

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**FARKLI SIĞIR IRKLARINDAN ELDE EDİLEN SPERM
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMLERİNİN AĞIR
METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE BOZKURT

BALIKESİR, EKİM- 2017

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**FARKLI SIĞIR IRKLARINDAN ELDE EDİLEN SPERM
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMLERİNİN AĞIR
METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE BOZKURT

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN. (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Nahit GENÇER

Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE

BALIKESİR, EKİM 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Özge BOZKURT tarafından hazırlanan “**FARKLI SIĞIR IRKLARINDAN ELDE EDİLEN SPERM GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMLERİNİN AĞIR METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 12.10.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye
Doç.Dr. Nahit GENÇER



Üye
Yrd.Doç.Dr. Başak GÖKÇE



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

FARKLI SIĞIR IRKLARINDAN ELDE EDİLEN SPERM GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMLERİNİN AĞIR METALLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE BOZKURT

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, EKİM - 2017

Son yıllarda, endüstrileşmenin artmasıyla meydana gelen ağır metaller, çevre kirliliğinin yanı sıra; üreme sistemi üzerine olan etkileri büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çalışmada, günümüzde artmakta olan ağır metallerin, Holştayn, Simental, Montofon siğir ırklarının spermelerinden elde edilen Glutasyon S-transferaz (GST) (EC2.5.1.18) enzimleri üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Araştırmamızda; Ag^+ , Cd^+ , Cu^+ , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} ağır metallerinin sperm Glutasyon S-transferaz enzim aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda Fe^{+2} , Simental sperm Glutasyon S-transferaz üzerinde aktivatör etkisi gösterdiği bulunmuştur. Fe^{+2} hariç araştırmamızda kullanılan Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^+ , Ca^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} söz konusu enzimleri inhibe ettiği bulunmuştur. Holştayn sperm Glutasyon S-transferaz enzimi için Cd^{+2} , Hg^{+2} en güçlü inhibitörler olarak bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELE: glutasyon s-transferaz, ağır metal, sperm, inhibisyon.

ABSTRACT

AFFINITY TO SOME HEAVY METALS OF SPERM GLUTATION S-TRANSFERASE ENZYMS FROM DIFFERENT CATTLE BREEDS

MSC THESIS

ÖZGE BOZKURT

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

(SUPERVISOR:PROF.DR.OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, OCTOBER 2017

In recent year, increased level of heavy metals production by rising industrialization causes not only enviromental pollution, but also a health problem due to their effects on reproduction system. In this study, inhibitory effects of heavy metals were investigated on sperm Glutation S-tansferase (GST, EC 2.5.1.18) enzyme activity from Holstein, Simmentel, Brown Swiss cattle breeds.

Our results showed that heavy metals including Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^+ , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} have an inhibitory effect on sperm Glutation S-tansferase enzyme activity. In this reseach, only Fe^{+2} showed activatory effect on Simmentel sGST. On the other hand, heavy metals used in this study including Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^+ , Ca^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} inhibited all of the enzymes activity in question. It has been found that Cd^{+2} , Hg^{+2} is the strongest inhibitor of Holstein sperm Glutation S-tansferase enzyme.

KEYWORDS:glutathione s-transferase, heavy metal, sperm, inhibition.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Glutasyon S – Transferaz Enzimi	2
1.1.1 GST'nin Yapısı	4
1.1.2 GST Enziminin Dağılımı	6
1.1.3 GST'in Fizyolojik Önemi	7
1.2 Glutasyon S – Transferaz Substratları.....	9
1.3 Glutasyon S-Transferaz Fonksiyonu ve Zehirsizleştirme Mekanizması.....	10
1.4 Ağır Metallerin Toksikitesi	12
2. MATERYAL VE METOD.....	13
2.1 Materyaller.....	13
2.1.1 Araştırmada Kullanılan Sığır Spermlerinin Elde Edilmesi	13
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	14
2.1.4 Araştırmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	14
2.2 METOD	16
2.2.1 Glutasyon S-Transferaz Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi	16
2.2.2 IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	16
3. BULGULAR.....	18
3.1 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Hg ⁺² 'nin Etkisinin Belirlenmesi	20
3.1.1 Hg ⁺² 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	20
3.1.2 Hg ⁺² 'nin Simental Sperm GST üzerine Etkisi	21
3.1.3 Hg ⁺² 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	22
3.2 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Ag ⁺ 'nin Etkisinin Belirlenmesi	24
3.2.1 Ag ⁺ 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	24
3.2.2 Ag ⁺ 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi.....	25
3.2.3 Ag ⁺ 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	26
3.3 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Cd ⁺² 'nin Etkisinin Belirlenmesi	28
3.3.1 Cd ⁺² 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	28
3.3.2 Cd ⁺² 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	29
3.3.3 Cd ⁺² 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	30
3.4 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Cu ⁺² 'nin Etkisinin Belirlenmesi	32
3.4.1 Cu ⁺² 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi.....	32
3.4.2 Cu ⁺² 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	33
3.4.3 Cu ⁺² 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	34

3.5	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Ca^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi.....	36
3.5.1	Ca^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	36
3.5.2	Ca^{+2} ' nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	37
3.5.3	Ca^{+2} ' nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi	38
3.6	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Pb^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi.....	40
3.6.1	Pb^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	40
3.6.2	Pb^{+2} ' nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	41
3.6.3	Pb^{+2} ' nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	41
3.7	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Zn^{+2} 'nın Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.7.1	Zn^{+2} 'nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	43
3.7.2	Zn^{+2} 'nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	44
3.7.3	Zn^{+2} 'nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi	45
3.8	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Co^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi.....	47
3.8.1	Co^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi	47
3.8.2	Co^{+2} ' nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi.....	48
3.8.3	Co^{+2} ' nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	48
3.9	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Mn^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi.....	50
3.9.1	Mn^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi.....	50
3.9.2	Mn^{+2} ' nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi.....	51
3.9.3	Mn^{+2} ' nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi	52
3.10	Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Fe^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi.....	54
3.10.1	Fe^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi.....	54
3.10.2	Fe^{+2} ' nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi	55
3.10.3	Fe^{+2} 'nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi.....	56
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
5.	KAYNAKLAR	61

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: GST Pi enziminin 3 boyutlu yapısı. (Oakley ve diğ.,1997).....	4
Şekil 1.2: Dimerik GST molekülünün iki aktif bölgesinin şematik gösterimi... 5	5
Şekil 1.3: GST' ın yapısı.	5
Şekil 1.4: 1- Aflotoksin B1= 8,9-epoksit, 2- Benzilizotiyosiyanat, 3-Dibrometan,	9
Şekil 1.5: GST substratı (CDNB).....	10
Şekil 1.6: Biyotransformasyon mekanizmasının şematik gösterimi [2].....	11
Şekil 3.1: Hg ⁺² ,nın hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi	20
Şekil 3.2: Hg ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	21
Şekil 3.3: Hg ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi	22
Şekil 3.4: Ag ⁺ ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	24
Şekil 3.5: Ag ⁺ ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	25
Şekil 3.6: Ag ⁺ ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	26
Şekil 3.7: Cd ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	28
Şekil 3.8: Cd ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	29
Şekil 3.9: Cd ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	30
Şekil 3.10: Cu ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	32
Şekil 3.11: Cu ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	33
Şekil 3.12: Cu ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	34
Şekil 3.13: Ca ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	36
Şekil 3.14: Ca ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	37
Şekil 3.15: Ca ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	38
Şekil 3.16: Pb ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	40
Şekil 3.17: Pb ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	41
Şekil 3.18: Zn ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	43
Şekil 3.19: Zn ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	44
Şekil 3.20: Zn ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	45
Şekil 3.21: Co ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	47
Şekil 3.22: Co ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	48
Şekil 3.23: Mn ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	50
Şekil 3.24: Mn ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	51
Şekil 3.25: Mn ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	52
Şekil 3.26: Fe ⁺² ,nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.....	54
Şekil 3.27: Fe ⁺² ,nın, ssGST üzerindeki aktivasyon etkisi.	55
Şekil 3.28: Fe ⁺² ,nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.3: Cd^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	27
Tablo 3.4: Cu^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	31
Tablo 3.5: Ca^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	35
Tablo3.6: Pb^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	39
Tablo 3.8: Co^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	46
Tablo 3.9: Mn^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	49
Tablo 3.10: Fe^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.....	53

SEMBOL LİSTESİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklama</u>
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S- Transferaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
ALT	Alenin amino transferaz
AST	Aspartat amino transferaz
GSTT1	Glutasyon s-transferaz theta 1
HCl	Hidroklorik asit
CDNB	1-kloro, 2,4 -dinitro benzen
sGST	Sperm glutasyon S transferaz
hsGST	Hoşayn sperm Glutasyon S transferaz
msGST	Montofon Glutasyon S transferaz
ssGST	Simentel Glutasyon S transferaz
GSTM1	Mu tipi Glutasyon S transferaz
GSTT1	Teta Glutasyon S transferaz
GSTP1	Pi Glutasyon S transferaz

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, engin bilgileriyle bana yol gösteren, değerli bilgilerine her başvurduğumda benim her sorumu sabırla yanıtlayan değerli hocam sayın Prof.Dr. Oktay Arslan'a,

Çalışmam sırasında yakınlığını ve desteğini her zaman hissettiğim ve bana tezimin her aşamasında yardımlarının esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Serap Beyaztaş Uzunoğlu'na,

Beni iki yıl boyunca hep destekleyip her anımda yanımda olan, zora düştüğümde bana hep varlığını hissettiren canım dostum Tuğçe Beyçiç'e,

Ve bütün bir eğitim hayatımın yanı sıra hayatımdaki kararlarımda bana yol gösterip destekleyip bana hep güvendiklerini hissettiren AİLEM'e ve EŞİM'e teşekkürlerimi borç bilirim.

1. GİRİŞ

Canlı organizmalar, gıda maddeleri dışında birçok kimyasal bileşiklere maruz kalırlar. Ksenobiyotik denilen bu kimyasallar, organizmayı etkileyerek birçok toksik etkiye sebep olurlar. Bu maddelerden bir bölümünün ise karsinojenik etkilere sahip olduğu bilinen bir gerçektir. Bu bileşiklerin canlı organizmalar üzerindeki oluşturduğu tehlike son yüzyılda çok daha fazla artmıştır. Özellikle bitkisel ve fungal kaynaklı doğal toksinlerin yanında yapay bileşik enflasyonu, yaşadığımız bu günlerde konunun önemini her geçen gün artırmaktadır [1]. Canlı organizmalarda bu büyük tehdide karşı, mükemmel işleyen bir mekanizma inşa edilmiştir. Bu süreç, yakalama, modifiye etme, bağlama ve dışarı atma genel stratejisi ile toksik kimyasal türlere karşı biyokimyasal koruma mekanizmasını kapsar. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu denen bu süreçte birbiri ile senkronize çalışan enzim sistemleri dikkat çekmektedir. Bu süreçte genel olarak ksenobiyotiklerin detoksifikasyon işlemi gerçekleşir. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, üç farklı fazda cereyan eder. Faz I ile ifade edilen bu aşamada, sitokrom P450 enzim sistemi ile apolar toksik bileşikler, oksidasyon başta olmak üzere bir seri reaksiyonlar ile daha polar bileşiklere dönüştürülür [2]. Söz konusu bileşiklerin, hem organizmadan atılması kolaylaşırken hem de çoğu durumda toksitesini düşürülür. Aynı zamanda faz II aşaması için ilgili moleküllerde uygun bir fonksiyonel grup hazırlanır [3].

Faz II enzimleri ise, Faz I ile aktifleştirilmiş ksenobiyotiklerin, glutatyon, UDP-glukouronik asit ve glisin bileşikleriyle arasındaki konjugasyon reaksiyonlarını katalizler. GST tarafından katalizlenen indirgenmiş glutatyon ile ksenobiyotikler arasındaki konjugasyon reaksiyonu Faz II de en temel süreçlerden birisidir [4]. GST bir çok nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonları, ketonlara ve epoksitlere katılma reaksiyonlarını katalizler. Ayrıca GST, hidroperoksitlerin indirgeme reaksiyonlarını da katalizler. Ancak bu reaksiyon sonucu glutatyon konjugatı değil yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oluşur.

Suni tohumlama amacı ile spermelerin dondurulması uzun yıllardan beri bilinen bir gerçektir. Ancak bu süreçte en önemli sorunlardan birisi reaktif oksijen türleri (ROS) artarken antioksidant enzimlerin aktivitesi düşmektedir. Sonuç olarak oksidatif stres oluşur. Sperm

hücre membranları diğer hücrelere göre daha fazla doymamış yağ asidi rezidüsü içermeleri nedeni ile oksidatif hasarlara karşı daha hassas olduğu bilinmektedir. Sperm hücreleri bu nedenle güçlü antioksidant sistem içermektedir. Bu sistemde birçok enzim antioksidant olarak işlev görmektedir. Sperm hücre membranına bağlı glutatyon-S-transferaz (sGST), en önemli enzimlerden birisidir. Bu nedenle söz konusu enzimin aktivitesini etkileyen parametreler fertilizasyon için son derece önemlidir [5].

Diğer yandan birçok bileşik ve ağır metal GST aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Özellikle ağır metallerin, enzimin üç boyutlu yapısını etkilemesi dışında ROS üretiminin başlıca sorumlusu olmaları konunun önemini daha da artırmaktadır. Bu nedenle GST, birçok farklı kaynaktan saflaştırılmış ve aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisi incelenmiştir. Ancak ağır metallerin sGST aktivitesini nasıl etkilediği konusunda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Fertilizasyon için son derece önemli olan sGST üzerinde ağır metallerin etkisinin bilinmesinin önemli olacağı kanaatindeyiz.

1.1 Glutatyon S – Transferaz Enzimi

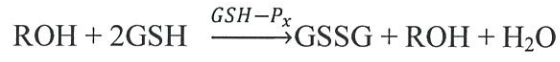
Barnes ve ark. ile Brey tarafından, 1959 yılında glutatyon konjugatlarının GST enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlarını gözlemledikleri görülmüştür. 1961 yılında memelilerde glutatyon s-transferazlar'ın yapısı hakkında ilk bilgiler, fare karaciğerindeki glutatyon konjugasyonunun gözlenmesi üzerine ortaya çıkmıştır. Habig ve ark. tarafından 1974 yılında GST ilk defa saflaştırılmıştır [6]. Bir GST'nin üç boyutlu yapısı ise 1991'de domuz akciğerinden saflaştırılan enzim üzerindeki yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur. 1992 yılında GST plasentadan saflaştırılmış ve üç boyutlu yapısı incelenmiştir [7] .

GST izoenzimleri, farklı yollarla organizmaya giren ksenebiyotiklerin biyotransformasyonunda anahtar rol oynadığı bulunmuştur [8]. Glutatyon (glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşmuş tripeptiddir. Glutatyon GSH olarak ifade edilir; SH sisteinin sülfidril grubunu gösterir ve molekül alışverişi yapan bölümüdür. GST, glutatyon tiyol (-SH) grupları ile ksenebiyotiklerin elektrofilik merkezine transfer reaksiyonunu katalizler. GST araşidonat ve lineolat olmak üzere birçok doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı antioksidant aktivite gösterdiği bulunmuştur (GSH-Px). Bu etki

sonucu GSH, GSSG'ye yükseltgenir. Söz konusu reaksiyon glutatyon peroksidaz enzimi tarafından da katalizlendiği bilinmektedir. Bu nedenle glutatyon peroksidaz aktivitesi “Selenyumdan bağımsız peroksidaz aktivitesi” şeklinde tanımlanır [9,10,6].

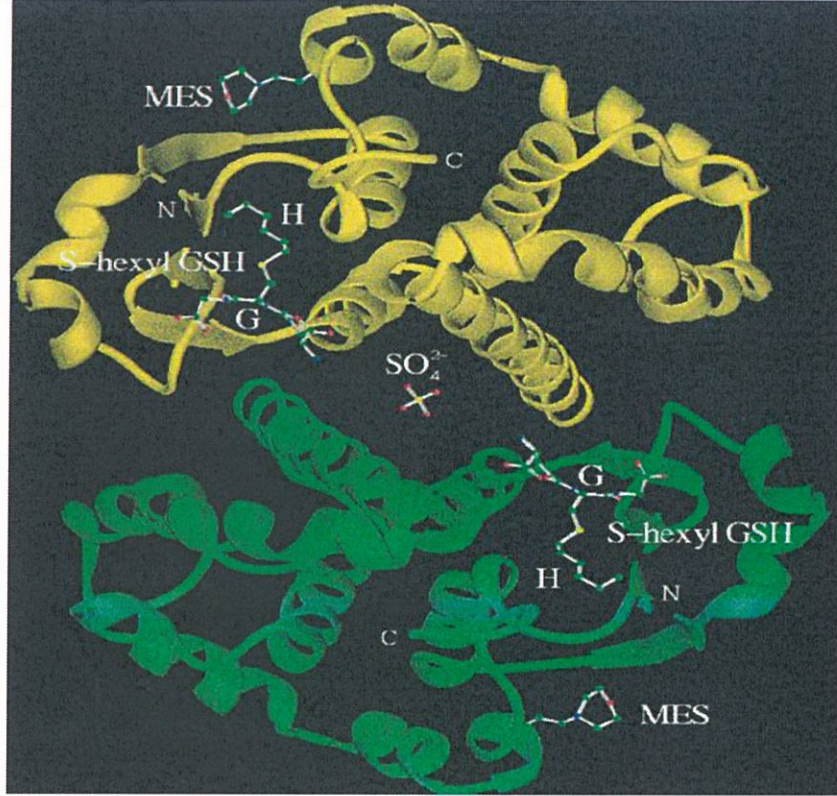
GST'nin peroksidaz aktivitesi organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda oldukça önemlidir. Çünkü diğer peroksidaz aktivitelere sahip enzimler genel olarak selenyum içerirler. GST'nin hidrojen peroksit bileşiğinden daha ziyade organik hidroperoksitlere karşı ilgisi daha yüksektir [11].

GST' ler lipit hidroperoksitlere karşı Se-bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesini şu şekilde gösterirler [12].



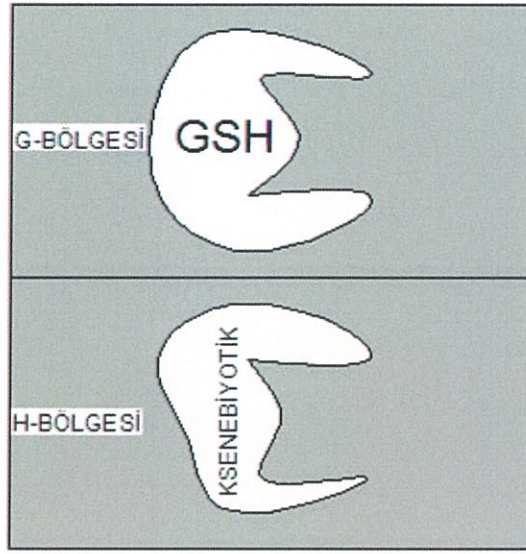
1.1.1 GST'nin Yapısı

GST, hücreyi ksenebiyotiklerin ve ROS'ların etkisinden koruyan çok fonksiyonlu polimorfik bir izoenzim ailesidir [13].



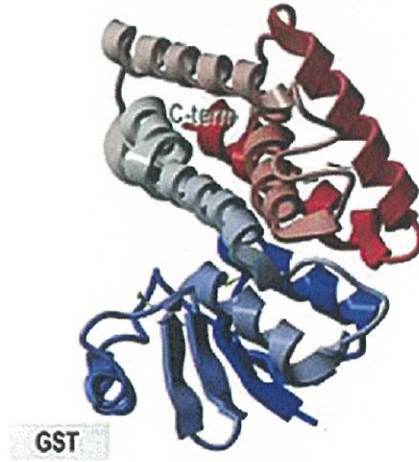
Şekil 1.1: GST Pi enziminin üç boyutlu yapısı [13].

Bu enzimler, canlı organizmalarda heterodimer veya homodimerik yapılarda bulunur [2]. Alt birimlerinin molekül ağırlığı 23-27 kDa arasında değişirken, izoelektrik noktaları 4.8-4.9 değerleri arasında olduğu bulunmuştur. Alt birimleri yaklaşık 200 ile 240 aminoasit rezidüsü içerirler [14]. GST'nin üç boyutlu yapısında en dikkat çeken özellik 2 farklı domaine sahip olmasıdır [10]. Bu domainlerden biri 3 α -heliks ve 1 β -kırmalı tabaka yapısında düzenlenmiş olan 80 aminoasit rezidüsünün oluşturduğu GSH bağlanma bölgesidir (G bölgesi). Diğer domain ise N- terminal bölgede oluşan hidrofobik elektrofil bileşiklerin bağlanması için spesifik bir bölgedir (H-bölgesi). Bunun dışında kalan 5 ve 6 heliks yapıları karboksil terminal bölgeyi oluşturur (C terminal) [2,15].



Şekil 1.2: Dimerik GST molekülünün iki aktif bölgesinin şematik gösterimi.

GST, çok substratlı enzim özelliği gösterir. Bir enzim molekülünü oluşturan her iki alt birim aktif merkezinde iki farklı işlevsel bölge bulunmaktadır [8].



Şekil 1.3: GST' in yapısı [8].

GST birçok hidrofobik substratların H bölgesine bağlanabildiği için çok substratlı enzim olarak tanımlanır [8]. GST enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiştir.

1.1.2 GST Enziminin Dağılımı

GST enzimi doğada kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, balıklar, kuşlar, maya, bakteriler ve memelilerde bulunur. Ama en çok da insanlarda ve sıçanlarda çalışılmıştır [16].

Genel olarak 3 sitozolik ve birde mikrozomal olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar. Ancak; enzimin en çok bulunan formları, hetero veya homodimerik yapıda olan sitoplazmik GST'lerdir [17].

GST genlerince kodlanan GST enzimleri birçok çevre kirletici kimyasalların ve doğal olarak meydana gelen çok sayıda toksik metabolitin detoksifikasyonundan sorumlu olduğu için bakteriler dahil hemen hemen tüm canlılarda bulunur [18].

GST enzimleri, sitozolik ve membrana bağlı olarak iki grupta incelenmektedir. Omurgalılarda yedi sınıftan meydana gelen sitozolik GST tespit edilmiştir: zeta (ζ), theta, pi (π), sigma (σ), kappa (κ), alfa (α) ve mü (μ). Bu sınıflama işleminde en önemli kriter yapısal farklılıklardır. Ayrıca türlere göre özel sınıflandırmalarda yapılmıştır. Bir sınıf içinde bulunan farklı GST'ler en az % 40, sınıflar arası en az % 30 aminoasit benzerlikleri gösterirler [14, 7].

GSTM1 mü (μ) sınıfında yer almaktadır. Kromozom 1p13, 3' de yer alır. Beyin, adrenal, böbrek, akciğer ve karaciğerde ekspre edilir [14]. GSTM1'in null ve yabancı tipi olmak üzere iki genotipi bulunmaktadır. Null tipinde gen delesyonu bulunması sebebiyle bu tipe sahip allel proteini ürünü vermez [19]. Null tipi ülkemizde % 55-61 oranda görülürken çeşitli popülasyonlarda % 50-74 sıklıkta görüldüğü rapor edilmiştir [19].

GSTT1 theta (θ) sınıfında görülmektedir ve 22q11.23'de lokalizedir. İnce bağırsak, böbrek, karaciğer, prostat, beyin ve akciğerde ekspresse olur. GSTT1 DNA, etilen oksit ve okside lipidleri substrat olarak kullanır [20]. GSTT1'inde null ve yabancı tipi olmak üzere allelleri vardır. Null genotipi popülasyonda % 25-47'dir [21, 22]. Null tipinde gen delesyonu olup protein ürünü bulunmamaktadır.

GSTP1 pi (π) sınıfında bulunmakta ve kromozom 11p13.3'de lokalizedir. Pankreas, testis, beyin, akciğer ve kalpte bulunmaktadır. DNA oksidasyonundan oluşmuş baz profenolleri (adenin, prefenol, timin) benzofenantren, benzoprin, lipid ve DNA oksidasyon ürünlerini detoksifiye eder [14]. GSTP1'in dört alleli vardır ve bunlar 105 ve 114'deki aminoasitlerin farklılıklarına göre adlandırılırlar [14]. 114. aminoasitte sitozin yerine timin

olduğu zaman ürün alaninin yerine valin olur, fakat bu 114. aminoasit katalitik bölgede bulunmadığı için detoksifikasyonda önemi bulunmamaktadır [23]. Katalitik bölgede bulunan aminoasit ise 105. aminoasittir [19]. 105. aminoasiti kodlayan adeninin guanin olması nedeniyle ürün izolösün yerine valin olur [21]. Bu değişimlerin enzim fonksiyonu üzerine çeşitli etkileri bulunmaktadır [24, 25].

GST aktivitesi insanların tüm dokularında bulunmaktadır. Sıçanlarda yapılmış olan çalışmalarda birçok dokuda cGST'lerin bulunmamasıyla birlikte en yüksek konsantrasyonları karaciğer ve testislerde tespit edilmiştir. cGST'lerin seviyeleri üzerinde birçok enzim indükleyicisinin azda olsa küçük arttırıcı etkileri bulunmaktadır. Örnek olarak fenobarbital, benzo(a)piren ve etanol gibi. Her bir dokuda, dokuya spesifik GST izoenzim grubu mevcuttur ve çeşitli izoenzimler farklı miktarlarda ifade edilmektedir. Herhangi bir dokudaki hücre tiplerinde GST alt ünite profilleri özellikle gelişme döneminde değişebilmektedir. Örnek olarak sıçan ve insanlar fetal hepatositlerinde GSTP1-1 oldukça yüksek seviyede ifade edilebilirken yetişkin hepatositlerinde normal olarak bile ifade edilememektedir.

Suni tohumlama hayvan yetiştiriciliğinde yıllardan beri uygulanan bir yöntemdir [26]. Bu şekilde, cinsel yollardan bulaşan birçok hastalığı önlediği gibi genetik iyileştirmeler içinde son derece kullanışlı bir yöntemdir. Bu konuda literatürde birçok çalışma mevcuttur [27].

Bu amaçla sperm dondurma işleminde antioksidant kapasitesi düştüğü gibi ROS miktarları da önemli ölçüde artmaktadır [28]. Bunun dışında sperm hücreleri oksidatif stresle karşı karşıya kalır. Ancak sperm hücre membranına bağlı GST enziminin varlığı oldukça dikkat çekicidir [29]. Söz konusu enzim birçok kaynaktan saflaştırılmış ve bazı özellikleri incelenmiştir [30, 31, 32, 33].

1.1.3 GST'ın Fizyolojik Önemi

Ksenebiyotiklerin transformasyonunda GST aktivitesi Faz II aşamasında anahtar role sahiptir. Söz konusu enzim bölüm 1.1.1'de belirtildiği gibi iki farklı domain ile GSH ve hidrofobik yapıya sahip elektrofilik substratlarla kongugasyon reaksiyonunu katalizler.

Reaksiyon sonucu oluşan glutatyon konjüгатının polaritesi arttığı gibi genel olarak toksiteside düşer. Bu şekilde söz konusu hidroforik ksenebiyotik organizmadan uzaklaştırılır.

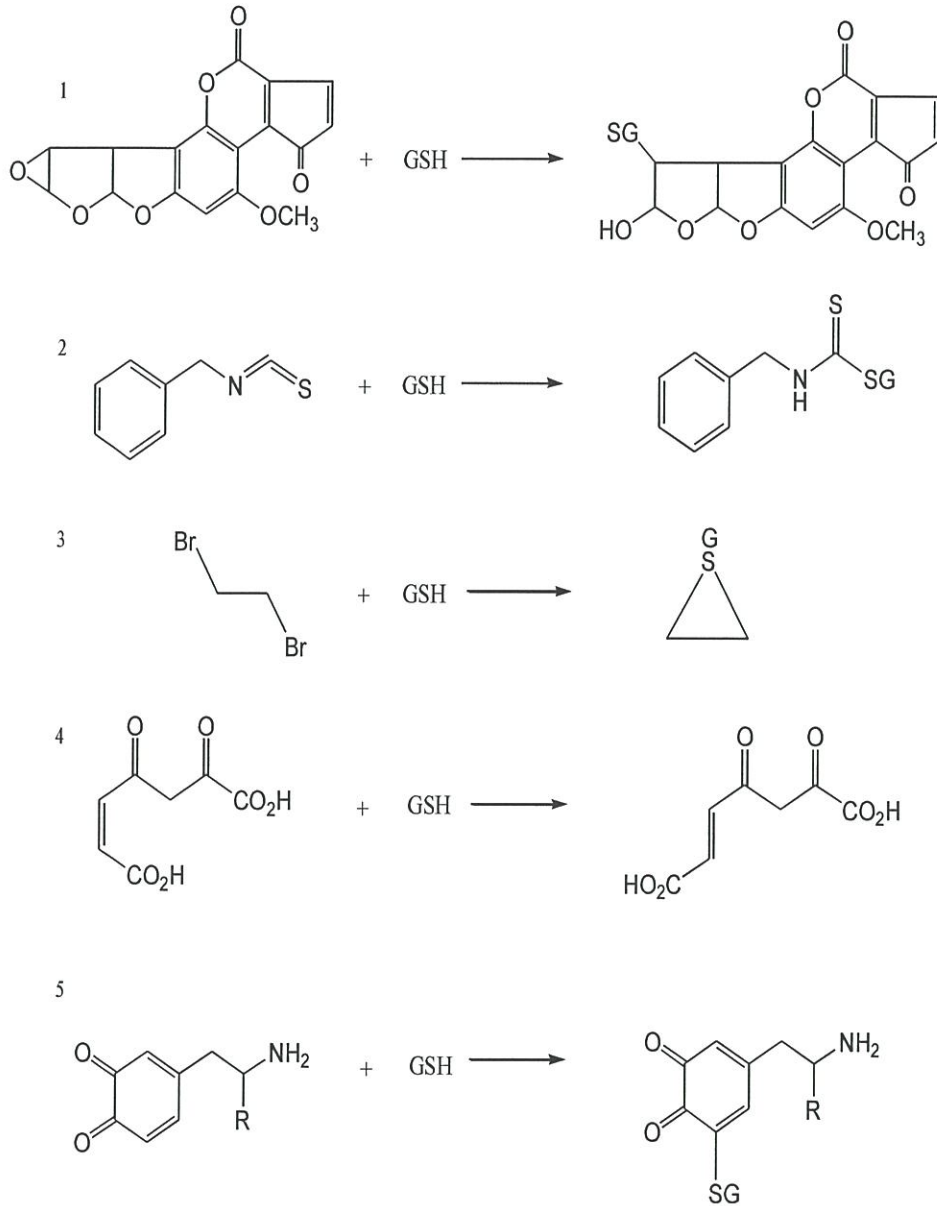
Çevre kirliliğinin her geçen gün arttığı günümüzde besin zinciri ile alınan ksenebiyotiklerin bu şekilde etkisiz hale getirilmesi birçok hastalığa karşı organizmanın en önemli direnç noktasıdır. Enzimin bu aktivitesi ile birçok ilacın organizmadan uzaklaştırılmasında hayati öneme sahiptir. Bu nedenle GST'nin ilaç metabolizmasında da önemli fizyolojik fonksiyona sahip olduğu söylenebilir.

GST'nin bir diğer önemli fizyolojik fonksiyonu antioksidant aktivitesidir. Söz konusu enzim birçok organik peroksitlerin parçalanma reaksiyonunu katalizler. Diğer peroksitler gibi selenyum bağımlı olmaması son derece önemlidir. Enzimin selenyum bağımsız bu antioksidant aktivitesi, birçok organizmayı oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Ancak, bu aktivite sonucu GSH, GSSG' ye dönüşür [34]. ROS'lar hemen hemen her organizmada oluşur ve canlı için en büyük tehditlerden birisidir [35]. Bu bileşikler birçok hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonunu gerçekleştirirler. Ayrıca, çok sayıda biyomolekülün oksidasyonundan sorumludur. GST, ROS'ların oluşturduğu birçok organik peroksidi parçalaması son derece önemlidir.

GST aynı zamanda biyolojik olarak önemli birçok molekülün izomerizasyonunda da önemli role sahiptir. Transferaz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile cis-trans izomerleşme reaksiyonlarını katalizlediği gibi polisiklik moleküller içinde bulunan çift bağların pozisyonunu da değiştirebilir. En önemli örneklerden birisi 13-cis-refinoik asitin trans-refinoik asite dönüşmesi sonucu reseptöre karşı söz konusu bileşiğin afinitesini artırır. Ayrıca, GST söz konusu aktivitesi ile tirozin metabolizmasında da önemli role sahip olduğu tespit edilmiştir [36, 37, 38].

1.2 Glutasyon S – Transferaz Substratları

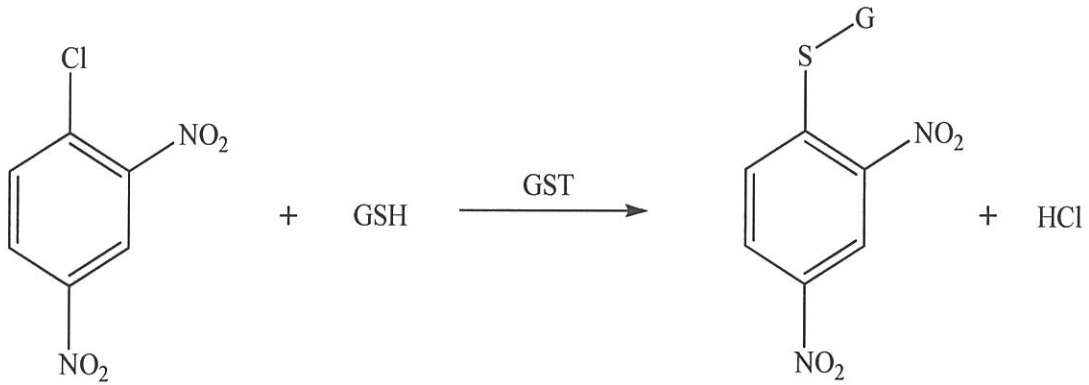
GST bölüm 1.1.1’de belirtildiği gibi birçok hidrofobik substratlara GSH’ın transfer reaksiyonunu katalizler. Bu bileşikler organizmaya zarar verebilen hidrofobik karaktere sahip çok sayıda bileşiklerdir. Söz konusu bileşikler arasında aflotoksin B1= 8,9-epoksit, benzilizotiyosiyanat, dibrometan, melailasetoasetat ve o- kinon en önemli örnekler arasındadır.



Şekil 1.4: 1- Aflotoksin B1= 8,9-epoksit, 2- Benzilizotiyosiyanat, 3-Dibrometan, 4- Melailasetoasetat ve 5- O- kinon.

GST' nin önemli reaksiyonlarından birisi de 1-kloro 2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile GSH arasındaki konjugasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyon aynı zamanda GST aktivitesi belirlenmesinde yıllardan beri kullanılmaktadır.

GST substratları, GST'lerin karakterizasyonu için bir araç görevi üstlenirler. GST'ler için substrat görevi yapan bir başka madde ise 2-kloro-5 nitro benzonitrilin olarak bulunmuştur. GSTT1 için diğer spesifik substratlar ise metilbromür, etilen oksit, diklorometan ve p-nitrobenzildir. Diklorometan temizlik maddelerinde, soğutucularda ve boyalarda çözücü olarak kullanılabilen önemli bir endüstriyel bileşiktir. Farelerde bu bileşiğin GSH konjugasyonu ile aktive edilerek karaciğer ve akciğer kanserlerine neden olduğu belirtilmiştir [2].



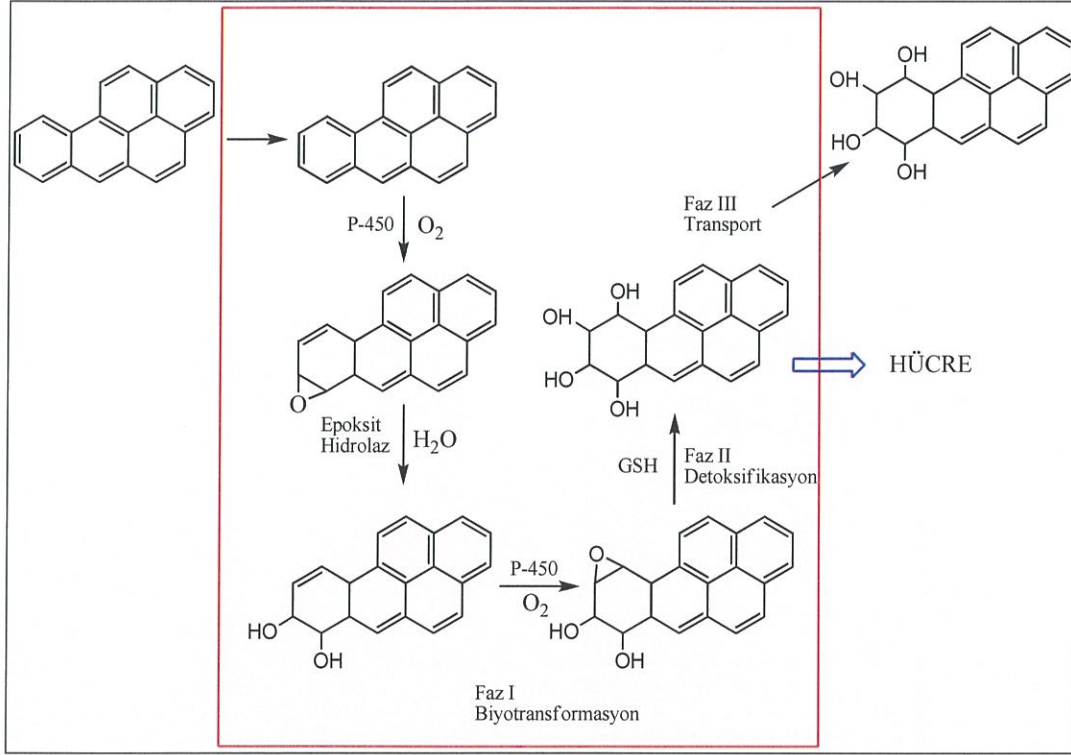
Şekil 1.5: GST substratı (CDNB).

1.3 Glutasyon S-Transferaz Fonksiyonu ve Zehirsizleştirme Mekanizması

Faz I ile ifade edilen bu aşamada, sitokrom P450 enzim sistemi ile apolar toksik bileşikler, oksidasyon başta olmak üzere bir seri reaksiyon ile daha polar bileşiklere dönüştürülür. Söz konusu bileşiklerin, hem organizmadan atılması kolaylaşırken hem de çoğu durumda toksitesi düşürülür. Aynı zamanda faz II aşaması için ilgili moleküllerde uygun bir fonksiyonel grup hazırlanır [4].

Faz II enzimleri ise, Faz I ile aktifleştirilmiş ksenobiyotiklerin, glutasyon, UDP-glukouronik asit ve glisin bileşikler arasındaki konjugasyon reaksiyonlarını katalizler. GST tarafından katalizlenen indirgenmiş glutasyon ile ksenobiyotikler arasındaki konjugasyon

reaksiyonu Faz II de en temel süreçlerden birisidir. GST bir çok nükleofilik aromatik sübstitüsyon reaksiyonlarının, ketonlara ve epoksitlere katılma reaksiyonlarını katalizler.



Şekil 1.6: Biotransformasyon mekanizmasının şematik gösterimi [2].

Biotransformasyonda görev yapan enzimlerin aktiviteleri sırasındaki hasarlar enzimin bloke olmasına neden olur ve toksik bileşikler de bu yüzden organizmaya zarar verir. Ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki Faz I ve Faz II reaksiyonları, lipofilik ve non-polar bir bileşiğin, hücreler tarafından daha kolay elimine edilen suda çözünür ve daha az toksik metabolite dönüşümünü içerir. Faz I reaksiyonları sitokrom P450 sistemi tarafından kataliz edilir. Faz II ise glutatyon, enzimler, glisin, UDP – glukronik asit gibi endojen suda çözünür maddelere indirgemek için aktive edilmiş olan ksenobiyotiklerin konjugasyonunu kataliz eder [2]. GST enzimleri memelilerde ise Faz II zehirsizleştirme enzimleri olarak görev yaparlar. Biz GST üzerine ağır metallerin etkisini çalıştık.

1.4 Ağır Metallerin Toksititesi

Doğada bulunan bazı metaller belli bir doza kadar canlı organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için gereklidir [39]. Metal iyonlarının büyük bir kısmı birçok enzimin aktivitesi için gereklidir. Bu nedenle, bu metaller biyokimyasal olayların yürütülebilmesini sağlayan temel elementlerdir [40]. Bunların biyolojik fonksiyonları olmadığı gibi su ortamında belirli limitlerin dışına çıktığı zaman toksik etki yapıp organizmanın canlılığına son verebilirler [41].

Metalleri, insanlar çok eski zamanlardan beri işleyip kullanmaktadırlar [42]. Bu faaliyetler sonucunda metaller doğal halleri dışında değişik formlarda doğaya yayılmaya başlamışlardır [43]. Bu metallerin doğal kaynaklardan, erozyon, volkanik ve jeolojik faaliyetler, insan faaliyetleri veya yangınlar sonucunda; evsel atıklar, maden arama, işleme, endüstriyel atıklar ve tarımsal faaliyetler ile derişimleri artar. Ağır metallerin bu şekilde çeşitli kaynaklardan çevreye yayılması nedeniyle çevre kirliliği ve zehirlenmeler meydana gelmektedir. Ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk zehirlenme tanısı Japonya’da ortaya çıkmıştır [39]. Herhangi bir metale ağır metal tanımı koyulabilmesi için fiziksel özellikleri açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ’ten daha yüksek olması gerekir.

Ağır metallerde toksik madde içerenler, özellikle çinko (Zn), nikel (Ni), kurşun (Pb) ve bakır (Cu) toprak yüzeyine yüksek konsantrasyonda lağım suyu içeren sulu çamur bırakırlar, bunlar gıda zincirine taşınabilir, toksititesi yüksek olduğundan dolayı, hayvan ve insan sağlığı ve ürün üretimi üzerinde bir tehdit oluşturabilir [44].

Ağır metaller genel olarak doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı yolla toksik etki gösterirler. Çoğu ağır metal enzimlerin tiyol gruplarıyla yada başka bölgeleriyle etkileşerek onların aktivitelerini önemli ölçüde değiştirirler. Bu nedenle ağır metallerin birçok enzim üzerinde etkileri araştırılmıştır [45]. Bu enzimlerin bir kısmının DNA, RNA ve protein sentezinde rol alması konunun önemini daha da arttırmaktadır [46]. Ayrıca, bazı metaller hücre içine girerek hücrenin bütünlüğüne önemli zararlar verirler [43].

Ağır metaller, metallerin reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde önemli derecede sorumludurlar. Bu olay metallerin doğrudan toksititesinin bir sonucudur. Özellikle geçiş metalleri; moleküler oksijene elektron transfer ederek söz konusu ROS’ ları oluştururlar. ROS’ ların canlı organizmaya verdiği hasar göz önüne alındığında ağır metallerin doğrudan etkisinin önemi daha net ortaya çıkmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyaller

2.1.1 Araştırmada Kullanılan Sığır Spermlerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan Holştayn, Montofon ve Simental sığır ırklarına ait sperm örnekleri, Balıkesir Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliğinden temin edilmiştir. Araştırma laboratuvarımıza sıvı azot içerisinde dondurulmuş halde getirilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1.L- Glutatyon (Sigma-Aldrich)
2. 1-kloro, 2, 4-dinitrobenzen (CDNB) (Sigma-Aldrich)
3. Fosfat tamponu (Sigma-Aldrich)
4. GST enzimi (Sigma-Aldrich)
5. Civa (II) klorür (HgCl)
6. Gümüş (I) klorür (AgCl)
7. Kadmiyum klorür hidrat ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
8. Bakır (II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
9. Kalsiyum (II) klorür (CaCl_2)
10. Kurşun (II) nitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)

11. Çinko nitrat heksahidrat ($N_2O_6Zn \cdot 6H_2O$)

12. Kobalt (II) klorür heksahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)

13. Magnezyum (II) klorür ($MnCl_2$)

14. Demir (II) klorür ($FeCl_2$)

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Hassas Terazî	Precisa XB220A
2. Manyetik Karıştırıcı	Wise Stir MSH-20A
3. pH metre	Hanna pH 221 Microprocessor
4. UV- Spektrofotometre	Biotek Power Wave XS
5. Otomatik pipetler	Thermo ve Eppendorf
6. 96' lık küvet	Hellma

2.1.4 Araştırmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. 0,2M L-Glutatyonun Hazırlanışı: 0,1 g L-Glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözülür ve toplam hacmi saf su ile 5 mL'ye tamamlanır.

2. 0,1 M CDNB' in Hazırlanışı: 0,51 g 1-kloro,2, 4-dinitrobenzen (CDNB) alınarak bir miktar etenol içinde hafif ısıyla beraber çözülür ve toplam hacim etenol ile 25 mL'ye tamamlanır.

3. Kontrol Grubunun Hazırlanışı: 196 ml fosfat tampon, 2 µL L-Glutatyon, 2 µL 1-kloro, 2,4-dinitrobenzen (CDNB) alınarak toplam hacmi 200 µL'ye tamamlanır.

4. 0,01 M $HgCl_2$ ün Hazırlanışı: 0,069 g $HgCl_2$ alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

5. 0,01 M AgCl' ün Hazırlanışı: 0,036 g AgCl alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

6. 0,01 M CdCl₂. H₂O' ın Hazırlanışı: 0,032 g CdCl₂. H₂O alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

7. 0,01 M CuSO₄. 5H₂O' ın Hazırlanışı: 0,062 g CuSO₄. 5H₂O alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

8. 0,01 M CaCl₂' ün Hazırlanışı: 0,028 g CaCl₂ alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

9. 0,01 M Pb(NO₃)₂' ın Hazırlanışı: 0,083 g Pb(NO₃)₂ alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

10. 0,01 M N₂O₆Zn. 6H₂O' ın Hazırlanışı: 0,074 g N₂O₆Zn. 6H₂O alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

11. 0,01 M CoCl₂. 6H₂O' ın Hazırlanışı: 0,060 g CoCl₂. 6H₂O alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

12. 0,01 M MnCl₂' ün Hazırlanışı: 0,040 g MnCl₂ alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

13. 0,01 M FeCl₂' ün Hazırlanışı: 0,041 g FeCl₂ alınarak bir miktar saf suda çözünür ve toplam hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanır.

2.2 METOD

2.2.1 Glutasyon S-Transferaz Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi

Araştırmamızda, GST aktivitesi, 1-kloro 2,4 – dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyon arasındaki kongugasyon reaksiyon hızı ölçülerek spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 180 µl fosfat tamponu (tampon), 7 µl L-Glutasyon (indirgenmiş glutasyon), 3 µl CDNB (substrat) konuldu. 10 µl sperm örneği (enzim) reaksiyon ortamına ilave edildikten sonra 340 nm’ deki absorbanstaki artış spektrofotometrik olarak kaydedildi.

2.2.2 IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Holştayn, Simental ve Montofon ırklarına ait sperm örneklerine ağır metallerin ilgisini bulmak için optimum şartlarda GST substratı olan, CDNB sabit konsantrasyonunda çalışarak IC₅₀ değerleri bulundu. İlk olarak inhibitörsüz enzim aktivitesi tayin edildi. Bu değer IC₅₀ değeri hesaplamasında kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra araştırmamızda kullanılan tüm ağır metallerin 5 farklı konsantrasyonda enzim aktiviteleri tayini yapılmıştır. Söz konusu çalışma Montofon, Holştayn, Simental enzimleri için tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite – [I]x µM grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak her bir ağır metalin, holştayn, simental, montofon sığır ırkları üzerindeki inhibisyon etkileri için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

2.2.2.1 Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Glutasyon S-Transferaz enzim aktivitesi hesaplanırken aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\text{Örnekteki enzim ünitesi}(\mu\text{mol/ml.dk}) = \frac{\Delta A_{340} \times V_{\text{küvet hacmi}}}{\epsilon_{mM} \times V_{\text{enzim}}}$$

Denklem 2.1: GST enzim aktivitesi hesaplama formülü.

ΔA_{340} = Birim zamandaki (dakikadaki) absorbans farkı

$V_{\text{Küvet hacmi}}$ = Reaksiyon karışımının toplam küvet hacmi (mL)

V_{Enzim} = Reaksiyona katılan örnek (enzim) hacmi (mL)

ϵ_{mM} = Absorbsiyon katsayısı ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

3. BULGULAR

Bu çalışmada; insan aktiviteleri, endüstriyel tüketim ve maden cevheri olarak kullanılan on farklı ağır metalin “ *in vitro* ” koşullarda 3 farklı sığır ırkı glutatyon s-transferaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiştir.

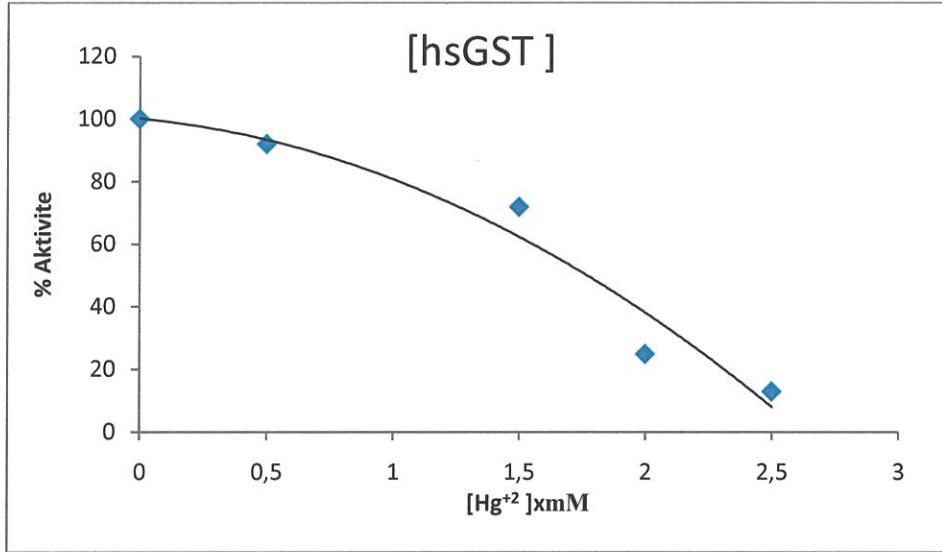
Tablo 3 1: Hg⁺² iyonunun, farklı sığır ırklardaki sGST enzimi üzerindeki inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μ L)	Sığır İrki	Enzim Çözeltisi (μ L)	Substratın Hacmi (μ L)	L-Glutatyon (μ L)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μ mol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,051	0,19
179					0,5	0,047	0,18
177					1,5	0,037	0,14
176					2	0,013	0,05
175					2,5	0,007	0,03
180	Simental	10	3	7	0	0,024	0,10
178					1	0,021	0,08
177					1,5	0,017	0,06
176					2	0,016	0,06
175					2,5	0,015	0,06
180	Montofon	10	3	7	0	0,039	0,15
178					1	0,029	0,11
177					1,5	0,027	0,10
176					2	0,014	0,05
175					2,5	0,013	0,05

3.1 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Hg^{+2} 'nın Etkisinin Belirlenmesi

3.1.1 Hg^{+2} 'nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

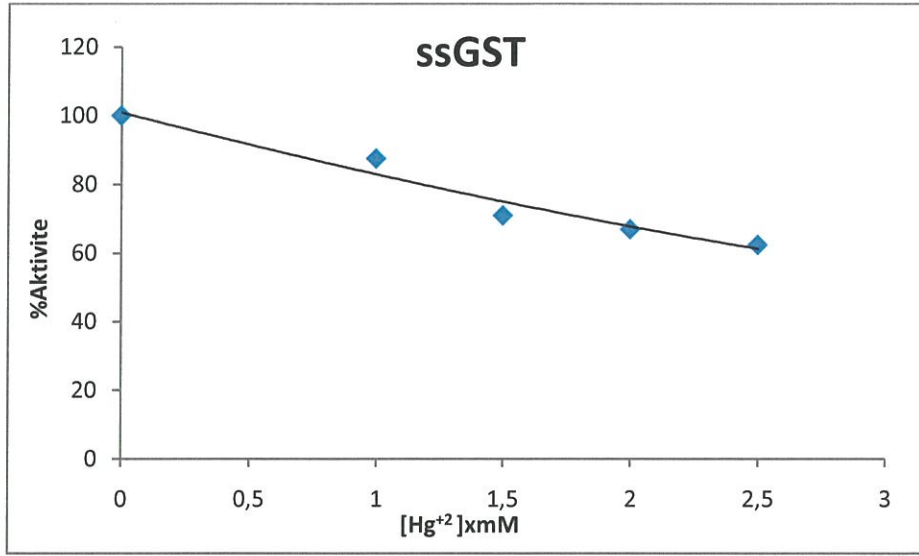
Hg^{+2} 'nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Hg^{+2} 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.1'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.77 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1: Hg^{+2} 'nın hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.1.2 Hg^{+2} 'nin Simental Sperm GST üzerine Etkisi

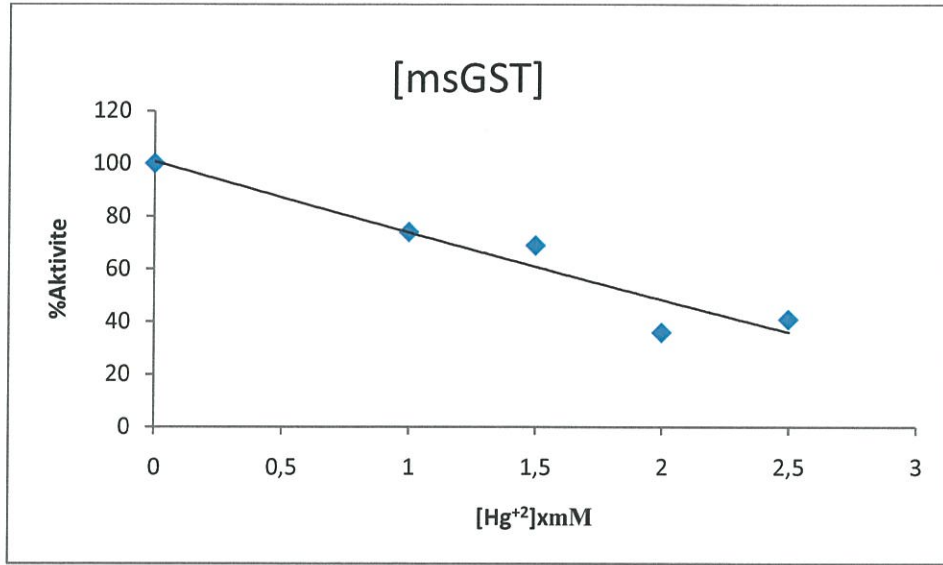
Hg^{+2} 'nin simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma eklenen Hg^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.2'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.72 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2: Hg^{+2} 'nin, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.1.3 Hg^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Hg^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Hg^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.3'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.94 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3: Hg^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

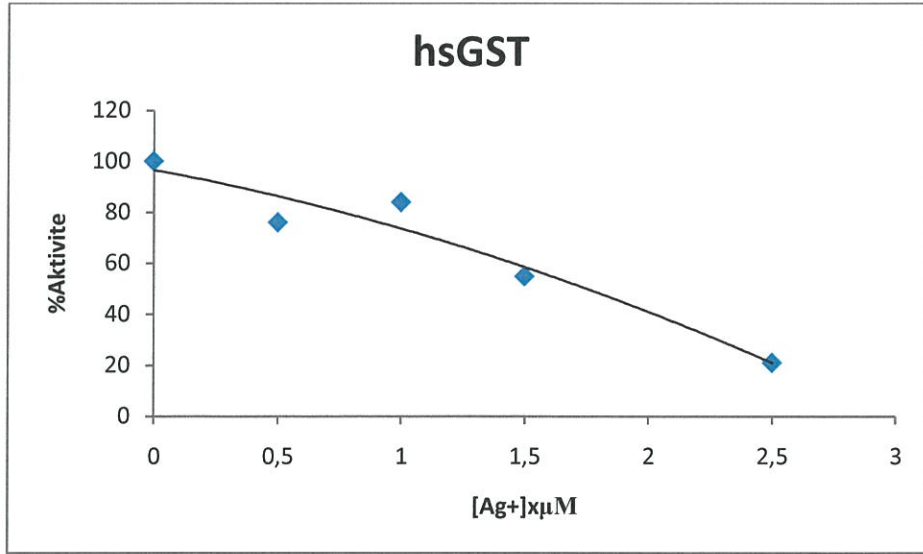
Tablo 3.2: Ag⁺ iyonunun, farklı sığır ırklardaki sGST enzimi üzerindeki inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μL)	Sığır ırkı	Enzim Çözeltisi (μL)	Substratın Hacmi (μL)	L-Glutatyon (μL)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μmol/ ml.dk))
180	Holştayn	10	3	7	0	0,038	0,14
179					0,5	0,029	0,11
178					1	0,032	0,12
177					1,5	0,021	0,08
175					2,5	0,008	0,03
180	Simental	10	3	7	0	0,036	0,14
179					0,5	0,023	0,09
178					1	0,014	0,05
176					2	0,011	0,04
175					2,5	0,005	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,055	0,21
179					0,5	0,028	0,11
177					1,5	0,016	0,06
176					2	0,007	0,03
175					2,5	0,007	0,03

3.2 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Ag^+ 'nın Etkisinin Belirlenmesi

3.2.1 Ag^+ 'nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

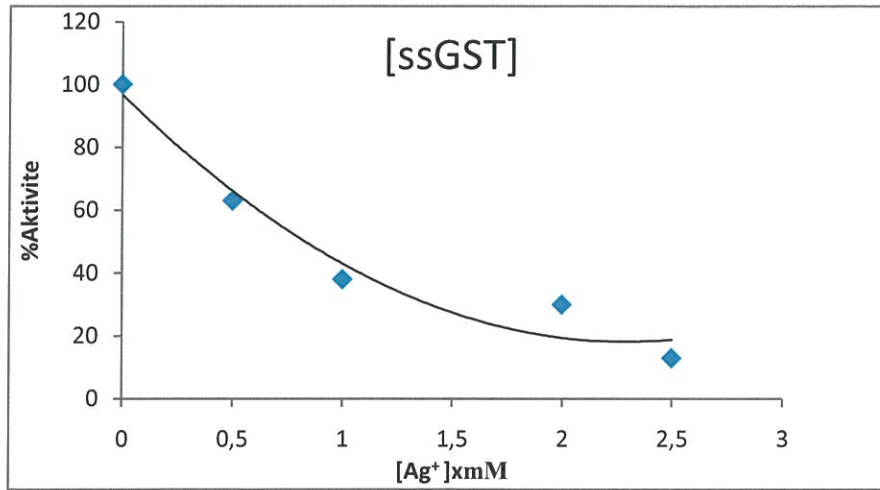
Ag^+ 'nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ag^+ 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.4'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 4.13 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4: Ag^+ 'nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.2.2 Ag^+ 'nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

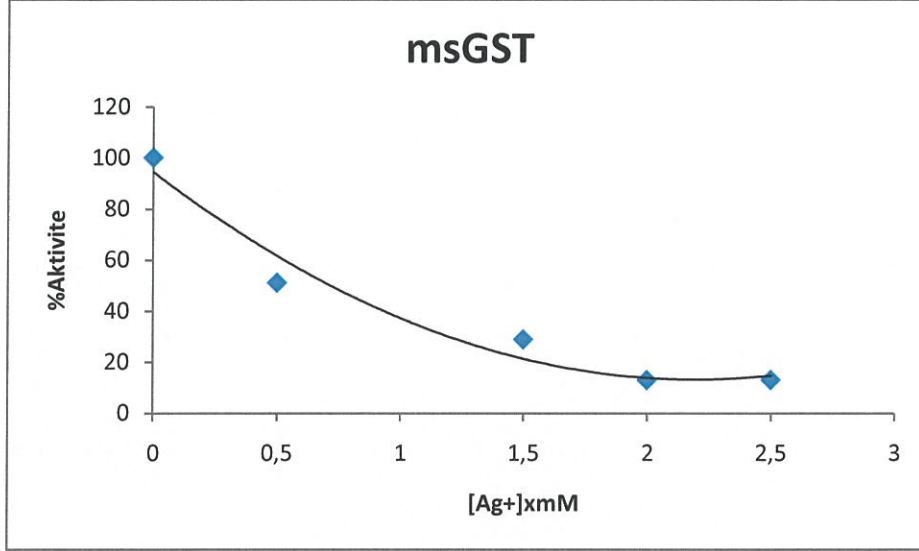
Ag^+ 'nın simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ag^+ 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.5'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.83 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5: Ag^+ 'nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.2.3 Ag^+ 'nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Ag^+ 'nın montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ag^+ 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.6'da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 3.71mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6: Ag^+ 'nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

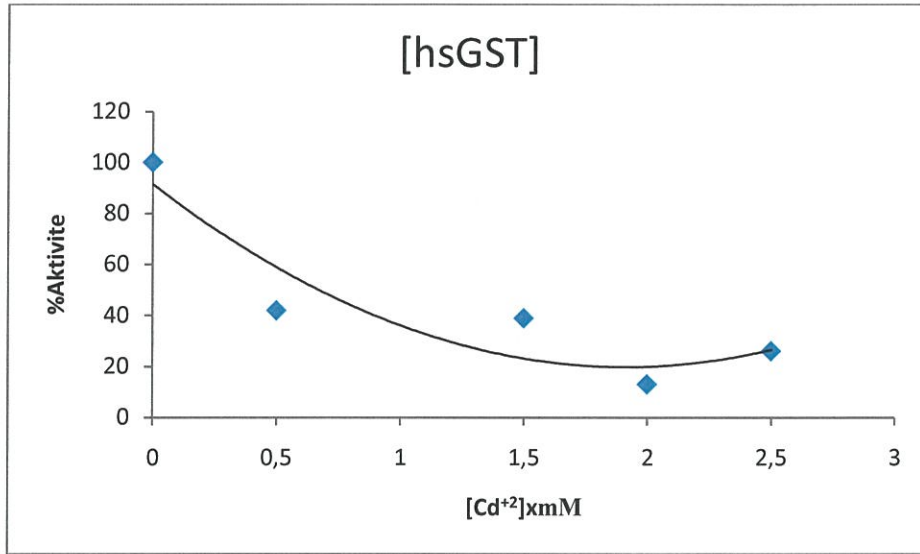
Tablo 3 3: Cd⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μL)	Sığır ırkı	Enzim Çözeltisi (μL)	Substratın Hacmi (μL)	L-Glutatyon (μL)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μmol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,031	0,12
179					0,5	0,013	0,05
177					1,5	0,012	0,05
176					2	0,004	0,02
175					2,5	0,008	0,03
180	Simental	10	3	7	0	0,043	0,16
179					0,5	0,038	0,14
178					1	0,036	0,14
177					1,5	0,005	0,02
175					2,5	0,003	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,024	0,09
179					0,5	0,014	0,05
178					1	0,011	0,04
177					1,5	0,008	0,03
175					2,5	0,005	0,02

3.3 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Cd^{+2} nın Etkisinin Belirlenmesi

3.3.1 Cd^{+2} nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

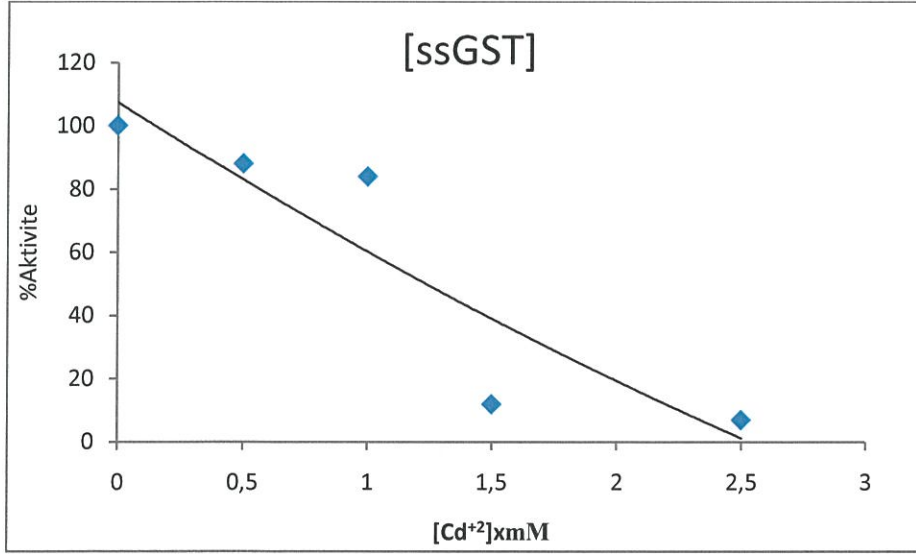
Cd^{+2} nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cd^{+2} nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.7'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.67 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7: Cd^{+2} nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.3.2 Cd^{+2} 'nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

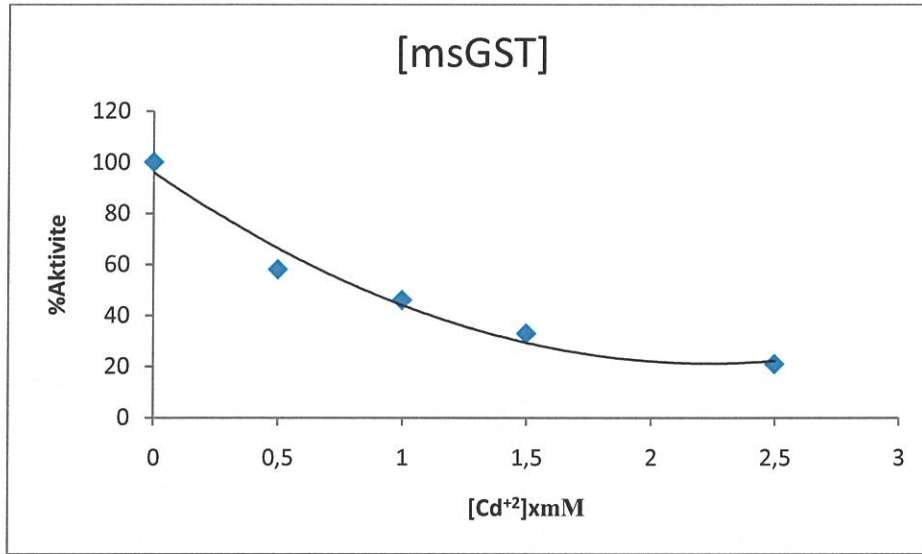
Cd^{+2} 'nın simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cd^{+2} 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.8'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.24 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8: Cd^{+2} 'nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.3.3 Cd^{+2} nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Cd^{+2} nın montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.3’de gösterilmiştir. Şekil 3.9’da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cd^{+2} nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.9’da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.85 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9: Cd^{+2} nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

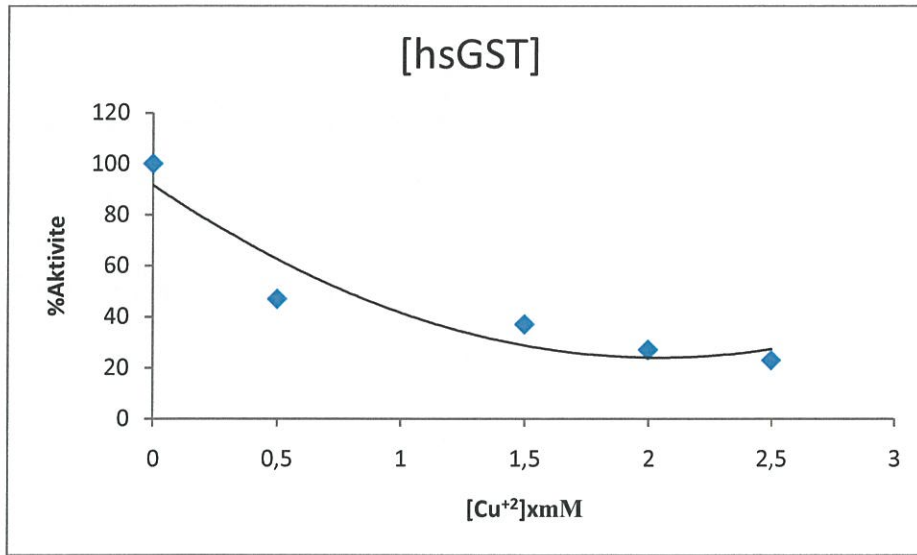
Tablo 3 4: Cu⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (µL)	Sığır Irkı	Enzim Çözeltisi (µL)	Substratın Hacmi (µL)	L-Glutatyon (µL)	Küvetteki Konsantrasyonu İnhibitör (Mm)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (µmol/ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,03	0,11
179					0,5	0,014	0,05
177					1,5	0,011	0,04
176					2	0,008	0,03
175					2,5	0,007	0,03
180	Simental	10	3	7	0	0,031	0,12
178					1	0,027	0,10
177					1,5	0,024	0,10
176					2	0,012	0,05
175					2,5	0,005	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,035	0,13
178					1	0,016	0,06
177					1,5	0,011	0,04
176					2	0,008	0,03
175					2,5	0,005	0,02

3.4 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Cu^{+2} ' nın Etkisinin Belirlenmesi

3.4.1 Cu^{+2} ' nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

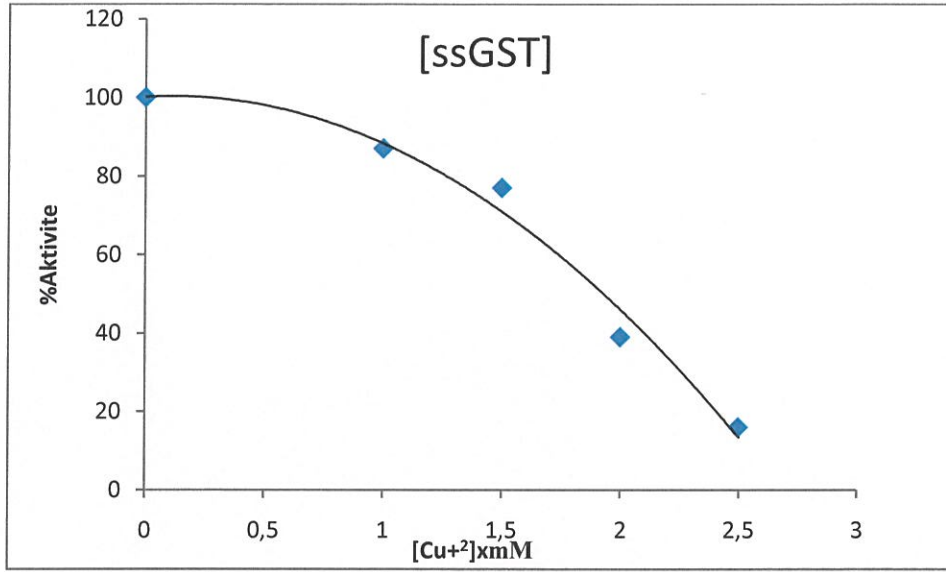
Cu^{+2} ' nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.4'de gösterilmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cu^{+2} ' nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.10'da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.77 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.10: Cu^{+2} ' nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.4.2 Cu^{+2} nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

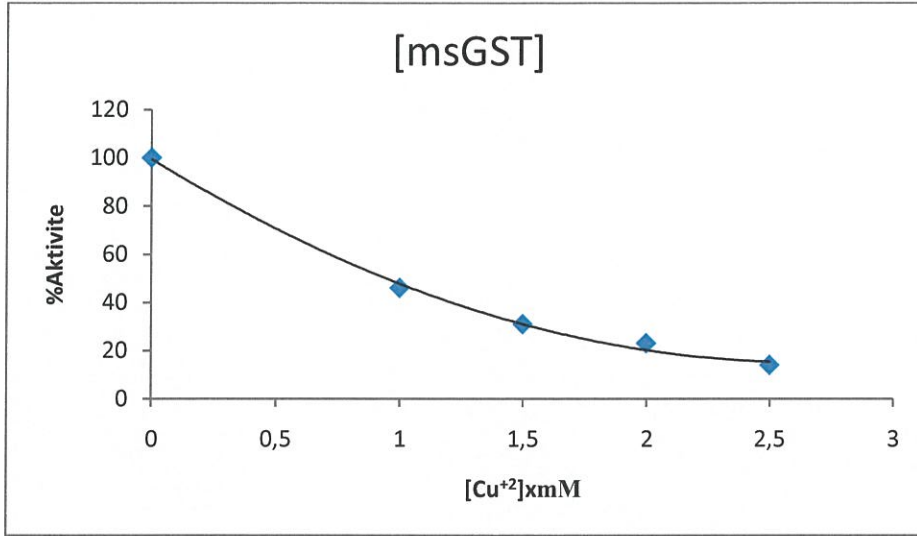
Cu^{+2} nın simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.4’de gösterilmiştir. Şekil 3.11’de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cu^{+2} nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.11’de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.94 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.11: Cu^{+2} nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.4.3 Cu^{+2} nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Cu^{+2} nın montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.4’de gösterilmiştir. Şekil 3.12’de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Cu^{+2} nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.12’de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.95 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.12: Cu^{+2} nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

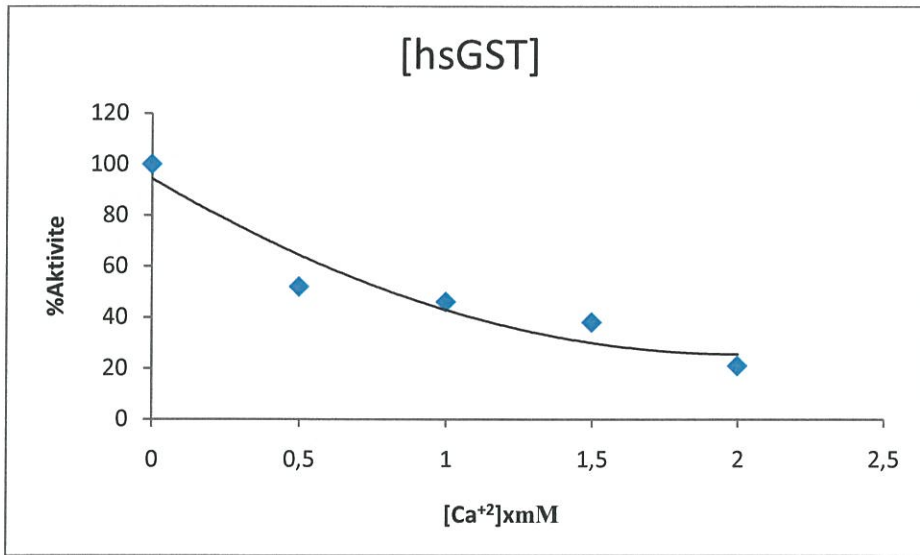
Tablo 3.5: Ca⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μ L)	Sığır ırkı	Enzim Çözeltisi (μ L)	Substratın Hacmi (μ L)	L-Glutatyon (μ L)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μ mol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,052	0,20
179					0,5	0,027	0,10
178					1	0,024	0,10
177					1,5	0,020	0,08
176					2	0,011	0,04
180	Simental	10	3	7	0	0,02	0,08
179					0,5	0,012	0,05
178					1	0,011	0,04
177					1,5	0,005	0,02
176					2	0,004	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,027	0,10
179					0,5	0,019	0,07
178					1	0,018	0,07
176					2	0,014	0,05
175					2,5	0,008	0,03

3.5 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Ca^{+2} ' nin Etkisinin Belirlenmesi

3.5.1 Ca^{+2} ' nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

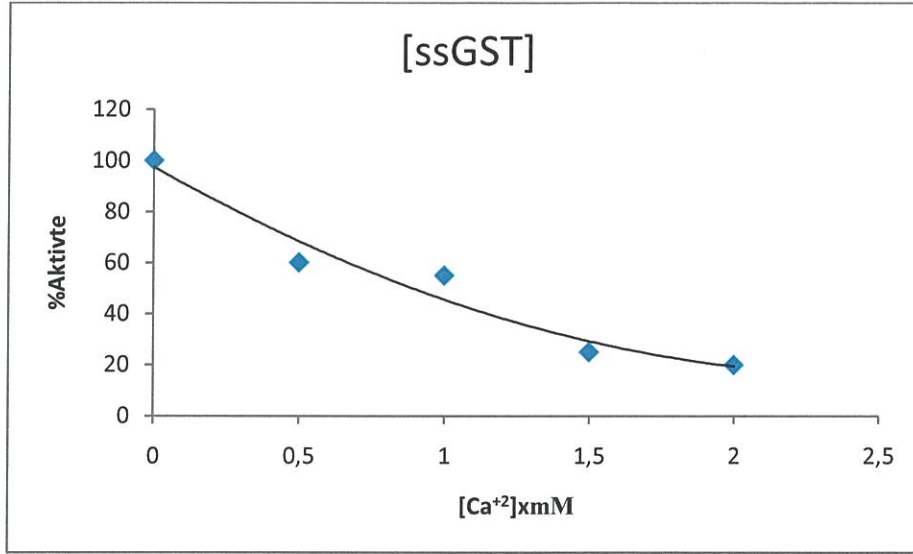
Ca^{+2} ' nin holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.5'da gösterilmiştir. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ca^{+2} ' nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.13'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.81 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.13: Ca^{+2} ' nin, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.5.2 Ca^{+2} 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

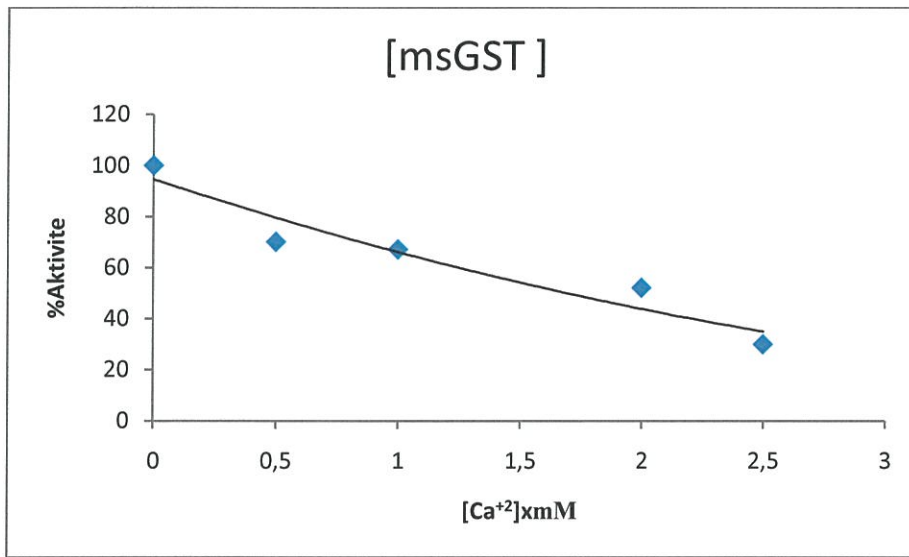
Ca^{+2} 'nin simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.5'da gösterilmiştir. Şekil 3.14'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ca^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.14'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.90 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.14: Ca^{+2} 'nin, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.5.3 Ca^{+2} 'nın Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Ca^{+2} 'nın montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Şekil 3.15'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Ca^{+2} 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.15'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.70 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.15: Ca^{+2} 'nın, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

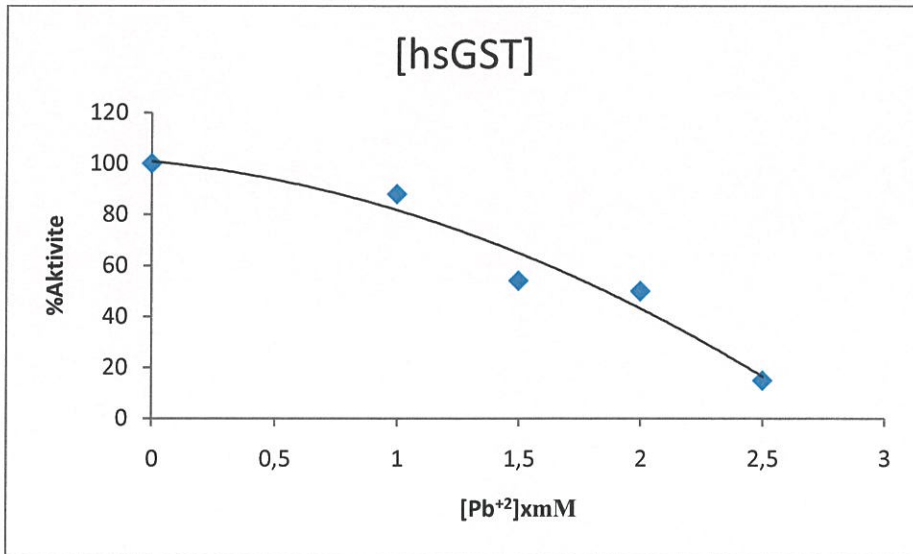
Tablo 3.6: Pb⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (µL)	Sığır Irkı	Enzim Çözeltisi (µL)	Substratın Hacmi (µL)	L-Glutatyon (µL)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (µmol/ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,026	0,10
178					1	0,023	0,09
177					1,5	0,014	0,05
176					2	0,013	0,05
175					2,5	0,004	0,02
-	Simental	10	3	7	-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
180	Montofon	10	3	7	0	0,022	0,08
179					0,5	0,022	0,08
177					1,5	0,016	0,06
176					2	0,015	0,06
175					2,5	0,012	0,05

3.6 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Pb^{+2} 'nin Etkisinin Belirlenmesi

3.6.1 Pb^{+2} 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

Pb^{+2} 'nin holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.6'de gösterilmiştir. Şekil 3.16'da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Pb^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.16'da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.85 mM olarak hesaplanmıştır.



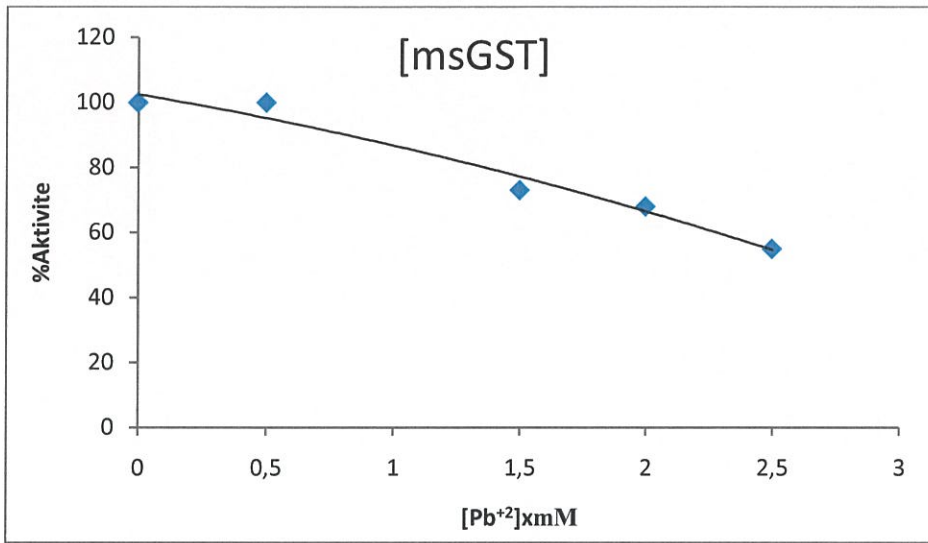
Şekil 3.16: Pb^{+2} 'nin, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.6.2 Pb^{+2} 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

Pb^{+2} 'nin simental sığır ırkı ve GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmemiştir.

3.6.3 Pb^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Pb^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Şekil 3.17'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Pb^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.17'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 2.69 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.17: Pb^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

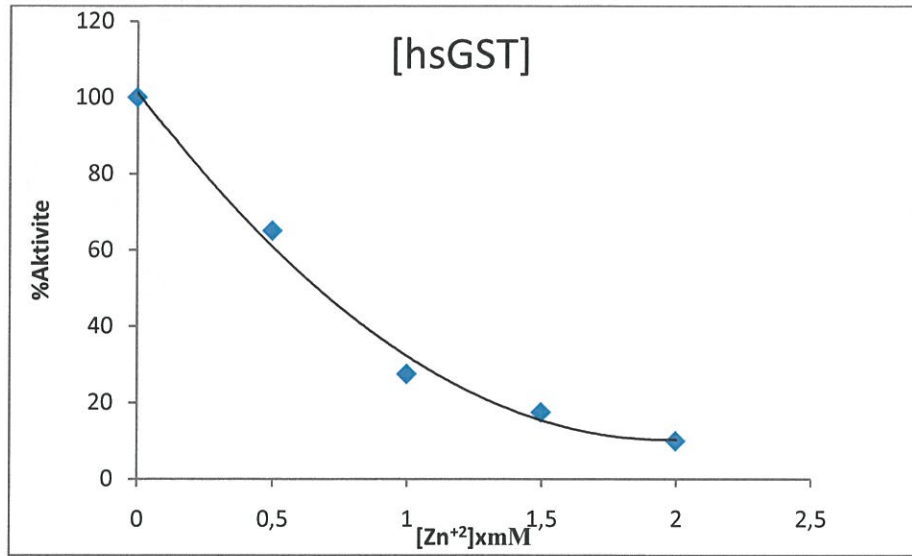
Tablo 3.7: Zn^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μ L)	Sığır İrki	Enzim Çözeltisi (μ L)	Substratın Hacmi (μ L)	L-Glutatyon (μ L)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μ mol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,040	0,15
179					0,5	0,026	0,10
178					1	0,011	0,04
177					1,5	0,007	0,03
176					2	0,004	0,02
180	Simental	10	3	7	0	0,017	0,06
179					0,5	0,015	0,06
178					1	0,014	0,05
176					2	0,011	0,04
175					2,5	0,004	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,044	0,17
179					0,5	0,018	0,07
178					1	0,013	0,05
176					2	0,007	0,03
175					2,5	0,005	0,02

3.7 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Zn^{+2} 'nın Etkisinin Belirlenmesi

3.7.1 Zn^{+2} 'nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

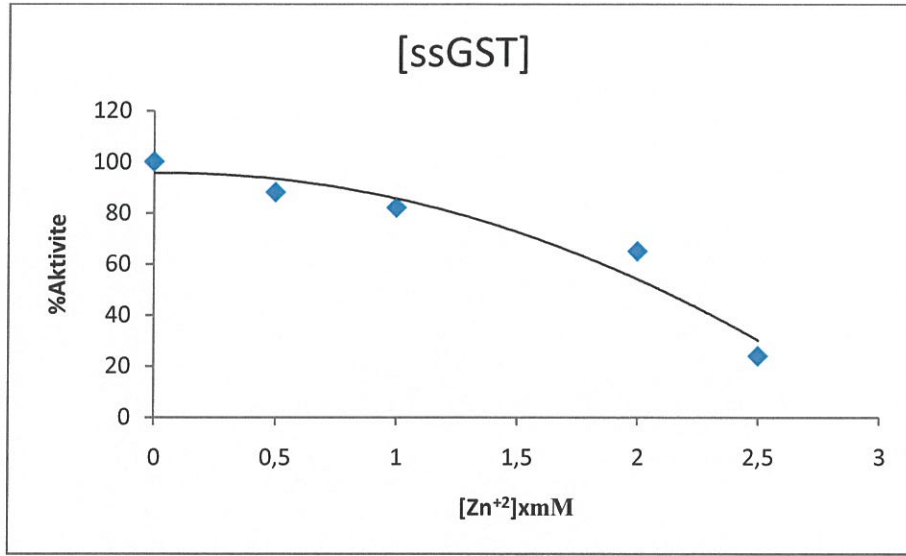
Zn^{+2} 'nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.7'de gösterilmiştir. Şekil 3.18'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Zn^{+2} 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.18'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.67 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.18: Zn^{+2} 'nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.7.2 Zn^{+2} nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

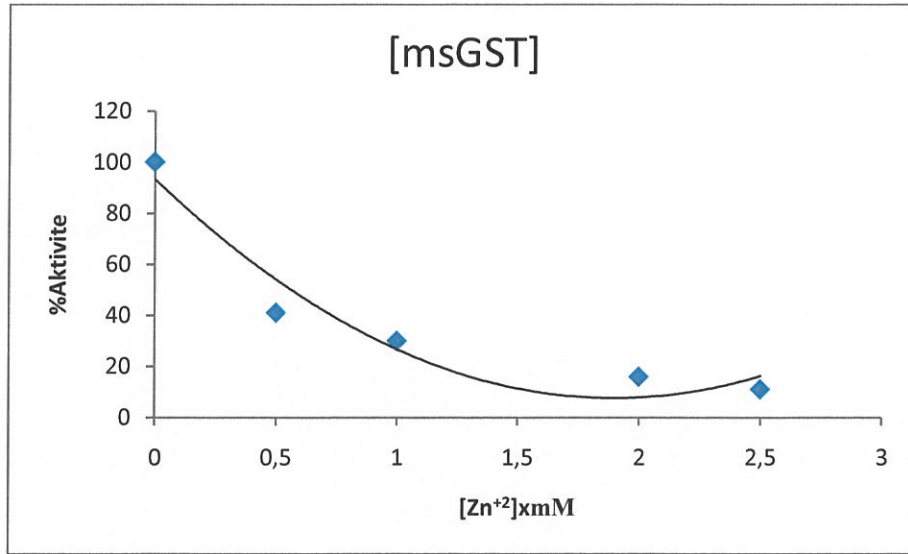
Zn^{+2} nın simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.7’de gösterilmiştir. Şekil 3.19’da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Zn^{+2} nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.19’da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 2.10 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.19: Zn^{+2} nın, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.7.3 Zn^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Zn^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.7'de gösterilmiştir. Şekil 3.20'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Zn^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.20'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.56 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.20: Zn^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

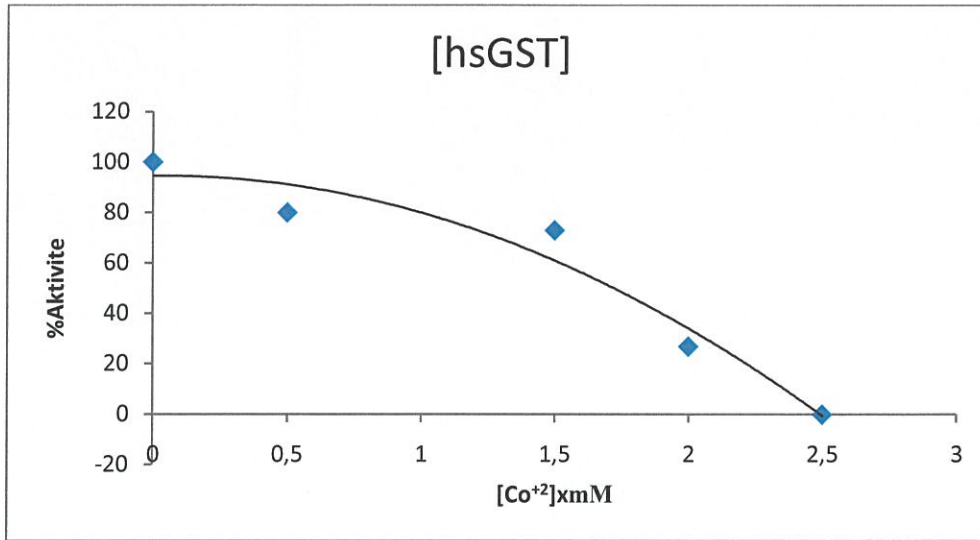
Tablo 3.8: Co⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μL)	Sığır İrki	Enzim Çözeltisi (μL)	Substratın Hacmi (μL)	L-Glutatyon (μL)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μmol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,015	0,06
179					0,5	0,012	0,05
177					1,5	0,011	0,04
176					2	0,004	0,02
175					2,5	0	0
-	Simental	10	3	7	-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
-					-	-	-
180	Montofon	10	3	7	0	0,019	0,07
179					0,5	0,018	0,07
177					1,5	0,012	0,05
176					2	0,012	0,05
175					2,5	0,007	0,03

3.8 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Co^{+2} 'nın Etkisinin Belirlenmesi

3.8.1 Co^{+2} 'nın Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

Co^{+2} 'nın holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Şekil 3.21'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Co^{+2} 'nın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.21'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.72 mM olarak hesaplanmıştır.



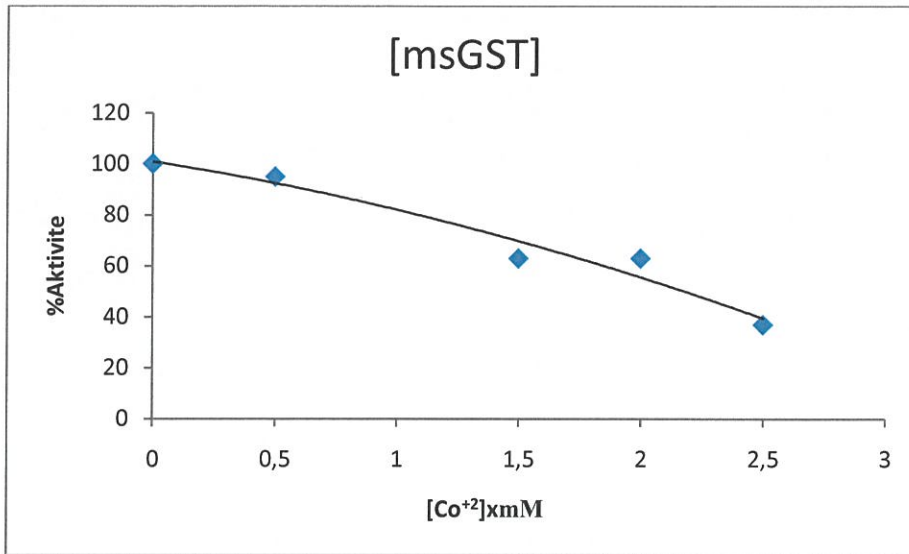
Şekil 3.21: Co^{+2} 'nın, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.8.2 Co^{+2} 'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

Co^{+2} 'nin simental sığır ırkı ve GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenememiştir.

3.8.3 Co^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Co^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Şekil 3.22'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Co^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.22'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 2.18 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.22: Co^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

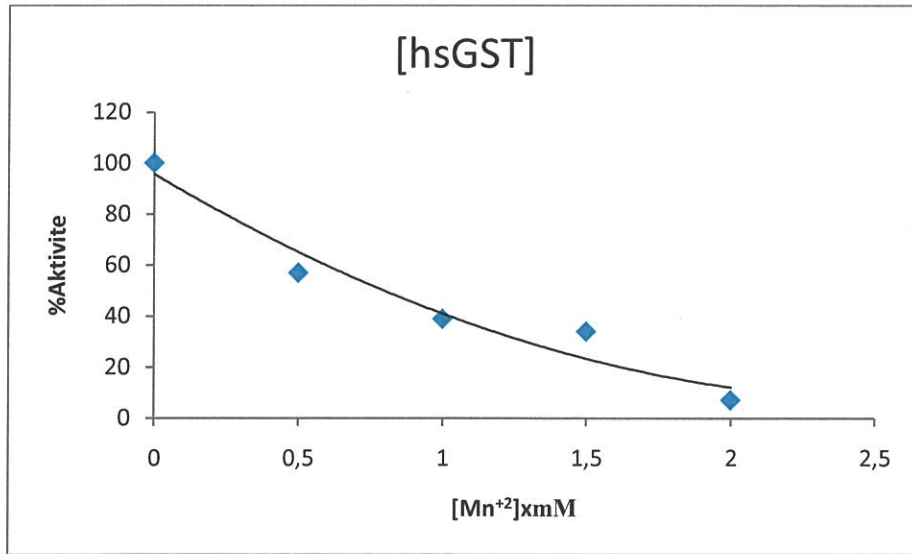
Tablo 3.9 : Mn^{+2} iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μ L)	Sığır İrki	Enzim Çözeltisi (μ L)	Substratın Hacmi (μ L)	L-Glutatyon (μ L)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (Mm)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μ mol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,044	0,17
179					0,5	0,025	0,10
178					1	0,017	0,06
177					1,5	0,015	0,06
176					2	0,003	0,01
180	Simental	10	3	7	0	0,012	0,05
178					1	0,009	0,03
177					1,5	0,008	0,03
176					2	0,009	0,03
175					2,5	0,006	0,02
180	Montofon	10	3	7	0	0,018	0,07
178					1	0,017	0,06
177					1,5	0,014	0,05
176					2	0,013	0,05
175					2,5	0,007	0,03

3.9 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Mn^{+2} 'nin Etkisinin Belirlenmesi

3.9.1 Mn^{+2} 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

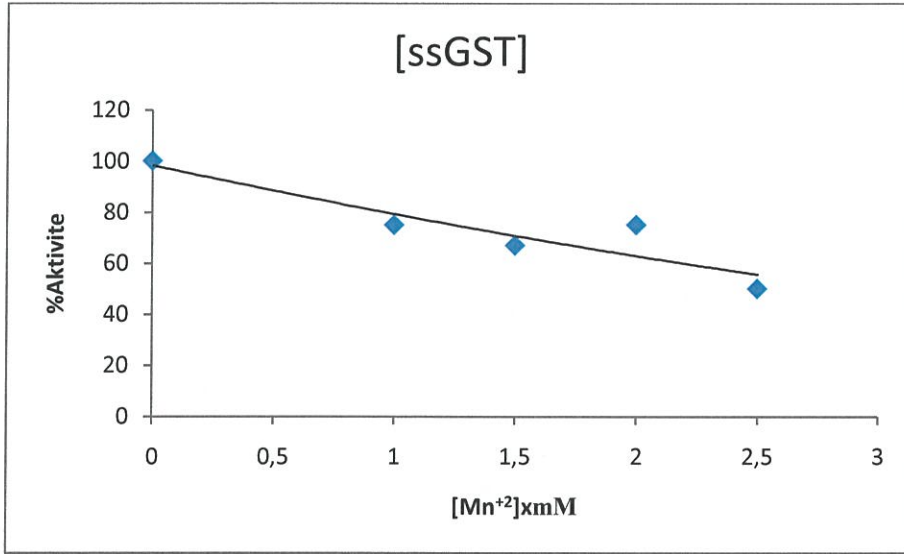
Mn^{+2} 'nin holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.9'da gösterilmiştir. Şekil 3.23'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Mn^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.23'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 0.80 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.23: Mn^{+2} 'nin, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.9.2 Mn^{+2} 'nın Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

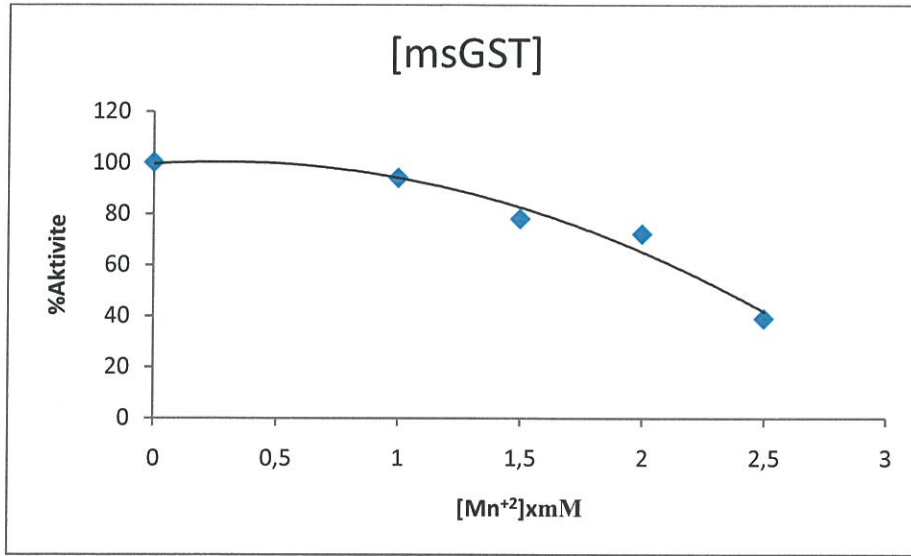
Mn^{+2} 'nın simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.9'da gösterilmiştir. Şekil 3.24'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Mn^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.24'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.66 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.24: Mn^{+2} 'nin, ssGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.9.3 Mn^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Mn^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.9'da gösterilmiştir. Şekil 3.25'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Mn^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.25'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 2.34 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.25: Mn^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

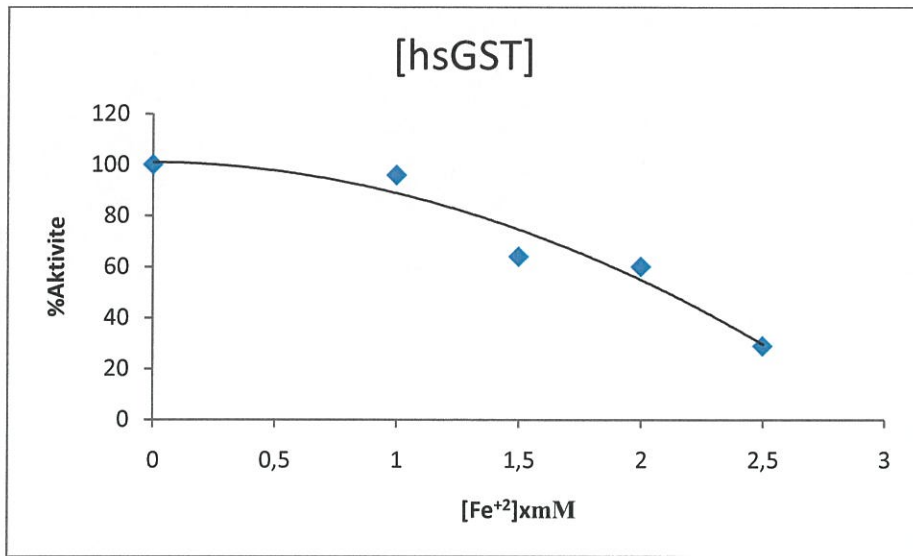
Tablo 3.10: Fe⁺² iyonunun, farklı sığır ırklarındaki sGST enzimi üzerinde inhibisyon/aktivasyon etkisi.

Tampon (μL)	Sığır İrki	Enzim Çözeltisi (μL)	Substratın Hacmi (μL)	L-Glutatyon (μL)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	(AOD) Absorbans Farkı (340 nm)	Aktivite (EU) (μmol/ ml.dk)
180	Holştayn	10	3	7	0	0,045	0,17
178					1	0,043	0,16
177					1,5	0,029	0,11
176					2	0,027	0,10
175					2,5	0,013	0,05
180	Simental	10	3	7	0	0,003	0,011
179					0,5	0,01	0,038
178					1	0,011	0,042
177					1,5	0,018	0,068
176					2	0,021	0,079
180	Montofon	10	3	7	0	0,044	0,17
178					1	0,037	0,14
177					1,5	0,02	0,08
176					2	0,009	0,03
175					2,5	0,008	0,03

3.10 Bazı Sığır Irklarının Sperm GST' leri Üzerine Fe^{+2} 'nin Etkisinin Belirlenmesi

3.10.1 Fe^{+2} 'nin Holştayn Sperm GST Üzerine Etkisi

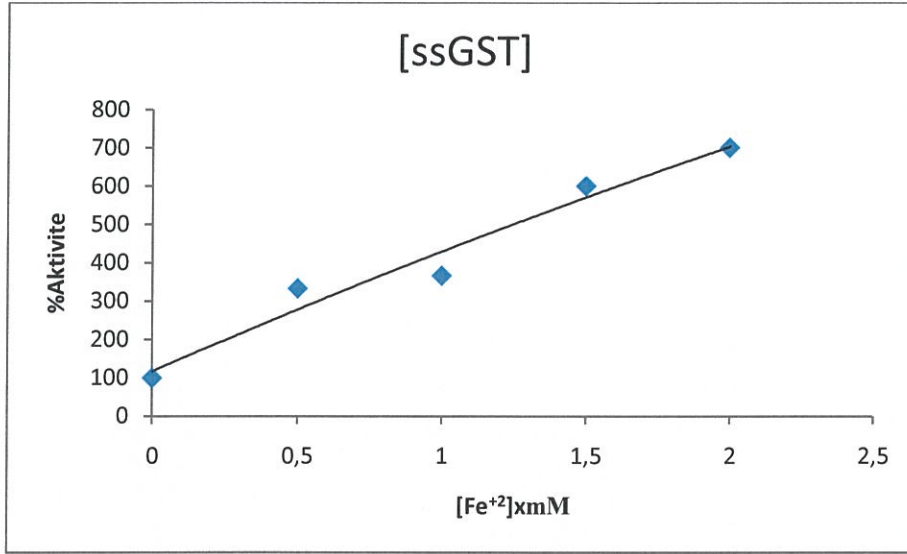
Fe^{+2} 'nin holştayn sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Şekil 3.26'da görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Fe^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.26'da belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 2.10 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.26: Fe^{+2} 'nin, hsGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

3.10.2 Fe⁺²'nin Simental Sperm GST Üzerine Etkisi

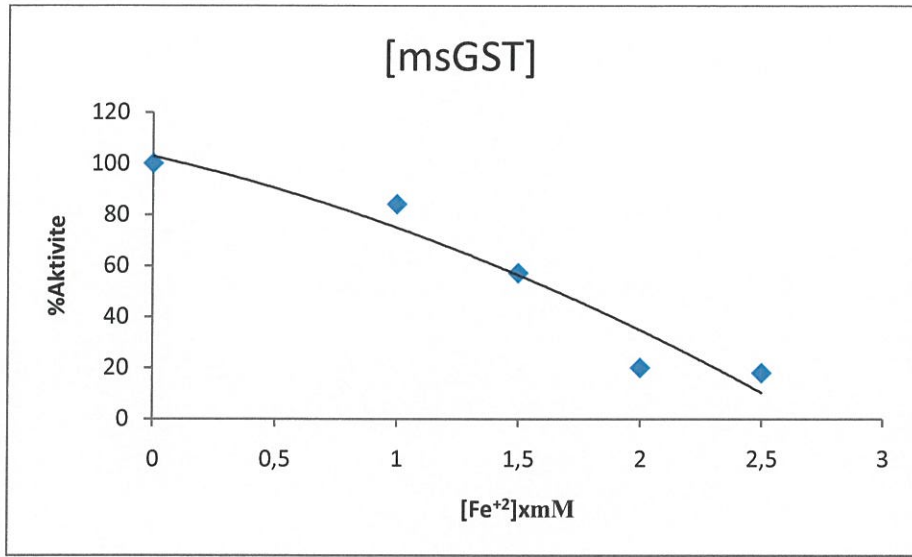
Fe⁺²'nin simental sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki aktivasyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Şekil 3.27'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Fe⁺²'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.27'de belirlenen aktivasyon değeri 17.53 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.27: Fe⁺²'nin, ssGST üzerindeki aktivasyon etkisi.

3.10.3 Fe^{+2} 'nin Montofon Sperm GST Üzerine Etkisi

Fe^{+2} 'nin montofon sığır ırkı GST enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular, Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Şekil 3.28'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma, eklenen Fe^{+2} 'nin lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.28'de belirlenen inhibisyon grafiğinde IC_{50} değeri 1.66 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.28: Fe^{+2} 'nin, msGST üzerindeki inhibisyon etkisi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Memeli sperm hücre membranları, uzun zincirli doymamış yağ asitlerini oldukça yüksek oranda içerirler. Bu yağ asitleri spermin canlılığı, bütünlüğü ve yumurtaya girişi için son derece önemlidir. Bu nedenle plazma membranının lipid kompozisyonu fertilizasyon için kritik öneme sahiptir. Suni tohumlama işlemi birçok avantajından dolayı yıllarca uygulanan bir tekniktir. Bu teknikte dondurulmuş sperm hücreleri kullanılmaktadır. Giriş bölümünde belirtildiği gibi dondurma işleminde ROS miktarının arttığı gibi spermin antioksidant aktivitesi düşmektedir. Bunun doğal bir sonucu olarak sperm hücreleri büyük bir oksidatif strese maruz kalmaktadır. Oksidatif stresten en çok etkilenen fertilizasyonda anahtar role sahip olan akrozom membranıdır. Bu durumda akrozom membranına bağlı sGST enziminin aktivitesinin önemi daha da artmaktadır.

Ağır metal kirliliği, besin zinciri ile tüm canlı organizmalara dağılabildiği için dünya çapında büyük bir endişe kaynağıdır. Toprak çoğu ağır metal için biyokimyasal olarak aktif bir filtre olmasına rağmen, kirliliğin boyutu arttığı zaman besin zinciri ile insana kadar ulaşabilmektedir. Bu konuda birçok araştırmalar yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Ayrıca hayvan yemlerindeki ağır metal içeriğinin artması, söz konusu metallerin hayvanın tüm dokularına yayılabildiğini gösteren çalışmalar vardır [47].

Ağır metaller, oksidasyon durumuna bağlı olarak oldukça reaktif ve çoğu organizma için toksiktir. Metallerin hücre ya da moleküler düzeydeki toksitesinin tam olarak aydınlatılması için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar Hg^{+2} , Ag^{+} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} gibi bazı metal iyonlarının ROS üretimini oluşturma yetenekleri gösterilmiştir. Çok sayıda metalin moleküler oksijene elektron transfer etmekle reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türleri oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca birçok ağır metalin çok sayıda enzimi inhibe ettiği konusunda birçok çalışma vardır. ROS'lar lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, sülfid gruplarının oksidasyonu ve kalsiyum homeostazı değişmesi gibi etkilere sebep olurlar. Dolaylı olarak söz konusu metal iyonlarının, yukarıda belirtilen hasarlara neden olacağı söylenebilir [48].

Hayatın devamlılığı için çok önem taşıyan üreme fonksiyonu, beslenme, yaşam şekli, yaş, üreme kanalı enfeksiyonları, stres ve kimyasal gibi pek çok nedenden etkilerler. Üreme fonksiyonlarının bazı nedenlerden dolayı sekteye uğraması, nüfus azalması ve infertiliteye, hatta

bazı türlerde soyun tükenmesine yol açabilir. Kimyasal maddeler, bozulmuş spermatogenezis ve hormonal dengesizliğe anormal sperm konsantrasyonu ve hareketliliğe yol açarak doğurganlığı olumsuz etkiler. Üreme sağlığı üzerine etkili kimyasal maddeler pestisitler, halojenli hidrokarbonlar, ağır metaller, aromatik hidrokarbonlar ve plastisizerler olarak sınıflandırılabilir [43].

Araştırmamızda enzim kaynağı olarak Holştayn, Montofon ve Simental sığır ırklarından elde edilen spermier doğrudan kullanılmıştır. Çünkü, sGST sperm hücrelerinin yüzeyine bağlı olduğu tespit edilmiştir [49]. Çalışılan ağır metallere Fe^{+2} hariç tüm iyonların her üç enzimi de farklı oranlarda inhibe ettiği; IC_{50} değerlerinden anlaşılmaktadır. Bu farklılıklar, söz konusu iyonların çözünürlükleri, absorpsiyon kapasitesi gibi faktörler ile açıklanabilir.

Araştırmamızda Cd^{+2} ve Zn^{+2} nin hsGST üzerinde oldukça güçlü bir inhibisyona sebep oldukları görülmektedir ($IC_{50} = 0,6$ mM). Ayrıca Ag^{+1} , hsGST ve msGST enzimleri üzerinde daha zayıf bir inhibitör olduğu haliyle ssGST üzerinde en güçlü inhibitör olmasıyla da dikkat çekmektedir.

Araştırmamızda gözlenen bir diğer ilginç sonuç ise Pb^{+2} nin hsGST ve msGST enzimlerini inhibe ederken ssGST üzerinde etkisiz olduğu bulunmuştur. Benzer durum Co^{+2} için geçerlidir.

Literatürde, Aksoy ve ark. Van Gölü balığından saflaştırılan GST üzerinde bazı metal iyonlarının etkisini araştırmışlardır. İlgili çalışmadaki IC_{50} değerlerine göre Cd^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+2} söz konusu enzim üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Ag^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} iyonların ise önemli ölçüde enzimi inhibe ettiği saptanmıştır [42].

Araştırmamızda elde edilen bulgulardan, söz konusu çalışmanın aksine Cd^{+2} nin 3 enzim üzerinde de önemli derecede inhibisyona sebep olduğu görülmektedir. Fe^{+2} ise ssGST üzerinde güçlü bir aktivatör olarak görülmektedir.

Araştırmamızda, Pb^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+2} iyonları dışındaki metallerin hepsinin ssGST üzerinde farklı düzeylerde inhibisyon etkisine sahip olduğu gözlenmektedir. ssGST enzimi için en güçlü inhibitör 0,83 mM, IC_{50} değeri ile Ag^{+} iken msGST, aktivitesinin çalışılan tüm metal iyonlarından önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Buna göre, msGST'nin metal iyonlarından hsGST ve ssGST'ye göre daha fazla etkilendiği söylenebilir.

Fertilizasyonda, en önemli aşama spermle yumurta hücresinin entegrasyonudur. Bu olayda sperm membranı oksidasyonu en temel sorunlardan birisidir. Bölüm 1.7'de belirtildiği gibi ağır

metaller enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde etkilenmektedir [50]. Araştırmamızda da 3 farklı kaynaktan elde edilen ssGST enzimlerinin aktivitelerinin ağır metallerden etkilendiği bulunmuştur. Söz konusu enzimin sperm membranına bağlı membran peroksidasyonunu önlediği düşünüldüğünde enzimin aktivitesinin fertilizasyonda ne ölçüde önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir. Tüm canlılarda olduğu gibi ülkemizde, yetiştirilen sığır ırklarının en önemlileri arasında bulunan söz konusu canlılarda besin zinciri ile ağır metallere aldıkları söylenebilir. Özellikle suni tohumlamada dondurulmuş spermelerde aktivitesi iyice azalan ssGST 'nin metalleri olan inhibisyonu çok daha önem kazandığı söylenebilir. Tüm bu bilgiler ışığında hayvan yetiştiriciliğinde söz konusu ağır metallerle inhibisyonun önemli olduğu söylenebilir. Araştırmamızda ilk defa ağır metallerin ssGST üzerindeki etkisinin incelenmesinin hem temel bilimler hemde fertilizasyon sahasında çalışan bilim adamları için yaygın etkiye sahip olacağı düşünülmektedir.

Sigma-Aldrich firmasından satın alınmış olan Glutatyon s-transferaz enziminin; Holştayn, Simentel ve Montofon sığır ırkından alınan sperm örneklerine, ağır metallerin inhibisyon etkilerinin bulunduğu belirlenmiştir. Buna göre IC_{50} değeri 0.56 mM olan Zn^{+2} ağır metalinin msGST enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. Bunun yanında; aktivasyon değeri 17.53 mM olan Fe^{+2} ağır metalinin ssGST enzimini aktive etmiş olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

1. Hg^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 1.77 mM, 0.72 mM, 1.94 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Hg^{+2} ağır metalinin en güçlü hsGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.
2. Ag^{+} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 4.13 mM, 0.83 mM, 4.43 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Ag^{+} ağır metalinin en güçlü ssGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.
3. Cd^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 0.12 mM, 0.16 mM, 0.09 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Cd^{+2} ağır metalinin en güçlü msGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.
4. Cu^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 0.11 mM, 0.12 mM, 0.13 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Cu^{+2} ağır metalinin en güçlü hsGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

5. Ca^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 0.81 mM, 0.90 mM, 1.70 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Ca^{+2} ağır metalinin en güçlü hsGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

6. Pb^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerinde etkileri incelenmiş ve IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. Pb^{+2} ağır metalinin IC_{50} değerleri; hsGST enzimi üzerinde 1.85 mM ve msGST enzimi üzerinde de 2.69 mM olarak bulunmuştur. Yalnız, Pb^{+2} ağır metalinin ssGST enzimi üzerine etkisi belirlenememiş ve dolayısıyla da IC_{50} değeri saptanamamıştır.

7. Zn^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 0.67 mM, 2.10 mM, 0.56 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Zn^{+2} ağır metalinin en güçlü msGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

8. Co^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerinde etkileri incelenmiş ve IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. Pb^{+2} ağır metalinin IC_{50} değerleri; hsGST enzimi üzerinde 1.72 mM ve msGST enzimi üzerinde de 2.18 mM olarak bulunmuştur. Yalnız, Co^{+2} ağır metalinin ssGST enzimi üzerine etkisi belirlenememiş ve dolayısıyla da IC_{50} değeri saptanamamıştır.

9. Mn^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerine etkileri incelenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 0.80 mM, 1.66 mM, 2.34 mM olarak tespit edilerek enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. Mn^{+2} ağır metalinin en güçlü hsGST enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

10. Fe^{+2} ağır metalinin; hsGST, ssGST, msGST enzimleri üzerinde etkileri incelenmiş ve IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. Fe^{+2} ağır metalinin IC_{50} değerleri; hsGST enzimi üzerinde 2.10 mM ve msGST enzim üzerinde de 1.66 mM olarak bulunarak bu enzimleri inhibe ettiği saptanmıştır. Ancak, Fe^{+2} ağır metalinin ssGST enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Moody, D.E., Narloch, B.A., Shull, L.R., and Hammock, B.D., ‘‘ The effect of structually divergent herbicides on mouse liver xenobiotic-metabolizing enzymes (P-450-dependent monooxygenases, hydrolases and glutathione S-transferases and carnitine acetyltransferase).’’, Toxicology Letters, 59, 175-85, (1991).
- [2] Alparslan, M.M., ‘‘Bazı Kumarin Türevlerinin Glutasyon S-Transferaz Enzimi Üzerindeki İnhibe Edici Etkilerinin Araştırılması’’. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, (2012).
- [3] Dr. Yüksel, N., ‘‘Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri.’’, Psikiyatri Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Klinik Psikiyatri, 1, 5-16, (2001).
- [4] Skrzydlewska, E., Kozusko, B., Sulkowska M., Bogdan Z., Kozlowski M., and Snarska J. et. al., ‘‘Antioxidant Potential in Esophageal, Stomach and Colorectal Cancers.’’, Hepatogastroenterology, 50(49), 126-31, (2003).
- [5] Erel, O.A., ‘‘Novel Automated Method to Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions.’’, Clin Biochem, 37(2), 112-9, (2004).
- [6] Altınışık, M., Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar, (12 Mart 2016), <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>, (2000).
- [7] Whalen, R., and Boyer, T.D., ‘‘Human Glutathione S-Transferases’’, Sem Liver Dis, 18, 4, (1998).
- [8] Fadılloğlu, E., Kaya, B., Erdoğan, H., Emre, M.H., ve Ünal, S., ‘‘Depresyonda Plazma Ksantin Oksidaz, Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri ve Plazma Nitrik Oksit Seviyesi Üzerine Egzersizin Etkisi’’, Anadolu Psikiyatri Dergisi, 2(2), 99- 105, (2001).
- [9] Pektaş, İ., ‘‘Bitki Gelişim Düzenleyicilerin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması’’, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).

- [10] Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, (2006).
- [11] Doç. Dr. Parmaksız, İ., Karadağ, F., “Farklı Dozlarda Selenyum Uygulamalarının Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Yapraklarında Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi.”, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (2013).
- [12] Terry, N., Zayed, A.M., Desouza, M.P., and Tarun, A.S. “Selenium in Higher Plants”, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol.*, 51, 401–432, (2000).
- [13] Koç, S., “Glutasyon S-Transferaz Genindeki Delesyonların (GSTT1 ve GSTM1) Koroner Arter Hastalığı ve Akut Miyokart İnfarktesi ile İlişkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana, (2008).
- [14] Dr. Şekerci, Abdüsselam., “Androjenik Alopeside Glutasyon S-Transferaz Gen Polimorfizm, Total Antioksidan Kapasite ve Kan Basıncı Değişiklikleri”, Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas, (2015).
- [15] Aköz, M., Vatansev, H., Gürbilek, M., Akkuş, İ., Vatansev, C. ve Kaptanoğlu, B. “Glutasyon S-Transferaz İzoenzimlerinin Çeşitli Kanser Vakalarında Araştırılması”, *Genel Tıp Dergisi*, 10(1), 1-6, (2000).
- [16] Dr. Ekinçi, M., “Bronşiyal Astımlı Çocuklarda Glutasyon S-Transferaz Gen Polimorfizminin Bir Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi”, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, (2006).
- [17] Arı, F., ve Dere, E., “ Benzen’in Karaciğer Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesine In Vitro Etkisi.”, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 24(1), (2003).
- [18] Hayes, J.D., and Pulford, D.J. “The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance”, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6), 445-600, (1995).
- [19] Balta, G., Yuksek, N., and Ozyurek, E. et al., “Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 Genotypes in Childhood Acute leukemia”, *Am J Hematology*, 73, 154-60, (2003).

[20] Strange, R.C., and Fryer, A.A., "The Glutathione S-Transferases: Influence of Polymorphism on Cancer Susceptibility", IARC Sci Publ, 148, 231-49, (1999).

[21] Hemmingsen, A., Fryer, A.A, and Heple, M. et al. "Simultaneous Identification of GSTP1 Ile 105→Val 105 and Ala 114→Val 114 Substitutions Using an Amplification Rrefractory Mutation System Polymerase Chain Reaction Assay: Studies in Patients With Asthma", Respir Res., 2, 255-260, (2001).

[22] Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, P.E., "Genetic Polymorphisms on Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione S-Transferase, Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity", Crit Rev Toxicol, 29(1), 59-124, (1999).

[23] Henderson, C.J., Smith, A.G. and Ure, J. et al. "Increased Skin Tumorigenesis in Mice Lacking pi Class Human Glutathione S-Transferases", Proc Natl Acad Sci USA, 95, 5275-5280, (1998).

[24] Fryer, A.A, Bianco, A., and Hepple, M.,et al. "Polymorphism At The Glutathione S-Transferase GSTP1 Locus: a New Marker For Bronchial Hyperresponsiveness and Asthma", Am J Respir Crit Care Med, 161, 1437-1442, (1999).

[25] Gilliland, F.D., Li, Y.F., and Saxon, A. et al. "Effect of Glutathione S-Transferase M1 and P1 Genotypes on Xenobiotic Enhancement of Allergic Responses: Rrandomised Plasebo Controlled Crossover Study", Lancet, 363, 119-125, (2004).

[26] Sans one, G., Nastri, M.J.F., and Fabbrocini, A., "Storage of Buffalo (Bubalus bubalis) Semen.", Anim Reprod Sci., 62:55-76, (2000).

[27] Tariq, M., Khan, M.S., Shah, M.G., Nisha, A.R., Umer, M., Hasan, S.M., Rahman, and A., Rabbani, "I. Exogenous Antioxidants Inclusion During Semen Cryopreservation of Farm Animals.", J. Chem. Pharm. Res., 7(3): 2273-2280, (2015).

[28] Chaudhari, D.V., Dharni, A.J., Hadiya, K.K., and Patel, J.A., "Relative Efficacy of Egg Yolk and Soya Based Extenders For Cryopreservation (-196°C) of Buffalo Semen.", *Vet.World*, 8(2): 239-244, (2015).

[29] Toda, T., and Arch. Androl., " Poor Semen Quality and ROS-TAC Scores in Patients with Idiopathic Infertility", 29, 219-224, (1992).

[30] Gopalakrishnan, B., Aravinda, S., Pawshe, C.H., Totev, S.M., Nagpal, S., Salunke, D., and Shaha, C., " Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage", *Biochem. J.*, in Press, (1997).

[31] Esteves, S.C., Spaine, D.M., and Cedenho, A.P., "Effects of Pentoxifylline treatment Before Freezing on Motility, Viability and Acrosome Status of Poor Quality Human Spermatozoa Cryopreserved by the Liquid nitrogen Vapor Method.", *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40 (7), 985–992., (2007).

[32] McCarthy, M.J., Baumber, J., Kass, P.H., and Meyers, S.A., "Osmotic Stress induces Oxidative Cell Damage to Rhesus Macaque Spermatozoa.", *Biol. Reprod.*, 82 (3), 644–651, (2010).

[33] Sariözkan, S., Tuncer, P.B., Bucak, M.N., and Ulutas. , P.A., "Influence of Various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen–Thawed Bull Semen.", *Acta Vet. Brno*. 78, 463–469, (2009).

[34] Dursun, B., Dursun, E., Suleymanlar G., Ozben B., Capraz, I., Apaydin, A., and Ozben, T., "The Effect of Hemodialysis on Accelerated Atherosclerosis in Diabetic Patients: Correlation of Carotid Artery Intima-Media Thickness With Oxidative Stress.", *Journal of Diabetes and Its Complications*, 23: 257–264, (2009).

[35] Reborna, A., "Baldness and Coronary Artery Disease: the Dermatologic.", *Point of View of a Controversial Issue. Arch Dermatol*, 137:943-7, (2001).

[36] Urade, Y., and Watanabe and Hayaishi, O., "Prostaglandin D, E, and F synthase. *Journal of Lipid Mediators in Cell Signalling*", 12, 257- 273, (1995).

[37] Jakobsson, P- J., Morgenstein, R., Mancini, J., Ford- Hutchinson, A., and Persson, B., "Common Structural Features of MAPEG, a Widespread s- Perfamily of Membrane Associated Proteins With Highly Diverdang Functions in Eicosanoid ind Glutathione Metabolishm.", Protein Science, 8, 689-692, (1999).

[38] Fernandez- Canon Mand Penelva, M.A., "Characterization of a Fungal Maleylace to Acetate İsomerase Gene and İdendification of its Human Homologue." , The Journal of Biological Chemistry., 273, 329- 337., (1998).

[39] Yalçın, V., "Bazı Ağır Metallerin (Pb, Cd, Ni) Sucul Bitkiler (Salvinia natans (L.) All., Lemna minör (L.) Üzerinde Yaptığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar", Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Nevşehir, (2014).

[40] Alkhalaf, N.A., Osman, A.K., and Salama, K.A., " Assessment of heavy metals in chicken feeds sold in south eastern, Nigeria ", African J. of Food Sci., . ISSN 1996-0794, pp., 192-1994(4), (2010).

[41] Waalkes,.M.P., " Cadmium carcinogenesis in review.", J. Inorganic Biochemistry, 79: 240-244, (2000).

[42] Özaslan, M.S., "Glutatyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü Balığı (chalcalburnus tarichi pallas). Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2014).

[43] Yılmaz, O., and Dinç, H., "Ağır Metallerin Üreme Sistemi Üzerine Etkisi", YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 24(2), 91-94, (2013).

[44] Korentejar, L., "A Review of The Agricutural Use of Sewage Sludge, Benefits and Potential Hazards", Water SA.,17(3), 189-196, (1991).

[45] Yrd. Doç. Dr. Işık, S., Şipal, B., “Koyun Serum Paroksanaz Enziminin Bazı Pestisitlere Karşı İlgisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).

[46] Şener S, Yıldırım M. Veteriner Toksikoloji. Teknik Yayıncılık, İstanbul, (2000).

[47] Evans, A.C.O., Hansen, P.J., Hinch, G.N., and Kinder, J.E., “Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentration.”, Animal Reproduction Science 160 , 97–104, (2015).

[48] Zhuang, P., Zou, B., Lu, H., and Li, Z., “Heavy Metal Concentrations in Five Tissues of Chickens from a Mining Area”, Pol. J. Environ. Stud. Vol. 23, No. 6, 2375-2379 , (2014).