



İskorpit Balığı Solungaç Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Metal İnhibisyonunun İncelenmesi

Purification and Metal Inhibition of Glutathione Reductase Enzyme from Gill Tissue of Scorpion Fish

Kübra IŞIK¹, Ercan SOYDAN²

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Atakum, Samsun
• kubraisik684@gmail.com • ORCID > 0000-0002-7743-817X

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Atakum, Samsun
• esoydan@omu.edu.tr • ORCID > 0000-0001-7849-4117

Makale Bilgisi / Article Information

Makale Türü / Article Types: Araştırma Makalesi / Research Article

Geliş Tarihi / Received: 29 Aralık / December 2022

Kabul Tarihi / Accepted: 25 Ocak / January 2023

Yıl / Year: 2023 | **Cilt – Volume:** 38 | **Sayı – Issue:** 1 | **Sayfa / Pages:** 221-233

Atf/Cite as: Işık, K., Soydan, E. "İskorpit Balığı Solungaç Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Metal İnhibisyonunun İncelenmesi" Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 38(1), Şubat 2023: 221-233.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ercan SOYDAN

İSKORPİT BALIĞI SOLUNGAÇ DOKUSUNDAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE METAL İNHİBİSYONUNUN İNCELENMESİ

ÖZ:

Bu çalışmada iskorpit balığı solungaç dokusundan glutatyon redüktaz enzimi literatürde ilk kez kısmi olarak saflaştırılmış ve ağır metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Saflaştırma işlemi homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz olarak üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda optimum pH 6.5, optimum substrat konsantrasyonu 2 mM NADPH ve optimum tampon 400 mM KH_2PO_4 olarak bulunmuştur. Kısmi saflaştırma sonrasında ağır metal iyonları olarak Ni^{2+} , Zn^{2+} ve Cd^{2+} 'nin inhibisyon etkileri araştırılmış ve ağır metallerin IC_{50} değerleri sırasıyla 31 μM , 56 μM ve 74 μM olarak hesaplanmıştır. En güçlü inhibitörün çinko oldu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelime: Enzim Saflaştırılması, Glutatyon Redüktaz, İskorpit Balığı, Metal İyonları.



ABSTRACT

PURIFICATION AND METAL INHIBITION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM GILL TISSUE OF SCORPIONFISH

In this study, glutathione reductase enzyme was partially purified from gill tissue of scorpion fish and the effects of heavy metal ions on enzyme activity were determined. The purification process was achieved in three steps as preparation of homogenate, ammonium sulfate precipitation and dialysis. As a result of the study, optimum pH 6.5, optimum substrate concentration 2 mM NADPH and optimum buffer 400 mM KH_2PO_4 were determined. After partial purification, the inhibition effects of Cd^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} as heavy metal ions were investigated. The IC_{50} values of heavy metals were calculated as 74 μM , 31 μM , and 56 μM , respectively. The most potent inhibitor was determined to be zinc.

Keywords: Enzyme Purification, Glutathione Reductase, Metal İon, Scorpion Fish.



1. GİRİŞ

İskorpit balığı (*Scorpaena porcus*), Scorpaenidae familyasının bir üyesi arasında yer almaktadır. Ülkemizde en yaygın olarak Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde yaşam göstermektedir. 1000 m'ye kadar derinliklerde yaşayan İskorpit balığı sığ ve alglerle kaplı bölgeleri tercih etmektedir (Akşiray, 1987). Denizlerdeki kirlilik esas olarak deniz canlılarında ve tortullarda birikmektedir. Bu nedenden dolayı besin zinciri yoluyla da insanlara geçmektedir (Aksakal ve ark., 2021). Balıklar en yüksek trofik seviyeyi en yüksek sucul ekosisteminde işgal etmektedir (Hisar ve ark., 2006). En önemli kirletici faktörlerden biri olan ağır metaller, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir ve oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebilmektedir. Reaktif oksijen türleri lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar vermektedir (Siktar ve ark., 2011). Sonuç olarak canlı vücudunda reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan oksidatif hasarı gidermede en önemli ajan antioksidanlardır (Bayir ve ark., 2011).

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyen ve neden oldukları hasarı tamir eden savunma sisteminin en önemli üyesi olarak bilinirler (Sen ve ark., 2010). Canlı hücrelerin yaşamının devamlılığı, karmaşık biyokimyasal reaksiyonların dengesine bağlıdır. Bu dengeyi bozacak faktörlerden kaynaklanan endojen/eksojen bileşikler hücre yıkımına neden olmaktadır (Demirdağ ve ark., 2012).

Doğal bir indirgeyici molekül olan glutasyon (GSH), hücreler tarafından oksidatif strese karşı kendilerini korumak için kolayca kullanılabilir. ROS'a karşı bu koruyucu etki, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi enzimlerle etkileşime girerek sağlanmaktadır (Mate, 2000). GSH, bir antioksidan olmasının yanı sıra hücrenin detoksifikasyon sisteminde, gen ekspresyonunda ve regülasyonunda da rol oynamaktadır (Townsend, 2003).

Glutasyon metabolizmasında önemli bir enzim olan glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7; GR), birçok reaktif elektrofil için güçlü bir şekilde nükleofilik olan indirgenmiş glutasyon formunun korunması için önemlidir (Calberg ve Mannervik, 1975; Şentürk ve ark., 2009). Flavin bir enzim olan GR, glutasyon disülfiti (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) indirgeyerek hücreleri oksidatif stresten korumak için bir antioksidan görevi görmektedir (Meister ve Anderson, 1983). Özellikle karaciğerde önemli bir role sahip olan indirgenmiş glutasyonun (GSH), ilaç ve detoksifikasyonu ve hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması reaksiyonlarında önemli bir etkiye sahiptir. Bunun nedeni detoksifikasyon olaylarının karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından sağlanmasıdır (Beutlar, 1963). GR enziminin katalizlediği reaksiyonların bilinen en önemli hedeflerinden biri, hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumasıdır (Kocaoğlu ve ark., 2019). Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği, hidroperoksitlerin detoksifikasyonu ve diğer bazı bileşiklerin indirgenmesiyle oluşan GSSG için glutasyon redüktaz

hücre içi glutatyonun indirgenme-yükseltgenme olayında önemli bir role sahiptir (Toribio ve ark., 1996). Bu katalitik süreçte kullanılan NADPH kaynağı, NADP+ bağımlı malat dehidrogenaz ve pentoz fosfat yolundan kaynaklanmaktadır (Ekinci ve Beydemir, 2009; Levy, 1979). Pentoz fosfat döngüsünün önemli bir ürünü olan NADPH, indirgeyici biyosentezde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, hücrenin oksidatif hasara karşı korunmasına da yardımcı olmaktadır (Townsend ve ark., 2003).

GR ve GSH eksikliği hücrede oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu eksiklik Alzheimer, Parkinson, karaciğer ve akciğer hastalıkları, orak hücreli anemi, HIV, AIDS, kanser, inme, şizofreni ve diyabet gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (Townsend ve ark., 2003; Wu ve ark., 2004).

Çevremizde doğal olarak ve su kütlelerinde bulunan metaller doğal ve antropojenik nedenlerden kaynaklanmaktadır. Çeşitli metaller ve kimyasallar, inhibitör etkileri açısından çeşitli enzimler üzerinde test edilmiştir (Durdağı ve ark., 2016). Çok fazla endüstriyel problemler nedeniyle çevredeki ağır metal birikimi ciddi bir sorun haline gelmiştir (Bewley, 1980). Düşük miktarlarda bile toksik etki gösteren ağır metaller vücuda ağız, solunum ve deri yoluyla girmektedir. Böbrek, karaciğer, barsak, akciğer ve deri gibi boşaltım yollarına özel bir müdahale olmadığı sürece atılamazlar. Bunun sonucunda ağır metallerin neredeyse tamamı biyolojik organizmalarda birikmektedir. Bu metaller canlı bünyesinde birikerek tiroid nörolojik hastalıkları, otizm ve kısırlık gibi önemli hastalıklara yol açmaktadır. Yüksek konsantrasyonlara sahip ağır metaller hayvanları, bitkileri ve insanları olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle ağır metaller, akuatik canlılarda serbest radikallerin oluşumunu başlatmakta ve arttırmaktadır. Bu yüzden serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla kontrol altında tutulmalıdır (Işık ve ark., 2015; Fidan ve ark., 2015; Taş ve ark., 2019; Keleştemur, 2012; Valavanidis ve ark., 2006). Ağır metaller ve metal iyonlarının enzim-substrat ve kofaktör afinitesini etkileyen değişkenler üzerinde de etkisi bulunmaktadır. GSH'ın geçici olarak tükenmesine ve antioksidan enzimlerin inhibisyonuna neden olan metal iyonlarının da enzim aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Tandoğan ve Ulusu, 2010). Ayrıca Glutatyon redüktaz enziminin, GSSG konsantrasyonu düşük olduğunda metal iyonlarına oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir (Garcia ve ark., 1993).

Bu çalışmada çeşitli hastalıkların tedavisinde hedef gösterilen glutatyon redüktaz enziminin İskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) solungaç dokusundan kısmi saflaştırması ve çevrede bol miktarda bulunan ağır metallerin inhibisyon kinetiğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kimyasallar

Saflaştırma işlemi için kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Diğer tüm dereceli kimyasallar Merck'ten temin edilmiştir.

2.2. Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesi

5 farklı balık örneğinden solungaç dokuları alındı (Şekil 1 ve 2). Alınan solungaç dokularından 5.935 g tartılarak havanda sıvı azot içerisinde parçalandı. Fiziksel parçalama işlemine tabi tutulduktan sonra 50 ml falkon tüp içerisine alınarak üzerine 1mM EDTA + 0,15 M KCl içeren 0,1 M KH_2PO_4 pH (7,6) tamponu eklenerek 45 ml'ye tamamlandı. Daha sonra +4°C 'de 10000 xg de 60 dk boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminden sonra süzgeç kağıdından süpernatant ve çökelek kısmı birbirinden ayrılarak enzim aktivitesine bakıldı. Enzim tayini spektrofotometrik yöntemle NADPH'nin oksitlenmesine bağlı olarak, 340 nm'de absorbans azalışına göre belirlendi. Ölçümler Kinetics rate'de 340 nm'de 3 dk boyunca yapıldı (Calberg ve Mannervik, 1985).



Şekil 1. İskorpit balığı (*Scorpaena porcus*)

Figure 1. Scorpion fish (*Scorpaena porcus*)



Şekil 2. İskorpit balığı solungaç dokusu

Figure 2. Gill tissue of scorpion fish

2.3. Amonyum Sülfat Çöktürme ve Diyaliz

İlgili proteinin başka proteinlerden ayrılması işlemlerinde ya da proteinlerin deriştirilmesi işlemi için amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) çöktürme işlemi yapılmıştır. İskorpit balığı solungaç dokusu ekstratı %0-100 çöktürme aralığına tabi tutuldu (Şekil 3). Yapılan çöktürme sonucunda %60-80 aralığında doygunluğa ulaşarak enzimin aktif olduğu aralık belirlendi. Çökelti KH_2PO_4 (400 mM; pH:6.5) tamponu içinde çözüldü. Belirlenen aralıktan sonra protein çözeltisinin tuzlardan arındırılması için diyaliz işlemi yapıldı (Şekil 4). Daha sonra 40 mM KH_2PO_4 (pH: 6.5) tamponu içinde 2 saat boyunca diyaliz edildi.



Şekil 3. Amonyum sülfat işlemi

Figure 3. Ammonium sulfate process



Şekil 4. Diyaliz işlemi

Figure 4. Dialysis process

2.4. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Karakterizasyonu

Saflaştırılmış enzim üzerinde kinetik özellikleri belirlemek için farklı pH, substrat ve iyonik şiddet koşulları incelenmiştir. Enzimin kinetik parametrelerinde optimum iyonik şiddet 400 mM KH_2PO_4 tamponu, optimum pH 6,5 ve optimum substrat konsantrasyonu 2 mM NADPH olarak bulundu.

2.5. Ağır Metallerin in Vitro Etkileri

Ağır metallerin iskorpit balığı solungaç dokusu GR üzerindeki etkilerini değerlendirmek için reaksiyon ortamına çeşitli konsantrasyonlarda ağır metaller ilave edildi. Enzim aktivitesi değerlendirildi ve ağır metal içermeyen bir deney kontrol olarak kullanıldı (%100 aktivite).

Farklı konsantrasyonlardaki $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ tuzlarının solungaç dokusu GR enzim aktivitesiiüzerindeki etkileri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tipik polinom regresyon yazılımı kullanılarak, her bir ağır metal için aktivite yüzdesine karşı inhibitör konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Enzim aktivitesini %50 oranında engelleyen ağır metal konsantrasyonları (IC_{50}) belirlenmiş ve Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. İskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) ağır metal iyonları ile GR enzim inhibisyon verileri

Table 1. Scorpion fish (*Scorpaena porcus*) GR enzyme inhibition data with heavy metal ions

Metal ion	IC ₅₀ (µM)
Ni+2	31
Zn+2	56
Cd+2	74

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

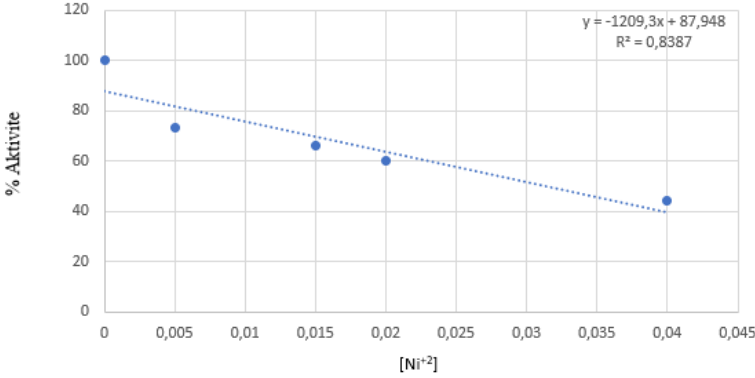
Glutasyon (GSH), karaciğerde üretilen ve hücrenin sitozolü, çekirdeği ve mitokondrisinde bulunan bir tripeptittir (Liebman ve Greenberg, 1988). Glutasyonun önemi, bitkilerde, memelilerde, mantarlarda ve bazı prokaryotik organizmalarda yaygın olarak kullanılmasından anlaşılmaktadır (Anderson, 1988). GSH, detoksifikasyona ek olarak, glioksalaz sistemi, ribonükleotitlerin indirgenmesi, tiyol:disülfit değişim reaksiyonları yoluyla protein ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere diğer hücrel reaksiyonlarda rol oynamaktadır (Mullineaux, 1997). Glutasyon redüktaz (GR), hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan hücre içi antioksidan sisteminin temel enzimlerinden biri olan düşük veya yüksek moleküler ağırlıklı disülfit substratları ile indirgenmiş piridin nükleotitleri arasındaki elektron transferini katalize etmektedir (Toribio ve ark., 1996). NADPH aracılığıyla glutasyon disülfürün (GSSG) indirgenmesi GR enzimi tarafından katalize edilir (Çakmak ve ark., 2011). GR enziminin katalizlediği reaksiyonda en önemli hedef hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Eritrosit hücrelerinde yaklaşık bu oran 500/1'dir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Bundan dolayı sadece GSH/GSSG oranını korumakla kalmaz, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu gibi hücrenin önemli görevlerinin devam etmesine de destek olmaktadır (Çakmak ve ark., 2011). Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Fazla üretilen serbest radikaller sonucunda antioksidan savunma mekanizmalarında bir hasar oluşmaktadır. Bu yüzden serbest radikaller ve antioksidan sistemi arasında bozulan denge sonucunda hücre oksidatif strese maruz kalmaktadır (Townsend ve ark., 2003).

Proteinlerin indirgenmiş formda kalmalarını sağlayan GSH eritrositlerde küresel yapının korunmasında rol oynamaktadır. Oksidatif hasara karşı duyarlı eritrositlerin GSH eksikliği sonucunda yaşam süreleri kısalmakta ve hemolitik kaynaklı anemiye neden olmaktadır (Chang ve ark., 1978).

Günümüzde hızlı nüfus artışı, kentsel atıklar, endüstriyel atıklar, tarımda bilinçsizce kullanılan gübre ve ilaçlar ağır metallerin oluşmasına sebep olmaktadır. Toprak, deniz ve akarsulara karışan bu ağır metaller canlıların maruz kalmasıyla hücrede antioksidan enzimlerin inhibisyonuna ve oksidatif hasara bağlı olarak organizmalarda birtakım sorunlar ortaya çıkarmaktadır.

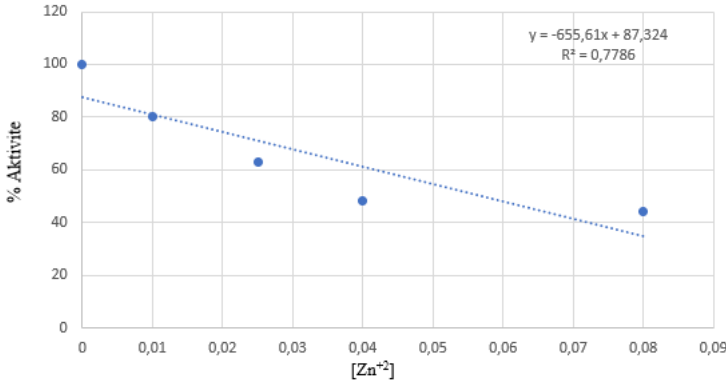
Bu makalede iskorpit balığı (*Scorpaena porcus*) solungaç dokusundan glutasyon redüktaz enzimi kısmi saflaştırma işlemine tabi tutulup bazı karakteristik özellikleri incelenmiştir. Kısmi saflaştırma işlemi sırasında homojenat hazırlama, amonyum sülfat çöktürme işlemi ve son olarak diyaliz işlemi ile gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma işlemi ilk olarak homojenat hazırlama işlemiyle gerçekleşti. Hazırlanan solungaç dokusu homojenatlarına %0-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı. Yapılan çöktürme işleminde GR enziminin %60-80 aralığında çöktüğü belirlendi. Kısmi bir saflaştırma yöntemi olan amonyum sülfat çöktürme işleminde birçok safsızlıklar giderilerek proteinler daha derişik hale getirildi. Erat (2002) sığır ve insan eritrositlerinden GR enzimi için amonyum sülfat aralığını %30-70, Acan ve Tezcan (1989) koyun beyni için GR enziminin amonyum sülfat aralığını %35-55, Ulusu vd. (2005) koyun karaciğerinden %0-60 aralıklarında bulmuştur. Çöktürme işleminden sonra ortamdaki iyonları uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Kısmi olarak saflaştırılan enzim üzerine Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} ağır metalleri uygulanmıştır. Uygulanan ağır metallerin IC_{50} değerleri sırasıyla 56 μM , 31 μM , 74 μM olarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerlerinin grafikleri Şekil 5-7 ve Tablo 1 de belirtildi.



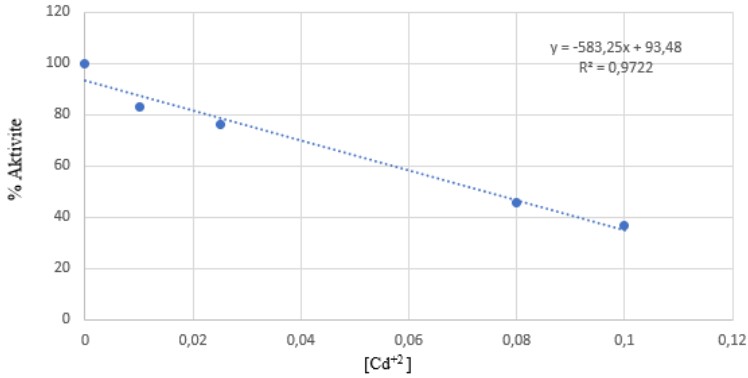
Şekil 5. Farklı ağır metal konsantrasyonlarında iskorpit balığı GR enzimi için % aktivite- $[Ni^{+2}]$ regresyon analiz grafikleri

Figure 5. Activity % $[Ni^{+2}]$ regression analysis graphs for Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) GR enzyme in the presence of different heavy metal concentrations.



Şekil 6. Farklı ağır metal konsantrasyonlarında iskorpit balığı GR enzimi için % aktivite-[Zn⁺²] regresyon analiz grafikleri

Figure 6. Activity %-[Zn⁺²] regression analysis graphs for Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) GR enzyme in the presence of different heavy metal concentrations



Şekil 7. Farklı ağır metal konsantrasyonlarında iskorpit balığı GRenzimi için %aktivite-[Cd+2] regresyon analiz grafikleri

Figure 7. Activity %-[Cd+2] regression analysis graphs for Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) GR enzyme in the presence of different heavy metal concentrations

Yapılan çalışmada karakterizasyon işlemi gerçekleştirildi. GR enziminin optimum pH:6.5, optimum substrat 2 mM NADPH ve optimum tampon 400 mM KH₂PO₄ olarak bulunmuştur. Literatürde sığır eritrosit GR enzimi için optimum iyonik şiddet 435 mM fosfat tamponu, koyun karaciğeri için 50 mM Tris olarak bulunmuştur (Erat, 2002; Uluş vd, 2005). Farklı türlerden yapılan çalışmalarda

ise GR'lerin optimum pH'sının 6.5-8.5 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Açan, 1990; Öğüs ve Özer, 1991; Oğus ve Ozer, 1998; Willmore ve Storey, 2007; Tekman vd, 2008).

Doğada bulunan ağır metallerin etki ettiği zararlar çalışmanın önemini göstermektedir. Çünkü çevresel problemler sonucu ortaya çıkan ağır metaller toprak, su ve denizlere karışarak canlı ekosistemine zarar vermektedir. Özellikle denizlerde ve akarsularda biriken ağır metaller sucul canlıların maruz kalmasına neden olmaktadır. Sucul canlıların maruz kalması sonucunda bu ağır metaller besin alımı vasıtasıyla da insanlara geçmektedir.

Ekinci ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, gökkuşuğı alabalığının karaciğerinden izole ettikleri GR enziminin Co^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cr^{+3} , Sn^{+2} ve Mg^{+2} ağır metalleri ile inhibisyon etkileşimini incelemiştir. Ağır metallerin IC50 değerleri sırasıyla 42.2 μM , 63.1 μM , 357 μM , 486 μM , 508 μM , 592 μM , 657 μM olarak bulunmuştur. Tekman ve ark., (2008) yaptıkları bir çalışmada ise Gökkuşuğı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden saflaştırdıkları GR enzimi üzerine uygulanan Cd^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} ve Al^{+3} ağır metallere ilişkin inhibisyon kinetiği incelenmiştir. IC50 değerleri sırasıyla 65.5 μM , 82 μM , 122 μM , 509 μM , 797 μM ve 804 μM olarak bulunmuştur. Yusuf ve Çiftçi, (2017) tarafından tavuk böbreğinden saflaştırılan GR enzimi üzerinden yapılan çalışmada ise Ni^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} ve Al^{+3} ağır metallere ilişkin inhibisyon etkilerini belirlemiştir. IC50 değerleri ise sırasıyla 337 μM , 191 μM , 168 μM , 187 μM , 289 μM olarak bulunmuştur.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre GR enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının IC50 değerleri küçükten büyüğe doğru $Cd^{+2} > Zn^{+2} > Ni^{+2}$ şeklindedir. Dolayısıyla enzimi en güçlü inhibe eden metal, Ni^{+2} iyonu olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada solungaç dokusu GR enziminin metal iyonları ile düşük mikromolar konsantrasyonlarda inhibe olduğu saptanmıştır. Canlı hücrelerde antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olan GR, çeşitli ağır metallerle inhibisyonu organizmada olumsuz etki bırakmıştır. Bu nedenle birçok patolojik durumun ortaya çıkışında etkin rol oynamaktadır. İskorpit balığı solungaç dokusundan kısmi olarak saflaştırılan GR enzimi hayati öneme sahip olan GSH/GSSG oranını kontrol altında tutmaktadır. GR enzimini inhibe ederek bu dengeyi bozabilecek bu metallere kullanımında dikkatli olunmalı ve kullanımı kontrol altında tutulmalıdır. Bu çalışma, İskorpit balığı solungaç dokusundan GR enziminin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi bakı-

mından literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular antioksidan enzim çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Çıkar Çatışması:

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik:

Bu çalışma etik kurul onayı gerektirmez.

Yazar Katkı Oranları:

Çalışmanın Tasarlanması (Design of Study): KI (30), ES (70)

Veri Toplanması (Data Acquisition): KI (30), ES (70)

Veri Analizi (Data Analysis): KI (30), ES (70)

Makalenin Yazımı (Writing up): KI (30), ES (70)

Makalenin Gönderimi ve Revizyonu (Submission and Revision): KI (30), ES (70)

KAYNAKÇA

- Açan, L., 1990. Koyun beyini glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aksakal, E., Ekinci, D., Supuran, C.T., 2021. Dietary inclusion of royal jelly modulates gene expression and activity of oxidative stress enzymes in zebrafish. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 36(1): 885-894. doi: 10.1080/14756366.2021.1900167.
- Akşiray, F., 1987. Türkiye deniz balıkları ve tayin anahtarı. Kardeşler basımevi, No.2, 811 s, İstanbul.
- Anderson, M.E., 1998. Glutatyon: biyosentez ve modülasyona genel bir bakış, Kimyasal-biyolojik etkileşimler, 111: 1-14.
- Bayir, A., Sirkecioglu, A.N., Haliloglu, H.I., Aksakal, E., Gunes, M., Aras N.M., 2011. Influence of season on antioxidant defense systems of *Silurus glanis* Linnaeus (Siluridae) and *Barbus capito capito* Guldenstädt (Cyprinidae), *Fresen Environ Bull*, 20(1): 3-11.
- Beutler, E., 1963. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity, In vivo and in vitro studies.
- Bewley, R.J.F., 1980. Effect of heavy metal pollution on oak leaf microorganism, *App. Environ. Microbiol*, 40: 1053-1059.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver, *J Biol Chem*, 250:5475-5480.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology*, Vol. 113, pp. 484-490.
- Chang, S. S., Peterson, R. J., and Ho, C. T. (1978). Chemical reactions involved in the deep fat frying of foods1. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(10), 718-727.
- Çakmak, R., Durdagi, S., Ekinci, D., Şentürk, M., Topal, G., 2011. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitroaromatic compounds as potent glutathione reductase inhibitors, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 21(18): 5398- 5402.
- Demirdağ, R., Yerlikaya, E., Aksakal, E., Küfrevioğlu, Ö.I., Ekinci, D., 2012. Influence of pesticides on the pH regulatory enzyme, carbonic anhydrase, from European Seabass liver and bovine erythrocytes, *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(2): 218-222. doi: 10.1016/j.etap.2012.04.007.
- Durdagi, S., Senturk, M., Guney, M., Ekinci, D., Aksoydan, B., Erol, I., Kantarcioglu, I., Cavdar, H., 2016. Design of novel uracil derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase I and II, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and glutathione reductase using in silico, synthesis and in vitro studies, *FEBS Journal*, 283:106.

- Ekinci, D., Beydemir, S., 2009. Effect of some analgesics on paraoxonase-1 purified from human serum, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24(4): 1034-1039.
- Ekinci, D., Ceyhun, S. B., Şentürk, M., Erdem, D., Küfrevioğlu, Ö. İ., and Supuran, C. T. (2011). Characterization and anions inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(2), 744-748.
- Ekinci, D., Şentürk, M., 2013. Assessment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28 (1): 11-15.
- Erat, M., 2002. İnsan ve siğir eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi. Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Fidan, I., Salmas, R.E., Arslan, M., Senturk, M., Durdagi, S., Ekinci, D., Senturk, E., Cosgun, S., Supuran, C.T., 2015. Carbonic anhydrase inhibitors: design, synthesis, kinetic, docking and molecular Dynamics analysis of novel glycine and phenylalanine sulphonamide derivatives, *Bioorg Med Chem*, 23:7353.
- Garcia-Alfonso, C., Martinez-Galisteo, E., Llobell, A., Barcena, J.A., Lopez-Barea, J., 1993. Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization, *Int J Biochem*, 25(1): 61-68.
- Hisar, O., Erdogan, O., Aksakal, E., Hisar, S.A., 2006. Authentication of fish species using a simple PCR-RFLP method, *Isr J Aquac - Bamidgeh*, 58 (1): 62-65.
- Isık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinci, D., Senturk, M., Cetin, A., Senturk, E., Supuran, C.T., 2015. Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives, *Bioorg Med Chem Lett*, 25: 5636.
- Karağözoğlu, Y., Çiftçi, M., 2017. Bazı ağır metal iyonlarının tavuk böbreğinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine in vitro etkilerinin araştırılması, *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, Vol. 6, No. 1
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya, Aktif yayınları*, Erzurum.
- Keleştemur, T.G., 2012. Physiological effects created on fish of hypoxic waters (in Turkish with English abstract), *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 5(1): 87-90.
- Kocaoglu, E., Talaz, O., Cavdar, H., Senturk, M., Supuran, C.T., Ekinci, D., 2019. Determination of the inhibitory effects of N-methylpyrrole derivatives on glutathione reductase enzyme, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 34:51.
- Levy, H.R., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Adv.Enzymol*, 48, 97-192.
- Liebman, J.F., Greenberg, A., VCH Publishers, 1988. New York.
- Mate, S., J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83-104.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione, *Annu. Rev. Biochem*, 52, 711-760.
- Mitchell, J.B., Russo, A., 1987. *Br. J. Cancer*, 8:96
- Mullineaux, P.M., 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*, 667-713.
- O 'Hara, J., 1973. Cadmium uptake by fiddler crabs exposed to temperature and salinity stress, *J. Fish. Res. Board Can*, 30: 846-848.
- Ogus, I.H., Ozer, N., 1998. Purification of NADPH-free glutathione disulfide reductase from human erythrocytes, *Protein Expr Purif*, 13(1): 41-44. doi:10.1006/prep.1997.0865.
- Öğüs, H., Özer, N., 1991. Human jejunal glutathione reductase: purification and evaluation of the NADPH-and glutathione-induced changes in redox state, *Biochemical medicine and metabolic biology*, 45(1): 65-73
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines, Current status and future prospect, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1): 91-100.
- Senturk, M., Talaz, O., Ekinci, D., Cavdar, H., Kufrevioğlu, Ö.İ., 2009. In vitro inhibition of human erythrocyte glutathione reductase by some new organic nitrates, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19:3661.
- Siktar, E., Ekinci, D., Siktar, E., Beydemir, S., Gulcin, I., Gunay, M., 2011. Protective role of L-carnitine supplementation against exhaustive exercise induced oxidative stress in rats, *Eur J Pharmacol*, 668(3): 407-413. doi: 10.1016/j.ejphar.
- Tandogan, B., Uluşu, N.N., 2010. Purification and kinetics of bovine kidney cortex glutathione reductase, *Protein Pept Lett*, 17(5): 667-674.
- Tas, M., Senturk, E., Ekinci, D., Demirdag, R., Comakli, V., Bayram, M., Akyuz, M., Senturk, M., Supuran, C.T., 2019. Comparison of blood carbonic anhydrase activity of athletes performing interval and continuous running exercise at high altitude, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 34:219.

- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 148(2): 117-121. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.04.005.
- Toribio, F., Martinet, L.E., Pascual, P., Lopez, B.J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684: 77-97.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease, *Biomed Pharmacother*, 57(3-4): 145- 155.
- Ulus, G., Erat, M., Ciftci, M., Sakiroglu, H., Bakan, E., 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(5): 1109-1117.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental Pollutants, *Ecotoxicol. Environ*, 64: 178-189. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- Willmore, W.G., Storey, K.B., 2007. Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 297(1-2): 139-149.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health, *The Journal of nutrition*, 134(3): 489-492.