



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**FAZ II GRUBUNDAN OLAN VE BİYOMARKÖR
OLARAK KULLANILAN *LIZA SALIENS*
GLUTATYON S-TRANSFERAZLARININ
DOKU DAĞILIMI VE KARAKTERİZASYONU**

PROJE NO : TBAG-2058 (101T064)

2004-281

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

**FAZ II GRUBUNDAN OLAN VE BİYOMARKÖR
OLARAK KULLANILAN *LIZA SALIENS*
GLUTATYON S-TRANSFERAZLARININ
DOKU DAĞILIMI VE KARAKTERİZASYONU**

PROJE NO : TBAG-2058 (101T064)

2004-281

**DOÇ. DR. ALAATTİN ŞEN
PROF. DR ORHAN ADALI
ARAŞ. GÖR ASLI KIRIKBAKAN**

**OCAK 2004
DENİZLİ**

İÇİNDEKİLER

1. ÖZ	4
2. ABSTRACT.....	5
3. ÖNSÖZ	6
4. GİRİŞ.....	6
5. BİLİMSEL GELİŞMELER VE SONUÇLAR	9
5.1. MATERYAL	9
5.2. BALIK VE DOKULAR	10
5.3. PROSEDÜR.....	10
5.3.1. Dokuların Sitolitik Fraksiyonlarının Hazırlanması	10
5.3.2. Protein Miktarı Tayini.....	11
5.3.3. GST- 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesinin Tayini	11
5.3.4. GST-CDNB Aktivitesinin Karakterizasyonu	12
5.3.5. GST-Etakrinik Asit Aktivitesinin (EA) Tayini.....	13
5.4. SONUÇLAR.....	14
6. DEĞERLENDİRMELER.....	28
7. ÖNERİLER.....	29
8. REFERANSLAR	30
9. PROJE ÖZET BİLDİRİ FORMU	32

TABLO DİZİNİ

TABLO 1. TİPİK GST-CDBN AKTİVİTE ÖLÇÜM KARIŞIMININ İÇERİĞİ	12
TABLO 2 TİPİK GST-EA AKTİVİTE ÖLÇÜM KARIŞIMININ İÇERİĞİ.	14
TABLO 3 . PASAPORT BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN FARKLI ÖRNEKLERDEKİ SİTOZOLİK GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİ.....	15
TABLO 4 GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNİN DOĞAL <i>LIZA SALIENS</i> KARACIĞER HÜCRE İÇİ (SUBSELLÜLER) FRAKSİYONLARDAKİ DAĞILIMI	16

ŞEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 1. <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNİN ZAMAN İLE DEĞİŞİMİ	17
ŞEKİL 2. PROTEİN MİKTARININ <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNE ETKİSİ	19
ŞEKİL 3. SUBSTRAT KONSANTRASYONLARININ <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ.....	20
ŞEKİL 4. <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNİN PH İLE DEĞİŞİMİ.....	21
ŞEKİL 5. <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNİN REAKSİYON SICAKLIĞI İLE DEĞİŞİMİ	22
ŞEKİL 6. ÇEŞİTLİ METALLERİN <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ	23
ŞEKİL 7. ÇEŞİTLİ DETERJANLARIN <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ.....	24
ŞEKİL 8. <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİNİN DOKU DAĞILIMLARI	25
ŞEKİL 9. İZMİR KÖRFEZİ ETRAFINDA <i>LIZA SALIENS</i> TOPLAMA İSTASYONLARI.....	26
ŞEKİL 10. TOPLAMA İSTASYONLARINDA AVLANAN <i>LIZA SALIENS</i> GST-CDNB VE GST-EA AKTİVİTELERİ.....	27

1. ÖZ

Bu çalışmada, kefal (*Liza saliens*) sitozolik glutatyon S-transferazları (GST) çalışılmış ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve etakrinik asit (EA) substratları kullanılarak karakterize edilmiştir. CDNB ve EA substratlarına karşı ortalama GST aktivitesi sırası ile 1365 ± 41 ve 140 ± 20 nmol/dak/mg protein olarak bulunmuştur. Sitozolik protein miktarının ve 4 - 70°C arasındaki sıcaklık değerlerinin enzim aktivitelere etkisi çalışılmıştır. CDNB ve EA'ya karşılık her iki aktivitede protein miktarına benzer şekilde bağımlılık görülürken, optimum sıcaklık sırası ile 37°C ve 42°C olarak bulunmuştur. Ek olarak pH'nın GST-CDNB ve -EA aktivitelere etkisi çalışılmış ve farklı pH aktivite profilleri gözlenmiştir. Her iki substrat için Michaelis-Menten Kinetiğine uyan V_{max} and K_m değerleri sırası ile 1661 nmol/dak/mg protein ve 0.24 mM ve 157 nmol/dak/mg protein ve 0.056 mM olarak bulunmuştur. *Liza saliens*'te GST'lerin dağılımı çalışılmış ve diğer balık türleri ile kıyaslanmıştır. *Liza saliens*'te oldukça yüksek aktivite karaciğer, böbrek, testis, bağırsak ve solungaçlar dokularında ölçülmüştür. Dahası, sonuçlarımız bize *Liza saliens*'ten elde edilen GST aktivitesinin sucul kirlilik için biyomarkör olarak çok yararlı olduğunu göstermektedir.

2. ABSTRACT

In this study, feral Leaping mullet (*Liza saliens*) liver cytosolic glutathione S-transferases (GSTs) were investigated and characterized using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and ethacrynic acid (EA) as substrates. The average GST activities towards CDNB and EA were found as 1365 ± 41 and 140 ± 20 nmol/min/mg protein, respectively. Effect of cytosolic protein amount and temperature ranging from 4 to 70°C on enzyme activities were examined. While both activities towards CDNB and EA showed similar dependence on protein amount, temperature optima were found as 37°C and 42°C, respectively. In addition, effect of pH on GST-CDNB and -EA activities were studied and different pH activity profiles were observed. For both substrates GST activities were found to obey Michaelis-Menten Kinetics with apparent V_{max} and K_m values of 1661 nmol/min/mg protein and 0.24 mM and 157 nmol/min/mg protein and 0.056 mM for CDNB and EA, respectively. Distribution of GSTs in *Liza saliens* tissues were investigated and compared with other fish species. Very high GST activities were measured in tissues from *Liza saliens* such as liver, kidney, testis, proximal intestine and gills. Moreover, our results suggested that GST activities from *Liza saliens* would be a valuable biomarker for aquatic pollution.

3. ÖNSÖZ

Sanayi ve endüstrideki gelişmelere paralel olarak sürekli artan miktarlarda toksik kimyasallara maruz kalan canlıların, bu toksik maddelerin etkilerini gidermede önemli bir sistem olan detoksifikasyon mekanizmasında rol alan enzimler Faz I ve Faz II enzimleri olarak gruplandırılmaktadır. Günümüzde hergün yeni bir ilacın üretilmesi ve bir çok kimyasal maddenin gıdalar dahil bir çok alanda kullanılması sonucu insanların bu maddelere maruz kalması; bu maddelerin vücutta nasıl metabolize edildiğini aydınlatıcı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Faz II enzimlerinden olan Glutatyon S-transferazlar (GST) ilaçlar gibi vücuda alınan ekzojen ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda primer metabolik yolağı olarak çok önem arz etmektedirler. Bu çalışmada, GST'lar balık (*Liza saliens*) dokularından 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve etakrinik asit (EA) substratları kullanılarak karşılaştırmalı karakterizasyonları gerçekleştirilecektir. Ayrıca, *Liza saliens* GST enzimlerinin çevre kirliliğı için biyomarkör önemi araştırıldı. Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Temel Bilimler Araştırma Grubunca TBAG-2058 (101T064) nolu araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

4. GİRİŞ

Ekosistemdeki bütün organizmalar sürekli olarak kimyasal yapısı organik veya anorganik olabilen toksik kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Çünkü modern dünyada ekzojen kimyasallara maruz kalmak kaçınılmazdır (Dawe, 1990). Toksik maddelerin artışına bağılı olarak, organizmalar bu maddeler (ksenobiyotik) ile mücadele edebilmek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu koruyucu mekanizmalar arasında, ksenobiyotik atım sistemleri, ksenobiyotik hidrolizi, ksenobiyotik metabolizması ve ksenobiyotik hedeflerinin onarımı bulunur (Guengerich, 1993; Mulder ve diğ., 1990; Hodgson ve Deuterman, 1982). Çeşitli kimyasalların etkilerini bertaraf eden bu mekanizmalardan "detoksifikasyon" olarak bilinen ve özellikle karaciğer tarafından gerçekleştirilen ilaç metabolizması özel bir öneme sahiptir. Karaciğer dışında detoksifikasyonun lokalize olduğu dokular arasında akciğer, böbrek, sindirim sistemi ve deri bulunur (Arınç, 1980; Adalı ve Arınç, 1990; Arınç ve İşcan, 1983; Hussey ve Hayes, 1993).

Ksenobiyotiklerin eliminasyonu, bu bileşiklerin biotransformasyon sonucu suda çözünebilir bileşiklere dönüştürülmesine bağlıdır (Heidelberger, 1975; Waterman ve diğ., 1986; Cooper ve diğ., 1965). Bio-transformasyonun sonucunda, absorpsiyonu kolay olan lipofilik bileşikler; absorpsiyonu zor, boşaltımı kolay olan hidrofilik bileşiklere dönüştürülür (Conney ve Burns, 1972; Williams, 1967). Biotransformasyon, “ilaçları metabolize eden enzimler” adı verilen enzim grubunun aktiviteleri sonucunda gerçekleşir. Bu enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlar, genellikle Faz-I ve Faz-II olarak adlandırılan iki alt gruba ayrılırlar (Schenkman, 1999). Faz-I reaksiyonları, -OH, -NH₂, -SH veya -COOH gibi, ksenobiyotiğin polaritesini artıran bir fonksiyonel grubun ilavesi ile sonuçlanır (Schenkman, 1991). Oluşan bu gruplar, Faz-II reaksiyonları için gerekli merkezlerin oluşumunu sağlar. Kenetlenme reaksiyonları olan Faz-II reaksiyonlarında ksenobiyotik ve onun herhangi metabolitleri, vücutta bulunan polar moleküller ile kenetlenir. Faz-II reaksiyonları başlıca glutatyon S-transferazlar, asetil transferazlar, glukuronil transferazlar ve sülfö transferazlar tarafından katalize edilir.

Faz-II detoksifikasyon enzim ailesinden olan Glutatyon S-Transferazlar (GST'ler) (E.C.2.5.1.18) çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu katalize eder. Bu bileşiklerin kimyasal yapısı organik ya da anorganik olabilir. Bu kataliz reaksiyonlarında GST'ler, elektrofilik substratlar üzerine glutatyon tripeptidin (γ -glutamilsistil glisin) nükleofilik atağını kataliz eder (Hayes ve Pulford, 1995; Armstrong, 1997; Jakoby ve Habig, 1980). Böylece GST'ler, dışarıdan alınan toksik yabancı maddelerin veya oksidatif basamakta oluşan ürünlerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar. Bu anlamda GST'ler, vücut için hayati koruyuculuk fonksiyonunu üstlenmiş olan enzim gruplarından birisidir. GST'ler, olağanüstü geniş substrat spektrumuna sahiptirler. GST'ler, konjugasyon oluşumunu kataliz etmelerinin yanı sıra peroksidaz veya izomeraz aktiviteleri de gösterirler ve çok çeşitli kimyasallara kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanabilirler (Mannervik ve Danielson, 1988). Bu şekilde bu metabolitlerin, makromoleküller ile olası etkileşimlerinin önlenmesi ile, ekzojen ve endojen olarak tanımlanan elektrofilik intermediyer bileşiklere karşı vücudun çok önemli savunma sistemlerinden birini oluştururlar (Jakoby ve Habig, 1980).

Son zamanlarda çeşitli patolojik ve çevresel faktörlerin bu izozimlerin ekspresyonunu etkilediğinin gösterilmesi bu ilgiyi daha da artırmıştır. Buna bağlı olarak, tümör markörleri olarak GST'lerin kullanımının mümkün olduğu önerilmiştir (Sato ve diğ., 1985; Tsuchida ve Sato, 1992; Kato ve diğ., 1995). Çok değişik türlerde, GST izozimlerinin varlığı, farklı substrat spesifikliğı ile tayin edilmektedir. GST izozimleri, hemen hemen tüm dokularda bulunmaktadır. İnhibitörler, antiseralar ve çeşitli substratlar kullanılarak elde edilen veriler ile sıçan, fare, insan gibi memelilerde sitozolik GST'lerin Latin alfabesine göre, Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta ve Zeta olarak 6 sınıfta gruplandırılmışlardır (Board ve diğ., 1997).

Balıklarda monooksijenazlar ve glutatyon S-transferazlar gibi biyotransformasyon enzimlerinin çalışılması evrimsel, ekolojik ve toksikolojik bakımdan önemlidir çünkü bugün bilinen 21.000 farklı balık türü bulunmaktadır ki bu sayı omurgalı türlerin toplamından fazladır (Moyle ve Cech, 1988). Ayrıca, balıklar insanlar için doğrudan besin kaynağıdır. Çeşitli sucul organizmalarda bu biyotransformasyon enzimlerinin karakterizasyon çalışmaları artmaktadır, çünkü bunlar kimyasal kirlilik için etkili birer biyomarkör olarak kabul edilmektedirler (Gallegher ve Eaton, 1995; Peticivsky ve diğ., 1997; Arıç ve diğ., 2000; Gadugbui ve James; 2000; Melgar-Riol ve diğ., 2001; Novoa-Valinas ve diğ., 2002).

GST izozimleri sergiledikleri farklı substrat spesifikliğı sayesinde farklı savunma görevlerinde yer alırlar (Mannervik ve Danielson, 1988). Bu enzimler, balıklar ve diğer deniz canlılarında ksenobiyotiklerin büyük bir çeşidinin detoksifikasyonuna katılırlar. Hepatik GST'lerin çeşitli izoformları saflaştırılmış ve farklı balık türlerinde kısmen karakterize edilmiştir (Lauren ve diğ., 1989; Perdu-Durand ve Cravedi, 1989; Gallegher ve Di Giulio, 1992; Al-Ghais, 1997). Bu enzimler ana olarak balıkların karaciğerlerinde bulunmasına rağmen çeşitli balıkların solungaç, böbrek, ve bağırsaklarında aktiviteleri gösterilmiştir (Gallegher ve Di Giulio, 1992; Al-Ghais, 1997; Perez-Lopez ve diğ., 2000). GST izozimleri aynı türün çeşitli dokularında ve farklı türlerin dokularında çeşitli miktarlarda bulunur. GST izozimlerinin farklı organlardaki farklı düzeydeki ekspresyonları araştırmacılar tarafından bu dokuların ksenobiyotiklerin toksik etkilerine karşı hassasiyetleri hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılmaktadır (Raza ve diğ., 1997). Birçok türde GST ekspresyon seviyeleri yabancı bileşiklere maruz kalma ile kimyasal

strese karşı adaptif bir tepki olarak kayda değer bir şekilde artış göstermekte ve bu artışlar sucul kontaminasyonun etkili biyomarkörü olarak kullanılabilir (Hayes ve Pulford, 1995).

Bu çalışmada, ilk olarak GST aktivitesi kefal (*Liza saliens*) karaciğer sitozolik fraksiyonlarında 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve etakrinik asit (EA) substratları kullanılarak karakterize edildi. Ek olarak, bu aktivitelerin *L. saliens*'in çeşitli dokularında ve İzmir Körfezinin çeşitli bölgelerinden yakalanan balıklardaki dağılımını incelendi.

5. BİLİMSEL GELİŞMELER VE SONUÇLAR

5.1. Materyal

ϵ -Amino kaproik asit (ϵ -ACA; A-2504), sığır serum albumin (BSA; A-7906), bütilehidroksitoluen (BHT; B-1378), 3-[(3-cholamidopropyl)dimetilamino]-1-propan sülfat (CHAPS; C-3023), kolik asit (C-1254), deoksikolik asit (D-6750), etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA; E-5134), etakrinik asit (EA; E-4754), Folin reaktifi (F-9252), glutatyon, indirgenmiş formu (GSH; G-6013), glisin (G-7126), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; C-6396), Brij 35 (P-1254), fenilmetan sülfonil florid (PMSF; P-7626), sodyum potasyum tartarat (S-2377), Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA)'den elde edilmiştir. Alüminyum klorür (06230), antimon (III) klorür (10774), asetik asit (27225), bakır (II) klorür (12826), bakır sülfat pentahidrat (61240), baryum klorür monohidrat (11750), civa (II) klorür (83355), coomassie pırlanta mavisi R-250 (27816), çinko klorür (96468), gliserin (15524), kadmiyum klorür monohidrat (11709), kobalt (II) klorür hegzahidrat (17739), lityum klorür (73036), magnezyum (II) klorür hegzahidrat (63068), metanol (34860), potasyum klorür (60129), sezyum klorür (20968), sodyum karbonat (31432), sodyum klorür (13423), tris (33742Fluka Chemie (GmbH Industriestrasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'den elde edilmiştir. potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873), sodyum dodesil sülfat (SDS; 13460), triton X-100 (11869) E. Merck (Darmstadt, Germany)'ten satın alınmıştır. Diğer kullanılan bütün kimyasal ve reaktifler ticari olarak mümkün olan en yüksek analitik saflıktadır.

5.2. Balık ve Dokular

Çalışmada kullanılan kefal balıkları (*Liza saliens*) Ege Denizi'nde İç Körfez'de Pasaport mevkiinde ve Dış Körfez'de Yeni Foça, Mordoğan ve daha dış noktada Çeşme-Ildırı koyunda balık ağı ile canlı olarak yakalandı. Yakalama alanı kıyı şeridinde oldukça yakın olmakla birlikte (karadan yaklaşık 10-20 m uzaklıkta), bölge tarımsal ve endüstriyel atıkların merkezi konumundadır. Yakalanan balıklar yaklaşık olarak 300-600 g ağırlığındaydı.

5.3. Prosedür

5.3.1. Dokuların Sitolik Fraksiyonlarının Hazırlanması

Çalışma alanından canlı olarak yakalanan kefal balıkları buz üstünde başları vurularak öldürüldü. Dokular (bağırsak, beyin, böbrek, dalak, kalp, karaciğer, kas, mide, solungaç, üreme organları) canlı olarak balıklardan dissekte edildi. İçeriğinin monooksijenaz aktivitesi için inhibitör olduğu bilinen safra keseleri karaciğerlerden dikkatlice uzaklaştırıldı. Dokular ilk olarak buz üstüne alındı ve önce soğuk distile su daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırıldı. Mide ve bağırsak dokuları soğutulmuş fizyolojik serum ile steril şırıngalar kullanılarak temizlendi. Dokular önce steril buzdolabı poşetlerine kondu ve daha sonra da alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek sıvı azotta donduruldu. Taze dondurulmuş dokular sıvı azot içerisinde çalışma alanından Denizli'deki üniversite laboratuvarına getirildi.

Laboratuvarda, dokular sıvı azottan çıkarıldı ve buz üstüne alındı. Filtre kağıdı üzerinde kurulandıktan sonra dokular hızla tartıldı. Bundan sonraki bütün işlemler 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Makas ile küçük parçalara ayrıldı. Kesilen dokulara 2 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM ϵ -ACA, 0.15 mM BHT, %0.05 Kolat ve %10 Gliserin içeren %1.15'lik KCl çözeltisi içinde buz içine oturtulmuş olan Patter-Elvehjem teflon cam homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan dokunun yaklaşık 3 katı kadar homojenizasyon çözeltisi eklendi. Teflon çubuk cam tüp içinde 15 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap kullanılarak yapıldı (Black & Decker, V2600). Homojenat, daha sonra post mitokondriyal fraksiyon elde etmek için Sigma

3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (12156 rotor, PO Box 1713, D-37507 Germany) kullanılarak 10500 rpm (13300 xg) de 40 dakika santrifüj edildi. Supernatant çift katlı steril salgi bezinden süzülerek çökelekten ayrıştırıldı ve Sorwall Ultrasantrifüj (T880 rotor, Dupont Company, Wilmington, DE 19898 USA) kullanılarak 45000 rpm (145215 xg) de 60 dakika santrifüj edildi. Sıvı sitozol kısmı tüplerden alınıp, içlerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde soğuk gliserin ilave edildi ve eppendorf tüplere eşit hacimlerde konuldu ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı azota atıldı.

5.3.2. Protein Miktarı Tayini

Kefal balığı dokularından elde edilen post mitokondriyal (S9), sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albümini) standart olarak kullanılarak Lowry ve diğ., (1951)'nin metoduyla yapıldı.

5.3.3. GST- 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) Aktivitesinin Tayini

Hazırlanan kefal S9 ve sitozollerinde GST aktivitesi CDNB substratı kullanılarak Habig ve diğ., (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. Habig metodu, GST tarafından CDNB ile GSH konjugasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutatyon kompleksinin ışığı 340 nm'de absorpsuyonuna dayanmaktadır. Aşağıdaki tablo da verildiği üzere tipik reaksiyon ortamı son 1 ml hacimde 100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.5, 1 mM glutatyon redükte formu (GSH), 25 µg sitozolik ve/veya S9 protein ve 1 mM KDNB içermektedir.

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 1'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, tek kullanımlık spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son CDNB ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn.lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi UV-VIS Analytic Jena Specord 200 model Spektrofotometre de 340 nm'de 1 dakika takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimlerinin $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olan molar absorblama katsayısına bölünmesi ile hesaplandı.

Tablo 1. Tipik GST-CDBN Aktivite Ölçüm Karışımının İçeriği

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
400 mM KPi Tamponu, pH 7.5	0.25	100 mM
50 mM GSH	0.02	1 mM
20 mM KDNB	0.05	1 mM
Sitozol veya S9 (1 mg/ml)	0.025	25 µg
Distile su	0.655	-
Toplam Hacim	1	-

5.3.4. GST-CDBN Aktivitesinin Karakterizasyonu

Kefal balık dokularında enzim aktivitesinin protein miktarı, pH, sıcaklık, zaman ve substrat (CDBN) miktarı ile değişimi incelendi ve optimum değerler tespit edildi.

5.3.4.1. GST-CDBN Aktivitesi Üzerine Protein Miktarı Etkisi

Tablo 1'de verilen reaksiyon karışımı 5, 12.5, 25, 37.5, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ve 400 µg olarak farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve kefal balık dokusu sitozollerinde GST aktivitesinin protein miktarı ile bağıntısı tespit edildi.

5.3.4.2. GST-CDBN Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Tablo 1'de verilen reaksiyon karışımı 3 farklı tampon sistemi kullanılarak inkübe edildi. pH 4-5.5 arasında sodyum asetat tamponu, pH 6.25-8.5 arasında potasyum fosfat tamponu ve pH 9.0-11.5 arasında NaOH-glisin tamponu kullanıldı ve 340 nm'deki absorbans farkı ölçülerek pH'nın kefal balığı GST aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi.

5.3.4.3. GST-CDBN Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Tablo 1'de verilen reaksiyon karışımı 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 42°C, 50°C, 60°C ve 70°C gibi dokuz farklı sıcaklıkta gerçekleştirilerek kefal balığı GST aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi tespit edildi.

5.3.4.4. GST-CDBN Aktivitesinin Zamana Karşı Değişimi

KDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan absorbands değişimi 0'dan başlayarak 600 saniyeye (10 dakika) kadar takip edildi. Absorbans ilk 60 sn sonunda okunmaya başlandı ve ilk 3 dakika boyunca her 20 sn.de bir okunurken, daha sonra her 30 sn.de bir olmak üzere ölçülerek yapıldı. Elde edilen bu değerler enzim aktivitesinin zamana karşı değişim grafiğinin çiziminde kullanıldı.

5.3.4.5. GST-CDNB Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Reaksiyon karışımı 0.05 – 8 mM arasında değişik CDNB konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve kefal balığı GST enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi incelendi.

5.3.4.6. Metal Etkisi

Alüminyum (Al), antimon (Sb), bakır (Cu), baryum (Ba), civa (Hg), çinko (Zn), demir [Fe(II) ve Fe(III)], kadmiyum (Cd), kobalt (Co), lityum (Li), mangan (Mn), nikel (Ni), potasyum (K), sezyum (Cs), sodyum (Na) metallerinin kefal balığı sitozollerinin GST aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi. Bunun dışında en fazla inhibisyon etkisi gösteren metaller ile inhibisyon tiplerini ve Km'lerini belirlemek amaçlandı. Metallerin stok çözeltileri 20 mM olarak hazırlandı. Genel metal etkilerini incelemek için tüm metaller reaksiyon ortamında 1 mM olacak şekilde kullanılırken, aktiviteyi en fazla düşüren sırasıyla Hg, Cu, Sb, Cd, ve Zn metalleri reaksiyon ortamında 0.1 mM olacak şekilde kullanıldı.

5.3.4.7. Deterjan Etkisi

Brij 35, CHAPS, Deoksikolik asit, Emulgen 913, Kolik asit, Lubrol, SDS, Triton X-100, Tween 20 deterjanlarının kefal balığı sitozollerinin GST aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkileri araştırıldı. Deterjanlar reaksiyon ortamında %0.1, %0.25, %0.5, %1 olacak şekilde eklendi.

5.3.5. ***GST-Etakrinik Asit Aktivitesinin (EA) Tayini***

Hazırlanan kefal S9 ve sitozollerinde GST aktivitesi, CDNB substratı yanı sıra EA substratı kullanılarak Habig ve diğ., (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. Aktivite, EA ile GSH konjugasyonu sonucu konjugasyon kompleksinin ışığı 270 nm'de absorpsiyonuna bağlı olarak ölçüldü. Tablo 2'de verildiği üzere tipik reaksiyon ortamı son 1 ml

hacimde 100 mM Tris-HCl tamponu, pH 6.8, 0.5 mM GSH, 25 µg sitozolik ve/veya S9 protein ve 0.2 mM EA içermektedir.

Tablo 2 Tipik GST-EA Aktivite Ölçüm Karışımının İçeriği.

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
500 mM Tris-HCl tamponu, pH 6.8	0.2	100 mM
50 mM GSH	0.01	0.5 mM
4 mM EA	0.05	0.2 mM
Örnek (1 mg/ml)	0.025	25 µg
Distile su	0.715	
Toplam Hacim	1	

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, tek kullanımlık spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son EA ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn.lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi UV-VIS Analytic Jena Specord 200 model Spektrofotometre de 270 nm’de 1 dakika takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimlerinin $5.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olan molar absorblama katsayısına bölünmesi ile hesaplandı.

5.3.5.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Kefal balık dokularında enzim aktivitesinin protein miktarı, pH, sıcaklık, zaman ve substrat (EA) miktarı ile değişimi bir önceki CDBN aktivitesinde verildiği gibi aynen incelendi ve optimum değerler tespit edildi.

5.4. Sonuçlar

Kefal balığı sitozolik GST CDNB ve EA aktiviteleri reaksiyonlar neticesinde oluşan konjugasyon ürünlerinin sırasıyla 340 ve 270 nm’de spektrofotometrik tayinleri ile gerçekleştirilmiştir. Her iki aktivite için de standard reaksiyon koşulları kolaylığı İzmir Körfezi

Pasaport mevkiinden yakalanan *L. saliens* balık dokuları için tayin edilmiş ve daha sonraki ölçümler için kullanılmıştır. Ayrıca, bazı reaksiyon koşulları farklı bölgelerden elde edilen örnekler ile de denenmiş, önemli farklılıklar gözlenmemiştir (veri sunulmamaktadır). Değişik balıklardan elde edilen sitozolik GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri Tablo 3'te verilmiştir. Yirmi yedi değişik *L. saliens* karaciğer sitozollerinde sırasıyla CDNB ve EA için Ortalama (Ortalama \pm Standard SapmaD) $1163,27 \pm 265,56$ ve $158,16 \pm 13,18$ nmol/dak/mg protein olarak bulunmuştur.

Tablo 3 . Pasaport bölgesinden elde edilen farklı örneklerdeki sitozolik GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri

CDNB (nmol/dak/mg protein)	EA (nmol/dak/mg protein)	
1645,02; 1354,36; 1602,48; 941,58; 1094,28; 1684,99; 1359,93; 1620,51; 1037,36; 1037,92; 1315,48; 1295,57; 1234,87; 1695,45; 1228,35; 966,99; 819,19; 1559,31; 871,23; 920,22; 1137,11; 973,01; 1571,64; 1451,21; 1341,2; 902,23; 1040,42; 1295,66; 1191,43; 1013,87; 777,08; 1060,39; 1286,88; 836,04; 1169,26; 1722,55; 1065,8; 1183,35; 1444,63; 1648,21; 1162,46; 736,12; 1193,48; 1080,66; 1315,35; 898,73; 892,55; 1257,53; 961,04; 846,37; 1535,31; 990,78; 1317,74; 1405,24; 996,82; 823,2; 820,45; 1304,2; 1358,82; 1137,34; 772,31; 779,68; 1523,99; 1540,25; 1084,51; 979,75; 1473,99; 774,67; 895,09; 797,77; 802,48; 885,72; 1034,42; 868,49; 1227,11; 887,93; 1093,91; 828,66; 732,52; 1340,27; 1227,16; 1347,96; 915,9; 1372,71; 1079,65; 1060,28; 1248,58; 1172,45; 879; 820,69; 1076,76; 1273,33; 1400,67; 1640,04; 1398,86; 1191,31; 1517,32; 1059,23; 1351,14; 534,92; 1404,38; 1393,22; 1040,71; 1230,7; 1082,56; 982,1; 1146,72; 659,52; 789,48; 858,23; 945,21; 1384,71; 1070,46; 972,09; 909,68; 1492,95; 958,57; 1591,45; 1391,55; 1627,1; 1406,04; 1239,78; 890,03; 1499,01; 1185,56; 1136,53; 877,55; 1561,7; 982,91; 1480,41; 1446,32; 1021,17; 728,33; 876,93; 1135,01; 1198,61; 1100,15; 1301,25; 1032,95; 1342,66; 1123,46; 1330,39; 1537,51; 1538,41; 1019,11; 1044,6; 1066,58; 1480,4; 852,08; 1472,21; 1394,33; 989,77; 1435,09;	142,001;154,643; 157,702; 161,131; 169,122; 151,523; 160,598; 159,528; 143,459; 134,942; 138,89; 174,86; 175,747; 159,363; 130,865; 170,247; 141,988; 183,394; 158,058; 179,416; 155,612; 139,495; 138,242; 156,381; 145,654; 138,951; 155,743; 173,581; 148,8; 167,659; 175,434; 167,084; 169,352; 180,346; 172,091; 162,18; 163,006; 168,345; 159,601; 138,004; 151,386; 145,084; 157,864; 150,079; 172,029; 162,988; 148,474; 157,47; 160,329; 155,844; 142,771; 173,2; 156,931; 144,571; 163,984; 168,603; 160,396; 170,782; 157,623; 143,929; 172,77; 138,865; 167,013; 171,989; 167,605; 148,35; 138,475; 182,501;	
Ortalama (Mean \pm SD):	1163,27 \pm 265,56	158,16 \pm 13,18

Liza saliens karaciğer mikrozoamlarında GST aktivitesi CDNB ve EA substratları kullanılarak karakterize edildi ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin araştırılması için aşağıdaki verilen işlemler gerçekleştirildi:

- Enzim aktivitelerinin hüresel fraksiyonlardaki dağılımı (Tablo 4)
- Enzim aktivitelerinin reaksiyon süresi ile değişimi (Şekil 1A ve B)
- Protein miktarının enzim aktivitelerine etkisi (Şekil 2A ve B)

- Substrat konsantrasyonunun enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve K_m ve V_{max} sabitlerinin bulunması (Şekil 3A ve B)
- pH'ın enzim aktiviteleri üzerine etkisi (Şekil 4A ve B)
- Optimum sıcaklık belirlemeleri (Şekil 5)
- Değişik metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkileri (Şekil 6)
- Değişik deterjanların enzim aktiviteleri üzerine etkisi (Şekil 7)
- GST aktivitelerinin *Liza saliens* dokularındaki dağılımı (Şekil 8)
- Farklı bölgelerden toplanan balıkların GST aktiviteleri (Şekil 9)

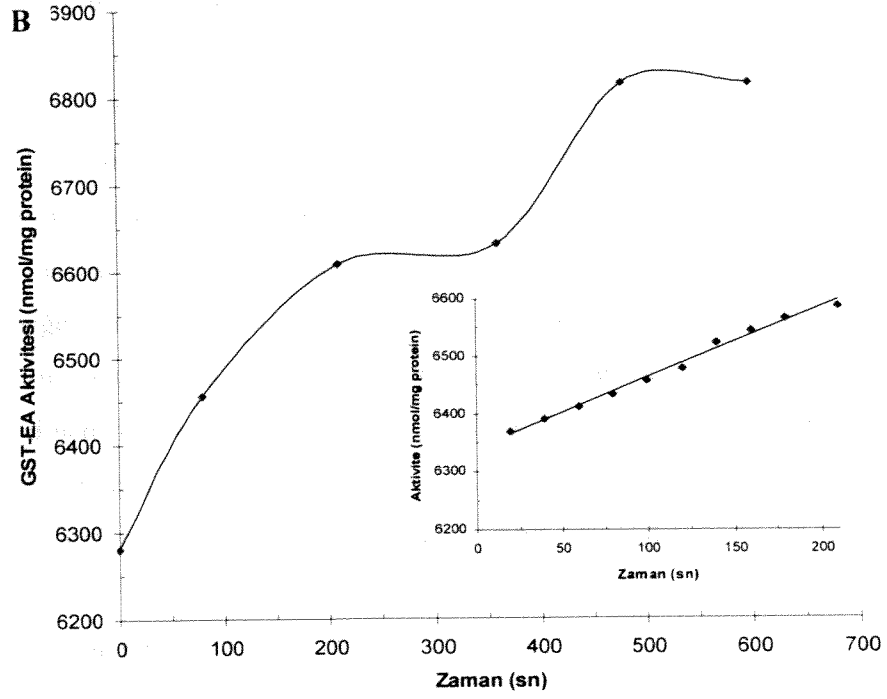
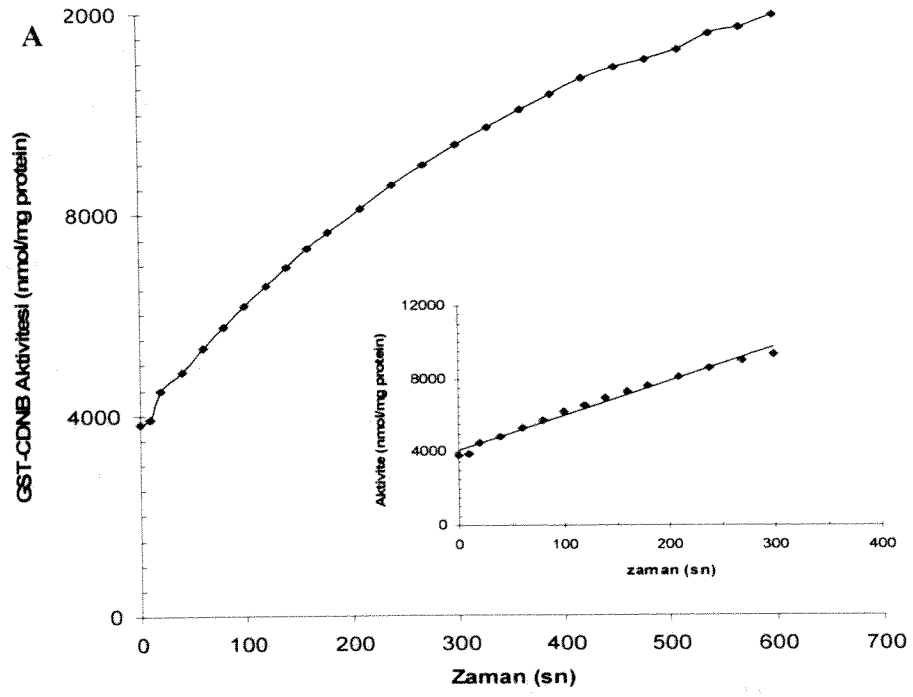
Karakterizasyon çalışmalarına geçmeden önce bu çalışmada incelenen GST aktivitelerinin kefal balığı hücre içi dağılımı incelendi. Sonuçlar Tablo 4'te sunulmaktadır. GST izozimleri primer olarak sitozolik olmalarından dolayı ağırlıklı olarak GST aktiviteleri sitoplazmada tespit edildi (sırasıyla CDNB ve EA için %50,5 ve %56). Bununla birlikte post-mitokondriyel fraksiyonlarda da hatırı sayılır derece de aktiviteler gözlemlendi (sırasıyla CDNB ve EA için %38,7 ve %31,1). Her iki substrat için de mikrozomal fraksiyonlarda oldukça yüksek aktiviteler (sırasıyla CDNB ve EA için $287 \pm 26,2$ ve $25,92 \pm 2,71$ nmol/dak/mg protein) gözlemlendi. Bu aktiviteler bir çok değişik balık türleri için literatürde verilen mikrozomal GST aktivitelerinden oldukça yüksektir. Bununla birlikte *Liza saliens* için bu çalışmada elde edilen GST aktivitelerinin hücre içi dağılımları değişik sucul ve karasal ortamlarda yaşayan canlılar için verilen dağılımlar için uyum göstermektedir (Raza ve diğ., 1997; Vidal ve Narborne, 2000).

Tablo 4 GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerinin doğal *Liza saliens* karaciğer hücre içi (Subsellüler) fraksiyonlardaki dağılımı

Subcellular Fraction	GST Aktiviteleri (nmol/dakika/mg protein)*	
	CDNB	EA
Postmitochondrial	1340.8 ± 18.5	108.8 ± 6.6
Cytosol	1028.8 ± 8.25	60.0 ± 2.4
Microsomes	287.3 ± 26.2	25.9 ± 2.7

*Sonuçlar dört set deneyin triplike ölçümlerinin Ortalama \pm SD'sı olarak verilmiştir.

Liza saliens sitozolik GST-CDNB ve EA aktivitelerinin zamana karşı değişimi reaksiyonların 10 dakika süresince tabii ile incelendi (Şekil 1). GST-CDNB aktivitesi enzim aktivitesi ilk beş dakika lineerite gösterirken (Şekil 1A içine yerleştirilmiş küçük grafik) GST-EA aktivitesi ilk üç

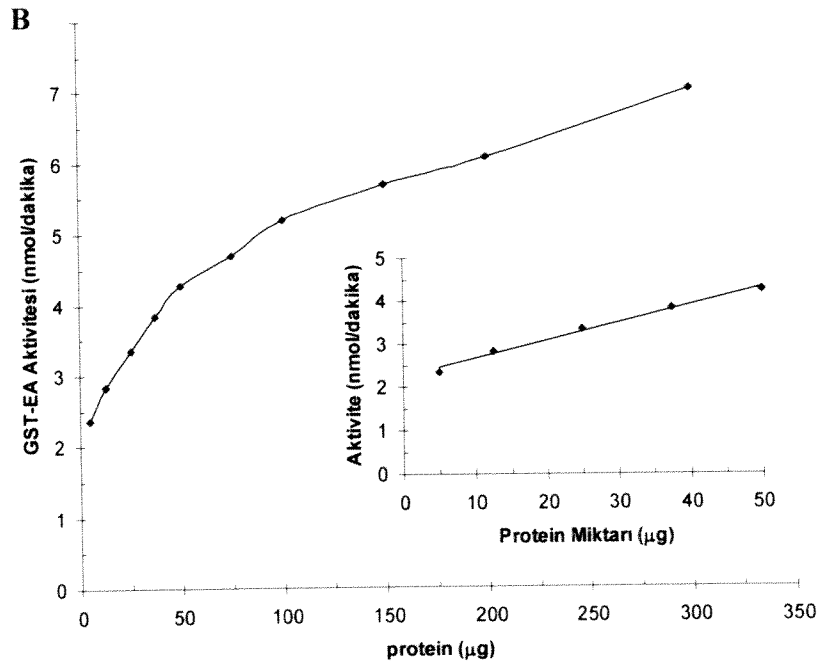
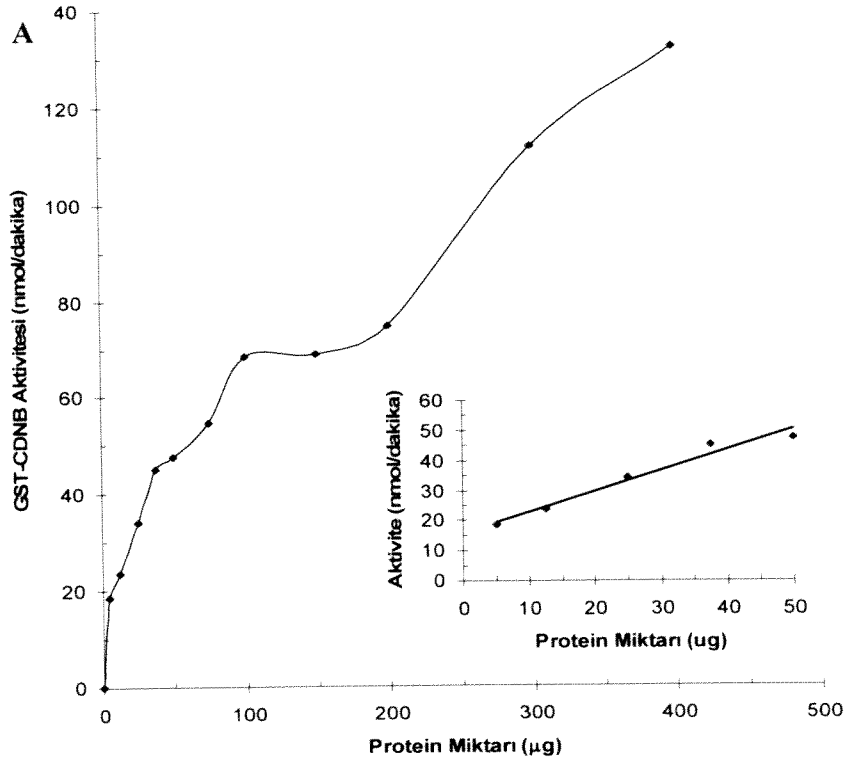


Şekil 1. *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerinin zaman ile değişimi

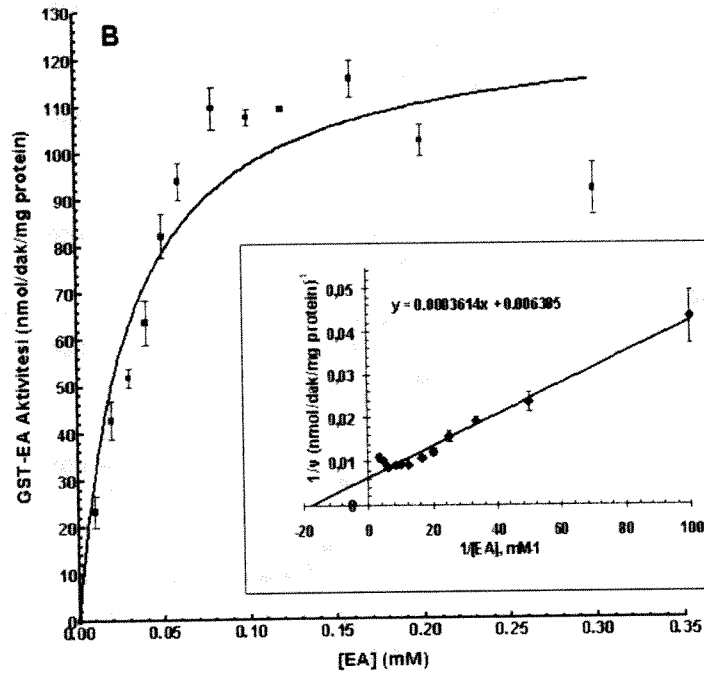
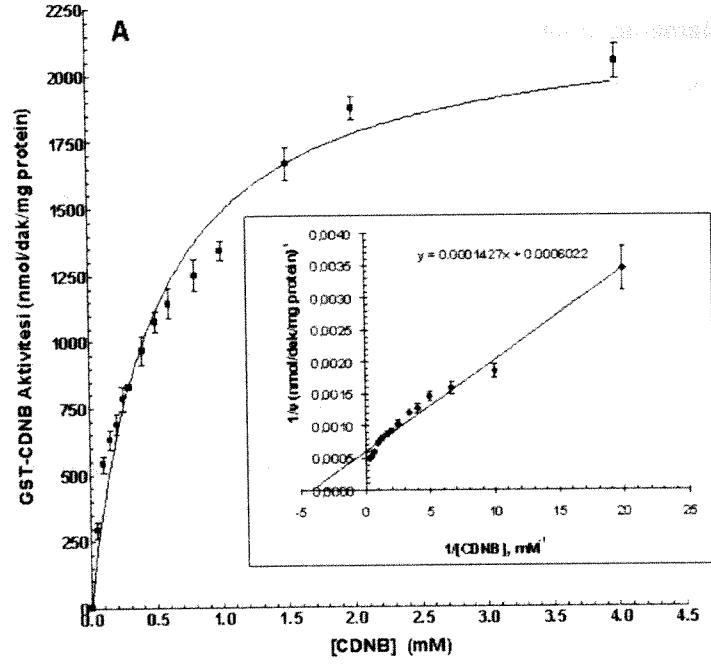
dakika boyunca doğrusallık gösterdi (Şekil 1B içine yerleştirilmiş küçük grafik). Ayrıca GST-EA aktivitesinde 10 dakikalık inkübasyon süresince daha fazla sapmalar belirlendi. Dolayısı ile bundan sonraki çalışmalarda her iki aktivite ölçümü reaksiyonun GSH ile başlatılmasından sonra 10 saniyelik bir bekleme periyodunun ardından 60 saniye takip edilerek gerçekleştirildi.

Protein miktarının *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri üzerine etkileri Şekil 2 de verilmektedir. Reaksiyon ortamındaki sitozolik protein miktarı 50 µg'a kadar artırıldığında her iki enzim aktivitesinde doğrusallık sergiledi. Bu noktadan sonra reaksiyon hızlarındaki artış azalmış ve daha sonraki artışlarda aktiviteler bir hayli yavaşlamıştır. Rutin aktivite ölçümleri için her iki substrat için de 25 µg protein miktarı kullanılmıştır.

Şekil 3A ve 3B'de *Liza saliens* hepatik GST'ların sırasıyla CDNB ve EA için substrat saçürasyon kinetikleri verilmektedir. Enzim aktivitelerinin 2 mM CDNB ve 0,1 mM EA konsantrasyonları üzerinde saçüre olduğu gözlenmektedir. Her iki enzim aktivitesi içinde reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna karşı çizen grafikleri Michaelis-Menten Kinetiğine uymaktadır (regresyon katsayıları sırasıyla CDNB ve EA grafikleri için 0,9725 ve 0,9002 olarak hesaplanmıştır). Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak yapılan saptamalarda gözlenen V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla CDNB ve EA için 1661 nmol/dak/mg protein ve 0,24 nM ve 156 nmol/dak/mg protein ve 0,056 mM olarak hesaplanmıştır. Bu noktada literatürde aynı substratlar için değişik balık türleri için verilen V_{max} ve K_m değerleri büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin, CDNB için verilen K_m değerleri 0,4 ile 6,15 mM arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle verilerin karşılaştırılmasının yapılması mümkün değildir. Ancak, yine de bu farklılıkların türler arası ekzojen veya endojen moleküllerin metabolizmasındaki farklılığı işaret ettiği aşikardır. Sonuç olarak, bir çok çalışmada gösterildiği gibi, CDNB substratı için çok yüksek değerler kaydedilirken EA için çok daha düşük aktiviteler tespit edilmiştir ki bu da muhtemel olarak CDNB'nin birden fazla izozim tarafından katalizlendiğini ve EA'nın da bir veya daha az sayıda izozim tarafından katalizlendiğini gösterebilir.

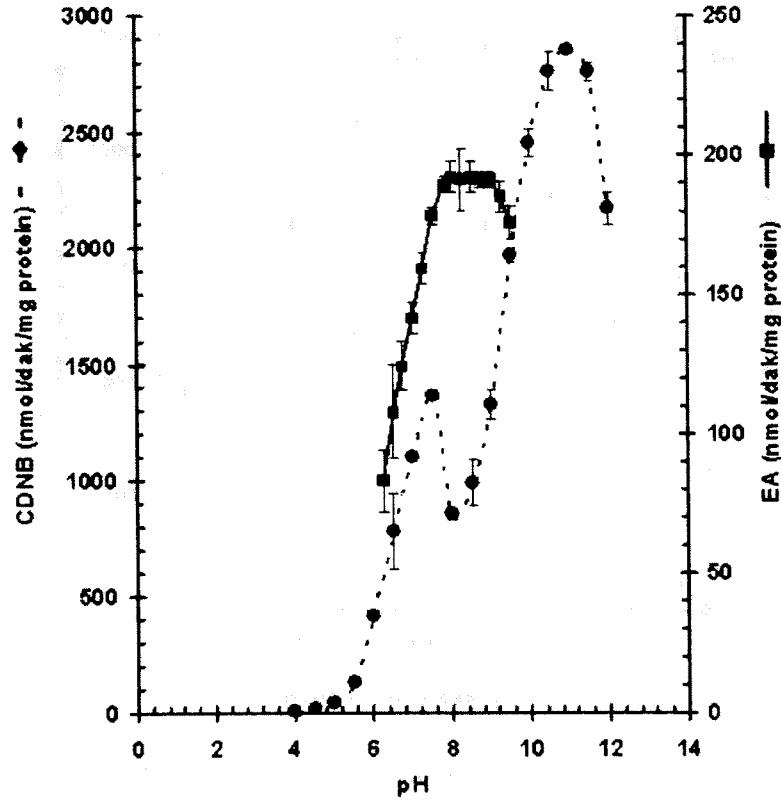


Şekil 2. Protein miktarının *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerine etkisi



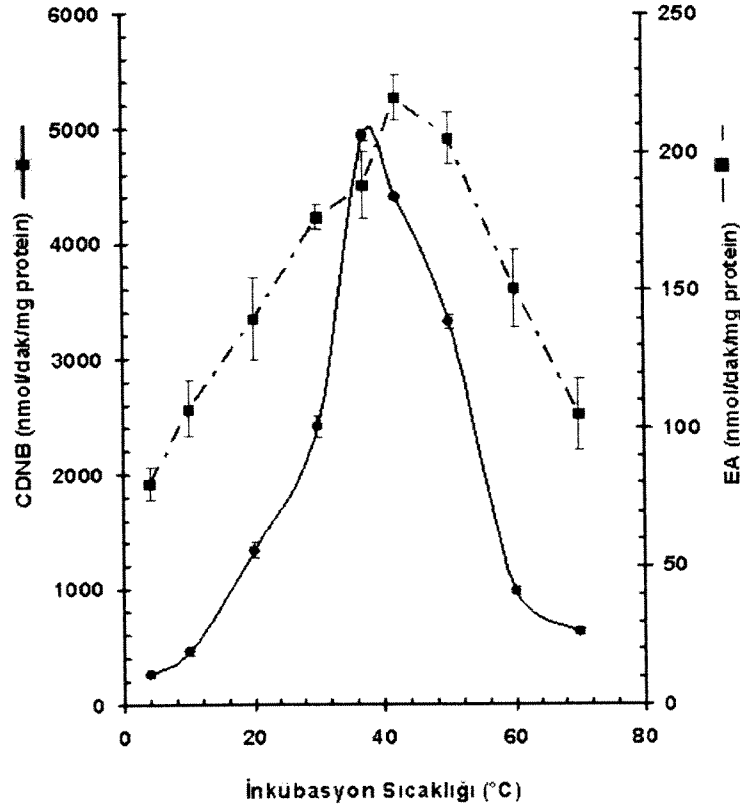
Şekil 3. Substrat konsantrasyonlarının *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelere etkileri

Farklı pH değerlerinin enzim aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 4'te verilmektedir. GST'lerin CDNB ve EA'ya karşı aktivitelerinin pH ile değişimini tanımlama çalışmaları asetat tamponu (pH 4 ile 5,5 arası), fosfat tamponu (pH 6 ile 8,5 arası) ve glisin-NaOH tamponu (pH 9 ile 11 arası) olarak üç değişik aralıkta üç değişik tampon kullanılarak gerçekleştirildi. GST-CDNB aktivitesi için pH 7,5 ve pH 11 olarak iki farklı optimum pH gözlenirken GST-EA aktivitesi için pH 6,5 ile 9 arasında düzlemsel bir optimum aralık bulundu. GST-CDNB aktivitesi için gözlenen iki pik noktası bu enzim için daha önce substrat çalışmalarında da değinildiği gibi birden fazla izozimin bu substratı katalize etmesini destekler bir bulgu olarak ele alınabilir. Benzer çıkarımlar literatürde de bildirilmiştir (Vidal ve Narborne, 2000). Bu çalışmada elde edilen optimum pH değerleri literatürde alabalık, kedibalığı ve kelebek balığı gibi diğer balık türleri için verilen değerler ile uygunluk göstermektedir (Lauren ve diğ., 1989; Gallegher ve Di Giulio; 1992; Al-Ghais, 1997).



Şekil 4. *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerinin pH ile değişimi

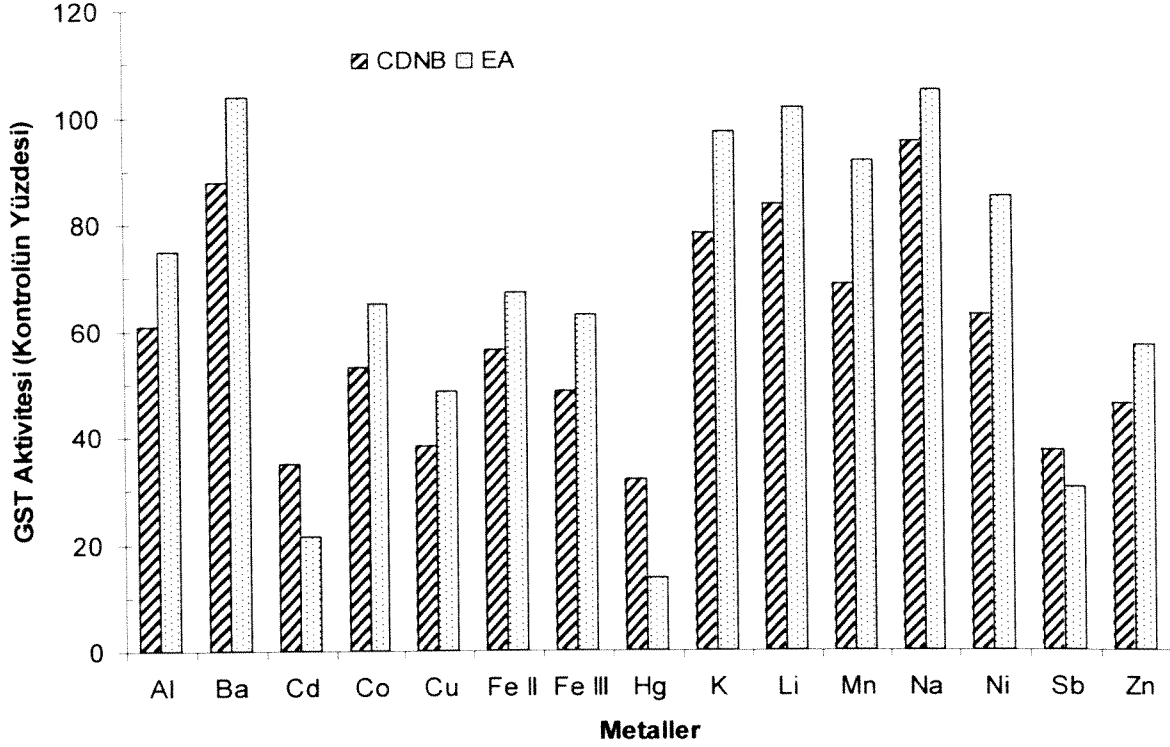
Değişik inkübasyon sıcaklıkların enzim aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek için inkübasyon karışımları 4 °C ile 70 °C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe edilerek aktiviteleri tayin edildi (Şekil 5). İnkübasyon sıcaklığı artırıldığında GST-CDNB aktivitesi daha dik ve hızlı bir artış gösterirken GST-EA aktivitesi daha yaygın ve düşük bir değişim gösterdi. GST-CDNB aktivitesi için optimum pH 37 °C olarak tayin edilirken GST-EA için 42 °C olarak bulundu. Hangi substrat kullanılırsa kullanılsın yüksek sıcaklıklarda mutlak denaçürasyon gözlenmedi, önemli düzeyde enzim aktiviteleri tayin edildi. Genel olarak, Faz II konjugaz enzimleri için pik değerler 35 °C ve üzerinde bildirilmektedir. Bu çalışmada elde edilen optimum reaksiyon sıcaklıkları literatürde alabalık, mersin balığı ve mercanlar için verilen değerler ile benzerlik sergilemektedir (Lauren ve diğ., 1989; Perdu-Durand ve Cravedi, 1989; Al-Ghais, 1997).



Şekil 5. *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerinin reaksiyon sıcaklığı ile değişimi

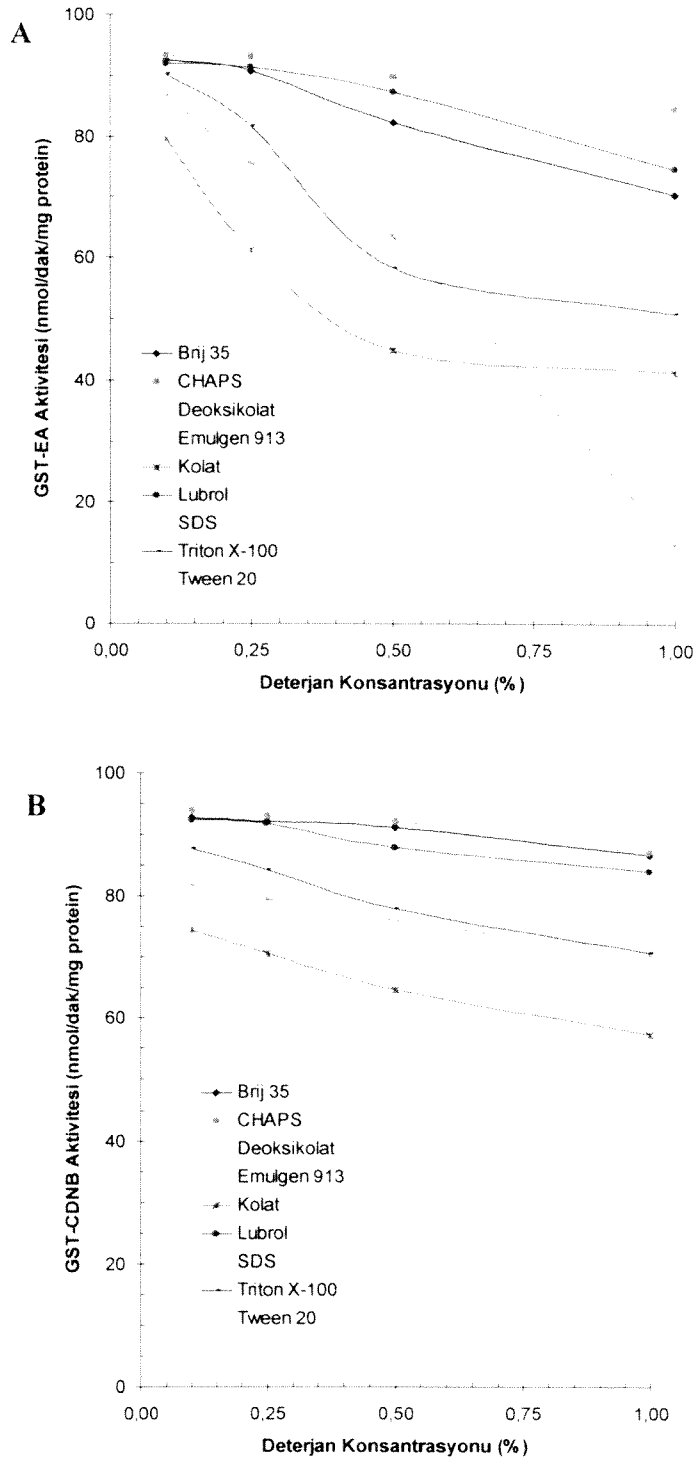
Liza saliens hepatik GST'lerinin CDNB ve EA'ya karşı olan affinitelerinin değişik metallerce nasıl etkilendiği Şekil 6'da verilmiştir. Genel metal etkilerini incelemek için tüm

metaller reaksiyon ortamında 1 mM olacak şekilde kullanılırken, aktiviteyi en fazla düşüren sırasıyla Hg, Cu, Sb, Cd, ve Zn metalleri reaksiyon ortamında 0.1 mM olacak şekilde kullanıldı. Genel olarak ağır metallerin her iki aktiviteyi önemli derecede inhibe ettiği gözlenmektedir.



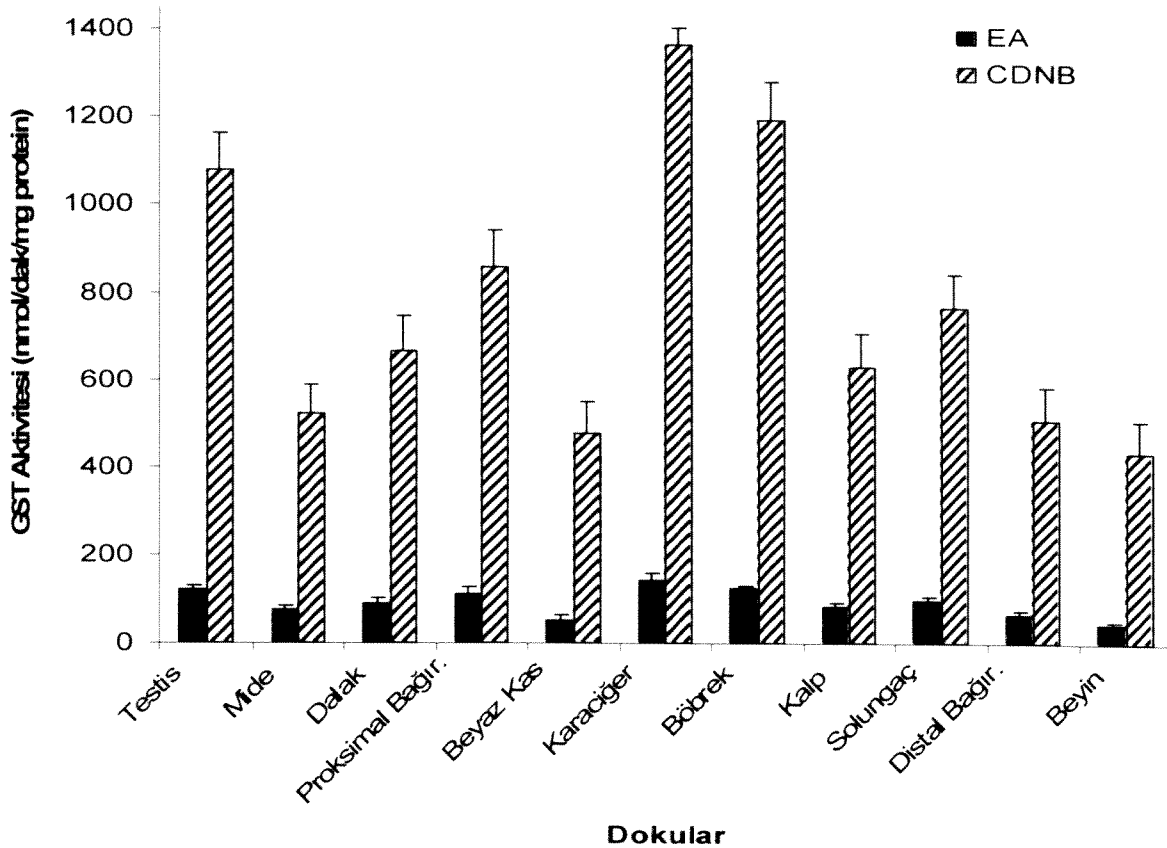
Şekil 6. Çeşitli metallerin *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitesine etkileri

Sucul veya karasal olsun değişik canlılardan elde edilen örneklerde GST ölçümleri için veya GST izozimlerinin saflaştırılması için reaksiyon ortamlarına veya saflaştırma tamponlarına değişik deterjanlar ve eklenmektedir. Ayrıca, deterjanlar sanayi atıkları ile ekosistemimize ve özellikle de sucul ekosistemlere katılmakta ve toksik etkiler yapmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmamızda değişik deterjanların GST-CDNB ve GST-EA aktivitesine etkilerini inceledik (Şekil 6). Her iki aktivite de özellikle iyonik deterjanların yüksek konsantrasyonlarında inhibe olduğu gözlenmektedir. Ayrıca GST-EA aktivitesinin GST-CDNB aktivitesine göre deterjan aktivitesine daha hassas olduğu bulunmuştur.



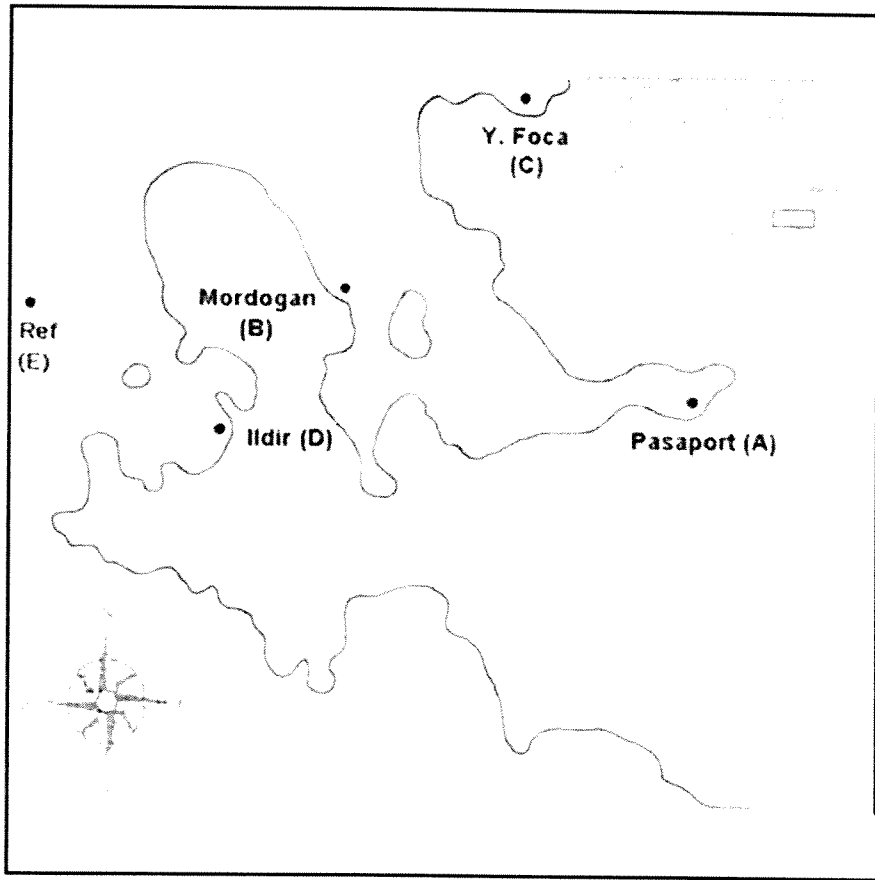
Şekil 7. Çeşitli deterjanların *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelere etkileri

Değişik organizma ve bu organizmaların dokularında değişik GST izozimlerin varlığı ve bunların farklı kombinasyonları neticesinde reaktif ksenobiyotiklerin metabolizmasında tür ve doku spesifik rolleri literatürde detaylı bir şekilde yer almaktadır (George, 1994; Leaver ve diğ., 1993). GST'ler Faz I metabolitlerinin veya doğrudan ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonlarını doku spesifik olarak katalize ederler. Bu nedenle, *Liza saliens*'in değişik dokularında GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri tayin edildi (Şekil 8). Her iki aktivite içinde maksimum aktivite karaciğerde bulundu. Bununla birlikte, böbrek ve testislerde karaciğere yakın düzeyde aktiviteler tespit edildi. Yüksek aktivite tespit edilen bu dokularda GST'ler çeşitli ksenobiyotiklerin veya endojen moleküllerin metabolizmasında önemli rol oynadıklarını söylemek yanıltıcı olmayacaktır. Böbrek ve proksimal bağırsak için literatürde bilgi mevcut iken testis için balıklarda herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bunun üzerine gidilebilir ve böylelikle literatüre yeni bir bilgi kazandırılabilir.



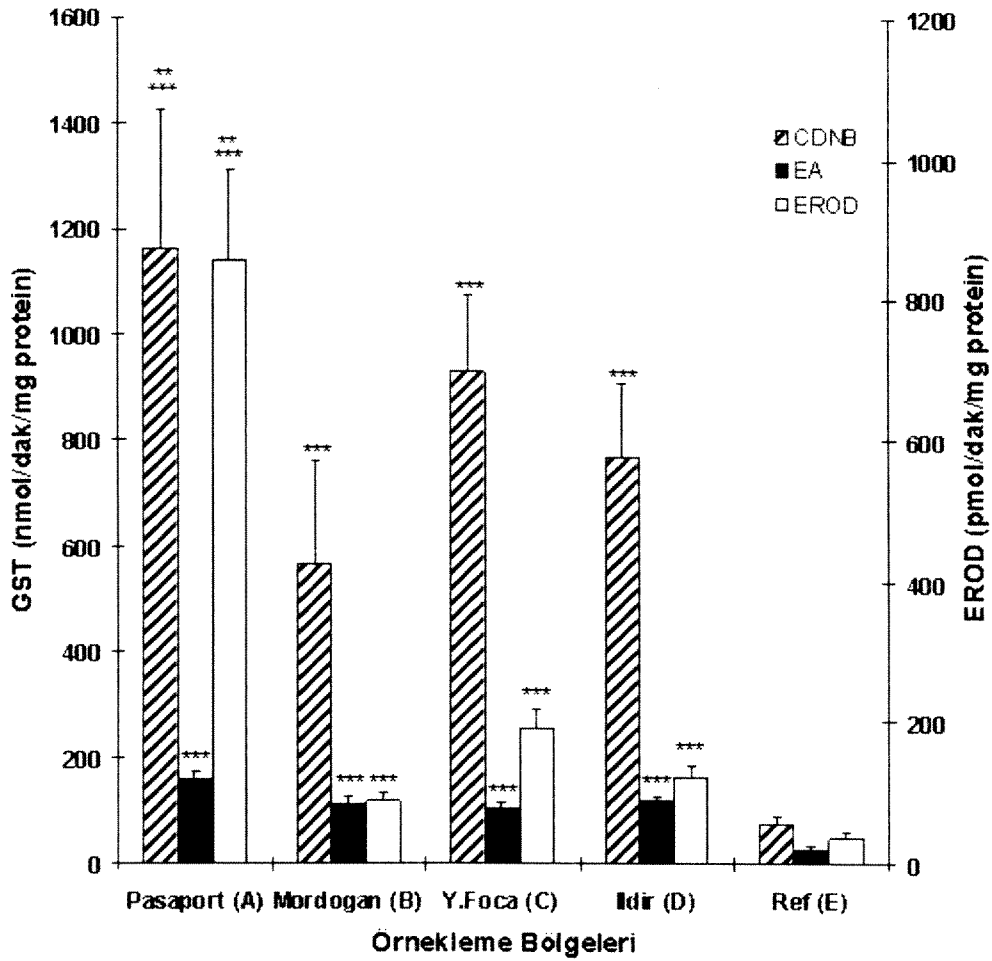
Şekil 8. *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktivitelerinin doku dağılımları

Son olarak, bu çalışmada GST'ların biyomarkör olarak kullanılabilirliğini araşırmak için İzmir Kõrfezi civarında beş değişik noktadan toplanan doğal kefal balıkları (*Liza saliens*) karaciğer dokularında GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri ölçüldü. Şekil 9'da İzmir Kõrfezi etrafında balık avlama istasyonları gösterilmektedir. Toplama noktaları İzmir Őehir merkezine (Liman) olan uzaklıklarına göre A'dan E'ye kadar harflerle adlandırılmıştır. Pasaport noktası (A) bilinen en kirli bölgedir çünkü burası hem endüstriyel ve hemde evsel atıklar ile kirletilmektedir. Mordoğan (B), dış kõrfezde bulunan ve hem daha az popülasyon yoğunluğuna ve hem de daha az endüstriye sahip bir bölgedir. Yeni Foça (C) ve Ildır (D) kuzey ve güney yönünde yaklaşık merkezden 100 km uzaklıkta bölgelerdir; her ikizi de kõrfez dışındadır ve Ildır en az nüfus yoğunluğuna sahip küçük ve Őirin bir koydur. E (referans) noktası temiz olduğu düşünölen Ildır koyununun yaklaşık bir kaç mil açıklarında açık denizde bir noktadır. Diğer noktalar kıyıya yakındır.



Şekil 9. İzmir kõrfezi etrafında *Liza saliens* toplama istasyonları.

Şekil 10 yukarıda verilen bölgelerden avlanan balıklarda ölçülen enzim aktivitelerini göstermektedir. Neticeler bulguları desteklemek amacı ile, tüm dünyada sucul ekosistemler ve bu ortamlardaki canlılardaki organik kirlenmeler için uygun ve hassas bir biyomarkör olarak kabul edilen EROD (EtoksiRezorufin O-Deetilaz) aktivitesi ile birlikte verilmektedir (Payne ve diğ., 1987; Bucheli ve Fent, 1995; van der Oost ve diğ, 2003). GST aktiviteleri aynı örneklerde ölçülen EROD aktiviteleri ile paralellik göstermektedir. Bu da GST'ların akuatik ortamlardaki organik kirlenmenin ve canlılar üzerine etkisinin tabii için biyomarkör olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 10. Toplama istasyonlarında avlanan *Liza saliens* GST-CDNB ve GST-EA aktiviteleri

6. DEĞERLENDİRMELER

1. GST'lerin Liza saliens balığı her dokusunda sitozolik olarak ekspres edilen enzimler olduğu gösterilmiştir.
2. Farklı dokularda tespit edilen farklı GST düzeylerinin dokuların kendilerine has ve fonksiyonlarına özel olarak değişmekte olduğu bulunmuştur. Bu noktada daha ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir
3. Liza saliens dokularında tespit edilen GST-CDNB ve GST-EA aktivite düzeyleri literatürde diğer balıklar ve hatta insane ve rat gibi canlılar için bildirilen düzeylerin çok çok üstündedir ki bu Liza saliens'in kirli bölgelerde yaşama adaptasyonuna katkı sağlayan bir mekanizma olabilir.
4. Ayrıca, bu çalışma Liza saliens GST aktivitelerinin akuatik ekosistemler için bir biyomarkör olabileceğini vurgulamıştır.
5. Proje önerisinde GST ile sunulan çalışmaların büyük bir kısmı tamamlanmıştır. Ancak, önerilen Western Blot analizleri gerçekleştirilememiştir. Bu noktada, Western Blot analizi için gerekli aparat ve teçhizat üniversite kaynaklarında satın alınmasına ve sarfın da bu proje kapsamında alınmasına rağmen satın alınan primer antikorların balık GST'leri ile reaksiyon vermemesi nedeniyle beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Western blot analizleri için İNTERLAB firmasından bu proje sarf kaleminden alımı yapılan Sigma GL7781 Kodlu primer antikor olan "Anti-Glutathione S-Transferase (GST), Unconjugated from Rabbit, buffered aqueous solution, IgG fraction of antiserum (17-02-2003 746193 nolu fatura) reaktif olmaması Western analizlerinden beklenen sonuçların eldesini engellemiştir. Bu konuda ilgili firma ile bu antikorların tekrar sağlanması için yazışmalar ve görüşmeler yapılmış fakat netice alınamamıştır. Bu konuda, 4 Ocak 2004 tarihinde proje de harcanmayan ve sağlanan destekten arta kalan bütçenin sarfa aktarılarak yeniden antikor alımı için yaptığım başvurunun reddi ile ilerleme sağlamak mümkün olmamıştır. Ancak, bu neticelerin eldesi için ODTÜ Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Mesude İŞCAN ile kolloborasyona geçilmiştir ve Prof. Dr. Mesude İŞCAN'ın antikorları ile bu sonuçlar mutlaka elde edilecektir. Ayrıca, yeni kaynaklar ile yeniden antikor alımında gündemdedir.

6. Ayrıca proje önerisinde sunulan *Liza saliens* karaciğer mikrozomlarında FMO aktivitesi methimazolün S-oksidasyonu, Dixit ve Roche, 1984 tarafından tarif edilen spektrofotometrik yöntemle takip edilerek tayin edilmeye çalışılmıştır ancak dedeksiyon limitlerinde gözlenebilen bir aktivite elde edilememiştir. Balık dokularında FMO aktivitesinin çok düşük olmasından dolayı bu gibi problemler ile karşı karşıya kalınmaktadır. Bu konuda farklı substratlar ile yapılan denemeler de sonuç vermemiştir.
7. Bu çalışmalardan
 - a. "Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S-Transferases in Mullet (*Liza saliens*)" başlıklı makale olarak **Biochemistry (Moscow)** dergisinde baskıdadır (kabul yazısı ekte verilmektedir).
 - b. 13th International Conference on Cytochromes P450 Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism, Prague, June 29 - July 3, 2003. kongresinde "Distribution of Glutathione S-Transferases in Mullet (*Liza saliens*)" başlıklı bildiri olarak sunulmuştur.
8. Projede sağlanan mali desteğin tamamı kullanılmamıştır. Projeden UV-VIS Analytic Jena Specord 200 model Spektrofotometre ve çeşitli sarf malzemeleri satın alımı için 28.678.200.000TL harcanmış ve 3.321.800.000TL tasarruf edilmiştir.
9. Proje çalışmalarını da kapsayan ve aynı zamanda proje de yardımcı araştırmacı olan Araş. Gör. Aslı KIRIKBAKAN'ın lisansüstü tezi yürütülmüş ve tamamlanmıştır.
10. GST ile ilgili olarak projede eksik kalan deneyler önümüzdeki yaz döneminde mutlaka tamamlanacaktır.
11. Sonuç olarak yayınları ve sonuçları ile başarılı bir proje gerçekleştirilmiştir.

7. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmalar daha ileri çalışmalar için temel oluşturmuştur. Bu kapsamda ilaçlar ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında önemli bir yeri olan GST izozimlerinin *Liza saliens*'ten klonlanması, ekspres (ifade) edilmesi, ifade edilen proteinlerin saflaştırılarak karakterize edilebilir. Elde edilen verilerin öncelikle kefal (*Liza saliens*) balığında GST'lerin düzeylerini ve

önemlerini belirlemede daha sonra da bu enzimlerin insan ve diğer canlılar ile olan benzerlik ve farklılıklarını ortaya koyacaktır. Böylelikle, elde edilen bu rekombinant proteinler kullanılarak insanlar için kullanılan çeşitli ilaçların veya antioksidant olduğu belirlenen bitkisel kaynaklı maddelerin bu enzimler tarafından nasıl metabolize edildiği belirlenerek insan sağlığı ile ilişkilendirilecektir. Buradan elde edilebilecek veriler yeni ilaç geliştirilmesi gibi alanlara da ışık tutacaktır. Tüm bunlara ilave olarak ülkemiz kıyılarında bolca bulunan kefal balığının bu tür çalışmalar için alternatif bir model oluşturmasına büyük katkılar sağlayacaktır. Tüm bu amaçları kapsayan bir İleri Araştırma Projesi sunulmuştur.

8. REFERANSLAR

- Adalı, O., and Arınç, E., (1990) *Int. J. Biochem.*, 22, 1437-1444.
- Al-Ghais, S. M. (1997) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 976-983.
- Arınç, E., (1980) *Microsomes and Drug Oxidations, and Chemical Carcinogenesis*, Vol. 1. (Edited by Coon, M. J., Conney, A. H., Estabrook, R. W., Gelboin, H. V., Gillette, J. R., and O'Brien, P. J.), pp. 207-210. Academic Press, New York.
- Arınç, E., and İşcan, M. Y., (1983) *Comp. Biochem. Physiol.*, 74 C; 151-158.
- Arinc, E., Sen, A., and Bozcaarmutlu, A. (2000) *Pure and Applied Chemistry* 72, 985-994.
- Armstrong, R. N., (1997) *Comprehensive Toxicology. Biotransformation*, 3. Elsevier Science, Oxford, pp. 307-327.
- Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., Jermiin, L. S., (1997) *Biochem. J.*, 328,929-935.
- Bucheli, T. D. and Fent, K. (1995) *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 200-268.
- Conney, A. H., and Burns, J. J., (1972) *Science*, 178, pp. 576-586.
- Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., and Estabrook, R. W. (1965) *Science*, 147, 400-402.
- Dawe, C. J., (1990) *Environ. Health Res.*, 86, 245-255.
- Gadugbui, B. K. M., and James M. O.(2000) *Aquat. Tox.* 49, 27-37.
- Gallagher, E. P., and Di Giulio, R. T. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 102C, 543-547.
- Gallagher, E. P., and Eaton, D. L. (1995) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 89-90.
- George, S. G. (1994) *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, CRC Press, Boca Raton. pp. 37-85.
- Guengerich, F., (1993) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 105 (Schenkmen J, Greim H, Eds.), pp. 89-104, Springer-Verlag, Berlin.
- Habig, W. H., and Jakoby, W. B., (1981) *Methods Enzymol.*, Vol. 77, pp. 398-405.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B., (1974a) *J. Biol. Chem.*, Vol. 249, No. 20, pp. 7130-7139.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B., (1974b) *J. Biol. Chem.*, Vol. 246, pp. 7139-7139.
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J., (1995) *CRC CritRev.Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30, No. 6, pp.445-600.
- Hayes, J.D., and Pulford, D. (1995) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.

- Heidelberger, C., (1975) *Annu. Rew. Biochem.*, 44: 79-121.
- Hodgson, E., and Deuterman, W. C. (1982) *Introduction to Biochemical Toxicology* (Hodgson, E., Ed.), pp 67-90. Elsevier. New York.
- Hussey, A. J. and Hayes, J. D., (1993) *Biochem. Biophys. Acta*, 1203, 131.
- Jakoby, W. B., Habig, W. H., (1980) In: Jakoby, W. B. (Ed.), *Enzymatic basis of detoxication*, 2. Academic Press, New York, pp. 63-94.
- Kato, S., Bowman, E. D., Harrington, A. M., Blomeke, B., and Shields, P. G., (1995) *J. Nat. Cancer Inst.*, 87, 902.
- Lauren, D. J., Halarnkar, P. P., Hammock, B. D., and Hinton, D. E. (1989) *Biochem. Pharmacol.* 38, 881-887.
- Leaver, M. J., Scott, K., and George, S. G. (1993) *Biochem. J.* 252, 189-195.
- Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 23, 283-337.
- Mannervik, B., and Danielson, U. H., (1988) *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 23, pp. 283-337.
- Melgar-Riol, M.J., Novoa, Valinas, M.C., Garcia, Fernandez, M. A., Perez-Lopez M. (2001) *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 128, 227-235.
- Moyle, P. B., and Cech, J. J. (1988) *Fishes. An introduction to ichthyology*, Prentice-Hall Int., London.
- Mulder, G., Coughtrie, M., Burchell, B., (1990) In *Drug Metabolism: An Integrated Approach*. (Mulder G. Eds.) pp. 51-105, Taylor & Francis, London.
- Novoa-Valinas, M. C., Perez-Lopez, M., and Melgar, M. J. (2002). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131, 207-213.
- Payne, J. F., Fancey, L. L., Rahimtula, A. D., Porter, E. L. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 233-245.
- Perdu-Durand, E. F., and Cravedi, J. P. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 921-928.
- Perez-Lopez, M., Anglade, P., and Bec-Ferte, M. P. (2000) *Fish. Physiol. Biochem.* 22, 21-32.
- Petcivalsky, M., Machala, M., Nezveda, K., Piacka, V., Svobodova, Z., and Drabek, P. (1997) *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1417-1421.
- Raza, H., Lakhani, M. S., Ahmed, I., John, A., Morgenstern, R., and Montague, W. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.* 118B, 829-835.
- Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. and Sato, K., (1985). *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 82, pp. 3964-3968.
- Schenkman, J. B., (1991) In *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*, (Arinç, E., Schenkman, J. B., and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-10, Plenum Press, New York.
- Schenkman, J. B., (1999) In *Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*. (Arinç, E., Schenkman, J., B., and Hodgson, E., Eds.), pp. 1-20, Plenum Publishers, New York.
- Tsuchida, S., and Sato, K., (1992) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27, pp. 337-384.
- van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. (2003) *Environ. Toxicol. Pharm.* 13 57-149.
- Vidal, M. L., and Narborne, J. F. (2000) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 455-462.
- Waterman, M. R., John, M. E., and Simpson, E. R., (1986) In *Cytochrome P450-Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Mantellano, P. R., Ed.), pp. 345-386, Plenum Press, New York.
- Williams, R. T., (1967) *Fed. Proc.*, 26: 1029-1039.

9. PROJE ÖZET BİLDİRİ FORMU

1. Proje No :	TBAG 2058 (101T064)
2. İlgili Araştırma Grubu :	TBAG
3. Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri :	1 Ocak 2003- 31 Aralık 2003
4. Projenin Adı :	Biyomarkörlerden ve İlaçları Metabolize Eden Faz II Enzimlerinden Glutasyon S-Transferaz ve Faz I Enzimlerinden Flavin Monooksijenazların Balık (<i>Liza Saliens</i>) Dokularından Karşılaştırmalı Karakterizasyonları
5. Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar :	Doç.Dr. Alaattin ŞEN Prof. Dr. Orhan ADALI Araş. Gör. Aslı KIRIKBAKAN
6. Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi :	Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 20017 Kınıklı-DENİZLİ
7. Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi :	TÜBİTAK
8. Özet (Abstract) :	<p>Bu çalışmada, kefal (<i>Liza saliens</i>) sitozolik glutasyon S-transferazları (GST) çalışılmış ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve etakrinik asit (EA) substratları kullanılarak karakterize edilmiştir. CDNB ve EA substratlarına karşı ortalama GST aktivitesi sırası ile 1365 ± 41 ve 140 ± 20 nmol/dak/mg protein olarak bulunmuştur. Sitozolik protein miktarının ve 4 - 70°C arasındaki sıcaklık değerlerinin enzim aktivitelerine etkisi çalışılmıştır. CDNB ve EA'ya karşılık her iki aktivitede protein miktarına benzer şekilde bağımlılık görülürken, optimum sıcaklık sırası ile 37°C ve 42°C olarak bulunmuştur. Ek olarak pH'nın GST-CDNB ve -EA aktivitelerine etkisi çalışılmış ve farklı pH aktivite profilleri gözlenmiştir. Her iki substrat için Michaelis-Menten Kinetiğine uyan V_{max} and K_m değerleri sırası ile 1661 nmol/dak/mg protein ve 0.24 mM ve 157 nmol/dak/mg protein ve 0.056 mM olarak bulunmuştur. <i>Liza saliens</i>'te GST'lerin dağılımı çalışılmış ve diğer balık türleri ile kıyaslanmıştır. <i>Liza saliens</i>'te oldukça yüksek aktiviteler karaciğer, böbrek, testis, bağırsak ve solungaçlar dokularında ölçülmüştür. Dahası, sonuçlarımız bize <i>Liza saliens</i>'ten elde edilen GST aktivitelerinin sucül kirlilik için biyomarkör olarak çok yararlı olduğunu göstermektedir.</p>
9. Anahtar Kelimeler :	Faz II, Glutasyon S-Transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen, Etakrinik asit, biyomarkör ve <i>Liza saliens</i>
10. Projede Yapılan Çalışmaların Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ) :	<p>a. Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S-Transferases in Mullet (<i>Liza saliens</i>)" başlıklı makale olarak Biochemistry (Moscow) dergisinde baskıdadır (kabul yazısı ekte verilmektedir).</p> <p>b. 13th International Conference on Cytochromes P450 Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism, Prague, June 29 - July 3, 2003. kongresinde "Distribution of Glutathione S-Transferases in Mullet (<i>Liza saliens</i>)" başlıklı bildiri olarak sunulmuştur.</p>
11. Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu :	Gizli <input type="checkbox"/> Gizli Değil <input checked="" type="checkbox"/>