bulunan değerlere yakın değerde olduğu görülmektedir.

Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'dan görüldüğü gibi pH'sı 7,5 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl ve pH'sı 5,5 , 6,0 , 6,5 , 7,0 , 7,5 ve 8,0 olan K-fosfat tamponlarında enzim aktiviteleri ölçülerek grafik elde edildi (Şekil 4.6). Grafikten görüldüğü gibi en yüksek aktivite pH= 8,5'te Tris-HCl tamponunda elde edildi. Dolayısıyla optimum pH Tris-HCl tamponunda 8,5 olarak kabul edildi. Benzer sonuçlar bıldırcın karaciğerinde (pH= 8,5,Tris-HCl) [3], E. Coli için pH= 7,0 [43], albus balığı karaciğerinde 7,0- 7,5 [48], insan kan serumunda 5,5 [49], Van Gölü balığında 7,3 [2] olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5, Tablo 4.6, Şekil 4.7 ve 4.8'den görüldüğü gibi enzim için K-fosfat ve Tris-HCl tamponları ile yapılan stabil pH çalışmalarında maksimum aktivitenin 48 saat boyunca en iyi şekilde korunan pH'nın Tris-HCl tamponunda pH= 8,5'de elde edildiği görünmektedir. Dolayısıyla enzimin pH değeri 8,5 olarak kabul edildi. Benzer sonuçlar Van Gölü balığı solungacı GST enzimi için 8,0 [2], bıldırcın karaciğeri için 8,5 [3], gökkuşağı alabalık karaciğeri için 8,0 [50] olarak bulunmuştur.

Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi Tris-HCl tamponunun çeşitli derişimleri ile ölçülen aktivite ölçümlerine bakıldığında en yüksek aktivitenin 150 mM olduğu görülmektedir. Dolayısıyla optimum iyonik şiddet 150 mM olarak kabul edildi. Yapılan literatür taramasında bıldırcın karaciğerinde bu değer 1400 mM [3] ve Van Gölü balığında ise 120 mM [2] tespit edilmiştir. Bulduğumuz sonuç Van Gölü balığı optimum iyonik şiddet değerine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 4.7'den görüldüğü gibi optimum sıcaklığın bulunması için 0-90°C sıcaklık aralığında her 10°C'de bir enzim aktivitesi ölçülerek Şekil 4.10'da gösterildi. Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi en yüksek aktivite 70°C olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla optimum sıcaklık 70°C olarak kabul edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında; Van Gölü balığında 35°C [2], albus balığında 35°C [48], gökkuşağı alabalık eritrositlerinde

30°C [51], bıldırcın karaciğerinde 55°C [3], E. Coli için 50°C [43], insan kan serumunda 65°C [49] olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi bulduğumuz sıcaklık literatürde bulunanların tümünden daha yüksek bir değere sahiptir. Bu durum amino asit sıralaması ve bulunduğu ortamla ilgili olduğundan canlıdan canlıya ve dokudan dokuya değişiklik göstermesi normaldir.

Bir enzimin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması son derece önemlidir. Şekil 4.11 ve 4.12 'de görüldüğü gibi enzimin substratları olan CDNB ve GSH için 5 farklı substrat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve bu grafikler yardımıyla her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri bulundu (Şekil 4.11, Şekil 4.12 Tablo 4.9, Tablo 4.10). CDNB ve GSH için elde edilen K_M sabitleri sırasıyla 3,6 ve 0,802 mM, V_{max} değerleri ise sırasıyla 2,829 ve 1,833 EÜ/mL'dir. Bu sonuçlara göre K_M sabiti daha düşük olan GSH substratının CDNB substratına göre enzime olan ilgisinin daha büyük olduğu söylenebilir. Yapılan literatür taramasında bıldırcın karaciğeri için GSH ve CDNB substratlarında K_M değerleri sırasıyla 0,114 ve 0,672 mM ; V_{max} değeri de sırasıyla 0,048 ve 0,047 EÜ/mL [3], albus balığı karaciğeri için K_M değerleri sırasıyla 0,35 ve 0,42 mM [52], insan kan serumu için GSH ve CDNB için K_M değerleri sırasıyla 4,11 ve 2,8 mM [49], Van Gölü balığı solungacı için K_M sabitleri 0,59 ve 1,057 mM [2], Tilapya balığı solungacı için K_M değerleri sırasıyla 0,5 ve 0,42 mM [52], gökkuşağı alabalığı eritrositleri için sırasıyla 0,0395 ve 0,259 mM [51], olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız literatürle karşılaştırıldığında genelde benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür.

Tez kapsamında ayrıca malathion WP, deltametrin ve corvette pestisitleri için inhibisyon çalışmaları yapıldı. Çalışmalar sonucunda pestisitlerin üçünün de enzim üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edildi. Pestisitler için %Aktivite- [I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı ve Tablo 4.17'de gösterildi. Tablo 4.17' de görüldüğü gibi malathion WP, deltametrin ve corvette için elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 0,093, 0,669 ve 0,226 mM dır. Bu sonuçlara göre en düşük IC_{50} değerinin corvette pestisitine ait olduğu ve dolayısıyla en etkin inhibitörün corvette olduğu söylenebilir. Yapılan literatür taramasında Van Gölü balığı solungacı GST enzimi üzerine okzamil (IC_{50} = 0,092 mM), dinikonazol (IC_{50} = 1,604 mM), carbofuran (IC_{50} = 0,041 mM), tebukonazol (IC_{50} = 0,056 mM) ve atrozin (IC_{50} = 0,075 mM) pestisitlerinin etkilerinin araştırıldığı ve IC_{50} değerlerinin bulunduğu görünmektedir [2]. Ancak literatür araştırmamızda bu tez

kapsamında çalışılan pestisitlerin GST üzerine etkisi ilgili ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. İlaveten deltametrin için 3 farklı inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek (Şekil 4.16 ve Tablo 4.13) K_i sabiti $0,0258 \pm 0,04$ mM olarak bulundu ve ayrıca inhibisyon tipinin yarışmasız olduğu görüldü. Malathion WP ve corvette pestisitleri 2 etken madde içerdikleri için bu pestisitler için K_i sabitlerine yönelik çalışmalar yapılmadı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimlerin metabolizmadaki fonksiyonlarının hayati bir önem taşıdığı ve bir enzim defektinin bile büyük sağlık problemlerine sebep olduğu bilinmektedir. Giriş bölümünde genişçe izah edildiği gibi metabolizma için son derece önemli olan enzimlerden biri de GST enzimidir. GST enzimi metabolizmada detoksifikasyon işlemlerinin önemli basamaklarında fonksiyon görmektedir. Bu tez kapsamında GST enzimi tavuk karaciğer dokusundan afinite kromatografisi ile saflaştırılarak karakterize edilmiş ve bazı pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. %8 verimle 24,56 kat saflaştırılan ve 8,35 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip GST enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik çalışmalar esnasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda (Tablo 5.1) gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Sonuçlarla ilgili sayısal değerler

Çalışılan Özellik	Sayısal Değer
Amonyum sülfat çökme aralığı	%40-100
Alt birim molekül ağırlık	30,9 kDa
Optimum pH	8,5 Tris-HCl
Stabil pH	8,5 Tris-HCl
Optimum İyonik Şiddet	150 mM
Optimum Sıcaklık	70 °C
GSH K _M	0,802 mM
GSH V _{max}	1,833 EÜ/mL
CDNB K _M	3,600 mM
CDNB V _{max}	2,829 EÜ/mL
IC ₅₀ malathion WP	0,093 mM
IC ₅₀ Deltametrin	0,669 mM
IC ₅₀ corvette	0,226 mM
Ki deltametrin	0,258±0,044 mM

Metabolizmanın antioksidan mekanizmasının kilit enzimi olan ve vücut savunmasında önemli katkısı bulunan GST enziminin, ilk kez tavuk karaciğerinden saflaştırılıp pestisitlerin ilgili enzim üzerinde etkilerinin incelenmesi açısından özgün bir çalışma olması, bilim camiası, tavuk yetiştiricileri ve tüketiciler için yol gösterici ve yararlı bir çalışma hedefini gerçekleştirmektedir. Ancak daha önemli sonuçların elde edilebilmesi için bu konuda *in vivo* çalışmaların yapılmasında fayda bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York; 2004.
- [2] Zariç Y. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü İnci Kefali Balığı (*chalcalburnus Tarichi*) Solungacından Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Metal Ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağrı; 2018.
- [3] Taysi MŞ. Glutasyon S-transferaz (GST) enziminin japon bıldırcın (*Coturnix coturnix japonica*) karaciğerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl; 2018.
- [4] Gözükar ME. Biyokimya, Nobel Matbaacılık, İstanbul; 2011.
- [5] Keha E, Küfrevioğlu Öİ. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum; 2009.
- [6] Dawn B, Marks Allan D, Mark, Colleen M, Smith. Basic Medical Biochemistry a clinical approach. A Wawely Company; 1996.
- [7] Nobel Lecture, James Eat the right time? from The Nobel Lecture (1974) G.E. Palade act[ing] as the overseers” - Nobel Lecture; 1907.
- [8] Koolman J, Klaus-Henrich R, Jürgen W. Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara; 2003.
- [9] Devlin TM. Biochemistry with Clinical Correlations, Kanada; 2002.
- [10] Onat T. Eritrosit Biyokimyasi. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya, Saray medikal yayıncılık, İzmir; 1996.
- [11] Söyüt H. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi) Erzurum; 2006.
- [12] Açı L. Koyun beyini glutasyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi) Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara; 1990.
- [13] Kosower EM. Chemical properties of glutathione. In Glutathione metabolism and function, ed. Irwin M, Arias and William B Jakoky, Raven Press, New York; 1976.

- [14] Drog F. Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.*, 1997; 16: 95-107.
- [15] Liebman JF and Greenberg A. Mechanistic principles of enzyme activity VCH Publishers, New York; 1988.
- [16] Schröder P. The role of glutathione and glutathione s- transferses in plant reaction and adaption to xenobiotics. Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment *Plant Ecophysiology*, 2001; 2: 155-183.
- [17] Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem.*, 2008; 107: 690-700.
- [18] Husak VV, Mosiichuk NM, Maksymiv IV, Storey J.M, Storey KB, Lushchak VI. Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016; 45: 163-169.
- [19] Zhang JF, Liu H, Sun YY, Wang XR, Wu JC, Xue, YQ. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-Dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005; 19: 185-190.
- [20] Autrup H. Genetic polymorphism in human xenobiotica matebolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research*, 2000; 464: 65-76.
- [21] Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.*, 2003; 349: 474-485.
- [22] Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalianmembers of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.*, 2001; 360, 1-16.
- [23] Özaslan MS, Demir Y, Küfrevioğlu O I, Çiftci M. Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Va Lake fish gills *J Biochem Mol Toxicol*, 2017; 73: e21967.
- [24] Espinoza HM, CR Williams and EP Gallagher. Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in Coho Salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquatic Toxicology*, 2012; 110-111: 37-44.
- [25] Aksoy AS. Bazı flavonoidlerin sığır karaciğer glutatyon stransferaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir; 2018.
- [26] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005; 45, 51-88.
- [27] Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001;10, 141-152.

- [28] Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 1997; 10 (1): 2-18.
- [29] Baş O. Dinitrocresol'ün (Rat rattus norvegicus) Sıçan glutatyon S-transferaz enzim aktivitesine etkisi (Yüksek Lisans Tezi) Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa; 2006.
- [30] Fleischner GK, Kamisaka IM, Arias IM. Immunoloanalysis of rats and human ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function*, 1976; 229-235.
- [31] <https://bku.tarimorman.gov.tr/BKURuhsat/Details/3968>.
- [32] Segel IH. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York; 1968.
- [33] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-251.
- [34] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S- transferases. The first enzymmatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, 1974; 246: 7130-7139.
- [35] Ahmed B. M, Temel Y, Çiftçi M. Purification and characterization glutathione S transferase enzyme from quail (*Coturnix, coturnix japonica*) heart and investigation the effect of some metal ions on enzyme activity. *Cumhuriyet Science Journal*, 2019; 40-4, 802-812.
- [36] Toribio F, Martinez-Lara E, Pascual P, Lopez-Barea J. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. *Journal of Chromatography B*, 1996; 684: 77-97.
- [37] Güvercin S, Erat M, Şakiroğlu H. Determination of some kinetic and characteristic properties of glutathione s-transferase from bovine erythrocytes. *Protein & Peptide Letters*, 2008; 15 (1): 6-12.
- [38] Laemmli DK, Lajmanovich RC, Andre's M, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227, 680-685.
- [39] Lineweaver H, and Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc.*, 1934; 56 (3): 658-666.
- [40] Awasthi YC, Dao DD, Saneto RP. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem J.*, 1980; 191, 1-10
- [41] Loscalzo J, Freedman J. Purification and characterization of human platelet glutathione-S transferase. *Blood*, 1986; 67, 1595-1599.
- [42] Arca P, Garcida P, Hardisson C, Suarez JE. Purification and study of a bacteril glutathione S- transferase Area de Microbiologia, Faaultad de Medicina, 1990; 1, 77-79.

- [43] Iizuka M, Inoue Y, Murata K, Kimura A Purification and some properties of glutathione S-transferase from escherichia coli B. *Journal of Bacteriology*, 1989; 6039-6042.
- [44] Hiratsuka A, Sebata N, Kawashima K, Okuda H, Ogura K, Watabe T, Satoh K, Hatayama I, Tsuchida S, Ann Ishikawa TA. New class of rat glutathione S-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990; 15, 265 (20): 11973-11981.
- [45] Barcena JAE, Martinez-Lara SG, George J, Lopez-Barea. Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver. *53 CMLS.*, 1997; 759-768.
- [46] Novoa-Valinas MC, Perez-Lopez M, Melgar MJ. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic glutathione S-transferase from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo solar*) and Brown trout (*Salmo Trutta*) *Comparative Biochemistry and physiology, part C*, 2002; 131, 207-213.
- [47] Young PR, and Briedis AV. Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. *Biochem J.*, 1989; 257, 541-548.
- [48] Huang Q, Liang L, Wei T, Zhang D, Zeng QY. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2008; 147, 96-100.
- [49] Türkanoglu A. Human serum arylesterase and glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University, Ankara; 2007.
- [50] Tekman B, Ozdemir H, Senturk M, Ciftci M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2008; 148, 117-121.
- [51] Çomaklı V, Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ. Gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden glutatyon S-transferas enziminin saflaştırılması ve bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. *Hacettepe J. Biol. & Chem*, 2011; 39 (4): 413-419.
- [52] Hamed RR, Maharem TM and Guinidi RAM. Glutathione and its related enzymes in the Nile fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2004; 30 (3-4): 189-199.