

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



**BAZI FLAVONOİDLERİN SIĞIR KARACİĞER GLUTATYON
S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE SELDA AKSOY

BALIKESİR, MAYIS - 2018

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



**BAZI FLAVONOİDLERİN SIĞIR KARACİĞER GLUTATYON
S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE SELDA AKSOY

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

Prof. Dr. Mustafa Arslan

Doç. Dr. Nahit Gençer

Doç. Dr. Mustafa Zengin

Doç. Dr. Semra Işık

BALIKESİR, MAYIS - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

AYŞE SELDA AKSOY tarafından hazırlanan "BAZI FLAVONOİDLERİN SIĞIR KARACİĞER GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 14.05.2018 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

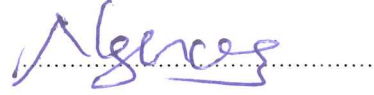
Danışman
Prof. Dr. Oktay Arslan



Üye
Prof. Dr. Mustafa Arslan



Üye
Doç. Dr. Nahit Gencer



Üye
Doç. Dr. Mustafa Zengin

.....

Üye
Doç. Dr. Semra Işık

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017/ 074 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

BAZI FLAVONOİDLERİN SIĞIR KARACİĞER GLUTATYON S- TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE SELDA AKSOY

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, MAYIS - 2018

Antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, vazodilatör, antioksidan ve antiradikal aktivitelerinden dolayı flavonoid tüketimi oldukça popüler hale gelmiştir. Ancak bu bileşiklerin yan etkilerinin önemli bir sorun olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, başta detoksifikasyon olmak üzere birçok biyolojik fonksiyona sahip glutatyon S-transferaz (GST) enzimi üzerinde bazı flavonoidlerin etkisi araştırılmıştır. GST enzimi, Holştayn karaciğerinden hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla Sepharose 4B-L-tirozin-9- naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılmıştır. Enzimin saflığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edilmiştir. Holştayn GST (hGST) enziminin K_m ve V_{max} değerleri, 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ve glutatyon (GSH) substratları kullanılarak Linewear- Burk yöntemine göre tespit edilmiştir. Bu değerler GSH için sırasıyla 1,11 mM, 3,06 EÜ/ mL; CDNB için 1,34 mM, 1,89 EÜ/ mL' dir.

Araştırmamızda çalışılan flavonoidlerin, hGST üzerinde etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) bulunmuştur. Bulunan sonuçlara göre en güçlü inhibitör 2,1 mM IC_{50} değeri ile 4'-(4-nitrofeniltiyürenil)-6-hidroksi-apigenidin olarak saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Glutatyon S- transferaz (GST), holştayn karaciğer, flavonoid, inhibisyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME FLAVONOIDS ON CATTLE LİVER GLUTATION S-TRANSFERASE ENZYME

MSC THESIS

AYŞE SELDA AKSOY

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, MAY 2018

Due to its antiviral, antibacterial, antiinflammatory, vasodilator, antioxidant and antiradical activities, flavonoid consumption has become very popular. However, side effects of these compounds are known to be a major problem. In this study, the effect of some flavonoids on the glutathione S-transferase (GST) enzyme with many biological functions, mainly detoxification, was investigated. The GST enzyme was purified by hydrophobic interaction chromatography (HEK) from Holstein liver. For this purpose, gel with Sepharose 4B-L-tyrosine-9-naphthylamine chemical structure was used. The enzyme purity was controlled by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The K_m and V_{max} values of *Holstein* GST (hGST) enzyme were determined by Lineweaver-Burk method using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) substrates. These values were 1.11 mM, 3.06 EU / mL for GSH; 1.34 mM for CDNB and 1.89 EU / mL for CDNB.

The effects of flavonoids studied in our study on hGST were investigated. For this purpose, inhibitor concentrations (IC_{50}) causing 50% inhibition were found. According to the results, the strongest inhibitor was identified as 4'-(4-nitrofeniltiyörenil)-6-hidroksi-apigenidin with an IC_{50} of 2.1 mM.

KEYWORDS: Glutathione S-transferase (GST), holstein liver, flavonoid, inhibition, hydrophobic interaction chromatography.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Flavonoidler.....	2
1.1.1 Flavonoidlerin Kimyasal Yapısı	2
1.1.2 Flavonoidlerin Antioksidant Etkileri	3
1.1.3 Flavonoidlerin Diğer Fizyolojik Etkileri	4
1.1.4 Flavonoidlerin GST 'ye Karşı Afinitesi.....	4
1.2 Glutasyon S-Transferazlar (GST).....	5
1.2.1 Glutasyon S-Transferaz Enzimi	5
1.2.2 Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması.....	6
1.2.3 Memeli Sitozolik GST' lerin Genel Yapısı	7
1.2.4 Glutasyon S-Transferazların Substratları	9
1.2.5 Glutasyon S-Transferazların Biyolojik Aktivitesi.....	10
2. MATERYAL VE METOD	12
2.1 Materyaller	12
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	15
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	15
2.2 Yöntemler	19
2.2.1 GST Enziminin Saflaştırılması	19
2.2.1.1 Homojenizatın Hazırlanması.....	19
2.2.1.2 Hemogloblin Çöktürmesi	20
2.2.1.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	20
2.2.1.4 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile GST Enziminin Saflaştırılması.....	21
2.2.1.5 SDS-PAGE ile hGST' nin Saflığının Kontrolü	22
2.2.2 Protein Tayini	24
2.2.2.1 Kalitatif Tayin	24
2.2.2.2 Kantitatif Tayin	24
2.2.3 GST Enziminin Aktivite Tayini.....	25
2.2.4 GST Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar	26
2.2.4.1 K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	26
2.2.4.2 Bazı Flavonoid Türevlerinin GST Enzim Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	27
3. BULGULAR	29
3.1 Bradford Yöntemi ile Hazırlanan Standart Eğri.....	29
3.2 hGST Enziminin Saflaştırılması.....	30
3.3 SDS-PAGE ile hGST' nin Saflık Kontrolü.....	32
3.4 hGST Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi.....	33

3.5	hGST Enzim üzerine Bazı Flavonoid Türevlerinin Etkileri.....	35
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	46
5.	KAYNAKLAR.....	51

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: GSTA1-1'in etakrinik asit (EA) ve GSH ile yapılan kompleksin üç boyutlu yapısı.....	8
Şekil 2.1: Homojenizatin hazırlanması.....	19
Şekil 2.2: Hemogloblin çöktürme işlemi.....	20
Şekil 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi.....	20
Şekil 2.4: Hidrofobik etkileşim kolonu.....	22
Şekil 2.5: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hGST' nin elektroforez işlemi.....	23
Şekil 2.6: Bradford yöntemi ile protein tayini.....	25
Şekil 3.1: Proteinlerin kantitatif tayini için standart grafik.....	29
Şekil 3.2: hGST enziminin elüsyon grafiği.....	30
Şekil 3.3: hGST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	32
Şekil 3.4: hGST enzimi için GSH substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	33
Şekil 3.5: hGST enzimi için CDNB substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	34
Şekil 3.6: 1.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	36
Şekil 3.7: 2.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	37
Şekil 3.8: 3.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	38
Şekil 3.9: 4.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	39
Şekil 3.10: 5.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	40
Şekil 3.11: 6.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	41
Şekil 3.12: 7.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	42
Şekil 3.13: 8.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	43
Şekil 3.14: 9.Bileşik için % aktivite-[I] grafiği.....	44
Şekil 3.15: 10.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.....	45

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler	3
Tablo 1.2: GST' nin bazı substratları	9
Tablo 1.3: GST' lerin katalizlediği reaksiyonlar.	9
Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan flavonoid türevleri ve isimleri.	13
Tablo 2.2: Safılaştırılan enzimin elektroforez işlemindeki çözeltilerin miktarları	18
Tablo 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.	21
Tablo 2.4: CDNB substratı için Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	26
Tablo 2.5: GSH substratı için Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	27
Tablo 2.6: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve miktarları.	28
Tablo 3.1: GST enziminin saflaştırma basamakları ve derecesi.	31
Tablo 3.2: GSH' ın kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	33
Tablo 3.3: CDNB' nin kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	34
Tablo 3.4: Flavonoidlerin IC ₅₀ -IC ₈₀ değerleri.	35
Tablo 3.5: 1.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	36
Tablo 3.6: 2.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	37
Tablo 3.7: 3.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	38
Tablo 3.8: 4.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	39
Tablo 3.9: 5.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler ve miktarları.	40
Tablo 3.10: 6.Bileşik hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	41
Tablo 3.11: 7.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	42
Tablo 3.12: 8.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	43
Tablo 3.13: 9.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	44
Tablo 3.14: 10.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler ve miktarları.	45

SEMBOL LİSTESİ

GST	:	Glutasyon S- transferaz enzimi
hGST	:	Holştayn glutasyon s- transferaz enzimi
GSH	:	Glutasyon
EA	:	Etakrinik asit
EC	:	Enzim kod numarası
HEK	:	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
kDa	:	Kilo Dalton
TEMED	:	N, N, N', N'- tetrametil etilendiamin
CNBr	:	Siyanojen Bromür
V_{max}	:	En yüksek reaksiyon hızı
Km	:	V_{max} 'ın yarısındaki substrat konsantrasyonu
IC₅₀	:	Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen gerek okul hayatımda gerekse hayatın zorlukları konusunda tecrübelerinden faydalandığım, her yönüyle bana rol model olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Oktay Arslan' a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca bilgilerinden beni mahrum bırakmayan Doç. Dr. Nahit Gençer, Doç. Dr. Semra Işık ve Adem Ergün ile Biyokimya bölümündeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Flavonoidlerin temininde Prof. Dr. Mustafa Küçükislamoğlu ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür etmek isterim.

Enzim kaynağı olarak kullanılan sığır karaciğerinin temininde bize her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Mikail Arslan' a da sonsuz teşekkür ederim.

Beni dokuz ay karnında, ondan sonraki yirmi beş yıl boyunca kalbinde taşıyan canım annem Ayten Aksoy' a, bana iyi insan olmayı öğreten, bu hayattaki en iyi arkadaşım olup omzunda huzur bulduğum tek adam olan babam Cevdet Aksoy' a ve bana gülümsemeyi öğreten ağabeyim, Ahmet Aksoy' a sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Zorlukların üstesinden gelmeyi onların sayesinde öğrendiğim, dualarını esirgemeyen, maddi manevi desteklerinden dolayı büyükbabam Şevki Aksoy ile canım amcalarım Cemal Aksoy, Muammer Aksoy' a ve ailemin her ferdine tek tek teşekkürlerimi borç bilirim.

Aynı zamanda daima iyi dilekleri ile beni mutlu eden, hep yanımda olan tüm dostlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak tezimi şimdi çok uzaklarda olsa da beni rüyalarımnda hiç yalnız bırakmayan, sevgisinden ilham alarak çalışmamı tamamladığım benim diğer yarım rahmetli büyükannem Ayşe Aksoy' a ithaf ederim.

1. GİRİŞ

Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan doğal fenolik bileşik olan flavonoidler; antiviral, antibakteriyal, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiradikal aktiviteleri de içeren çoklu biyolojik etkiler gösterdiği saptanmıştır [1]. Bu nedenle tüm dünyada flavonoid içeren çeşitli ürünlerin hazırlanması oldukça popüler hale gelmiştir. Ancak söz konusu bileşiklerin, başta flavonoid-ilaç etkileşimi olmak üzere birçok yan etkileri ortaya çıkmaya başlamıştır [2]. Flavonoidlerin yan etkilerini belirlemek amacıyla birçok enzim üzerinde bu bileşiklerin etkileri araştırılmıştır. Bazı flavonoid türevlerinin, lipoksigenaz ve siklooksigenaz enzimleri üzerinde belirli düzeyde inhibisyon etkileri gösterdiği saptanmıştır [3]. Bir başka çalışmada ise 6 farklı gruptaki flavonoidlerin sıçan ince bağırsak glikozidaz ve domuz pankreas α -amilazı üzerinde inhibisyon etkileri çalışılmıştır. IC_{50} değerlerinin mM düzeyde olduğu tespit edilmiştir [4]. Ayrıca araştırma grubumuz tarafından bazı yeni flavonoid türevlerinin, enzimatik kararmanın önlenmesinde kilit role sahip polifenol oksidaz enzimi üzerinde etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada IC_{50} değerlerinin mM düzeyde olduğu gösterilmiştir [5].

Flavonoidlerin, glutatyon S- transferaz enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılması konusunda literatürde birçok çalışmaya rastlamak mümkündür [6- 19].

GST hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan, başta detoksifikasyon olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip bir enzim ailesidir. Özellikle ksenobiyotik metabolizmasının Faz II aşamasındaki işlevi, bu enzim üzerinde çok yoğun çalışmalar yapılmasına sebep olmuş ve halen çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir [20]. Bu enzim, glutatyon ile elektrofilik ksenobiyotiklerin konjugasyon reaksiyonunu katalizler. Bu şekilde söz konusu ksenobiyotiğin hidrofobitesinin azaltılarak vücuttan atılımını kolaylaştırır. GST' nin bu rolü haricinde, Se-bağımsız peroksidaz ve izomeraz aktiviteleriyle de önemli fizyolojik işlevlere sahip olduğu bilinmektedir [21]. Ayrıca GST; bilirubin, safra tuzları ve ilaçlar gibi bazı molekülleri bağlayarak onların mobilitesini arttırarak sitotoksitesini azaltmaktadır [22]. GST' nin bu fizyolojik fonksiyonları göz önüne alındığı zaman,

enzim aktivitesindeki değişiklik canlı organizmalar için önemli sorunlara neden olduğu söylenebilir [23].

Yukarıda açıkladığı gibi birçok farklı flavonoid türevlerinin GST üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılmasına rağmen, bu çalışmada kullanılan flavonoid türevlerinin GST üzerindeki etkileri konusunda literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır. Araştırmamızda Prof. Dr. Mustafa Küçükislamoğlu ve ekibi tarafından sentezlenen bu bileşiklerin, *holştayn* sığır karaciğer GST enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Bu sığır cinsinin ülkemizde oldukça popüler olması ve söz konusu flavonoid türevlerinin ilk defa GST enzimi üzerinde çalışılacak olması, araştırmamızın orijinalliğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızdan elde edilecek sonuçların farklı alanlarda yaygın etki göstereceği düşünülmektedir.

1.1 Flavonoidler

1.1.1 Flavonoidlerin Kimyasal Yapısı

Bir grup benzo- γ -pyron türevi olan flavonoidler meyve ve sebzelerde bulunan doğal fenolik bileşiklerdir. Latince ‘ *flavus* ’ kelimesinden esinlenerek isimlendirilen flavonoidler, sarı anlamına gelir. Bu ismi verilmesinin başlıca sebebi ise söz konusu moleküllerin genel olarak sarı renkte olmasıdır [24].

Flavonoidler, birçok ülkede insan diyetinin önemli bileşenlerindedir [1]. Meyve ve sebzelerce zengin diyetlerin, kardiyovasküler hastalıklar, kanser türleri ve diğer birçok hastalığa karşı koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Özellikle flavonoidlerce zengin diyetlerin alınması ile birçok kardiyovasküler hastalığın azalması arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur [25].

Bitkilerde flavonoidler genellikle glikozillenmiş ve sülfatlanmış türevler olarak bulunurlar. Bu şeker rezidülerinin glikoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz olduğu belirlenmiştir [26]. Günümüze kadar 9000’ den fazla flavonoid türevinin bitkilerden izole edildiği bilinmektedir [27].

Çok sayıda flavonoid türevidir olmasına rağmen en önemli yapısal özelliği halka sistemlerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler yapılarına göre alt sınıflara ayrılmıştır. Bu alt sınıflar şöyledir; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller, kalkanlar, dihidrikalkanlar, antosiyanidinlerdir [5].

Flavonoidler sadece difenil propanın farklı formlardaki düzenlenmesiyle değil aynı zamanda bu halkalara farklı sübstituentlerin bağlanmasıyla çeşitlilik kazanır. Her sınıf içinde, aromatik halkalara bağlı sübstituentlerin sayısı, türü ve pozisyonları bu bileşiklerin yapı farklılıklarına sebep olur. Tablo 1.1’ de yapı iskeletlerine göre ayrılan flavonoid türleri ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 1.1: Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler [5].

Flavonlar	Flavanonlar	Flavonoller
Krisin	Kuersetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Hesperidin
Luteolin	Kemferol	Naringin
	Rhamnetin	Eriodiktol
Flavanoller	Flavanonoller	Antosiyanidinler
Kateşin	Slibin	Siyanidin
Epikateşin	Taksifolin	Apigenidin

1.1.2 Flavonoidlerin Antioksidant Etkileri

Flavonoidlerin antioksidant ve anti-radikal özellikleri hem *in vitro* hem *in vivo* olarak detaylıca araştırılmıştır. Bu çalışmalarda reaktif oksijen türlerinin azaltılması, metal şelatlama aktivitesi, α - tokoferil radikallerinin azaltılması, ürik asit düzeyindeki artış gibi özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca flavonoidlerin antioksidant enzimler üzerindeki etkileri saptanmıştır. Söz konusu çalışmalar Prochozkova ve arkadaşları tarafından bir derleme çalışması ile sunulmuştur [1].

Flavonoidler aynı zamanda sulu fazda, hidroksit ve süperoksit radikallerini temizlediği saptanmıştır [28]. Bununla birlikte flavonoidlerin bazı antioksidant enzimlerinin ekspresyonunu arttırarak organizmanın antioksidant kabiliyetine önemli katkılar sağladığı bulunmuştur [29].

1.1.3 Flavonoidlerin Diğer Fizyolojik Etkileri

Flavonoidler antioksidant özelliklerinin yanı sıra birçok potansiyel aktivitelere sahiptir. Bu bileşiklerin, birçok enzim üzerinde inhibisyon etkileri saptanmıştır. Bu enzimler arasında talomeraz, siklooksigenaz, lipoksigenaz, ksentinoksidaz ve bazı metalo proteazlar tanımlanmıştır [24]

Ayrıca flavonoidlerin, hücrel ilaç taşıyıcı sistemler, glikoz taşıyıcı sistem ve protein glikozilasyonu üzerinde önemli etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten paroksanaz ve tiroid peroksidaz aktiviteleri üzerinde belirli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [30].

Tüm bunların dışında canlı organizmaya alınan flavonoidler; hidroksilasyon, sülfatasyon ve glikozilasyon ile biyotransformasyona uğrarlar [31]. Oluşan bu metabolitlerin farklı biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Genellikle flavonoidlerin, hidroksil türevlerinin biyolojik aktiviteleri artarken; sülfat türevlerinin ise biyolojik aktivitelerinde azalma olduğu beklenmektedir [24].

1.1.4 Flavonoidlerin GST 'ye Karşı Afinitesi

Birçok flavonoid türevlerinin GST' leri inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibisyon birkaç açıdan kritik öneme sahiptir. İlk olarak, GST aktivitesinin inhibisyonu birçok ksenobiyotiğin birikmesine ve toksitesinin artmasına sebep olur [32]. Aynı zamanda bu inhibisyon, özellikle kemoterapi direncinin önlenmesinde umut verici bir yaklaşımdır [33].

Aynı zamanda GST lökotrienlerin, steroid hormonlarının ve prostaglandinlerin biyosentezinde rol oynar. GST inhibisyonu bu bileşiklerin konsantrasyonunu düzenlemek için kullanılmaktadır [34].

Bunlara ek olarak GST' nin bazı izoformları, hücrenin oksidatif stresinin azaltılmasına önemli katkılar sağlarlar. Bu nedenle, bu izoformların spesifik inhibisyonu tümörlere veya enfeksiyon ajanlarına yönelik önemli bir yöntem olabileceği düşünülmektedir [35].

Son olarak söz konusu inhibisyon, türler içindeki GST izoenzimlerinin farklılaşması ve tanımlanması için bir araştırma yöntemi olarak işlev görebilir [6].

1.2 Glutasyon S-Transferazlar (GST)

1.2.1 Glutasyon S-Transferaz Enzimi

Glutasyon s-transferazlar, detoksifikasyonun Faz II aşamasında önemli bir role sahip olan çok fonksiyonlu ksenobiyotik metabolizan enzimlerinin süper ailesidir. Elektrofilik ksenobiyotiklerle indirgenmiş glutasyon arasındaki konjugasyonu katalizleyen GST, detoksifikasyonda anahtar rol oynar. Söz konusu elektrofilik bileşikler; ilaçlar, toksinler, çevre kirleticileri, oksidatif stres ürünleri ve karsinojenlerdir. Bu bileşiklerin GSH ile konjugasyonu sonucu hidrofilik karakteri artırılarak vücuttan atılımı sağlanır [20,36].

Glutasyon s-transferazlar, endojen ve eksojen kaynaklı ksenobiyotiklere konjugasyon için glutasyonu kullanırlar. Ökaryotik hücrelerde en bol bulunan, düşük molekül ağırlıklı, tiyol grubu içeren glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Söz konusu tripeptid, metabolizmada oldukça önemli proseslerde anahtar role sahiptir. Protein ve DNA sentezi, birçok transport işlevi ve detoksifikasyon bunlardan sadece birkaçıdır [37].

Glutasyonun biyosentezi iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamakta γ -glutamilsisteinil sentetaz (γ -GCS; EC 6.3.2.2) enzimi, sistein ve glutamati γ -glutamil-sisteine dönüştürerek hız belirleyici basamağı katalizler. İkinci basamakta

ise GSH sentetaz enzimi (GS; EC 6.3.2.3), glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. Glutasyon, indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur [38].

Geniş bir aileye sahip olan GST' ler; memeliler, böcekler, kuşlar, bakteriler de dahil olmak üzere hayatın birçok formunda işlev gördüğü bilinmektedir. Bu enzimler karaciğer başta olmak üzere ince bağırsak, kalınbağırsak, böbrek, akciğer, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok organın sitozolü ya da membranından izole edilerek çalışılmıştır [39].

İnsanlarda GST' ler oldukça yaygın bir şekilde bulunur. Özellikle karaciğerde çözülebilen proteinlerin yaklaşık % 4' ünü teşkil eder. Bu enzimler ayrıca ilaca dirençli hücreler ve insan tümörlerinde aşırı derecede eksprese edilirler [20].

Glutasyon s-transferazlar (GST; EC 2.5.1.18); elektrofilik substratların glutatyonla nükleofilik ataklarını katalize etmesiyle bu substratların hücredeki makro moleküllerle reaksiyona girme kabiliyetini azaltır [40]. Bu enzimler, ksenobiyotikleri glutatyondaki tiyol grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler. Bu işlemle oluşan metabolitlerin daha fazla suda çözünür hale gelmesi amaçlanır. Daha sonra GSH' dan koparılan glisin ve glutamik asit, sisteinin amino grubu ile asetillenip merkaptürik asitlere dönüştürülerek safra yolu vasıtasıyla vücuttan atılır. Bu şekilde pek çok sitotoksik, kanserojen ve genotoksik bileşiklerin hücre komponentlerine zarar vermeden atılması sağlanır. Söz konusu zehirsizleştirme mekanizması metabolizma için büyük önem taşır [2].

1.2.2 Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması

Bu enzimler hücresel lokalizasyonuna göre sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyel olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bunların arasından en iyi tanımlanmış ve en geniş aile türü; sitozolik GST' lerdir. Diğer aile olan mikrozomal GST' ler (MAPEG), eikozanoid sentezinde yer alan GSH'a bağımlı transferaz ve izomeraz reaksiyonlarını katalizleyen integral membran proteinleridir. Mitokondriyel GST' ler ise peroksizomlarda lokalize olmuşlardır. Katalitik aktivitesi ve bazı taşıma

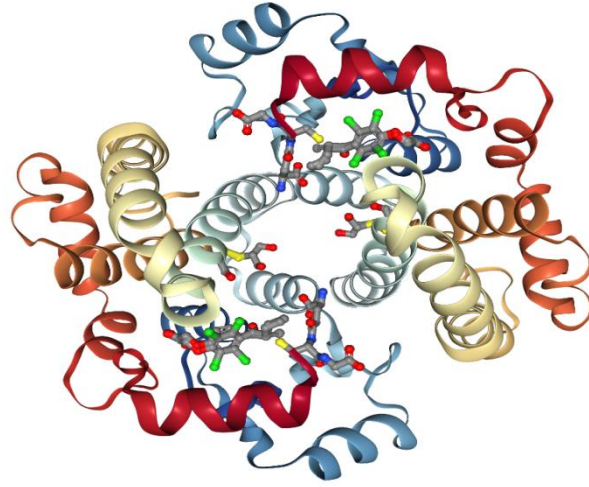
fonksiyonlarının yanında yağ asitlerinin β -oksidasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir [41,42].

GST sınıflandırılması ve isimlendirilmesi, protein dizilimi ve yapısına dayanmaktadır. GST isimlendirme antlaşması Mannervik ve arkadaşlarının derlemesinde özetlenmiştir. Alfa (A), mu(M), pi (p), sigma (S), zeta (Z), teta (T), omega (O) olarak bilinen yedi sınıf memeli sitozolik GST bulunmaktadır. Sitozolik GST' lerin diğer sınıfları beta (B), detta (D), epsilon (E), lambda (L), nu, tau (U) ve fi (F) bitkilerde ve susuz türlerde tespit edilmiştir [20,42,43]. Sitozolik GST'ler ile benzerlik gösteren kappa (K) sınıfı, insanlardaki tek GST sistemini oluşturur. Sitozolik ve mitokondriyel GST' ler dimer olarak oluşur. Yaklaşık molekül ağırlığı (mw) 44-55 kDa' dur [43]. MAPEG ailesi 4 alt gruptan (MGST I-IV) oluşur. Bugüne kadar insanlarda alt grup I,II ve IV' e ait altı MAPEG enzimi tespit edilmiştir [44].

Yetişkin insanların dokularında çeşitli GST izoformlarının farklı bir ifadesi görülür. Örneğin yetişkin insanların karaciğerinde, alfa sınıfı GST (GSTA), hepatositlerde izoenzimlerin baskın olduğu gösterilmiştir. Bu izoenzimlerden MGST ve GSTM sınıfları küçük miktarlarda bulunurken, GSTP sınıfı sadece safra epitelyumunda bulunur. GSTK1 haberci RNA (mRNA), incelenen tüm dokularda değişken seviyelerde böbrek, karaciğer ve en bol olmak üzere adrenal bezinde eksprese edilmiştir. Dahası, insan dokularındaki bireysel GST izoformlarının ifadesi, yaşla birlikte değişir; GSTP1 fetal gelişme sırasında en önemli GST' dir [41,45].

1.2.3 Memeli Sitozolik GST' lerin Genel Yapısı

Genel olarak sitozolik GST' ler her biri aktif bölge içeren dimerik yapıda proteinlerdir. Alt birimlerinin molekül ağırlıkları 23 kDa-29 kDa ve her bir alt birim 200-240 amino asitten oluşan homodimer veya heterodimer olarak bulunan enzimlerdir [24].



Şekil 1.1: GSTA1-1'in etakrinik asit (EA) ve GSH ile yapılan kompleksin üç boyutlu yapısı.

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi mavi renkli bölgeler, etakrinik asit ve GSH'ın iki alt biriminde aktif bölgeye bağlandığını göstermektedir. Dimerik bir yapıya sahip GST enziminin, GSH kosubstratına spesifik bir G bölgesi ve hidrofobik ya da elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesi bulunur [39,46]. Her alt biriminde de iki domain bulunmaktadır. N-terminal domain olarak adlandırılan alanda α/β yapısal birimleri hakimdir. Bu domain tiyoredoksin bağlanma bölgesi olarak da anılır ve sistein amino asidini bağlama özelliği olan $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ birimini yapısında barındırır. C-terminal domain ise α -heliks yapılarından oluşmaktadır ve H-bölgesinin büyük bölümünü oluşturur. Bu enzimlerin arasındaki H-bölgesini oluşturan hidrofobik aminoasit rezidülerindeki farklılıkların, substrat özgünlüğünde rol oynadığı düşünülmektedir [24].

G ve H bölgeleri dışında bazı GST' ler non- substrat ya da ligand bağlama bölgesi denen spesifik domainler içerir. Bu domaine L-bölgesi denir. Bu bölge porfirin, bilirubin, anyonik boyalar, steroid ve tiroid hormonları gibi anyonik yapıda fonksiyonel grup içeren lipofilik molekülleri bağlar [47]. GST, katalitik etkisi olmayan L bölgesi ile hücrede depolama ve transport gibi işlevler görür [20]. GST'nin ligandı bağlama özelliği, enzimin bazı substratları (GSH ve CDNB) ile kompetitif olarak inhibe edildiği saptanmıştır [22].

1.2.4 Glutasyon S-Transferazların Substratları

GST' ler çok geniş substrat özgülüğüne sahiptirler. Bazı substratları Tablo 1.2' de gösterilmiştir. GST enziminin en yaygın substratı, elektrofilik merkeze sahip olan CDNB' dir. Bu substratın GSH ile konjugasyon reaksiyonu ise GST aktivitesi belirlenmesinde kullanılmaktadır [48].

Tablo 1.2: GST' nin bazı substratları.

GST SUBSTRATLARI			
Eksojen Kaynaklı	Endojen Kaynaklı	İlaçlar	Pestisitler
Bütadien	Dopamin	Sisplatin	Lindan
Aflatoksin	Prostaglandin	Klorambusil	Atrazin
Etilenoksit	Kolesterol-5,6-oksit	Fosfomisin	DDT
Metilen klorid	Katekol	Nitrogliserin	
	Östrojen		

GST' lerin katalizlediği temel reaksiyonlara örnek olarak nükleofilik yer değiştirme, oksiran halkasının nükleofilik açılımı, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonları verilebilir. GST' lerin katalizlediği bazı reaksiyonlar ve substratları Tablo 1.3' de gösterilmiştir [37].

Tablo 1.3: GST' lerin katalizlediği reaksiyonlar.

Reaksiyon Tipi	Substrat
1.Michael katımı	N-asetilbenzokinonmin
2.Oksiran halkasına atak	1-nitropiren-4,5 oksit
3.Nükleofilik yer değiştirme	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
4.Organik hidroksiperoksinin indirgenmesi	Linoleik asit hidroperoksit
5.Organik nitratın indirgenmesi	Nitrogliserin ve türevleri

1.2.5 Glutasyon S-Transferazların Biyolojik Aktivitesi

Glutasyon s-transferazlar, ksenobiyotik Faz II biyotransformasyonunda anahtar rol oynamaktan başka ligandların bağlanması ve taşınması, hormon biyosentezi, tirozin katabolizması, lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesi ve sinyal yollarının modülasyonu gibi birçok fizyolojik rol oynar [24].

GST' nin en önemli fizyolojik fonksiyonu, çok çeşitli elektrofilik ksenobiyotikler ile GSH arasındaki konjugasyon reaksiyonunun bir sonucu olan detoksifikasyondur. Söz konusu ksenobiyotikler; çevresel kirleticiler olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), klinikte kullanılan çeşitli ilaçlar ve Faz I metabolitlerini içerir [20].

GSH konjugasyonu için lipofilik substratın yeterince elektrofilik karaktere sahip olması ya da konjugasyon öncesi Faz I biyotransformasyonu ile aktif hale gelmesi gerekir.

GST' nin detoksifikasyon aktivitesinin yanında peroksidaz aktivitesiyle de metabolizmada önemli işleve sahiptir. Birçok insan alfa sınıfı GST' ler (GSTA1- 1 ve GSTA2-2), lipid peroksidasyonun endojen ürünlerine karşı peroksidaz aktivitesine sahiptir. Bu nedenle glutasyon peroksidazın aksine GST' ye Se-bağımsız peroksidaz da denir [21].

Memelilerde bazı GST sınıfları inflamatuvar sürece dahil olan steroid hormonlarının ve eikozanoidlerin sentezinde yer alır. *Prostaglandin D-sentetaz* olarak da bilinen sigma sınıfı GST' ler, PGH₂' nin PGD₂' ye izomerleşmesini katalizler. Bu enzimler, prostaglandin PGE₂ üretiminde önemli rol oynarlar. Ayrıca GST' nin bazı izoformları, testosteron ve progesteron biyosentezi için öncül maddelerin üretiminde büyük önem taşırlar [49].

GST' lerin bir başka önemli fizyolojik fonksiyonu, birçok molekülün transportunda önemli işleve sahip olmasıdır. Bu enzimler başta bilirubin, hem, safra tuzları, kanserojenler, boyalar ve bazı ilaçlar olmak üzere çok sayıda bileşiklere tersinir bir şekilde bağlanır. Bu nedenle söz konusu bileşiklerin hızlı bir biçimde transportunda GST' nin rolü oldukça önemlidir. Ayrıca bazı ligandların aktivitesini

de azaltarak anti-sitotoksik bir etki oluştururlar [22]. Buna ilaveten, zeta sınıfında yer alan bazı GST' lerin fenilalanin ve tirozin katabolizmasında önemli bir işleve sahip olduğu bilinmektedir [50].

Bazı GST izoenzimleri, hücre proliferasyon ve apoptozisi kontrol eden hücre sinyal iletim yollarını modüle ettiği saptanmıştır. Bu enzimler, söz konusu sinyal iletim yolunda önemli fizyolojik role sahip protein kinazın aktivitesini de etkilediği bilinmektedir [23].

2. MATERYAL VE METOD

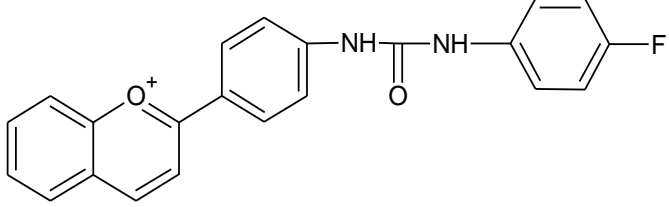
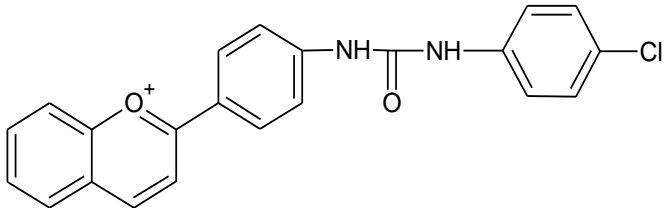
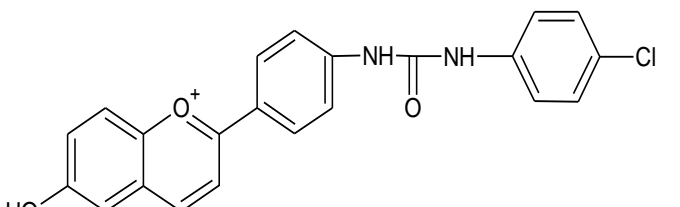
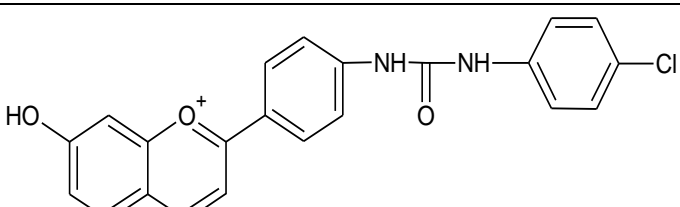
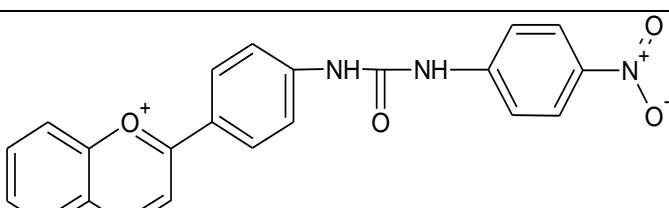
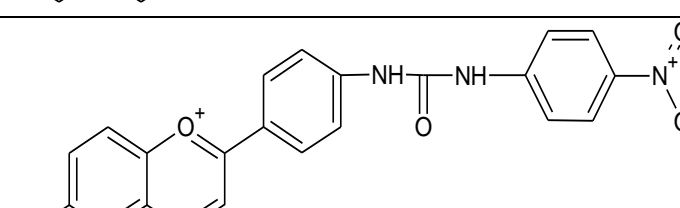
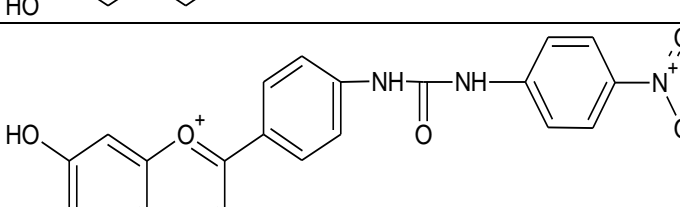
2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan, L-Glutatyon, 1-kloro,2-4-dinitrobenzen (CDNB), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum karbonat, amonyum sülfat, siyanojen bromür, sülfürik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum bi karbonat gibi kimyasallar Merck ve Sigma' dan sağlanmıştır. Akrilamid, bisakrilamid, amonyumpersülfat, SDS, bromtimol mavisi, Coomassie brillant blue G-250 ise Fine Chemical' dan temin edilmiştir. Ayrıca elektroforezde kullanılan protein marker ThermoFisher Scientific' ten sağlanmıştır.

GST enzimi üzerindeki etkileri araştırılan orijinal flavonoid türevleri, Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Laboratuvarı'nda Küçükislamoğlu ve ark. tarafından sentezlenen bileşiklerdir. Tez kapsamında inhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşikler Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan flavonoid türevleri ve isimleri.

Bileşik	Şekil
4'-(4-florofenilürenil)- apigenidin (1)	
4'-(4-klorofenilürenil)- apigenidin (2)	
4'-(4-klorofenilürenil)-6- hidroksi-apigenidin (3)	
4'-(4-klorofenilürenil)-7- hidroksi-apigenidin (4)	
4'-(4-nitrofenilürenil)- apigenidin (5)	
4'-(4-nitrofenilürenil)-6- hidroksi-apigenidin (6)	
4'-(4-nitrofenilürenil)-7- hidroksi-apigenidin (7)	

Tablo 2.1: (Devam).

<p>4'-(4-nitrofeniltiyürenil)- 6-hidroksi-apigenidin (8)</p>	
<p>4'-(4-nitrofeniltiyürenil)- 7-hidroksi-apigenidin (9)</p>	
<p>4'-(4-klorofeniltiyürenil)- 7-hidroksi-apigenidin (10)</p>	

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan alet ve cihazlar aşağıdaki verilmiştir.

- Hassas Terazî Precisa XB220A
- Manyetik Karıştırıcı Wise Stir MSH-20A
- UV-Spektrofotometre Biotek Power Wave XS
- pH-metre Orion-Model 920A
- Otomatik Pipetler Thermo ve Eppendorf
- Homojenize Edici Felix Blender
- Derin Dondurucu Beko Buzdolabı
- Soğutmalı Santrifüj Sigma Laborzentrifügen
- Kromatografi Kolonu Sigma (1,5 x 10 cm)
- Gradient Mikser Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
- Çalkalayıcı Biolab 1575-2B
- Elektroforez BIORAD

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneyisel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanışları ve kullanıldıkları aşamalar aşağıda verilmiştir.

- **Ekstraksiyon Tamponu**

0,1 M fosfat tamponu (pH 6,5); 8,709 g (0,05 mol) K_2HPO_4 500 mL saf suda çözülerek 1 M hidroklorik asit ile pH' sı 6,5'e ayarlandı ve hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

- **Hemoglobin çöktürmesi için kullanılan çözeltiler**

20 mM tris-baz (pH 7,4) ; 0,02 g tris-baz 90 mL saf suda çözülerek 1 M HCl ile pH' ı ayarlandı ve son hacmi 100 mL' ye getirildi.

- **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon**

0,1 M Fosfat Tamponu (pH 6,5) ; 1,7418 g (0,001 mol) K_2HPO_4 95 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH' sı 6,5' e getirildi ve son hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

- **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon**

1 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren 0,1 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 8); 14,2 g (0,1 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $(NH_4)_2SO_4$ 950 ml distile suda çözülerek 1M HCl ile pH' sı 8,00'e getirildi ve son hacmi 1 L' ye tamamlandı.

- **GST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon**

0,1 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 8); 7,1 g (0,05 mol) Na_2HPO_4 450 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH' sı 8,00'e getirildi ve son hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

- **GST Aktivite ölçümünde kullanılan tampon**

0,1 M Fosfat Tamponu (pH 6,5) ; 8,709 g (0,05 mol) K_2HPO_4 450 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH' sı 6,5'e getirildi ve son hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

- **Substrat Çözeltileri**

0,2 M L-Glutatyon Çözeltisi; 0,3073 g (0,001 mol) L-glutatyon 4 mL distile suda iyice çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 5 mL' ye tamamlandı.

0,1 M CDNB Çözeltisi; 2,04 g (0,01 mol) 1-kloro-2,4-dinitrobenzen alınarak bir miktar etanol içinde hafif ısıyla çözülür ve son hacmi etanol ile 100 mL' ye tamamlandı.

- **GST Aktivite ölçümünde kullanılan etanol**

Saf etanol kullanıldı.

- **Protein tayininde kullanılan serum albümin çözeltisi**

Standart serum albümin (1 mg/mL) ; 10 mg serum albümin 10 mL saf su ile çözüldü.

- **Kantitatif protein tayini için çözeltilerin hazırlanması**

50 mg Coomassie brilliant blue G-250, 25 mL etanol içinde çözüldü. Daha sonra bu karışıma 50 mL fosforik asit (% 95) eklendi.

- **Flavonoid çözeltileri**

Araştırmamızda kullanılan flavonoid bileşiklerinin stok konsantrasyonları 0,1 M olarak hazırlanmıştır.

- **Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hGST enziminin elektroforezinde kullanılan tamponlar**

Tris-HCl, pH 6.8 (0.5 M)	5 mL
---------------------------	------

SDS (% 10)	8 mL
------------	------

Gliserol	4 mL
----------	------

β -merkaptöetanol	2 mL
-------------------------	------

Renk Reaktifi	0,02 g
---------------	--------

Saf su	1 mL
--------	------

○ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi**

0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

○ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi**

% 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

○ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jeller**

Elektroforezde kullanılan çözeltiler ve miktarları Tablo 2.2' de belirtilmiştir.

Tablo 2.2: Saflaştırılan enzimin elektroforez işlemindeki çözeltilerin miktarları

	% 10' luk Ayırma Jeli	% 3' lük Yığıma Jeli
Akril amid/ Bis (%30)	16.65 mL	2.6 mL
Destile Su	20.1 mL	12.2 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	12.5 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	5 mL
% 10' luk SDS	0.5 mL	200 µL
TEMED	25 µL	20 µL
% 10' luk amonyum persülfat	750 µL	400 µL

2.2 Yöntemler

2.2.1 GST Enziminin Saflaştırılması

2.2.1.1 Homojenizatın Hazırlanması

Enzim kaynağı olarak *Holştayn* karaciğeri kullanıldı. Enzim saflaştırılmadan önce karaciğer homojenize edildi. Bu amaçla küçük parçalara ayrılmış karaciğer, blender içine alındı. 0,1 M fosfat tamponu ile birlikte homojenize edildi. Homojenizat tülbent ile süzüldü. Elde edilen süzüntü, soğutmalı santrifüj ile 1 saat süreyle +4°C' de 15.000 rpm' de santrifüj edildi. Çöken kısım atıldı ve süpernatant homojenizat olarak kullanıldı.



Şekil 2.1: Homojenizatın hazırlanması.

2.2.1.2 Hemoglobin Çöktürmesi

Hemoglobin çöktürme işlemi için hazırlanan $ZnCl_2$ -Tris çözeltisi kullanıldı. Homojenizat alınarak 1/1 oranında $ZnCl_2$ -Tris çözeltisi eklendi. Bu karışım $+4^{\circ}C$ 'de 6.000 rpm hızla 15 dakika santrifüj edildi. Çöken kısım atıldı ve kalan kısım diğer aşamalarda kullanılmak üzere ayrıldı.



Şekil 2.2: Hemoglobin çöktürme işlemi.

2.2.1.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi



Şekil 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi.

Amonyum sülfat çöktürme aralığını belirlemek amacıyla Tablo 2.3' de verilen hacimlerdeki numuneye, belirtilen miktarlarda amonyum sülfat eklenmiştir.

Eklenen amonyum sülfat iyice çözüldükten sonra +4°C 6.000 rpm' de 15 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulandı. Çökelek, çözünebilen minimum hacimde 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,5) ile çözülmüştür. Bu işlem % 0-100 doygunluk arasına uygulanmıştır. Aktivite ve protein tayininden sonra çöktürme aralığı % 60 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.

Tüp No	Doygunluk	Hacim (mL)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	Absorbans Farkı (A ₂ -A ₁)
1	0-10	30	1.54	0.651
2	10-20	27	1.43	0.741
3	20-30	27	1.47	0.888
4	30-40	26	1.46	1.157
5	40-50	25	1.45	1.185
6	50-60	24	1.44	1.381
7	60-70	23	1.43	1.305
8	70-80	22	1.42	0.129
9	80-90	22	1.47	0.065
10	90-100	22	1.53	0.014

2.2.1.4 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile GST Enziminin Saflaştırılması

Çalışma grubumuz tarafından daha önceden sentezlenen hidrofobik jel kullanılarak GST enzimi saflaştırıldı [51]. Hidrofobik jel 1,5x10 cm' lik kolona yavaş yavaş paketlendi. Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 8) tamponu ile dengelendi. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan numune alınarak 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,5) ile çözüldü ve numune kolona tatbik edildi. Gradient mikser kullanılarak yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti oluşturuldu. 2 mL hacmindeki ependorf tüplere elüatlar toplandı. Daha sonra her bir tüp için GST'nin protein ve

aktivite işlemleri gerçekleştirildi. Hidrofobik etkileşim tekniği ardından aktivitesi yüksek elüatlar birleştirildi.



Şekil 2.4: Hidrofobik etkileşim kolonu.

2.2.1.5 SDS-PAGE ile hGST' nin Saflığının Kontrolü

Araştırmamızda elektroforez işlemi %3 ve %10 akrilamid konsantrasyonunda kesikli olarak Laemelli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirildi[52].

Sabitlenen elektroforezin dökme aparatına, Tablo 2.2' de verilen miktarlara göre hazırlanan jel eklendi. Elektroforez işleminde çok önemli olan hava kabarcıklarının bulunmamasına özen gösterildi. Hazırlanan ayırma jelinin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 15 dakika beklendi. Daha sonra yığılma jeli dökülerek tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarak, polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra çıkarıldı ve oluşan kuyucuklara numune tatbik edildi. Dökme aparatı, elektroforez tankına yerleştirildi ve yürütme tamponu ilave edildi.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucu saflaştırılan hGST enziminin saflığının kontrolü için yapılan elektroforez işlemi daha önce araştırma grubumuz tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi [52]. Şekil 2.5'te görüldüğü gibi yapılan işlem sonucu elde edilen protein bantları belirginleşince jel fotoğrafı çekildi.



Şekil 2.5: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hGST' nin elektroforez işlemi.

2.2.2 Protein Tayini

2.2.2.1 Kalitatif Tayin

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucu elde edilen elüatların kalitatif protein tayinleri 280 nm’ de absorbans ölçümleri alınarak yapıldı. Kalitatif protein tayini 280 nm’ de proteinlerin yapısında bulunan tirozin, fenil alanin, triptofan amino asitlerinin UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanır. Elüatlar kuvarz küvetlerde, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu. Ölçülen bu değerler protein tayini olarak kaydedildi.

2.2.2.2 Kantitatif Tayin

Saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim çözeltisindeki protein miktarı tayinleri, Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem boya reaktifi olarak kullanılan ve negatif yüke sahip olan Coomassie brilliant G-250’ nin protein üzerindeki pozitif yüke bağlanması esasına dayanır.

Bu yöntem kullanıldığında standart bir grafik hazırlanması gerekir. Bu işlem şu şekilde yapıldı; 1 mL’ sinde 1 mg protein içeren standart serum albümin çözeltisinden tüplere farklı miktarlarda (0- 100 µL) eklendi. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL’ ye tamamlandı. Her tüpe 5 mL boya reaktifi ilave edildi. Hızlıca her tüp çalkalandı ve sonra 10 dakika karıştırıcıya bırakıldı.

Hazırlanan her bir tüp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm’ de absorbans ölçümleri yapıldı. Kör olarak kullanılan küvet içerisine 0,1 mL saf su ve 5 mL boya reaktifi eklendi. Ölçülen absorbans değerlerine sebep olan protein miktarları ile grafik çizildi.



Şekil 2.6: Bradford yöntemi ile protein tayini.

Daha sonra belirli saflaştırma basamaklarından sonra elde edilen 4 adet saf enzim numunelerinden 0,1 mL tüplere konuldu ve üzerine 5 mL boya reaktifi ilave edildi. Hızlıca çalkalandıktan sonra 10 dakika karıştırıcıya bırakıldı ve sonrasında 595 nm’ de absorbanları ölçüldü. Hazırlanan standart grafiğin denkleminde yararlanılarak protein tayinleri belirlendi.

2.2.3 GST Enziminin Aktivite Tayini

Glutasyon s-transferaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 50 μ L enzim çözeltisi alınıp önceden hazırlanmış olan 920 μ L fosfat tamponu, 10 μ L CDNB, 5 μ L etanol, 15 μ L L-glutasyon çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 1 dakikada absorbansta oluşan değişme okundu. Absorbanstaki artış kaydedildi.

2.2.4 GST Enzimi ile İlgili Kinetik Çalışmalar

2.2.4.1 K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, L-glutasyon (GSH) ve CDNB substratlarının Tablo 2.4 ve Tablo 2.5’de gösterildiği gibi değişik derişim kullanılarak GST enzim aktivitesi tespit edildi.

Söz konusu enzim ünitelerinden $1/V$ ve $1/[S]$ ölçümleri tespit edilerek Lineweaver-Burk grafiği bilgisayar programı yardımıyla çizildi. Enzimin kinetik sabitleri (K_m ve V_{max}) grafiklerden belirlendi.

Tablo 2.4: CDNB substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

0,1 M Fosfat Tamponu (μL)	0,1 M CDNB Çözeltisi (μL)	Etanol (μL)	0.2 M GSH Çözeltisi (μL)	Enzim Çözeltisi (μL)
928	2	5	15	50
925	5			
923	7			
920	10			
918	12			
915	15			
913	17			
910	20			

Tablo 2.5: GSH substratı için Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

0,1 M Fosfat Tamponu (μL)	0,1 M CDNB Çözeltisi (μL)	Etanol (μL)	0.2 M GSH Çözeltisi (μL)	Enzim Çözeltisi (μL)
933	10	5	2	50
930			5	
928			7	
925			10	
923			12	
920			15	
928			17	
915			20	

2.2.4.2 Bazı Flavonoid Türevlerinin GST Enzim Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

hGST enzim aktivite tayin metodunda olduğu gibi önce aktivite tamponu sonra sırasıyla diğer çözeltiler küvete ilave edildi, enzimden önce inhibitör ilave edilerek enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlemlendi. Bu ölçümden önce ise inhibitörsüz ortamda aktivitesi bulundu ve değerler %100 aktivite olarak kullanıldı. Sığır karaciğeri GST enzim aktivitesi üzerine flavonoid türevlerinin etkilerini belirlemek amacıyla Tablo 2.6'da belirtildiği gibi küvet ortamına en az beş farklı konsantrasyonda flavonoid türevleri katılarak absorbanları okundu. Okunan bu absorban değerleri ile % Aktivite-[İnhibitör] grafiği çizildi. Söz konusu grafiklerden IC₅₀ değerleri belirlendi.

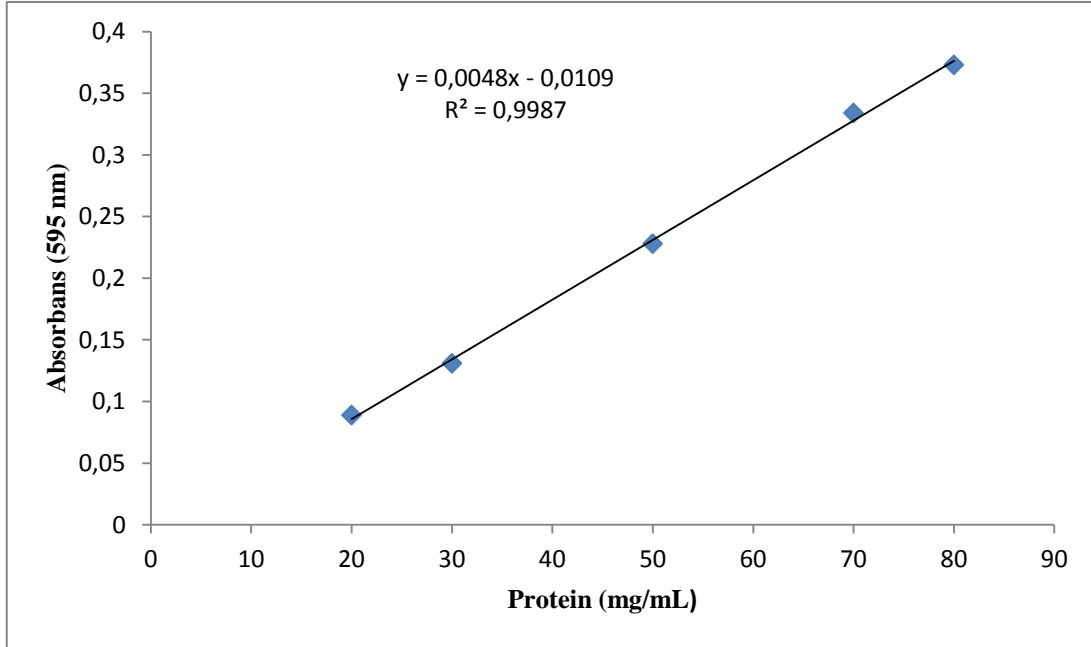
Tablo 2.6: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve miktarları.

0,1 M Fosfat Tamponu (μL)	0,1 M CDNB Çözeltisi (μL)	Etanol (μL)	0.2 M GSH Çözeltisi (μL)	Flavonoid Çözeltisinin Hacmi (μL)	Enzim Çözeltisi (μL)
920	10	5	15	-	50
915				5	
910				10	
905				15	
900				20	
895				25	
890				30	
885				35	
880				40	
875				45	
870				50	
860				60	

3. BULGULAR

3.1 Bradford Yöntemi ile Hazırlanan Standart Eğri

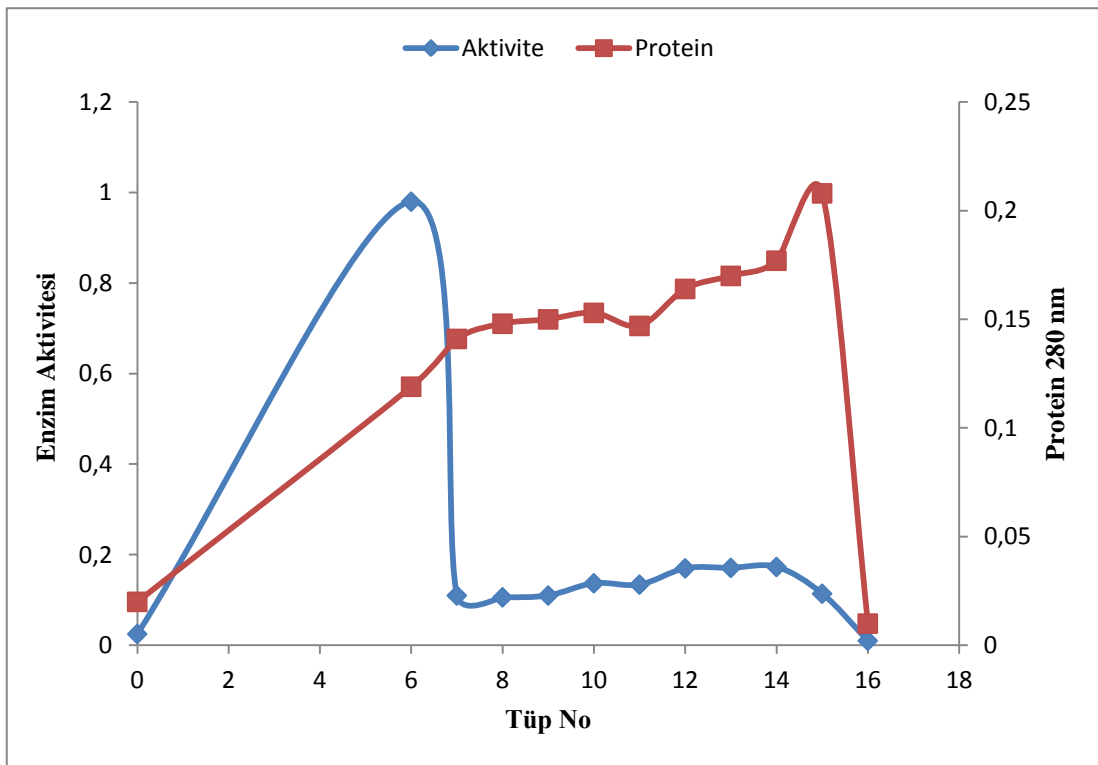
Kantitatif protein tayini Bölüm 2.2.2.2' de anlatılan prosedüre göre Bradford yöntemi kullanılmıştır. Homojenizat ve saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini bu grafiğe göre belirlendi. Söz konusu grafik Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Proteinlerin kantitatif tayini için standart grafik.

3.2 hGST Enziminin Saflaştırılması

Enzim saflaştırılması için Bölüm 2.2.1.4' de anlatılan aşamalar uygulanmıştır. Saflaştırma işlemi sonrası toplanan elüatların her biri için protein tayini ve aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafikleri çizildi (Şekil 3.2). Hidrofobik etkileşim kromatografisinin ardından enzim aktivitesi yüksek olan elüatlar toplandı. Hidrofobik jele yüklenen GST çözeltilerinde protein ve aktivite tayinleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.1' de verilmiştir.



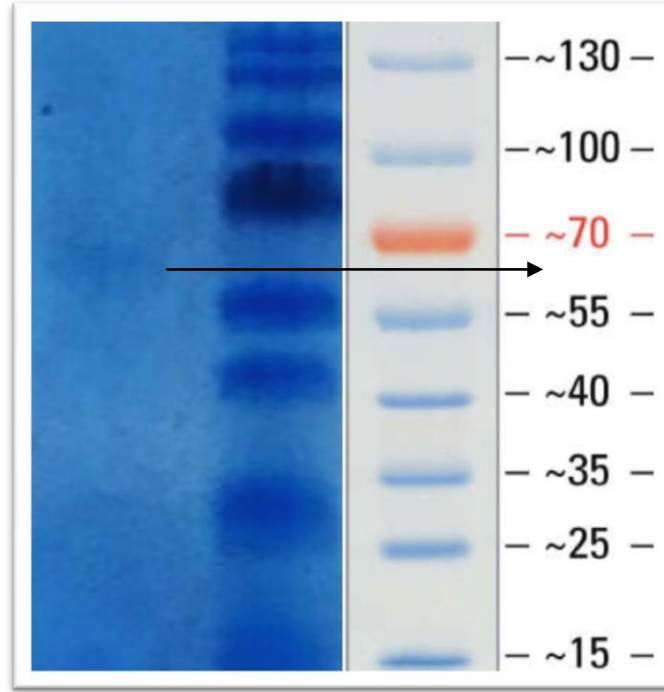
Şekil 3.2: hGST enziminin elüsyon grafiği.

Tablo 3.1: GST enziminin saflaştırma basamakları ve derecesi.

hGST Saflaştırma Aşaması	Numune Hacmi (mL)	Enzim Ünitesi (U/mLdk)	hGST'nin Toplam Aktivitesi	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Derecesi
Homojenizat	75	8.92	669	15002	1125000	5.95×10^{-4}	-
Hemoglobin Çöktürmesi	50	13.6	680	3829	191450	3.55×10^{-3}	5.97
Amonyum sülfat Çöktürmesi	6	9.55	57.3	6942	41652	1.37×10^{-3}	0.4
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2	1.51	3.02	13.81	27.62	0.109	79.8

3.3 SDS-PAGE ile hGST' nin Saflık Kontrolü

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hGST' nin saflık kontrolü Bölüm 2.2.1.5' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. SDS-PAGE sonrası protein bantları görülen jelin fotoğrafı çekildi. Proteinin molekül ağırlığı 70 ila 55 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.3).



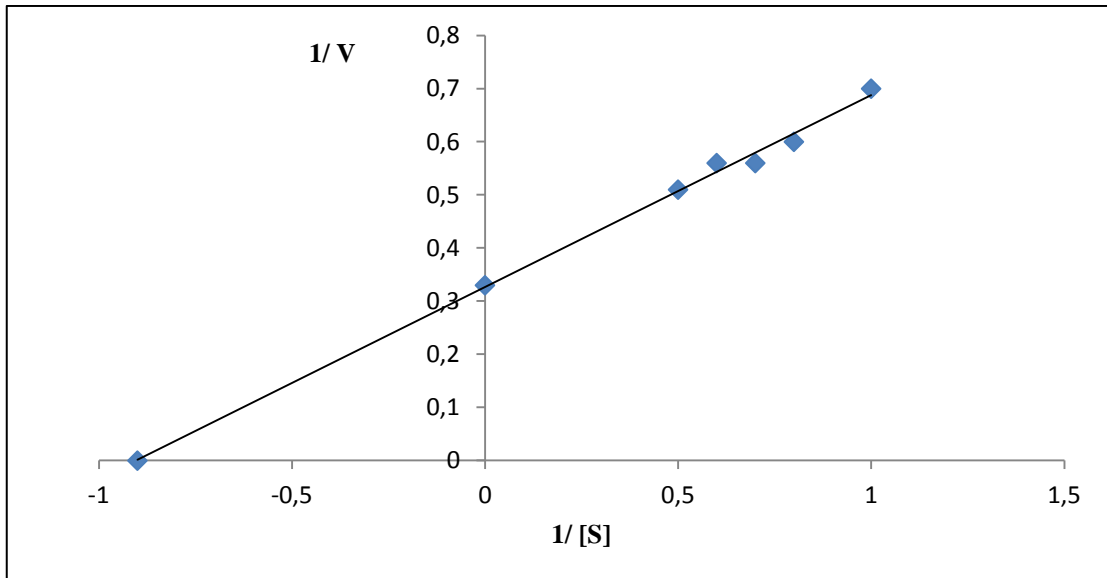
Şekil 3.3: hGST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.

3.4 hGST Enziminin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

hGST enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi gayesiyle, Bölüm 2.2.4.1’ de belirtildiği gibi L-glutasyon (GSH) ve CDNB substratlarının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Söz konusu aktivite ve konsantrasyon değerlerinden $1/V$ ve $1/[S]$ grafiği çizildi. K_m ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

Tablo 3.2: GSH' in kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

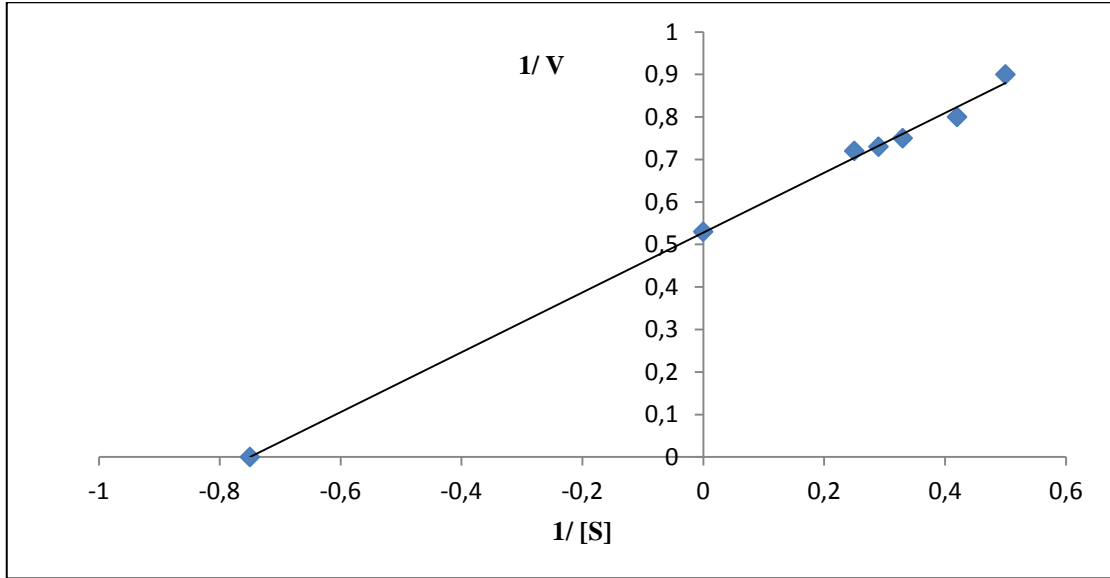
Değişken GSH Konsantrasyonu (mM)	$1/[S]$	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	$1/V$
2	0,5	0,188	1,95	0,51
1,7	0,6	0,17	1,77	0,56
1,5	0,7	0,169	1,76	0,57
1,2	0,8	0,143	1,49	0,6
1	1	0,139	1,44	0,7



Şekil 3.4: hGST enzimi için GSH substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.3: CDNB' nin kinetik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

Değişken CDNB Konsantrasyonu (mM)	1/ [S]	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	1/ V
4	0,25	0,133	1,38	0,72
3,4	0,29	0,131	1,36	0,73
3	0,33	0,127	1,32	0,75
2,4	0,42	0,121	1,26	0,8
3	0,5	0,12	1,25	0,9



Şekil 3.5: hGST enzimi için CDNB substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

3.5 hGST Enzim üzerine Bazı Flavonoid Türevlerinin Etkileri

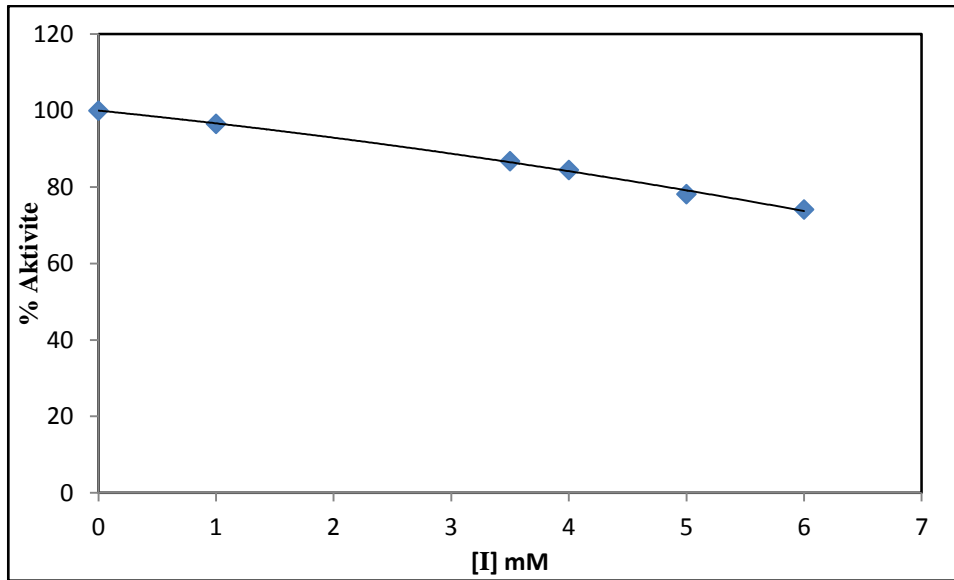
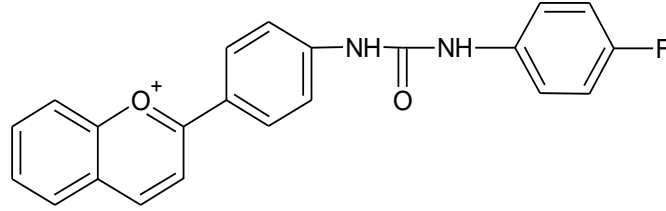
Flavonoidlerin, GST enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için Bölüm 2.2.3.2' de anlatıldığı gibi GSH ve CDNB substratlarına karşı aktivitesi ölçüldü. 340 nm' de bir dakikada absorbanstaki değişme okundu ve okunan bu absorbans değerlerinden faydalanılarak % aktivite hesaplandı. Her bir inhibitör için % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Bu grafiklerde baz alınarak tüm her bir flavonoid türevi için IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ ve IC₈₀ değerleri Tablo 3.4' de verilmiştir.

Tablo 3.4: Flavonoidlerin IC₅₀-IC₈₀ değerleri.

Flavonoid	IC ₅₀ Değerleri (mM)
1	IC ₅₀ : 9,71 IC ₈₀ : 4,81
2	5,8
3	4,69
4	4,97
5	4,22
6	3,77
7	3,12
8	2,1
9	3,05
10	3,43

Tablo 3.5: 1.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

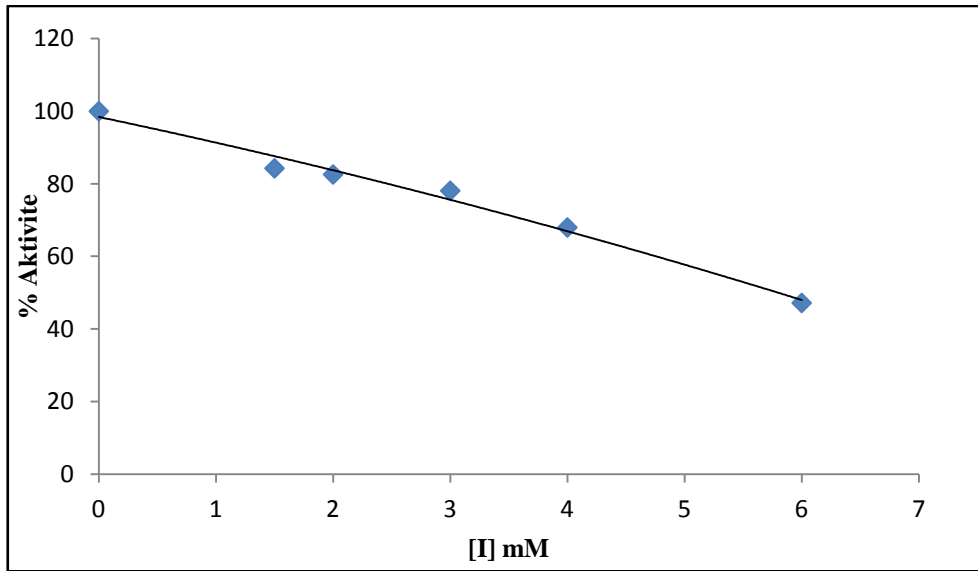
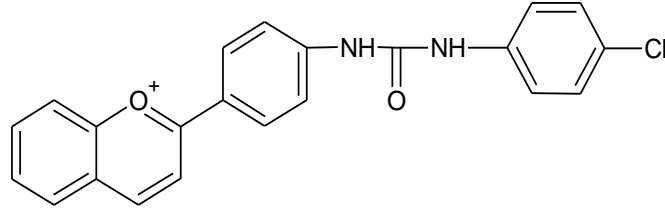
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,174	1,81	100
10	1	0,168	1,75	96,5
35	3,5	0,151	1,57	86,8
40	4	0,147	1,53	84,5
50	5	0,136	1,41	78,2
60	6	0,129	1,34	74,1



Şekil 3.6: 1.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.6: 2.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

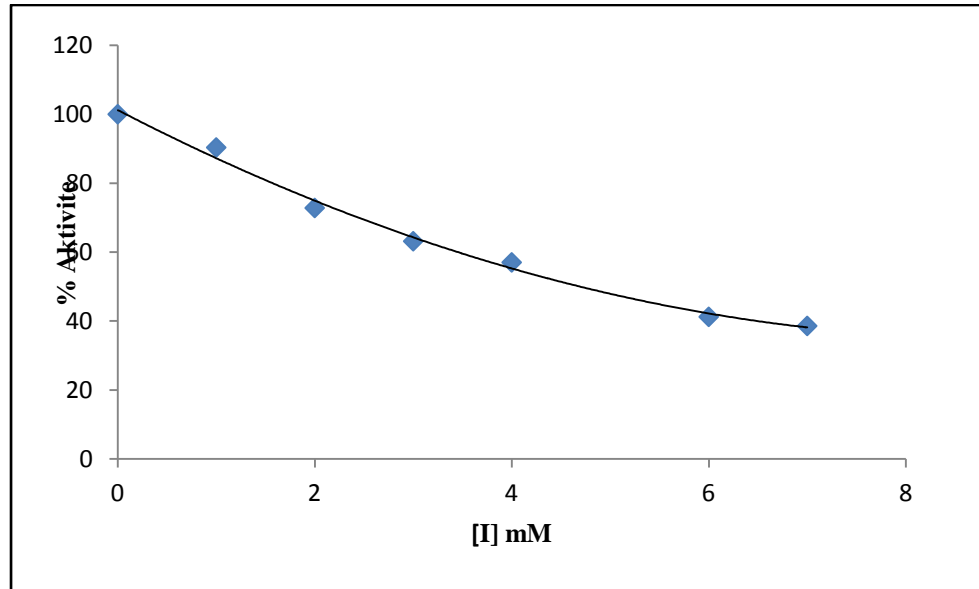
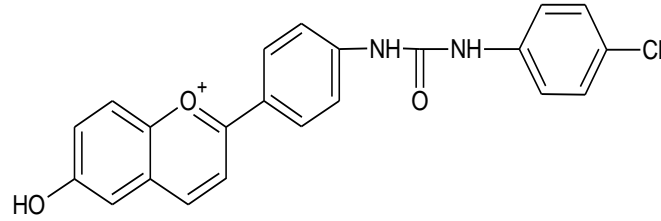
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,178	1,85	100
15	1,5	0,15	1,56	84,3
20	2	0,147	1,53	82,6
30	3	0,139	1,45	78,1
40	4	0,121	1,26	67,9
60	6	0,084	0,87	47,2



Şekil 3.7: 2.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.7: 3.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

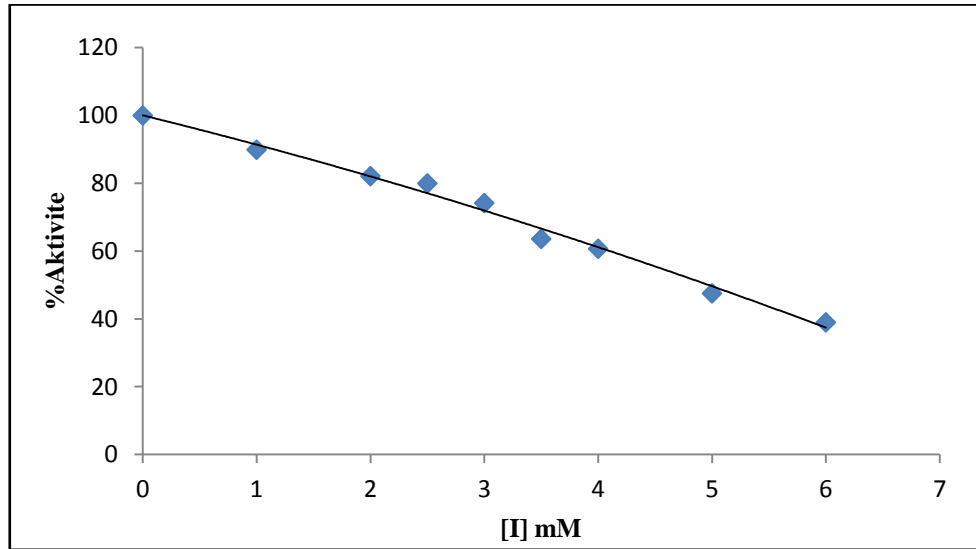
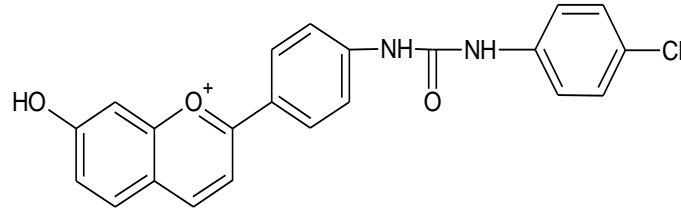
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,114	1,18	100
10	1	0,103	1,07	90,3
20	2	0,083	0,86	72,8
30	3	0,072	0,75	63,1
40	4	0,065	0,68	57,6
60	6	0,047	0,49	41,2
70	7	0,044	0,46	38,6



Şekil 3.8: 3.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.8: 4.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

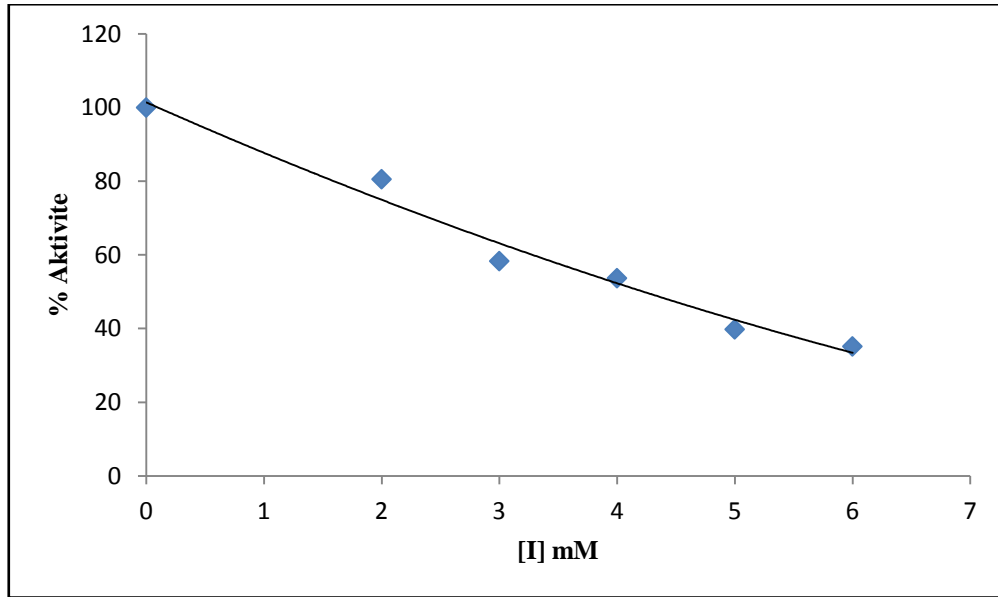
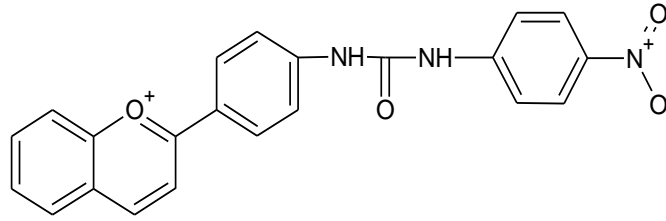
Flavonoid Hacmi (µL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite (µmol/mL/min)	% Aktivite
-	-	0,654	6,8	100
10	1	0,588	6,12	89,9
20	2	0,537	5,58	82,1
25	2,5	0,523	5,44	79,9
30	3	0,485	5,04	74,1
35	3,5	0,416	4,32	63,6
40	4	0,397	4,13	60,7
50	5	0,311	3,23	47,5
60	6	0,255	2,65	38,9



Şekil 3.9: 4.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.9: 5.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler ve miktarları.

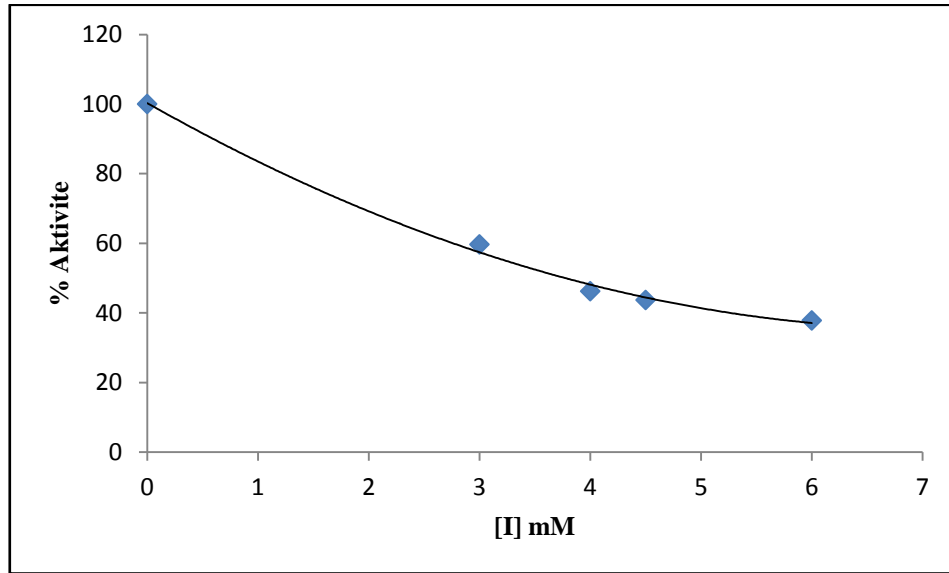
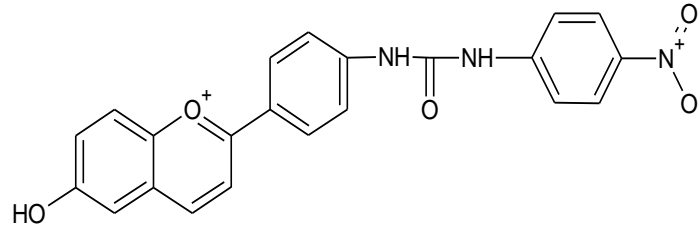
Flavonoid Hacmi (μ L)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite (μ mol/mL/min)	% Aktivite
-	-	0,108	1,12	100
20	2	0,087	0,90	80,5
30	3	0,063	0,65	58,3
40	4	0,058	0,60	53,7
50	5	0,043	0,45	39,8
60	6	0,038	0,39	35,2



Şekil 3.10: 5.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.10: 6.Bileşik hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

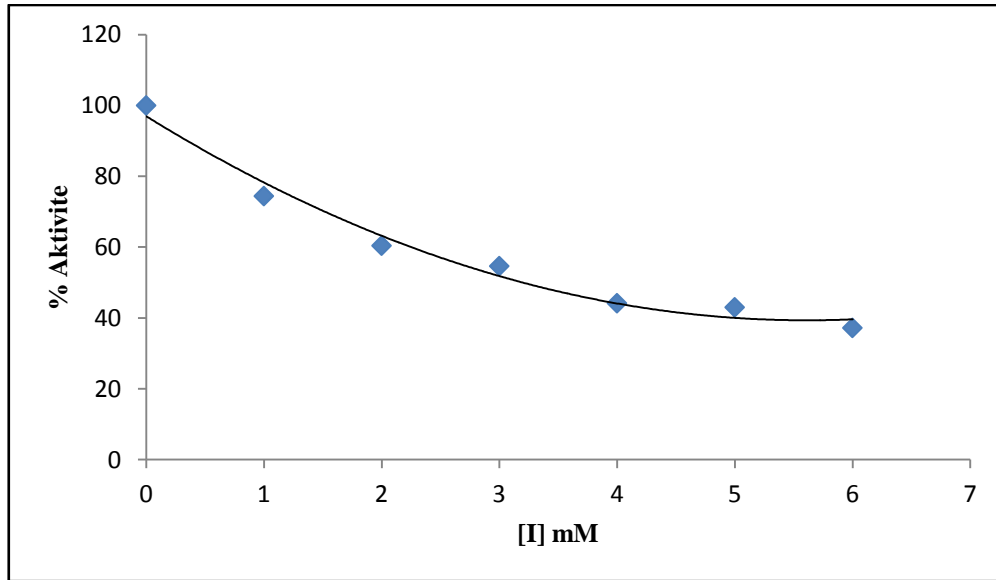
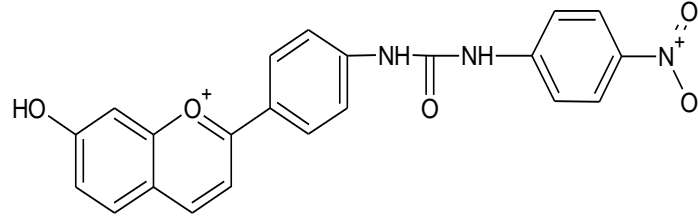
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,119	1,24	100
30	3	0,071	0,74	62,2
40	4	0,055	0,57	59,7
45	4,5	0,052	0,54	46,2
60	6	0,045	0,47	37,8



Şekil 3.11: 6.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği

Tablo 3.11: 7.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

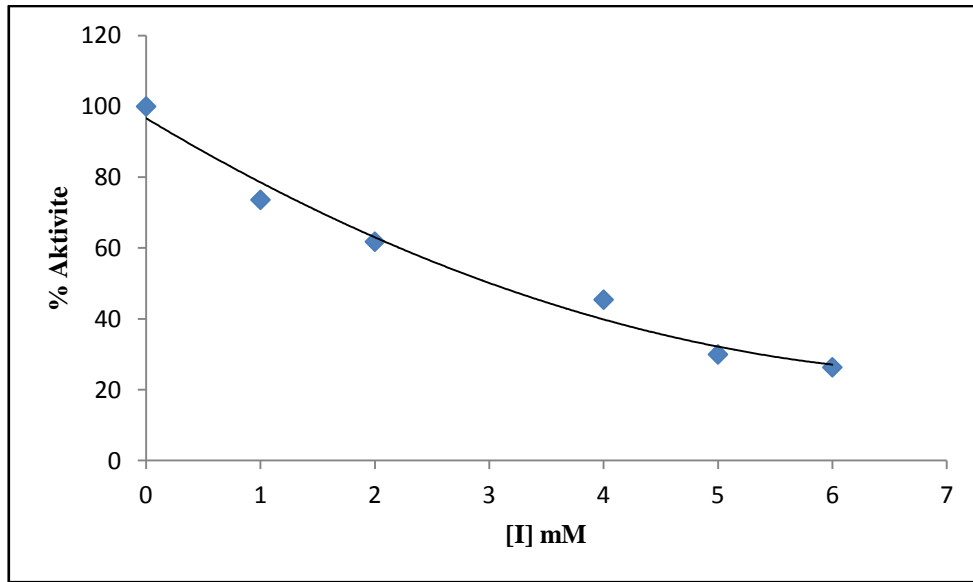
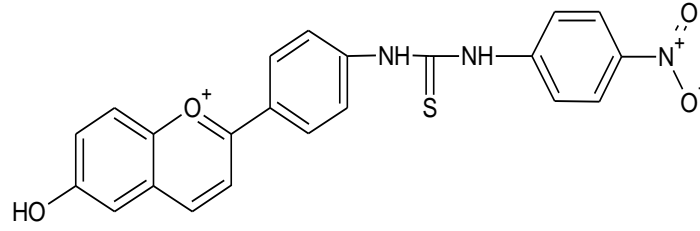
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,086	0,89	100
10	1	0,064	0,66	74,4
20	2	0,052	0,54	60,5
30	3	0,047	0,49	54,6
40	4	0,038	0,39	44,2
50	5	0,037	0,38	42,6
60	6	0,032	0,33	37,2



Şekil 3.12: 7.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.12: 8.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

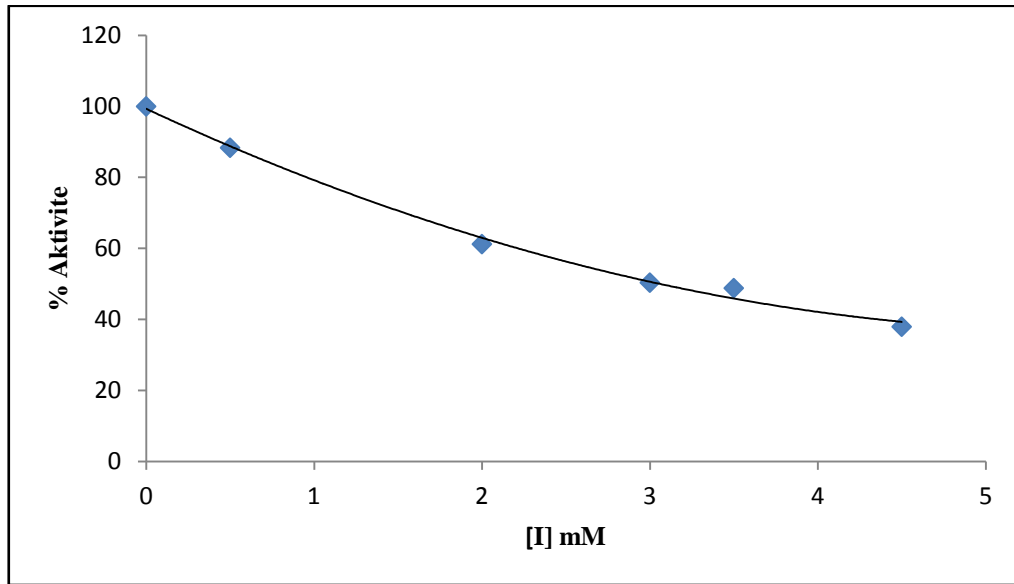
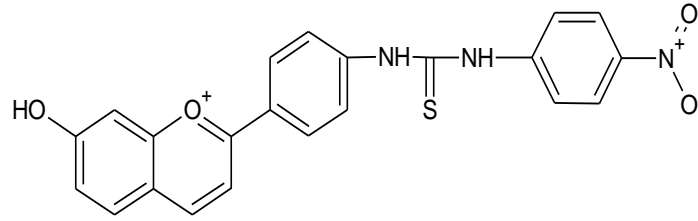
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,11	1,14	100
10	1	0,081	0,84	73,6
20	2	0,068	0,71	61,8
40	4	0,05	0,52	45,5
50	5	0,033	0,34	29,8
60	6	0,029	0,30	26,4



Şekil 3.13: 8.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

Tablo 3.13: 9.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

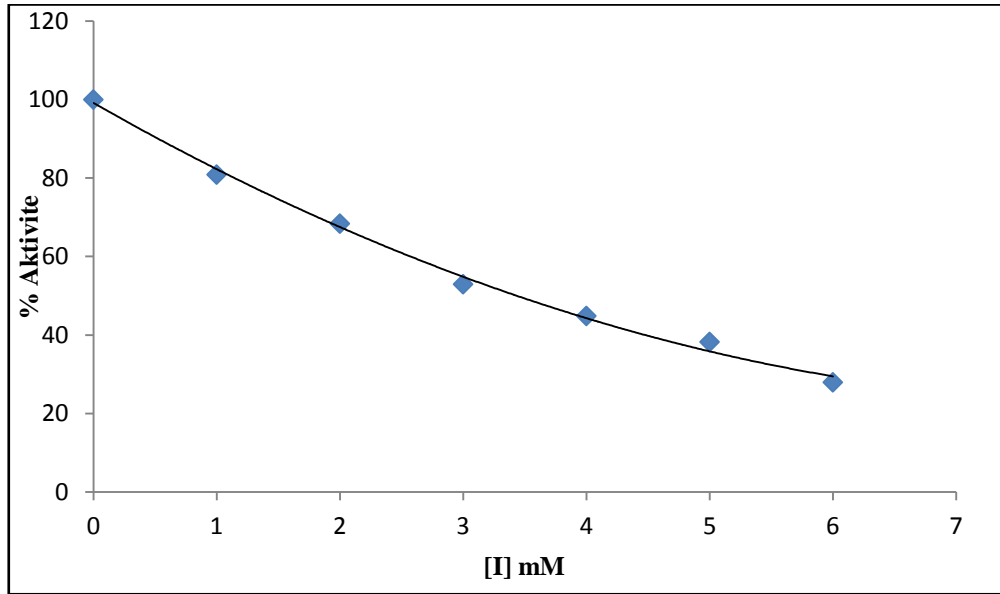
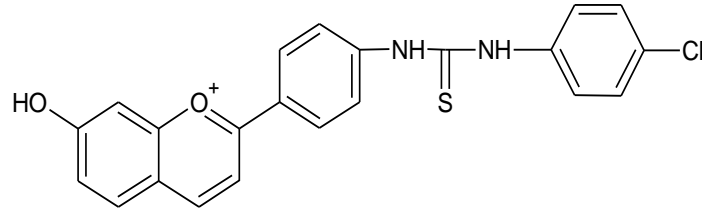
Flavonoid Hacmi (μL)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite ($\mu\text{mol/mL/min}$)	% Aktivite
-	-	0,129	1.34	100
5	0,5	0,114	0,92	88,4
20	2	0,079	0,82	61,1
30	3	0,065	0,68	50,3
35	3,5	0,063	0,65	48,8
45	4,5	0,049	0,51	37,9



Şekil 3.14: 9.Bileşik için % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.14: 10.Bileşik'in hGST üzerinde etkilerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler ve miktarları.

Flavonoid Hacmi (μ L)	Küvetteki Flavonoid Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (340 nm)	Aktivite (μ mol/mL/min)	% Aktivite
-	-	0,136	1,41	100
10	1	0,110	1,14	80,8
20	2	0,093	0,97	68,4
30	3	0,072	0,75	52,9
40	4	0,061	0,64	44,8
50	5	0,052	0,54	38,2
60	6	0,038	0,39	27,9



Şekil 3.15: 10.Bileşik için % aktivite- [I] grafiği.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hGST enzimi üzerine bazı flavonoid türevlerinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu enzim, giriş bölümünde de belirtildiği gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. GST enzimi hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan, başta detoksifikasyon olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip bir enzim ailesidir. Özellikle ksenobiyotik metabolizmasının Faz II aşamasındaki işlevi, bu enzim üzerinde çok yoğun çalışmalar yapılmasına sebep olmuş ve halen çalışmalar yapılmaya devam etmektedir [20,53-60]. Bu enzim; glutatyon (GSH) ile elektrofilik ksenobiyotiklerin konjugasyon reaksiyonunu katalizler. Bu şekilde söz konusu ksenobiyotiğin hidrofobisitesinin azaltılarak vücuttan atılımını kolaylaştırır. Buna ilaveten birçok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinde antioksidan olarak fonksiyon ve GSH-bağımlı peroksidaz aktivitesi de vardır [21]. Bu enzimler, non-katalitik aktiviteleri ile birçok hidrofobik ligandı bağlayarak onların transportunda önemli rol oynar.

Araştırmamızda enzim kaynağı olarak holştayn karaciğeri kullanılmıştır. Ülkemizde, diğer adıyla *Siyah Alaca* olarak bilinen holştayn yetiştiriciliği süt ve döl verimliliğinin avantajları sebebiyle oldukça popülerdir [61].

Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan doğal fenolik bileşik olan flavonoidler; antiviral, antibakteriyal, anti-inflamatuar, antioksidant ve antiradikal aktiviteleri de içeren çoklu biyolojik etkiler gösterdiği saptanmıştır [1]. Bu nedenle tüm dünyada flavonoid içeren çeşitli ürünlerin hazırlanması oldukça popüler hale gelmiştir.

20. yüzyılın ortalarına doğru flavonoidlerin önemli bir kısmını oluşturan apigenidin türevlerinin biyolojik aktiviteye sahip olduklarının anlaşılmasından dolayı flavonoidlere karşı ilgi artmıştır [62].

Bu çalışmamızda Prof.Dr. Mustafa Küçükislamoğlu ve ekibi tarafından sentezlenen flavonoid türevleri kullanılmıştır. Bu bileşiklerin *polifenol oksidaz* enzimi üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğu araştırma grubumuz tarafından daha önce tespit edilmiştir [5]. Söz konusu bileşiklerin GST üzerindeki etkileri ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. İnhibisyon çalışmalarında saf enzim kullanılmıştır. Enzim Sepharose-4B-L-tirozin-9-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak hidrofobik etkileşim tekniğiyle saflaştırılmıştır. Enzimin GSH dışında farklı hidrofobik substratları bağlayabildiği bir bölgeye sahip olduğundan dolayı söz konusu teknik tarafımızca uygulanmıştır. Bu teknikte kullanılan jel ile araştırma grubumuz tarafından birçok enzim saflaştırılmıştır. Aynı jel kullanılarak GST enziminin saflaştırılmasının birkaç açıdan önemli olduğu düşüncesindeyiz. Afinite tekniğinde kullanılan gerek ligand gerekse matriks oldukça pahalı olduğu gibi sentez sırasındaki olumsuzluklar, tekniğin uygulanmasını sınırlamaktadır. Uyguladığımız hidrofobik teknikte ise aynı jelle birçok enziminin saflaştırılması büyük bir avantajdır.

Hidrofobik etkileşim tekniğinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da önemli noktalardan biridir.. Bu kromatografide yaygın olarak Na₂SO₄, K₂SO₄, NaCl, NaBr, NaSCN kullanılıyor olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir[63].

GST enzimi literatürde genel olarak *GS-Agaroz* afinite jeli kullanılarak saflaştırılmıştır [64]. Örneğin GST enzimi; Erat ve arkadaşları tarafından Glutatyon-agaroz afinite kolunu ile 16 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, 1143 kat saflaştırılmıştır [65]. Başka bir çalışmada GST enzimi Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden glutatyon-sepharose afinite kolonuyla saflaştırılmıştır [66]. İnsan cenin karaciğerinden yapılan bir çalışmada GST'nin asidik bir formu afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır [67]. Yine bir başka çalışmada kefal balığı karaciğerinden anyon değişim kromatografisi yardımıyla GST'nin 14 izoformu saflaştırılmıştır [68]. Plasental glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi doğum yapmış hastanın plasentasından alınarak *glutatyon-agaroz* afinite kolonu kullanılarak Çelik ve arkadaşları tarafından saflaştırılmıştır [69]. Bir diğer çalışmada, Down sendromlu çocukların eritrositlerinde bulunan GST' nin afinite tekniğiyle saflaştırılarak, sağlıklı çocukların enzimleriyle karşılaştırılmıştır [70].

GST enziminin saflaştırılması konusunda bir diğer çalışmada, şifalı bir bitki olan *Thonningia sanguinea*'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A, *in vitro* olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör olduğu tespit edilmiştir [71]. HepG2 karaciğer hücrelerine kurutulmuş, dondurulmuş ve taze zencefilin metanol ekstraktı ile 12 ve 24 saat boyunca muamele edilerek GST enzim aktivitesi ve glutatyon seviyeleri incelenmiştir. Enzim aktivitesi ve GSH seviyesi 24 saat muamele sonucunda 12 saate kıyasla daha yüksek etki gösterdikleri saptanmıştır [72]. İnsan eritrositlerinden elde edilen GST enzimi üzerine hiperisin etkisini incelendiği çalışmada, söz konusu enzim eritrositlerden %71 verimle 2250 kat saflaştırılmıştır [73].

Araştırmamızda hGST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit CDNB konsantrasyonunda, GSH'ın 8 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Söz konusu grafiklerden GSH için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,11 mM, 3,06 EÜ/ mL olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, CDNB için bulunan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,34 mM, 1,89 EÜ/ mL' dir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre hGST enziminin daha düşük K_m değerine sahip olan GSH substratına ilgisinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Literatürde farklı kaynaklarda izole edilen enzimler için tespit edilen K_m ve V_{max} değerlerinin farklı olduğu görülmektedir. Tilapya balığı karaciğeri GST enziminin CDNB ve GSH substratları için K_m değerleri 0,42 mM ve 0,35 mM olarak belirlenmiştir [66]. Bir diğer çalışmada, gökkuşağı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_m ve V_{max} değerleri 0,0395- 0,2590 ve 0,0328- 0,0655 EÜ/ mL olarak saptanmıştır [74]. Bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden saflaştırılan GST enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerini sırasıyla 0,20 mM ve 0,28 mM olarak V_{max} değerlerini ise 7,57 μ mol/mg ve 15,68 μ mol/mg olarak belirlenmiştir [75]. Yine başka bir çalışmada plasental glutatyon s-transferaz enzimi için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Belirlenen değerler GSH için K_m sabiti 2 mM, V_{max} değeri 11,1 EÜ/ mg ve CDNB için K_m sabiti 0,55 mM, V_{max} değeri 35 EÜ/ mg' dır [69].

Araştırmamızda kullanılan flavonoidlerin IC_{50} değerleri % Aktivite-Flavonoid konsantrasyonları grafiklerinden tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullandığımız flavonoidlerin tümünün, çalışılan konsantrasyonlarda (0,5-7 mM) hGST enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. 8.Bileşik olan flavonoid türevinin 2,1 mM IC_{50} değeri ile en güçlü inhibitör olduğu görülmektedir. 1.Bileşik ve 2.Bileşik ise yüksek IC_{50} değerleri ile dikkat çekmektedir (9,71 mM – 5,8 mM). Diğer flavonoidler, 2 ila 5 mM aralığında IC_{50} değerleri ile hGST üzerindeki afinitelerinin benzer olduğu saptanmıştır. Literatürde flavonoidlerin GST enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin farklı olduğu görülmektedir[76-78]. Sıçan karaciğerinden saflaştırılan GSTA 1-1 enzimi üzerine silybin flavonoidinin etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada IC_{50} değeri 20 μ M olarak belirlenmiştir [6]. Bunun yanında yine sıçan karaciğerinde quercetin türevi flavonoid ile yapılan çalışmada μ M düzeylerde IC_{50} değerleri bulunmuştur[7]. İnsan rekombinant GSTP1-1 enzimi üzerine quercetin türevi flavonoidin etkileri Zanden ve arkadaşları tarafından araştırılmış. % 100 inhibisyon sağlanan bu çalışmada IC_{50} değeri 100 μ M olarak saptanmıştır [79]. Hayeshi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan rekombinant GST P1-1, A1-1, A2-2, M1-1 izoenzimleri üzerine genistein flavonoidinin etkileri araştırılmış. Yapılan bu çalışmada P1-1 ve A2-2 izoenzimleri inhibisyon etkisi göstermezken, A1-1 izoenziminde ise % 93 inhibisyon etkisi sağlanmıştır. M1-1 izoenziminde μ M düzeylerde IC_{50} değerleri hesaplanmıştır[11]. Yine başka bir çalışmada GST P1-1 enzimini üzerine galangin türevi flavonoidin inhibisyon etkileri araştırılmış ve IC_{50} değeri 14,4 μ M olarak tespit edilmiştir [80]. Hücre hatları üzerine bazı flavonoid türevlerinin inhibisyon etkilerinin araştırılmış ve kaempferol için 23,1 μ M, eriodictyol için 22,8 μ M, quercetin için 25,9 μ M IC_{50} değeri bulunmuştur [80]. Hepatoselüler karsinom denilen HepG2 ile yapılan çalışmada quercetin kullanılarak % 30 inhibisyon sağlanmıştır (IC_{50} 250 μ M) [12]. Yapılan başka çalışmada ise insan meme kanseri hücre hatları üzerine protoapigenon flavonoidinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İntact hücrelerinde IC_{50} değeri 10 μ M iken hücre lizatlarında bu değer 26,3 μ M olarak hesaplanmıştır [14]. Yine kanserli insandan alınan hücre üzerine 2,2'-dihidroksikalkonun etkilerinin araştırıldığı çalışmada; IC_{50} değeri 28,9 μ M bulunmuştur [16].

Bölüm 1' de belirtildiği gibi meyve sebzelerde bulunan doğal fenolik bileşikler olan flavonoidler antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiradikal gibi çoklu biyolojik aktivitelere sahip olması, bu bileşiklerin tüketilmesini önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak söz konusu bileşiklerin potansiyel olumsuz etkilerinin de olması flavonoid tüketimi konusunda endişelerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu bileşiklerin özellikle sitokrom P450 ve GST' de dahil olmak üzere bazı Faz II enzimleri üzerindeki olumsuz etkilerinin, hücrelerin detoksifikasyon kabiliyetinde azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Araştırmamızda GST üzerine çalışılan flavonoidlerin mM düzeyde inhibe etmesi iki açıdan önemlidir. Bunlardan ilki; özellikle ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve önemli bir ırk olan *holştayn* GST' sini çalışılan flavonoidlerin inhibe etmesi, söz konusu sığırın detoksifikasyon kabiliyetini ve gelişimini etkileyeceği düşünülmektedir. İkinci olarak; bu flavonoid türevlerinin GST enzimini inhibe etmesi, özellikle kemoterapide en önemli sorun olan ilaç direncinin azaltılması için aday bileşikler olacağı düşünülmektedir. Bunun için insan GST izoenzimleri üzerinde daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Procházková, D., Boušová, I. and Wilhelmová, N., “Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids”, *Fitoterapia*, 82(4), 513-523, (2011).
- [2] Rodeiro, I., Donato, M. T., Lahoz, A. Garrido, G., Delgado, R. and Gómez-Lechón, M. J., “Interactions of polyphenols with the P450 system: possible implications on human therapeutics”, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(2), 97-106, (2008).
- [3] Schubert, S. Y., Lansky, E. P. and Neeman, I., “Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids”, *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 11-17, (1999).
- [4] Kim, G. N., Kwon, Y. I. and Jang, H. D., “Mulberry leaf extract reduces postprandial hyperglycemia with few side effects by inhibiting α -glucosidase in normal rats”, *Journal of medicinal food*, 14(7-8), 712-717, (2011).
- [5] Ergün. A., “Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı bileşiklerin bu enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2016)
- [6] Bartholomaeus, A. R., Bolton, R. and Ahokas, J. T., “Inhibition of rat liver cytosolic glutathione S-transferase by silybin”, *Xenobiotica*, 24(1), 17-24, (1994).
- [7] Merlos, M., Sanchez, R. M., Camarasa, J. and Adzet, T., “Flavonoids as inhibitors of rat liver cytosolic glutathione S-transferase”, *Experientia*, 47(6), 616-619, (1991).
- [8] Zhang, K. and Das, N. P., “Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases”, *Biochemical pharmacology*, 47(11), 2063-2068, (1994).
- [9] Sahu, S. C. and Gray, G. C., “Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei”, *Cancer letters*, 104(2), 193-196, (1996).
- [10] Boušová, I., Hájek, J., Dršata, J. and Skálová, L., “Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione S-transferase”, *Xenobiotica*, 42(9), 872-879, (2012).
- [11] Hayeshi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V. and Mukanganyama, S., “The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin”, *Food and chemical toxicology*, 45(2), 286-295, (2007).
- [12] Apáti, P., Kéry, Á., Houghton, P. J., Steventon, G. B. and Kite, G., “In vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase”, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(2), 251-256, (2006).

- [13] Švehlíková, V., Wang, S., Jakubíková, J., Williamson, G., Mithen, R. and Bao, Y., “Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells”, *Carcinogenesis*, 25(9), 1629-1637, (2004).
- [14] Chen, W. Y., Hsieh, Y. A., Tsai, C. I., Kang, Y. F., Chang, F. R., Wu, Y. C. and Wu, C. C., “Protoapigenone, a natural derivative of apigenin, induces mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in human breast cancer cells associated with induction of oxidative stress and inhibition of glutathione S-transferase π ”, *Investigational new drugs*, 29(6), 1347-1359, (2011).
- [15] Nagaprashantha, L. D., Vatsyayan, R., Singhal, J., Lelsani, P., Prokai, L., Awasthi, S., et al., “2'-Hydroxyflavanone inhibits proliferation, tumor vascularization and promotes normal differentiation in VHL-mutant renal cell carcinoma”, *Carcinogenesis*, 32(4), 568-575, (2011).
- [16] Goh, K., Chen, Y., Zheng, L., Ong, L., Jin, Y., Chow, P., et al., “2, 2'-Dihydroxychalcone, a glutathione transferase inhibitor, sensitises human colon adenocarcinoma cells to chlorambucil and melphalan, but not to actinomycin”, *Molecular medicine reports*, 1(4), 575-579, (2008).
- [17] Wiegand, H., Boesch-Saadatmandi, C., Regos, I., Treutter, D., Wolffram, S. and Rimbach, G., “Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-S transferase (GST), NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats”, *Nutrition and cancer*, 61(5), 717-722, (2009).
- [18] Mitchell, A. E., Burns, S. A. and Rudolf, J. L., “Isozyme-and gender-specific induction of glutathione S-transferases by flavonoids”, *Archives of toxicology*, 81(11), 777-784, (2007).
- [19] Chow, H. H. S., Hakim, I. A., Vining, D. R., Crowell, J. A., Tome, M. E., Ranger-Moore, J., et al., “Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention”, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(8), 1662-1666, (2007).
- [20] Oakley, A., “Glutathione transferases: a structural perspective”, *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151, (2011).
- [21] Seeley, S. K., Poposki, J. A., Maksimchuk, J., Tebbe, J., Gaudreau, J., Mannervik, B., et al., “Metabolism of oxidized linoleic acid by glutathione transferases: peroxidase activity toward 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(7), 1064-1070, (2006).
- [22] Kolobe, D. and Sayed, Y., “Characterization of bromosulphophthalein binding to human glutathione S-transferase A1-1: thermodynamics and inhibition kinetics”, *Biochemical Journal*, 382(2), 703-709, (2004).
- [23] Laborde, E., “Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death”, *Cell death and differentiation*, 17(9), 1373, (2010).

- [24] Boušová, I. and Skálová, L., “Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences”, *Drug metabolism reviews*, 44(4), 267-286, (2012).
- [25] De Lange, D. W., Verhoef, S., Gorter, G., Kraaijenhagen, R. J., Van De Wiel, A., and Akkerman., et al., “Polyphenolic Grape Extract Inhibits Platelet Activation Through PECAM 1: An Explanation for the French Paradox”, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31(8), 1308-1314, (2007).
- [26] Dewick, P. M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, UK: Wiley, (2002).
- [27] Williams, C. A. and Grayer, R. J., “Anthocyanins and other flavonoids”, *Natural product reports*, 21(4), 539-573, (2004).
- [28] Boots, A. W., Haenen, G. R. and Bast, A., “Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical”, *European journal of pharmacology*, 585(2-3), 325-337, (2008).
- [29] Bayram, B., Ozcelik, B., Grimm, S., Roeder, T., Schrader, C., Ernst, I. M., et al., “A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression” , *Rejuvenation Research*, 15(1), 71-81, (2012).
- [30] Halliwell, B., “Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health”, *Cardiovascular research*, 73(2), 341-347, (2007).
- [31] Aherne, S. A. and O’Brien, N. M., “Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism”, *Nutrition*, 18(1), 75-81, (2002).
- [32] Townsend, D. M. and Tew, K. D., “The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance”, *Oncogene*, 22(47), 7369, (2003).
- [33] Mathew, N., Kalyanasundaram, M. and Balaraman, K., “Glutathione S-transferase (GST) inhibitors”, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(4), 431-444, (2006).
- [34] Srinivasan, L., Mathew, N. and Muthuswamy, K., “In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors”, *Parasitology research*, 105(4), 1179-1182, (2009).
- [35] Mahajan, S. and Atkins, W. M., “The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(11), 1221-1233, (2005).
- [36] Peklak-Scott, C., Townsend, A. J. and Morrow, C. S., “Dynamics of glutathione conjugation and conjugate efflux in detoxification of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide: contributions of glutathione, glutathione S-transferase, and MRP1”, *Biochemistry*, 44(11), 4426-4433, (2005).

- [37] Güven, A. and Kaya, N., "Determination of reduced glutathion, glutathione-S-transferase and selenium levels in Goose liver cells with damage induced by carbon tetrachloride and ethanol", *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(6), 1233-1238, (2006).
- [38] Kidd, P. M., "Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage", *Altern Med Rev*, 2(3), 155-176, (1997).
- [39] Savranoglu, S. and Tumer, T. B., "Inhibitory effects of spirulina platensis on carcinogen-activating cytochrome P450 isozymes and potential for drug interactions", *International journal of toxicology*, 32(5), 376-384, (2013).
- [40] Armstrong, R. N., "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases", *Chemical research in toxicology*, 10(1), 2-18, (1997).
- [41] Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., et al., "Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization", *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16246-16253, (2004).
- [42] Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R., "Glutathione transferases", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 45, 51-88, (2005).
- [43] Dourado, D. F., Fernandes, P. A. and Ramos, M. J., "Mammalian cytosolic glutathione transferases", *Current protein & peptide science*, 9(4), 325-337, (2008).
- [44] Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford- Hutchinson, A. and Persson, B., "Common structural features of MAPEG a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism", *Protein Science*, 8(3), 689-692, (1999).
- [45] Raijmakers, M. T. M., Steegers, E. A. P. and Peters, W. H. M., "Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues", *Human reproduction*, 16(11), 2445-2450, (2001).
- [46] (28.01.2018), <https://www.rcsb.org/3d-view/1GSE/1>
- [47] Abramovitz, M., Homma, H., Ishigaki, S., Tansey, F., Cammer, W. and Listowsky, I., "Characterization and localization of Glutathione- S- Transferases in rat brain and binding of hormones neurotransmitters and drugs", *Journal of neurochemistry*, 50(1), 50-57, (1988).
- [48] Bozkurt, Ö., "Farklı sığır ırklarından elde edilen sperm Glutatyon S-Transferaz enzimlerinin ağır metallere karşı ilgisinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2017).
- [49] Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I. and Pearson, W. R., "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases", *Methods in*

enzymology, 401, 1-8, (2005).

- [50] Polekhina, G., Board, P. G., Blackburn, A. C. and Parker, M. W., “Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity”, *Biochemistry*, 40(6), 1567-1576, (2001).
- [51] Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties”, *Food Chemistry*, 88, 479-484, (2004).
- [52] Laemelli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage”, *Nature*, 227-680, (1970).
- [53] Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N. D., “Glutathione metabolism and its implications for health”, *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492, (2004).
- [54] oşkun, G., “Glutathion-S-Transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, İzmir, (2007).
- [55] Güven, A. and Gülmez, M., “The Effect of Kefir on the Activities of GSH- Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride- Induced Mice Tissues”, *Zoonoses and Public Health*, 50(8), 412-416, (2003).
- [56] Armknecht, S. L., Kaattari, S. L. and Van Veld, P. A., “An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*)” *Aquatic Toxicology*, 41(1-2), 1-16, (1998).
- [57] Gümüş, N., “Akciğer Kanseri Olgularında Glutathion-S-Transferaz M1 VE T1 Gen Polimorfizimlerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2005).
- [58] Özaydın, A., “Glutathion-S-Transferaz GSTM1 VE GSTT1 Polimorfizimlerin Glutathionla İlişkili Detoksifikasyon Sistemlerine Etkisi”, Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2000).
- [59] Ahmad, R. and Srivastava, A. K., “Inhibition of Filarial Glutathione-S-transferase by various classes of compounds and their evaluation as novel antifilarial agents”, *Helminthologia*, 45(3), 114, (2008).
- [60] Castro-Caldas, M., Milagre, I., Rodrigues, E. and Gama, M. J., “Glutathione S-transferase pi regulates UV-induced JNK signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells”, *Neuroscience letters*, 451(3), 241-245, (2009).
- [61] Akkaş, Ö. ve Şahin, E. H., “Holştayn Irkı Sığırlarda Bazı Verim Özellikleri”, *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 1(1), 25-32, (2014).

- [62] Bilaloğlu, G. V. and Harmandar, M., “Flavonoidler”, *Aktif Yayınevi*, İstanbul, (1997).
- [63] Gençer, N., “Paraoksonaz Q ve R izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı çevre kirleticilere karşı afinitesinin araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2008).
- [64] Asaoka, K., “Affinity purification and characterization of glutathione S-transferases from bovine liver”, *The Journal of Biochemistry*, 95(3), 685-696, (1984).
- [65] Erat, M. and Şakiroğlu, H., “The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes”, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(4), 711-716, (2013).
- [66] Hamed, R. R., Maharem, T. M. and Guinidi, R. A., “Glutathione and its related enzymes in the Nile fish”, *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(3-4), 189-199, (2004).
- [67] Kashiwada, M., Kitada, M., Shimada, T., Itahashi, K., Sato, K. and Kamataki, T., “Purification and characterization of acidic form of glutathione S-transferase in human fetal livers: high similarity to placental form”, *The Journal of Biochemistry*, 110(5), 743-747, (1991).
- [68] Martinez-Lara, E., George, S. G., Lopez-Barea, J. and Bárcena, J. A., “Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(9), 759-768, (1997).
- [69] Celik, V. K., Armutcu, F. and Aker, A., “Human placental glutathione-S-Transferase: Isolation, kinetic properties and in vitro interactions with several drugs”, *CU Tıp Fakultesi Dergisi*, 25, 187-192, (2003).
- [70] Hamed, R. R., Maharem, T. M., Abdel-Meguid, N., Sabry, G. M., Abdalla, A. M. and Guneidy, R. A., “Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: A comparative study”, *Research in developmental disabilities*, 32(5), 1470-1482, (2011).
- [71] Gyamfi, M. A., Ohtani, I. I., Shinno, E. and Aniya, Y., “Inhibition of glutathione S-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro”, *Food and Chemical Toxicology*, 42(9), 1401-1408, (2004).
- [72] Offei-Okyne, R., Patterson, J.L., Walker, L.T., Boateng, J. and Verghese, M., “Chemopreventive Potential of Ginger on Hep2G Cells”, *International Journal of Cancer Research*, 11 (2), 52-66, (2015).
- [73] Turk, S., Erkmen, G. K., Dalmizrak, O., Ogus, I. H. and Ozer, N., “Purification of Glutathione S-Transferase pi from Erythrocytes and Evaluation of the Inhibitory Effect of Hypericin”, *The protein journal*, 34(6), 434-443, (2015).
- [74] Riol, M. M., Valinas, M. N., Fernandez, M. G. and Lopez, M. P., “Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*

& *Pharmacology*, 128(2), 227-235, (2001).

- [75] Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D. and Zeng, Q. Y., "Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(1), 96-100, (2008).
- [76] Arinç, E., Yilmaz, D. and Bozcaarmutlu, A., "Mechanism of inhibition of CYP1A1 and glutathione S-transferase activities in fish liver by quercetin, resveratrol, naringenin, hesperidin, and rutin", *Nutrition and cancer*, 67(1), 137-144, (2015).
- [77] Wiegand, H. Wagner, A. E., "Effect of dietary genistein on Phase II and antioxidant enzymes in rat liver", *Cancer Genomics-Proteomics*, 6(2), 85-92, (2009).
- [78] Iio, M., Kawaguchi, H., Sakota, Y., Otonari, J. and Nitahara, H., "Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferase and glutathione reductase", *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 57(10), 1678-1680, (1993).
- [79] Van Zanden J. J., Ben Hamman O., Van Lersel, M. L. P. S., Boeren, S., Cnubben N. H. P., Lo Bello, M., et al., "Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin", *Chem biol interact*, 139-148, (2003).
- [80] Van Zanden, J. J., Geraets, L., Wortelboer, H. M., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M., and Cnubben, N. H., "Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells", *Biochemical pharmacology*, 67(8), 1607-1617, (2004).

