

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ASETİLKOLİN ESTERAZ VE
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GURBET ÇELİK

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. YUSUF TEMEL**

BİNGÖL-2023

**BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ASETİLKOLİN ESTERAZ VE GLUTATYON
S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Yusuf TEMEL danışmanlığında, Gurbet ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma 12/09/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ *İmza* :
Üye : Doç. Dr. Ümit Muhammet KOÇYİĞİT *İmza* :
Üye : Doç. Dr. Yusuf TEMEL *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma; Bingöl Üniversitesi – Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BÜBAP) projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: (BAP-FEF.2023.002)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalı Sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL yönetiminde Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren her türlü desteğini gördüğüm, çalışmalar sırasında tüm bilgi ve tecrübelerini sabırla paylaşıp, göstermiş olduğu insani değer ve davranışlarına minnettar olduğum ve tez çalışmamı onunla birlikte tamamlayıp öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum saygıdeğer danışmanım, sayın hocam Doç. Dr. Yusuf TEMEL'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarımızın yürütülmesi için gerekli ortamı sağlayan Bingöl Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Zafer ŞERBETÇİ'ye ve yüksek lisans eğitim-öğretim hayatımda bilgilerinden yararlandığım değerli Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanlarına ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Proje kapsamında çalışmalarımı destekleyen Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Son olarak ise yüksek lisans tezimin başından sonuna kadar her türlü sıkıntıda yanımda olup desteğini üzerimden eksik etmeyen en az sayın danışman hocam kadar bu tezi bitirebilmeme vesile olan sevgili anneme, hayatımın her anında arkamda kocaman bir dağ gibi duran kıymetli babama, kardeşlerime ve göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan ötürü hayatıma varlıklarıyla anlam katan eşim ve biricik oğluma tüm kabimle çok teşekkür ederim.

Gurbet ÇELİK

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Adlandırılması	3
1.3. Enzim İnhibisyonu.....	4
1.4. Eritrositler.....	5
1.5. Antibiyotikler	6
1.6. Araştırmada Kullanılan Antibiyotikler.....	8
1.6.1. Gentamisin Sülfat	8
1.6.2. Streptomisin sülfat	8
1.6.3. Linkomisin	9
1.6.4. Ampisilin	9
1.6.5. Klindamisin.....	9
1.7. Glutasyon (GSH)	10
1.8. Glutasyon S-Transferaz (GST)	11
1.9. Asetilkolin Esteraz (AChE).....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
2.1. Çalışmanın Amacı	20

3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	22
3.1.3.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	22
3.1.3.2. Eritrositlerin Yıkınmasında Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.1.3.3. Hemolizat Çözeltisinin Hazırlanması	23
3.1.3.4. Affinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	23
3.1.3.5. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	23
3.1.3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	24
3.1.3.7. Kullanılan Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. GST Enziminin Aktivite Ölçümü	26
3.2.2. Protein Tayini	26
3.2.2.1. Kalitatif Protein Tayini	26
3.2.2.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	27
3.2.3. Eritrosit Temini ve Hemolizat Hazırlanması.....	27
3.2.4. GST Enziminin Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması	28
3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	28
3.2.6. Kinetik Çalışmalar	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları	31
4.2. İnsan Eritrosit GST Enziminin Glutasyon-Agaroz Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılmasına ait Sonuçlar	32
4.3. İnsan Eritrosit GST Enzimine Ait Saflaştırma Sonuçları.....	33

4.4. SDS-PAGE Yöntemi ile GST Enziminin Saflık Kontrolü.....	34
4.5. GST ve AChE Enzim Aktiviteleri Üzerine Bazı Antibiyotiklerin İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları.....	35
4.5.1. İnsan Eritrosit Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Gentamisin Sülfat, Streptomisin Sülfat, Linkomisin, Ampisilin ve Klindamisin Antibiyotiklerinin İnhibisyon Etkileri	35
4.5.2. AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Gentamisin Sülfat, Streptomisin Sülfat, Linkomisin, Ampisilin ve Klindamisin Antibiyotiklerinin İnhibisyon Etkileri.....	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

TEMED	: N, N, N', N'-tetrametilendiamin
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutatyon
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel
TCA	: Triklor asetik asit
GST	: Glutatyon s-transferaz
AChE	: Asetilkolin esterase
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim-İnhibitör denge sabiti
EC	: Enzim kodu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
V _{max}	: Maksimum hız
K _m	: Michealis-Menten sabiti
E	: Enzim
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
EÜ/mL	: 1 mL'deki enzim ünite sayısı
PER	: Amonyum per sülfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
I	: İnhibitör
6PGD	: 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
mM	: Mili molar
µM	: Mikro molar
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	İnsan eritrosit GST enzimi kantitatif protein tayini için sığır serum albümin proteini kullanılarak hazırlanan standart grafik	32
Şekil 4.2.	İnsan eritrosit GST enziminin glutatyon-agaroz afinite kolonundan elüsyonu.....	33
Şekil 4.3.	SDS-PAGE fotoğrafı (1. ve 2. kuyu insan eritrosit GST enzimi 3. kuyu: standart proteinler).....	34
Şekil 4.4.	İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı gentamisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Gentamisin sülfat] grafiği.....	35
Şekil 4.5.	İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı gentamisin sülfat konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.6.	İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı streptomisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Streptomisin sülfat] grafiği.....	36
Şekil 4.7.	İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı streptomisin sülfat konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 4.8.	İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı linkomisin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Linkomisin] grafiği.....	37
Şekil 4.9.	İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı linkomisin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 4.10.	İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı ampisilin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Ampisilin] grafiği.....	38
Şekil 4.11.	İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı ampisilin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	39

Şekil 4.12.	İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı klindamisin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Klindamisin] grafiği.....	39
Şekil 4.13.	İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı klindamisin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	40
Şekil 4.14.	AChE enzim aktivitesi üzerine farklı gentamisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Gentamisin sülfat] grafiği.....	41
Şekil 4.15.	AChE enzim aktivitesi üzerine farklı streptomisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite -[Streptomisin sülfat] grafiği.....	41
Şekil 4.16.	AChE enzim aktivitesi üzerine farklı linkomisin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite - [Linkomisin] grafiği.....	42
Şekil 4.17.	AChE enzim aktivitesi üzerine farklı ampisilin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite - [Ampisilin] grafiği.....	42
Şekil 4.18.	AChE enzim aktivitesi üzerine farklı klindamisin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite - [Klindamisin] grafiği.....	43

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.2.1.	GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözelti.....	26
Tablo 3.2.5.	Hazırlanan elektroforez jelleri.....	29
Tablo 4.1.	İnsan eritrosit dokusu GST enzimine ait saflaştırma sonuçları.....	34
Tablo 4.2.	İnsan eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerin IC ₅₀ , K _i değerleri ve inhibisyon türleri.....	40
Tablo 4.3.	AChE enzimi aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerin IC ₅₀ ve R ² değerleri.....	43

BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ASETİLKOLİN ESTERAZ VE GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Glutasyon S-transferaz (GST; E.C. 2.5.1.18) izoenzimleri, hücre içi ve hücre dışı kaynaklı toksik bileşiklerin ve okside moleküllerin glutasyon (GSH) substratına bağlanma reaksiyonunu katalizleyen önemli antioksidan enzimlerdir. Asetilkolin esterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) sinapslarda bulunan bir nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) substratının hidrolizini gerçekleştirerek impuls iletimini sonuçlandırır. Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Çalışmanın ilk aşamasında, sitozolik GST izoenzimi insan eritrosit dokularından homojenat hazırlanması ve glutasyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak iki adımda 2,58 EÜ/ mg spesifik aktivite ve %14,7 verim ile 161,25 kat saflaştırılırken, asetilkolin esterase enzimi ticari olarak temin edildi. İnsan eritrosit dokularından saflaştırılan GST enziminin saflık derecesi SDS-PAGE metodu ile tespit edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında, bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan GST ve AChE enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. İnhibitör etkisi gösteren antibiyotikler için çizilen %Aktivite-inhibitör konsantrasyonu grafiklerinden IC₅₀ değerleri, Lineweaver- Burk grafiklerinden K_i sabitleri bulundu. GST enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri gentamisin sülfat'ın 0,0144 mM, streptomisin sülfat'ın 0,231 mM, linkomisin'in 1,06 mM, ampisilin'in 3,57 mM ve klindamisin'in 69,31 mM olduğu ve gentamisin sülfat'ın 0,0195 mM, streptomisin sülfat'ın 0,021 mM, linkomisin'in 0,85 mM, ampisilin'in 6,87 mM ve klindamisin'in 66,80 mM K_i sabitleriyle inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. AChE enzimi için IC₅₀ değerleri gentamisin sülfat'ın 0,0135 mM, streptomisin sülfat'ın 0,099 mM, linkomisin'in 0,92 mM, klindamisin'in 0,94 mM ve ampisilin'in 3,01 mM olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon S-transferaz, saflaştırma, asetilkolin esterase, antibiyotik, inhibisyon.

INVESTIGATION OF THE IN VITRO EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS ON ACETYLCHOLINE ESTERASE AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ENZYME ACTIVITIES

ABSTRACT

Glutathione S-transferase (GST; E.C. 2.5.1.18) isoenzymes are important antioxidant enzymes that catalyze the binding reaction of intracellular and extracellular toxic compounds and oxidized molecules to the glutathione (GSH) substrate. Acetylcholine esterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) catalyzes the hydrolysis of acetylcholine (ACh) substrate, a neurotransmitter found at synapses, resulting in impulse transmission. This study, which was presented as a master's thesis, was carried out in two stages. In the first phase of the study, the cytosolic GST isoenzyme was purified with a specific activity of 2.58 EU/mg, with a yield of 14.7% and 161.25-fold using the homogenate preparation and glutathione-agarose affinity chromatography method in two steps from human erythrocyte tissues, while the acetylcholine esterase enzyme was commercially available. The purity of GST enzyme from human erythrocyte tissues was determined by SDS-PAGE method.

In the second phase of the study, the inhibitory effects of Gentamicin sulfate, Streptomycin sulfate, Lincomycin, Ampicillin and Clindamycin antibiotics, which are used in the treatment of infections caused by bacteria in human medicine, on purified from human erythrocytes GST enzyme and AChE enzyme activities were investigated. For antibiotics showing inhibitory effect, IC₅₀ values were calculated from the %Activity-inhibitor concentration graphs and Ki values were calculated from the Lineweaver-Burk graphs. The IC₅₀ values found for the GST enzyme were gentamicin sulfate 0.0144 mM, streptomycin sulfate 0.231 mM, lincomycin 1.06 mM, ampicillin 3.57 mM and clindamycin 69.31 mM. It was determined that it showed an inhibition effect with Ki constants of 0.0195 mM, streptomycin sulfate with 0.021 mM, lincomycin with 0.85 mM, ampicillin with 6.87 mM and clindamycin with 66.80 mM. IC₅₀ values for the AChE enzyme were found to be 0.0135 mM for gentamicin sulfate, 0.099 mM for streptomycin sulfate, 0.92 mM for lincomycin, 0.94 mM for clindamycin and 3.01 mM for ampicillin.

Keywords: Glutathione S-transferase, purification, acetylcholine esterase, antibiotic, inhibition.

GİRİŞ

1.1. Enzimler

Kimyasal reaksiyonlar gerçekleştiğinde herhangi bir değişime uğramadan ve tepkimelerin hızları üzerinde arttırıcı etkileri olan maddelere katalizörler denir. Metabolizmadaki reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürüp hızlarını artırma görevinde bulunan bu biyolojik katalizörler enzim olarak adlandırılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Enzimler canlılarda hücre sel hayatın devamlılığının sağlanması için meydana gelen biyokimyasal reaksiyonların %100 verimle ve yan ürün oluşmaksızın gerçekleşmesinde rol alırlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Canlı organizmalardaki tüm metabolik reaksiyonlar enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir (Çiftçi, 2021). Enzimler substrat adı verilen yapılara etki ederler (Çomaklı, 2011; Tuna, 2008). Tepkime sonrasında substrat ürüne dönüşürken enzim ise üründen ayrılarak reaksiyona girdiği ilk haline döner.

Enzimler biyokimya tarihi boyunca birçok araştırmalara konu olmakla birlikte biyokimyasal kataliz olayının 1700'lü yılların sonunda midede et ürünlerinin sindirilmesi keşfiyle başlayan enzim çalışmaları 1800'lü yıllarda ise nişastanın şekere dönüştürülmesiyle devam etmiştir (Lehninger vd., 2005; Galip, 2019; Sayın, 2022).

Enzimi ilk kez Kühne 1878 yılında adlandırmıştır. 1850 yılında ise Louis Pasteur şekerin alkole maya aracılığıyla fermentlendiğini saptamıştır. Nobel ödüllü Richard Willstätter ve bazı diğer bilim adamları proteinlerin enzimleri taşıma görevinde olduklarını ve kataliz işlemini tek başlarına yapamadıklarını iletmiştir. 1926 yılında ise Sumner tarafından saf protein olan üreaz enzimini 'Jack Bean' bitkisinden elde edilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Bir sindirim enzimi olan tripsin ve kimotripsin üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda da bu iki enzimin saf protein olduğunu ispatlayan Northop ve Stanley 1946 yılında Nobel kimya ödülünü almaya hak kazanmışlardır (Sayın, 2022; Nobel Lecture 1907).

Canlı organizmalarda gerçekleşen tepkimeler oldukça yüksek bir kinetik kararlılığa sahip olup kendiliğinden gerçekleşemezler ve enzimlere ihtiyaç duyarlar. Bu durum ise hücre içerisinde tüm reaksiyonların DNA tarafından kontrol edilen enzimler tarafından meydana gelmesini sağlamaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimler ortak birçok özellik gösterirler: Katalitik aktiviteye sahip RNA grubu dışında tüm enzimler protein yapıdadırlar ve bundan dolayı da proteinlerle aynı özellikler gösterirler (Lehninger vd., 2005). Bir enzim defalarca kez aynı tür tepkimeleri katalizleyebilir, girdikleri tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürür ve reaksiyonu hızlı bir şekilde dengeye ulaştırma çabası gösterirler. Canlı veya cansız birçok ortamda bulunabilmelerine rağmen ortamın asit veya alkali olmasından etkilenirler (Sayın, 2022).

Enzimlerin büyük moleküllü olması onların kolodyum zarlarından geçişini imkânsız hale getirir. Belli bir sıcaklık aralığında etki hızları artarken sıcaklığın 40 °C'nin üzerine çıkması yapılarını bozup denatüre olmalarına neden olur. Tepkimelerin yüksek sıcaklık ve yüksek enerji düzeyi isteklerini enzimler aşağı çekmeye çalışırken reaksiyon hızlarını da arttırarak zayıf bağlanma özelliği gösterirler. Aynı zamanda enzimler gerçekleşen bu reaksiyonlar sırasında değişikliğe uğrasalar bile tepkime bitince eski hallerine dönerler (Gözükara, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 2012; Sayın, 2022).

Enzimlerin basit protein yapılarının yanı sıra protein olmayan grupları da bulunmaktadır. Bu gruplar prostetik grup veya koenzim olarak adlandırılır (Demirci, 2013). Mn, Mg, Zn, Fe gibi metal kofaktörler ve NAD, FAD, CoA gibi molekül yapıli koenzimler prostetik grupları oluşturur. Enzim kofaktör kompleksi haloenzim olarak adlandırılır. Kofaktörü bulunan proteine apoprotein, enzime de apoenzim denir. Organik yapıdaki kofaktörler koenzim, metal iyonları ise aktivatör veya anorganik kofaktör olarak adlandırılır (Sayın, 2022). Aktivatörler enzimlerin aktivitesini arttırmakla görevlidirler. Koenzimler ise çoğunlukla B grubu olmak üzere vitaminlerden oluşmaktadır. Apoenzim, kataliz olayını koenzim veya kofaktör ile birlikte gerçekleştirir (Demirci, 2013). Kimyasal reaksiyonları koenzimler ve prostetik gruplar belirlerken substratı ise apoenzim belirler (Özeriş, 1993; Sayın, 2022).

1.2. Enzimlerin Adlandırılması

Katalizledikleri tepkimenin adına ya da substratın sonuna –az ekinin getirilmesiyle adlandırılmakta olan enzimler spesifik oldukları substrat ve tepkimeye göre sınıflandırılırlar (Demirci, 2013). Bu sınıflandırma 6 gruptan oluşmaktadır. Her grubun 4 ile 13 arasında olmak üzere alt grupları bulunmaktadır. “Uluslararası Biyokimya Derneği (International Union of Biochemistry-IUB)”nin keşfettiği yeni adlandırmaya göre her enzimin dört sayılı bir numarası vardır ve ‘EC’ kısaltması ile tanımlanır. EC numarasında ilk rakam reaksiyonun adını, ikinci rakam etkilediği kimyasal grubu, üçüncü rakam alıcı grubunu, dördüncü rakam ise sıra numarasını bildirir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Enzimlerin reaksiyon tiplerine ve mekanizmalarına göre 6 gruptan oluşan sınıflandırılması şöyledir;

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-İndirgenme tepkimelerinin katalizlendiği sınıftır.
2. Transferazlar: Substratlar arasındaki hidrojen dışındaki grupların transferini sağlarlar.
3. Hidrolazlar: Bir su molekülünün eklenmesiyle peptid, ester ve glikozid bağlarının koparıldığı hidroliz reaksiyonları sınıfıdır.
4. Liyazlar: Substratların gruplardan koparıldığı ve yeni çift bağlarının oluşturulduğu tepkimeleri katalizlerler.
5. İzomerazlar: Moleküllerde optik, yapısal ve geometrik değişiklikler yaparlar. oksidasyon -redüksiyon ve grup transferini sağlarlar.
6. Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili moleküllerden fosfat bağının kopması ile çıkan enerjiyle iki molekülün bağlanmasını katalizlerler (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Aynı canlı organizmalarda aynı reaksiyonu gerçekleştirirken farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip enzimler de bulunmaktadır. Bu enzimlere izoenzimler adı verilmektedir. İzoenzimler substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı farklı ilgilere sahiptir. Birtakım özellikleri bulunmaktadır. Bunlar: Amino asit sayı ve sıralarının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması ve farklı genlere sahip olması özellikleridir. Karbonik anhidraz, alkalin fosfataz, laktat dehidrogenaz ve glutatyon s-transferaz izoenzimlerin başlıca örneklerindedir (Sayın, 2022).

1.3. Enzim İnhibisyonu

Bazı bileşikler tarafından enzim aktivitelerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak azaltılması veya tamamen yok edilmesi inhibisyon olarak adlandırılmaktadır (Çomaklı, 2011). İnhibitör adı verilen bu bileşikler düşük molekül ağırlıklı olup bazı iyonlar da örnek verilebilir. Dönüşümlü inhibisyon ve dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyon olayında inhibitör enzimle kovalent bağlanır. V_{max} azalır, K_M değişmez (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Dönüşümlü inhibisyonda bir denge durumu vardır. Ve üç başlıkta incelenir. Yarışmalı inhibisyon, yarı yarışmalı inhibisyon ve yarışmasız inhibisyon olmak üzere. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör substrata bağlanarak substratın enzimle bağlanamamasına neden olur. Enzimin V_{max} değerinde değişiklik olmazken K_M artar. Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör ES kompleksine bağlanarak tepkimenin hızını yavaşlatır. Kompleksi bozarak ürün çıkışını engeller (Yılmaz, 2019). Yarışmasız inhibisyon türünde inhibitör ve substrat farklı bölgelere tutunur. V_{max} azalırken K_M değişmez.

Ezimlerin kinetik özelliklerine Michaelis-Menten denklemindeki ifadelerle ulaşılır. Denkleminde bulunan K_M değeri enzimin substrata ilgisini gösterirken V_{max} ise katalitik aktivitenin göstergesidir. Enzim aktivitesi demek enzim ünitesi demektir. Enzim Ünitesi, “25 °C’de optimal şartlarda 1 μ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı” demektir. 1 katal enzim saniyede 1 mol madde dönüştüren enzimi ifade ederken spesifik aktivite ise “1 mg protein başına enzim ünitesi” olarak ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

İnhibisyon çeşidi ve K_i sabiti Lineweaver-Burk eğrisi ile belirlenmektedir (Çağlayan, 2017). Bu egride $1/V$ ’ye karşı $1/[S]$ grafiği üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonuyla beş farklı substrat konsantrasyonu belirlenerek birleşme noktaları değerlendirilir. K_i ve V_{max} değerlerinin hesaplandığı formüller şu şekilde bulunur.

Yarışmasız inhibisyon grafiklerinde K_i , $V_{max}^I = V_{max} / (1+[I]/K_i)$ denklemi ile bulunur.

Yarışmalı inhibisyon grafiklerinde K_i , $K_M^I = K_M / (1+[I] / K_i)$ denkleminde yararlanılır.

Yarı yarışmalı inhibisyon grafiklerinde ise K_i ve V_{max} değeri, $V_{max}^I = V_{max} / (1+[I]/K_i)$ ve $K_M^I = K_M / (1+[I]/K_i)$ ile bulunur (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimlerin aktivitelerini etkileyen faktörler vardır bunlar: Substrat konsantrasyonu, ortamda bulunan enzimlerin konsantrasyonu, pH, ortam sıcaklığı, iyonik şiddet, kofaktör konsantrasyonu, ortamdaki inhibitör ya da aktivatörlerin varlığı olarak sıralanırlar. Enzim aktivitesinin ölçülmesi demek reaksiyonun hızının belirlenmesi demektir. Spektrofotometrik yöntem ile genellikle ölçülür. Zamana bağlı olarak substratın değişimi veya ürün oluşması ile ölçüm yapılmaktadır (Lehninger vd., 2005).

Enzimler kalitatif ve kantitatif tayinlerinin hesaplanabilmesiyle birçok kalıtsal hastalıkların teşhis ve tedavisinde fayda sağlamaktadır.(Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimlerin saflaştırılması olayı çok zor işlemler olup çok dikkat gerektirirler. Saflaştırma işlemleri sırasında ise enzimin çözünürlüğünün farklılığı, molekül büyüklüğü, adsorbsiyon davranışları ve elektrik yüklerine bakılmalıdır.

1.4. Eritrositler

İnsan kanı trombosit, lökosit ve eritrosit hücrelerinden oluşmaktadır. Trombositler damarların endotel bütünlüğünü sağlayıp damardan kanın sızmasını önler. Lökositler mikroorganizmaların vücuda yayılmasını önler. 1665 yılında eritrositleri ilk Malphigi tanımladı ve 1673'te de Leewenhock ise kana kırmızı renginin eritrositlerden dolayı olduğunu buldu. Eritrositler dıştan bir membran ile sarılı olup iç kısmında ise ağ şeklinde stroma ve hemoglobin bulunmaktadır (Güvercin, 2006).

Hücrelerin %50 -60'ı proteinden, %10-12'si lipidlerden ve geri kalan kısmı da sudan oluşmaktadır. Eritrosit membranı, üre, HCO_3^- ve OH^- gibi bazı metabolitler için geçirgen özellik gösterirken, Na^+ , Ca^{+2} ve K^+ gibi bazı iyonlar ve inorganik fosfat için aktif taşıma gereklidir. Eritrositlerin en önemli görevi yapılarında bulunan hemoglobinin dokulara oksijen taşımasıdır (Güvercin, 2006). Eritrositlerin 120 günlük ortalama bir ömürleri bulunmaktadır. Olgun hücre çekirdeksiz ve çift iç bükey yapıdadır (Türk, 2012).

Eritrositler görevlerini yerine getirebilmek için içyapılarını, membran aktivitelerini ve şekillerini de koruyacak enerjiye gereksinim duyarlar. Gerekli olan bu enerji eritrositlere glikoliz olayından sağlanır. Glukoz %90 anaerobik glikoliz ile harcanırken pentoz fosfat

yolu ile de harcanır. Pentoz fosfat yolu sonucunda oluşan NADPH, okside glutatyonun indirgenmesinde kullanılır. Bu tepkimeler sonucunda hücre içinde yüksek K^+ ve düşük Na^+ seviyeleri korunur, hemoglobin demiri indirgenir, hücre içi ve membranlardaki tiyol (-SH) grupları oksidasyona karşı korunur ve yapı bütünlükleri sağlanır (Güvercin, 2006).

1.5. Antibiyotikler

Alexander Fleming tarafından 1928 yılında keşfedilen antibiyotikler bakteri, virüs ve mantar gibi hastalık yapıcı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmede kullanılan kimyasal bileşiklerdir (Karaman, 2016). Karaman (2016) tarafından bildirildiğine göre bakteriler ve bitkiler tarafından doğal olarak ya da laboratuvar ortamında yapay üretildiğini ilk kez Diamiond (1951) ileri sürmüştür. Louis pasteur 1857 yılında soğan suyunun laktik asit bakterilerinin büyümesini engellediğini keşfetmiştir (Burkholder, 1959).

Antibiyotikler bakteriyostatik ya da bakterisid olmak üzere iki şekilde etki ederler ve en çok bilinen etki mekanizmaları şöyledir:

- 1.Hücre membran fonksiyonunu inhibe eden antibiyotikler,
- 2.Ribozom fonksiyonunu inhibe edenler antibiyotikler,
- 3.Nükleik asit sentezini inhibe edenler antibiyotikler,
- 4.Folat metabolizmasını inhibe edenler antibiyotikler,
- 5.Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler.

Savcı (2016) tarafından bildirildiğine göre bakterilerin birkaçında etkili olan antibiyotikler dar spektrumlu birkaçından fazla bakterilerde etkili olanlar geniş spektrumlu antibiyotik olarak adlandırıldığını Dumitrescu (2011) ileri sürmüştür. Bakterilerin duyarlı oldukları antibiyotikler o ilacın antimikrobiyal spektrumunu gösterir. Etki spektrumu dar olan bakteriyostatik antibiyotikler bakterinin gelişmesini ve üremesini engellerler. Metronidazol, eritromisin, tetrasiklinler ve sülfonamidler bakteriyostatik etkili ilaçlardır. Savcı (2016) tarafından bildirildiğine göre bakteriyi direkt öldürerek çok etkili olan bakterisid antibiyotiklere ise penisilinler, sefalosporin, vankomisin, aminoglikozidler ve fluorokinolonların örnek olduğunu ilk kez Ciancio and Bourgault (1989) ileri sürmüştür.

Kimyasal yapıları farklı olan antibiyotiklerin terapötik davranışlarının da farklılığı bu antibiyotiklerin de sınıflandırılmasını sağlamıştır. Aminoglikozitler, β -laktamlar, makrolidler, amfenikoller, linkozamidler, tetrasiklinler, kinolonlar, sülfonamidler, glikopeptidler ve oksazolidinonlar kimyasal yapılarına göre ayrılan antibiyotikler sınıfıdır (Burç, 2020).

Türkiye’de IMS Health (2002) verilerine göre yaygın bir şekilde penisilin sefalosporin makrolid, aminoglikozid, tetrasiklin ve sülfonamid antibiyotikler kullanılmaktadır (Karaman, 2016). B-laktam grubu antibiyotiklerine penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler örnek verilebilir (Burç, 2020). Bu antibiyotikler hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterileri öldürücü etki gösterirler. Alexander Fleming tarafından 1928 yılında keşfedilen penisilinler Howard Walter Florey ve Ernst Boris Chain tarafından kullanıma hazır hale getirilmiştir. Böylelikle tıp alanında büyük bir gelişme yaratarak antibiyotik çağını başlatmışlardır (Burç, 2020).

Makrolid grubu antibiyotik olan eritromisin ise bakteriyostatik etkili olup gram-pozitif bakterilere yönelik geniş spektrumludur (Burç, 2020). Tetrasiklinler ribozomların 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini engellerler (Burç, 2020). Folik asit sentezi inhibisyonunu gerçekleştiren sülfonamidler ise bakteriyostatik etkiye sahip ilk antimikrobiyal ilaç grubundandır (Burç, 2020). Bir diğer grup glikopeptitler ise hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklerden olmakla birlikte vankomisin en yaygın kullanılan glikopeptit antibiyotiktir (Burç, 2020). Bakteriyostatik etki gösteren oksazolidinonlar gram-pozitif bakterilere karşı son çare olarak kullanılan protein sentez inhibitörleridir.

Kinolon grubu antibiyotikler sentetik olarak yapılan bakteriyostatik ilaç grubudur. Ve daha çok idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılır. Kinolon grubuna ait olan siprofloksasin en çok kullanılan antibiyotiklerdendir. CİPRO olarak bilenen ilaç gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde etkilidir. Burç (2020) tarafından bildirildiğine göre etki alanı geniş olan CİPRO birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır: Akciğer enfeksiyonları, orta kulak iltihabı, idrar yolu enfeksiyonları gibi daha birçok enfeksiyonun tedavisinde önemli rolü bulunduğunu ilk kez Şenol (2002) ileri sürmüştür.

Aminoglikozidler gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında güçlü etkilere sahiptirler. Bu gruptaki ilaçlar benzer kimyasal, fiziksel ve farmakolojik özellikler gösterirler. Amikasin, gentamisin, netilmisin, streptomisin ve tobramisin bu grup ilaçlardır. Aminoglikozidler, bakterilerin 30S ribozomal alt birimine bağlanarak translasyonu inhibe ederler. Streptomyces veya mikromonospora türü mikroorganizmalardan elde edilirler (Manavoğlu, 2021).

Günümüzde neredeyse hayatımızın her alanında karşılaştığımız antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar olmak üzere yerini almıştır. Antibiyotikler en çok karşımıza insan ve hayvan sağlığı, gıda sektörü, hastaneler, ilaç endüstrisi, sulak alanlardaki canlıların gelişimi ve bilimsel araştırmalarda çıkar (Topal et al., 2015). Bu ilaçların faydaları kadar canlılara yan etkileri de vardır. Özellikle de gereksiz yere ve bilinçsizce kullanımı beraberinde birçok sağlık sorunlarını ortaya çıkarmaktadır.

1.6. Araştırmada Kullanılan Antibiyotikler

1.6.1. Gentamisin Sülfat

Gentamisin, gram negatif bakterilerin neden olduğu hastalıklarda etkilidirler. Aminoglikozid grubundandır. Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt 13 birimlerine bağlanıp protein sentezini inhibe ederler. Bakterisid etki yaparlar. Amikasinden sonra en kuvvetli ve geniş spektruma sahip antibiyotiktir. Plazma proteinlerine az bağlanırlar. Polar yapıda olup lipofilik özellik gösterirler (Ayna vd., 2021).

1.6.2. Streptomisin sülfat

Streptomisin, aminoglikozid sınıfına ait olup keşfedilen ilk antibiyotiktir. Bakterilerin 30S alt birimlerine bağlanarak onların protein sentezinin inhibe olmasına neden olur. Hem gram pozitif hemde gram negatif bakterilere karşı etkilidirler. Bakterisid etki gösterirler. Aktinomisetler grubundan olan Streptomyces griseus'dan elde edilirler. Tüberküloz, bruselloz, veba, tularemi ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılırlar (Rossini vd., 1977).

1.6.3. Linkomisin

Linkozamid grubunun ilk üyesidir. Streptomyceslincolnensis'ten elde edilmiştir. 1962 yılında elde edilen linkomisin bir amino şeker ve bir amino asitten oluşan bir yapıya sahip amiddir. Etki mekanizması ve antibakteriyel spektrum özellikleri makrolid grubundan olan eritromisin ile aynıdır. Bakteriyostatik etkilidirler. Bakterilerin 50S ribozomal alt kısımlarına bağlanırlar. Gram pozitif anaerob ve gram negatif anaerob bakterilere karşı etkilidirler. Mide–bağırsak duvarında hızlı emilirler. Doku ve vücut sıvılarında hızlı dağılır ancak beyin omuriliğe yeterli dağılamaz. Menenjit dışında birçok hastalıklarda kullanılır (Dalkılıç, 2016).

1.6.4. Ampisilin

Bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan β -laktam grubu antibiyotiktir. E.coli, salmonella, shigella, proteusmiribalis gibi negatif basillerin suşlarına karşı bakterisid etkisi bulunmaktadır. E.Coli gibi duyarlı bakterilerin neden olduğu üriner enfeksiyonlarda, duyarlı bakterilerin birçoğunun neden olduğu akut otitismedia'da ve kronik bronşitte tercih edilirler. Kristalize yapısı suda güç çözünmesine neden olur. Organik çözücülerde ise neredeyse hiç çözünmez. Asit, baz ve penisilinaz enzim etkisiyle β -laktam halkasının gergin yapısından hızlı bir parçalanma süreci geçirir (Tarhan, 1988).

1.6.5. Klindamisin

Linkozamid grubunun bir üyesi ve linkomisinin yarı sentetik türevi olup bir hidroksi grubunun 7. Pozisyonundaki klor atomunun yer değiştirilmesiyle oluşur. Gram pozitif ve anaerob mikroorganizmalara düşük dozlarda bile etkilidirler. Bakterilerin 50S grubuna bağlanıp etki gösterir (Dönmez, 2011). S. pneumoniae, s. viridans, s. pyogenes, s. aureus, b. fragilis, fusobacterium spp peptococcus spp peptostreptococcus, c. perfringens gibi mikroorganizmalara karşı etkili olup b. fragilise karşı en etkili olan antibiyotik grubudur.

İdrar ve safra yolu ile vücuttan atılırlar (Tarhan, 1988). Ağır böbrek ve karaciğer yetmezliğinde doz ayarlama gereksinimi vardır. Suda ve etanolde çözülürken klindamisin hidroklorid nötral Ph da az çözünürler. Linkomisinden daha fazla antibakteriyel özellik

gösterirler. Anaerop enfeksiyonlarda ilk tercih edilmesi gereken antibiyotik grubudur. Anaerop akciğer enfeksiyonlarında özellikle tercih edilebilir. Beta laktam antibiyotiklere karşı alerjik olan hastalarda da kullanılabilir. Stafilokokosteomyelit, kalp kapak hastalarında, diş çekim ve öncesi tedavide, bakteriyel vaginosis oral kullanımı, akne vulgaris, akne rozacea 'da topikal kullanımı gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir (Aydın, 2007).

1.7. Glutasyon (GSH)

Glutasyon hücrede en fazla bulunan tiyol olup protein yapılı olmamakla birlikte birçok hücrel savunma görevinde bulunmaktadır (Schultz et al., 1997). Bir tripeptid olan GSH tüm memeli organizmalarda bulunur. İki peptid bağı iki amino grubu, iki karboksil grubu ve bir tiyol grubu yapıdadırlar (Çomaklı, 2011). GSH glutamik asit, sistein ve glisinden oluşmaktadır (Bayram, 2018).

İndirgenmiş glutasyon (GSH) ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) olmak üzere iki kısma ayrılır. Eritrositlerde GSH/GSSG oranı 500 olan glutasyon kırmızı kan hücrelerinde bulunan sistein rezidüleri indirgeyerek sülfhidril tamponu işlevini sağlarlar (Güvercin, 2006).

Glutasyonun sentezlenmesi ATP'nin harcandığı iki tepkime sonunda gerçekleşir. Güvercin (2006) tarafından bildirildiğine göre bu tepkimeler γ -glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri tarafından katalize uğradığını ilk kez Toribio (1996) ileri sürmüştür. Aynı zamanda bir tripeptit olan glutasyon canlı organizmalarda DNA sentezi, transport işlemi ve detoksifikasyon başta olmak üzere birçok önemli görevde bulunur (Aksoy, 2018).

Glutasyon hücrelerden toksik bileşenleri uzaklaştırma ve sülfhidril grubunun devamlılığını gerçekleştirme konusunda önemli bir görev üstlenmiştir(Liebman ve Greenberg, 1988). Galip (2019) tarafından bildirildiğine göre aynı zamanda molekül kütesinin küçük olması ve hidrofilik grupların fazlalığı sudaki çözünürlüğünü artırırken moleküler yapıdaki kararlılığını ve savunmasını arttırdığını Kidd (1999) ve Kosower (1976) ileri sürmüştür.

Vücudumuzda bulunan toksik moleküller, DNA ve proteinleri yok etmeye çalışarak hücrenin ölümüne neden olurlar. Bu nedenle yaşamın devam edebilmesi vücudumuzda bulunan detoksifikasyon işlemleri ile gerçekleşir. Detoksifikasyon tepkimeleri iki fazda gerçekleşmektedir. Faz I bölümünde yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz olayları ile substrata aktif gruplar bağlanırken, faz II'de ise konjugasyon reaksiyonları meydana geldiğini ilk kez Lee (2003) ileri sürmüştür. Faz II tepkimelerinde en önemli görevi üstlenen enzimlerden biri ise Glutatyon S-transferazlardır.

Mitokondri, nukleus ve sitoplazmada bulunan glutatyon önemli bir antioksidandır (Alscher, 1989). Hücreleri oksidatif zararlardan serbest radikallerle ve peroksitlerle reaksiyona girerek korurken sülfhidril gruplarını indirgeyerek ve demirin de ferröz halinde kalmasını sağlayarak enzimlerin inaktivasyonunu önler (Droog, 1997).

1.8. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzimi tripeptit glutatyon (GSH) ile etkileşim kurarak biyolojik mekanizmalarda bulunan elektrofilik ksenobiyotikleri uzaklaştırmakla bir detoksifikasyon görevine sahiptir (Balcı vd., 2019). Endojen veya eksojen kaynaklı ksenobiyotiklerin eliminasyonunu sağlayan glutatyon S-transferaz enzimi faz II detoksifikasyon reaksiyonlarının en önemli enzim ailesinin üyesidir (Hayes vd., 2005; Halliwell, 2009; Mazzetti vd., 2015).

Ksenobiyotikler üç aşamada detoksifikasyon işlemine tabi tutulurlar. Faz I detoksifikasyon mekanizması vücutta yabancı maddelere karşı ilk savunma görevinde bulunan sitokrom P450 enzim sisteminden oluşmaktadır. Faz II'de faz I aşaması sonucunda oluşan polar moleküllerin konjugasyon tepkimeleri gerçekleşir. Faz III'te suda daha fazla çözünen polar olmayan ve hücreler tarafından kolayca uzaklaştırılabilen ksenobiyotikler oluşur (Türkan ve Atalar, 2018). Faz II'de Detoksifikasyon tepkimelerinde suda çözünür hale gelen son ürün olan merkaptirik asit oluşumunun ilk basamağı GST tarafından gerçekleştirilir (Türkan ve Atalar, 2018).

Boylard ve arkadaşları GST izoenzimlerini ilk olarak sıçan karaciğerinde tespit etmişlerdir (Taysı, 2018). GST en çok insanlarda olmak üzere memeliler, böcekler, bakteriler, kuşlar

gibi birçok canlılarda yaygın olarak bulunmakla birlikte karaciğer, böbrek, akciğer, dalak, kas ve plasenta gibi organlardan ayrıştırılarak çalışmalara konu olmuştur (Aksoy, 2018).

Taysı (2018) tarafından bildirildiğine göre GST substratlarının çoğu hidrofilik özellik gösterir ve elektrofilik merkezlere sahip olduklarını ilk kez Coşkun (2007) ileri sürmüştür. GST enzimi tarafından katalizlenen tepkimelerin ilk basamağında hidrofobik elektrofiller glutatotyona bağlanır ve açığa çıkan merkaptürik asit son ürünü ile denge sağlanır (Demir Çay ve Yörük, 2022).

GST enziminin çalışması glutatyonun ortamda olmasına bağlıdır. Bu yüzden GSH kosubstrat olarak da adlandırılmaktadır (Taysı, 2018). Enzimin temel görevi glutatyonu ve substratı aktif bölge üzerinde birbirine yaklaştırarak bağlamak (Eaton and Bammler, 1999) ve sülfhidril grubunu aktive edip glutatyonun elektrofilik substratla tepkimeye girmesine neden olmaktır (Armstrong, 1997).

İnsan GST enzimlerinin sınıflandırılmaları izoelektrik noktaları baz alınarak Latin harfleri ile gösterilmiştir (Kamisaka vd., 1975). GST enzimleri üç farklı alt aileden oluşur. İlki sitozolik alfa (α), mu (μ), pi (π), sigma (σ), teta (Θ), zeta (ζ), omega (ω) ve ikincisi mitokondriyel kappa (κ) ve üçüncüsü mikrozomal enzimleridir (Khoshnaw, 2018; Orhan, 2018).

Sitozolik ve mitokondriyel GST'ler üç boyutlu yapıları ile birbirlerine benzerlik gösterip birlikte çözünebilirler. Bu grup enzimlerin çok sayıda izoenzimleri bulunmakla birlikte izoenzimlerin aminoasit dizilimleri ve izoelektrik noktaları birbirinden farklıdır (Tuna, 2008). Memeli türlerde alfa, mü, pi, sigma, teta, omega ve zeta sitozolik GST'ler bulunurken memeli olmayanlarda beta, delta, epsilon, lambda, pi, tau ve u sitozolik GST'ler sınıfı mevcuttur (Tuna, 2008). Mitokondriyel GST sınıfında ise kappa bulunur. MAPEG ailesinin üyesi olan mikrozomal GST'ler çözünebilir diğer GST'lerden farklı özelliklere sahip olmakla birlikte eikozonoid üretiminde görevi bulunmaktadır (Tuna, 2008). Hayvanlarda bulunan GST enzimleri teta ve zeta iken omurgasız hayvanlarda sigma ve teta çok miktarda bulunur (Dixon vd., 2002). Bitkilerde en çok bulunan GST enzimleri ise pi, tau, teta, zeta ve lambda izoenzimleridir.

GST enzimlerinin detoksifikasyon ve hücre koruma görevinden başka antikanser ilaçların geliştirilmesinde de büyük bir biyolojik önemi bulunmaktadır. GST enziminin Kinazlarla etkileşimlerinin aydınlatılması çalışmaları kanser tedavi modellerinin geliştirilmesine ve tümör patofizyolojisindeki görevinin belirlenmesine yol açacaktır (Khoshnaw, 2018).

GST enzimlerinin koruma mekanizmaları ile organik hiperoksitlerin azaltılmasını ve östrojenlerin metabolik redoks süreci içerisinde bulunun serbest radikaller ile hücreleri oksitadif strese karşı koruma görevi vardır (Ge vd., 2015).

Dimerik yapıdaki GST'ler 19 ile 23 arası kDa molekül kütlesine sahiptirler. 200-240 aminoasit diziliminden oluşan alt birimleri mevcuttur. Her alt birimi ise iki domainden oluşan bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. N-terminal domain bir beta tabaka ve üç alfa heliks yapısında olan 80 aminoasitten oluşan GSH'nin bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve elektrofillerin bağlanma bölgesi olan H bölgesinden oluşur. C terminal domain ise 5 veya 6 alfa-heliksten oluşmaktadır (Tuna, 2008).

Glutasyonun elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu G ve H bölgeleriyle gerçekleşmektedir. GST enzimlerinde G bölgesi GSH spesifikliğı ile benzer olup H bölgesi ise tüm GST 'lerde farklılık göstermektedir. Çomaklı (2011) tarafından bildirildiğine göre İnsan ve sıçan GST enzimlerinde aspartik asit, glutamik asit ve lösin aminoasitleri çok bulunurken triptofan ve sistein ise sıçanda az miktarda olup insanlarda hiç bulunmadıklarını ilk kez Fleischn vd. (1976) ve Baş (2006) ileri sürmüştür.

Çiftçi (2021) tarafından bildirildiğine göre GST enziminin *in vitro* olarak en çok kullanılan substratı olan 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) indirgenmiş glutasyon ile konjugasyon reaksiyonu, GST aktivitesinin bulunmasında önemli bir yerinin olduğunu ilk kez Arı ve Dere (2003) ile Bozkurt (2017) öne sürmüşlerdir.

GST aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Bu yöntem Habig ve ark. ile Howie ve ark. önerdiği indirgenmiş glutasyonun CDNB substratı ile konjugasyonu sonrasında oluşan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesi esası ile yapılır. İkinci yöntem ise immünoradiyometrik ölçümdür (Howie vd., 1988).

1.9. Asetilkolin Esteraz (AChE)

Asetilkolinesteraz enzimi (E.C.3.1.1.7) 1938 yılında bir elektrik balığının (Torpedo marmorata) elektrik organından saflaştırılmıştır(Öztaşkin et al., 2015). Asetilkolin vücutta başta sinir hücreleri ve kas hücreleri olmak üzere, merkezi ve periferel, eritrositlerde, karaciğerde ve dalakta bulunur (Bingöl, 2016).

Kolinerjik sinir uçlarında bulunan kolin ve asetil koenzim A'nın kolin asetiltransferaz enzimi tarafından katalizlenerek tepkimeye girmesi ile asetilkolin sentezlenir (Arabacı, 2015).

Asetilkolin sinir impulslarının sinapstan geçişini kolaylaştırarak bir nörotransmitter madde görevi görür (Demirci, 2013). Asetilkolin esteraz enzimi asetilkolini asetat ve koline hidroliz ederek sinaptik boşluklarda oluşan sinirsel impulsu sona erdirme görevi görür (Schumacher et al., 1986). Asetilkolinin çok fazla inaktive edilmesiyle de sinir iletimi kesilir ve Alzheimer hastalığı ortaya çıkar (Demirci, 2013).

Göçer (2014) tarafından bildirildiğine göre AChE enziminin sinir impulsu taşıma görevi dışında sinir hücreleri ve kas liflerinde oluşan biyoelektriksel akımın da sorumlusu olduklarını Wilson ve Nachmansohn (1954) ile Carlson (1992) ileri sürmüşlerdir. Aktif bölge ve katalitik mekanizma yönüyle diğer enzimlerden farklı özellikleri bulunmaktadır. Enzimin üç boyutlu yapısı incelendiğinde α -heliks ve β tabakalarından oluştuğu görülmüştür. Aktif merkezinde erin, Glutamat ve Histidin katalitik üçlüsüyle birlikte 14 aromatik rezidü tarafından çevrelenmiştir (Oakeshott vd., 1999).

Asetilkolinesteraz'ın aktif bölgesindeki proteinin çok az bir kısmı bile substratın çok az bir konsantrasyonuyla tepkime girmesi yeterlidir. AChE tarafından gerçekleştirilen tepkimeler iki basamakta gerçekleşir. Göçer (2014) tarafından bildirildiğine göre nükleofil olarak ilk basamakta yer alan enzim ikinci basamakta güçlü bir parçalayıcı görevi gördüğünü Demir and Turkoglu (2005) ileri sürmüştür.

AChE enziminin asetilkoline bağlanmasıyla aktif merkezin ikinci bölgesinde hidrolitik reaksiyonlar gerçekleşir. Bunun sonucunda ise asetilkolinin ester bağları kırılmaya

uğrayarak asetat ve kolin açığa çıkar. Kolin presinaptik merkezdeki kolin toplama sistemi tarafından tutulurken asetat alt merkezdeki serin rezidüleri ile kovalent bağlanarak asetillenir. Bu asetil formu ile bir molekül su reaksiyona girerek asetatin ayrılığını sağlar (Vale, 1998).

AChE enziminin önemli bir inhibötörü olan organofosfatlı pestisitler enzimi inhibe ederek sinir sistemini etkilerler (Arabacı, 2015). İşlevi bozulan AChE enzimi sinaptik boşluklarda asetilkolin birikmesine sebep olarak kas paralizi, nöbet ve ölüm gibi sonuçlar ortaya çıkarır (Aldridge ve Reiner, 1969).

Alzheimer hastalığının beyinde kolinerjik kavşak ve sinapslarda bulunan asetilkolinin azalması sonucu oluştuğu tespit edilmiştir. Ve buna yönelik olarak asetilkolinin AChE enzimi inhibitörleri kullanılarak miktarı arttırılmaya çalışılmıştır (Daniel, 1987; Francis vd., 1999).

Alzheimer hastalığında başarılı tek ilaç grubu olan asetilkolin esteraz inhibitörleri asetilkolini hidrolizleyen AChE enzimini inhibe ederek enzimin etkisinin azalmasıyla hastaların üzerinde olumlu etkileri görülmeye başlanır. İki sinir hücresi arasındaki iletişimi sağlayan bu nörotransmitter asetilkolini hidroliz ettiğinde sinirler arasındaki geçiş sona erer. Hafıza kaybı ile ilgili hastalıklarda asetilkolin çok hızlı bir parçalanma süreci yağar. Bu parçalanmayı gerçekleştiren enzimin inhibe edilmesi sinirler arasındaki geiği tekrar kuvvetlendirir. Asetilkolinesteraz ilaçlarının birtakım yan etkilerinin (hepatotoksisite ve gastrointestinal) olması farklı ve daha doğal inhibitörlerin kullanılmasını öne çıkarmıştır (Bingöl, 2016).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

GST izoenzimleri üzerine ilk araştırmalar 1961 yılında sıçan karaciğerinde keşfedilmesi sonucu başlanmıştır. Bu keşif sonrası GST izoenzimleri epoksit transferaz, asiltransferaz, alkiltransferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz olmak üzere beş ana grupta sınıflandırıldı (Booth vd., 1961).

GST'ler üzerine yapılan daha sonraki araştırmalar GST izoenzimlerinin prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm canlılarda bulunduğunu göstermiştir (Taysi, 2018).

GST izoenzimleri keşfedildikten sonra pek çok hayvansal kaynaktan çeşitli yöntemlerle saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu kaynaklar ve kullanılan yöntemler; sıçan karaciğerinden, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz kolon kromatografisi, CM-selüloz katyon değişim kolon kromatografisi yöntemleriyle (Pabst ve ark.,1974), sığır karaciğeri sitozolünden orange-A agaroz afinite kromatografisi ve DEAE iyon değişim kolon kromatografisi yöntemleriyle (Asaoka ve ark.,1983), sığır beyninden kalsiyum fosfat jeli, amonyum sülfat çöktürme metodu, DEAE selüloz iyon değişim kolon kromatografisi ve GSH-sepharose afinite kolon kromatografisi yöntemleri ile (Young ve Briedis, 1989), kahverengi alabalığın karaciğer ve böbreklerinden, HPLC ve glutatyon agaroz afinite kolon kromatografisi yöntemleriyle (Novoa ve Valinas, 2001), tilapia (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğer dokularından, glutatyon-sefaroze afinite kolon kromatografisi yöntemiyle (Hamed ve ark., 2004), kefal balığı karaciğer dokularından, anyon değişim kolon kromatografisi yöntemiyle (Martinez ve Lara, 1997), monopterus albus balığı karaciğer dokularından, afinite kolon kromatografisi yöntemiyle (Huang ve ark., 2008) saflaştırılmıştır.

Arca ve ark. tarafından GST izoenzimi *E. coli* bakteri ekstraktından, DEAE-sephadex iyon değişim ve glutatyon agaroz afinite kolon kromatografisi kullanarak (Arca ve ark., 1990) saflaştırılmıştır.

GST izoenzimleri keşfedildikten sonra pek çok insan dokusundan çeşitli yöntemlerle saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu kaynaklar ve kullanılan yöntemler; insan karaciğerinden, amonyum sülfat tuz çöktürmesi, DEAE-selüloz anyon değişim kolon kromatografisi, sephadex G-200 jel filtrasyon kolon kromatografisi, sephadex G-200 jel filtrasyon kolon kromatografisi yöntemleriyle (Awasthi ve ark., 1980), insan akciğerinden, anyon ve katyon kromatografisi yöntemleriyle (Catherine ve ark., 1984), insan karaciğerinden, glutatyon-afinite kromatografisi ve kromatofokuslama yöntemleriyle (Jagt ve ark.,1985), insan trombositlerinden, amonyum sülfat tuz çöktürmesi CM-selüloz iyon değişim ve Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleriyle (Loscalzo ve Freedman, 1986), insan böbreklerinden, epoksi bağlanarak aktivasyon sağlanan GSH-Sepheroz-6B afinite kromatografisi yöntemiyle (Singh ve ark., 1987), insan fetal karaciğerinden, afinite kromatografisi ve kromatofoklama yöntemleri ile (Kashiwada ve ark., 1991), insan plasentasından, glutatyon-agaroz kolon kromatografisi yöntemiyle (Çelik ve ark., 2003), insan serumundan, afinite kromatografisi ile (Türkanoglu ve ark., 2005), insan eritrosit dokularından, glutatyon-agaroz afinite kolon kromatografisi kullanılarak (Erat ve Şakiroğlu., 2012), bildircin karaciğer dokularından, glutatyon-agaroz afinite kolon kromatografisi yöntemiyle (Taysi ve Temel, 2021), koyun dalak dokusundan, glutatyon-agaroz afinite kolon kromatografisi yöntemiyle (Yüksel ve Temel, 2022) saflaştırılmıştır.

Aynı zamanda GST izoenzimleri üzerine çeşitli ilaç ve kimyasalların etkileri araştırılmıştır. Çetinkaya ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan GST enzimi üzerine bromobenzen ve karbon tetraklorürün etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçları karaciğer GST enzim aktivitesinde azalma serum GST aktivitesinde artma olduğunu göstermiştir (Çetinkaya vd., 1993). İnsan eritrosit GST ve sıçan karaciğer GST izoenzim aktiviteleri üzerine indometasinin *in vitro* etkilerininin araştırıldığı bir çalışmada, indometasinin sıçan karaciğeri GST enzimini inhibe ettiği, fakat insan eritrosit GST aktivitesinde bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Orhan vd., 1994). İntraperitoneal olarak diklorvos uygulanan sıçanlarda GST enzim aktivitesinin karaciğerde diğer dokulardan daha fazla arttığı gözlenmiştir (Luty vd., 1998). Farklı bir çalışmada tıbbi bitkiler sınıfına dahil edilen thonningia sanguinea'dan izole edilen ve güçlü bir antioksidan olan thonningianin A'nın (ThA), karaciğer dokusu GST enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Gyamfi ve arkadaşları, 2004). Cd⁺² ve Mn⁺² ağır metal iyonlarının sıçan karaciğeri GST enzim aktivitesi üzerine etkilerininin araştırıldığı başka bir çalışmada, CdCl₂ (2,5 mg.kg⁻¹) veya

MnCl₂ (2,0 mg.kg⁻¹)'ün GST enzim aktivitesini %36 oranında artırdığı görülmüştür (Casalino ve ark., 2004). Cr⁺⁶ metal iyonlarının insan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Cr⁺⁶ metal iyonlarının insan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Farklı bir çalışmada gökkuşuğu alabalığı eritrosit GST enzimi üzerine gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum, ampisilin, ornidazol ve metranidazol gibi antibiyotiklerin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları gentamisin, sefuroksim ve amikasinin inhibitör etkisi gösterdiği ve sırasıyla 0,568, 1,104 ve 7,637 mM IC₅₀ değerleriyle GST enzimi inhibisyonuna neden olduklarını göstermiştir (Çomaklı vd., 2011).

İnsan eritrosit GST enzimi üzerine paklitaksel, siklofosfamid ve gemitabin ilaçlarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, GST enzimini sırasıyla paklitaksel'in 0,23 mM, siklofosfamid'in 5,75 mM ve gemitabin'in 6,35 mM IC₅₀ değerleri ve 0,182 ± 0,028 mM, 6,97 ± 0,49 mM ve 6,71 mM K_i sabitleriyle inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Erat ve Şakiroğlu, 2012).

Türkan ve ark. Tarafından yürütülen bir çalışmada sefazolin; sefuroksim, sefaperazon antibiyotiklerinin sıçan böbrek, karaciğer ve kalp dokuları üzerindeki *in vivo* etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları tüm dokularda GST aktivitesinin antibiyotik gruplarında 1. ve 3. saatlerde kontrol grubuna göre artarken, 5. ve 7. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğünü göstermiştir (Türkan vd., 2019). Türkan ve ark. Tarafından yapılan başka bir çalışmada sefazolin, sefuroksim ve sefaperazon antibiyotiklerinin beyin, göz ve kas dokusu GST enzim aktivitelerini ilk üç saatte inhibisyona uğrattığını göstermiştir (Türkan vd., 2019).

Sıçan eritrosit dokusu GST enzim aktivitesi üzerine gentamisin, klindamisin, ampisilin ve skopolamin antibiyotiklerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; gentamisin, klindamisin, ampisilin ve skopolamin antibiyotiklerinin etkileri araştırılmış, gentamisin ve klindamisin'in sırasıyla 1,69 ve 6,9 mM IC₅₀ ve 1,70 and 2,36 mM K_i sabitleriyle inhibe ettiği, ampisilin ve skopolaminin ise aktivatör olduğu rapor edilmiştir (Ayna vd., 2021).

Alzheimer hastalığı, beyin hücrelerinin zamanla işlevini kaybetmesine bağlı olarak hafıza kaybı ve genel manada bilişsel fonksiyonlardaki azalma ile karakterize olan tıbbi bir durumdur. Alzheimer hastalığı üzerine yapılan araştırmalar, hastalığın ilerlemesi esnasında en çok azalma gösteren nörotransmitterin asetilkolin olduğunu göstermektedir (Tu vd., 2009). Günümüzde kesin bir tedavisinin olmamasına karşın hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan ilk ilaç takrin'dir. Takrin'in karaciğer toksisitesine neden olmasından dolayı kullanımı tercih edilmemektedir. Şuan kolinesteraz inhibitörü olarak donepezil, rivastigmin ve galantamin yaygın olarak kullanılmaktadır (Bingöl, 2016).

Literatürde asetilkolinesteraz enzimi üzerine pekçok çalışma yapılmıştır. Organofosforlu bileşikler ve karbamat türevlerinin balıklar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, balık solungaç, kas ve beyin dokusunda organofosforlu bileşikler ve karbamat türevlerinin asetilkolinesteraz enzimi aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Nec, 2008), Yang ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada Huperzine A'nın, asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Gülçin ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada biberiye bitkisinde bol bulunan rosmarinik asidin asetilkolin esteraz enziminin güçlü bir inhibitörü olduğu keşfedilmiştir (Gülçin vd., 2016).

Sinefrin ve fenilefrin'in AChE enzimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sinefrin ve fenilefrinin AChE enzimini sırasıyla 0,226 ve 0,302 μM IC_{50} ve 0,169, 0,088 μM ortalama K_i sabitleriyle yarışmalı olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Taslimi vd., 2017). Taslimi ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, çoklu insan malignitelerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik olan siklofosfamid (CYP) ve çeşitli bitkilerde, propoliste ve balda bulunan bir flavonoid olan krisin (CH) uygulanan ratların beyin, kalp, testis, karaciğer ve böbrek dokularında; karbonik anhidraz, aldoz redüktaz, paraoksonaz-1, α -glikosidaz, asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz gibi bazı metabolik enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, CH'nin CYP'nin neden olduğu beyin, kalp, karaciğer, testis ve böbrek toksisitesine karşı iyileştirici bir etkisinin olduğunu göstermiştir (Taslimi ve Mustafa, 2019).

2.1. Çalışmanın Amacı

Yapılan literatür çalışmalarında GST enziminin birçok dokudan saflaştırıldığı ve bazı antibiyotiklerinin AChE ve GST enzim aktiviteleri üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin araştırıldığı görüldü (Akkemik vd., 2012; M. Aksoy et vd., 2016; Ayna vd., 2021; Taysi ve Temel, 2021). Ancak yaptığımız literatür taramasında gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin insan eritrosit GST ve AChE enzimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Bundan dolayı bu çalışma kapsamında gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin AChE ve GST enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması amaçlandı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), İndirgenmiş glutatyon (GSH), etilen daimin tetra asetik asit (EDTA), sığır serum albümin, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyom klorür, borik asit, sodyum asetat, glutatyon agaroz afinite jeli, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, potasyum fosfat, 1-kloro-2,4-dnitrobenzen (CDNB), etanol, sodyum azotür, Coomassie Brilliant Blue G-250, brom timol mavisi, fosforik asit, potasyum fosfat, potasyum klorür, sodyum klorür, β -merkpto etanol, glisin, sodyum dodesil sülfat (SDS), akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, izopropnol, sephadex G-100, gliserol, asetik asit, metanol, trikloroasetik asit ve diğer kimyasallar ve numuneler Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) veya Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan alet ve cihazlar şunlardır:

Soğutmalı santrifüj	: Universal 320 R, Hettich
Spektrofotometre	: UV-1800, Shimadzu CC-10
pH metre	: Thermo Orion 3 Star
Homojenizatör	: KA T25
Elektroforez tankı	: Bio Rad
Elektroforez güç kaynağı	: EC 300 XL
Peristaltik pompa	: ATTA SJ-120

Karıştırıcı	: SK-300
Vorteks	: Velp Scientifica SK-300
Hassas terazi	: Denver Instrument SI-234
Kar makinesi	: Hoshizaki Ice
Otomatik pipet	: Transferpette, Eppendorf
Çalkalayıcı	: Lab.Companion SK-300
Derin dondurucu	: Vestel NF 64012 (-20)
Saf su cihazı	: MP Minipure

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.1.3.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. “ KH_2PO_4 Tampon çözeltisi (0,1 M, pH:6,5)”: 0,68 g KH_2PO_4 ve 0,014 g EDTA hassas terazi ile ölçülerek 30 mL saf suda çözüldü. pH 6,5’ a ayarlanarak son hacim saf su ile 50 mL’ye tamamlandı.
2. “20 mM GSH çözeltisi”: 0,03 g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 5 mL’ye tamamlandı.
3. “25 mM CDNB çözeltisi”: 0,025 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95’lik etanol çözeltisinde çözüldü ve son hacim etanol ile 5 mL’ye tamamlandı.

3.1.3.2. Eritrositlerin Yıkanmasında Kullanılan Çözeltiler

1. 0,154 M NaCl: 9,009 g (0,154 mol) alınarak hacim saf su ile 1 L’ ye tamamlandı.
2. 0,16 M KCl: 11,92 g KCl (0,16 mol) alınarak saf su ile son hacmi 1 L’ye tamamlandı.

3.1.3.3. Hemolizat Çözeltisinin Hazırlanması

1. 0,789 g EDTA bir miktar saf suda çözülerek içerisine 0,05 ml β -merkaptoetanol ilave edilerek pH:7,0'ye ayarlandı. Son hacim saf su kullanılarak 1 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Affinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

1. “10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) (Affinite kolonunu yıkamak ve dengelemek için kullanılan çözelti)”: 0,4 g KH_2PO_4 ve 2,61 g NaCl alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH: 7,4' e ayarlanarak son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. “2,5 mM, 5 mM ve 10 mM çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH: 9,5) (Affinite jeline tutunan GST enziminin elüsyon tamponu)”: 50 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 9,5) içerisinde GSH katısı çözündürülerek 10 mM'lık GSH çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan GSH çözeltisi ile 4 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve sırasıyla düşük konsantrasyondan başlanarak affinite kolonuna yüklendi.

3. “0,5 M NaCl e 0,1 M H_3BO_3 pH: 8,5 (Borat tampon) (Affinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan tampon)”: 0,2 g H_3BO_3 ve 2,92 g NaCl tartılarak 80 mL saf suda çözülüp pH: 8,5' e ayarlandı. ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

4.“0,1 M NaCH_3COO ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Asetat tampon) (Affinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan ikinci tampon)”: 0,82 g NaCH_3COO ve 2,92 g NaCl tartılarak 80 mL saf suda çözüldü ve pH: 4,5 olarak ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5. “%0,02 NaN_3 çözeltisi (Kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözelti)”: 20 mg NaN_3 alınarak saf suda çözüldü ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.5. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. “Boyama Çözeltisi (Coomassie Brilliant Blue)”: Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 100 mg alınarak %95'lik 50 mL etanol'de çözüldü. Hazırlanan çözeltiye

100 mL %95'lik fosforik asit eklendi. Karışımın son hacmi saf su ile 1000 mL' ye tamamlandı ve karanlık ortamda muhafaza edildi.

2. "Sığır serum albümin çözeltisi": 10 mg sığır serum albumin protein alındı ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

1. "1 M Tris-HCl (pH: 8,8)": 12,11 g Tris tartılarak 70 ml saf suda çözüldü. pH:8,8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. "1 M Tris-HCl (pH: 6,8)": 6,055 g Tris tartılarak 35 mL saf suda çözüldü. pH: 6,8 olarak ayarlandıktan sonra son hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

3. "%30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi": 0,4 g bisakrilamid ile 15 g akrilamid hassas terazi ile tartılarak 34,6 mL saf suda çözüldü. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4. "%10'luk SDS çözeltisi": 1 g SDS 9 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

5. "%10'luk amonyum persülfat çözeltisi": 1 g amonyum persülfat 8 mL saf suda çözülerek son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

6. Yürütme tampon: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılıp alınarak 450 mL saf suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 mL alınarak çözeltiliye eklendi. pH: 8,3'e ayarlanıp hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

7. Numune tampon: 1 M Tris-HCl (pH: 6,8)'den 0,65 mL %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL %10'luk SDS'den 1 mL ve %100'lük gliserinden 1 mL alınarak hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Tampona kullanılmadan önce 950 µL numuneye karşı 50 µL β-merkapto etanol eklenmiştir.

8. “Sabitleştirme çözeltisi”: Proteinlerin jel içerisinde yürütülürken sabitleştirilmesi için 50 mL izopropanol'den ve 10 mL TCA'dan alınarak son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

9. “Jel boyama çözeltisi”: 10 mL asetik asit ve 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi çözündürülerek üzerlerine 50 mL metanol ve 40 ml saf su eklendi.

10. Jel yıkama çözeltisi: 10 mL asetik asit, 50 mL metanol ve 40 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

Bromtimol mavisi çözeltisi (%0,1): 16 mL, 0,01 M NaOH içerisinde 0,1 g bromtimol mavisi çözüldü son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.7. Kullanılan Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması

1. **Gentamisin sülfat:** 0,01 g gentamisin alındı ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

2. **Ampisilin:** 0,01 g ampisilin alınarak toplam hacim 8 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

3. **Klindamisin:** 0,01 g Klindamisin alınarak son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

4. **Linkomisin-HCl:** 0,01 g linkomisin alındı ve son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

5. **Streptomisin sülfat:** 0,01 g streptomisin sülfat alınarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. GST Enziminin Aktivite Ölçümü

Glutasyon S-transferaz izoenzimleri glutasyon molekülü ile aromatik elektrofilik özellik gösteren 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) molekülünün konjugasyonu reaksiyonunu katalizler. CDNB substratı reaksiyona girdiğinde dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) molekülü oluşur ve bu molekül 340 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterir. Dalga boyundaki bu absorpsiyon değişiminden GST enziminin aktivite ölçümü gerçekleştirilir. Aktivite ölçümünün gerçekleştirilmesi için toplam hacmi 1 mL olan kuvarz küvetler kullanıldı. Küvet içeriği Tablo 3.2.1’ de gösterildi. Spektrofotometrede üç dakika boyunca absorpsiyon değerleri ölçüldü ve sonuçlar kaydedildi (Habig vd., 1974).

Tablo 3.2.1. GST enzim aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde kullanılan küvet içeriği (Taysı, 2018)

Küvet içeriği	Standart	Numune
0,5 M aktivite tamponu	200 µL	200 µL
25 mM CDNB	20 µL	20 µL
20 mM GSH	50 µL	50 µL
Saf su	730 µL	720 µL
Enzim numunesi	-	10 µL

3.2.2. Protein Tayini

3.2.2.1. Kalitatif Protein Tayini

Çomaklı (2011) tarafından bildirildiğine göre enzimlerde bulunan proteinlerin yapısındaki triptofan ve tirozin aminoasitlerinin 280 nm ışıpta maksimum absorpsiyon göstermeleri ile kalitatif protein tayini yapılmasını Segel (1968) öne sürmüştür. Bu metod ile saflaştırmanın her aşamasında olmak üzere kromatografi işlemlerinde eşit hacimde fraksiyonlar toplandı. Alınan fraksiyonlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometre yardımıyla absorpsiyonlar köre karşı okundu.

3.2.2.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Glutasyon agaroz afinitesi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları Bradford yöntemiyle bulundu. Bu yöntemde göre Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi proteine bağlanarak 595 nm ışıktaki maksimum seviyede absorpsiyon gösterir. Protein üzerinde bulunan pozitif yük ile boyada bulunan negatif yük hızlı bir şekilde bağlanarak kompleks oluşturur. Protein ile boyanın bağlanması sonucunda boya üzerinde bulunan kırmızı form mavi forma dönüşür. 1-100 mg hassasiyetinde bir protein tayini yöntemine sahiptir (Bradford, 1976). Reaksiyon tekrarlanabilir ve iki dk gibi kısa bir sürede ise tamamlanabilir.

Bradford protein tayininde hazırlanan sığır serum albümin proteini çözeltisi (1 mg protein 1 mL'de olacak şekilde) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 mL hacimlerinde tüplere konuldular. Sonrasında tüplerin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Üzerlerine 4900 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifi eklenerek tüpler vorteks ile karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 10 dakika kadar tüpler inkübeye bırakıldı. 10 dk süreden sonra tüpler sırasıyla 595 nm'de 3 mL'lik küvetler kullanılarak köre karşı albümin çözeltilerinin absorpsiyon değerleri ölçüldü. Kör tamponunda ise 100 mL saf su ve 4900 mL renklendirme reaktifi kullanıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen değerlere karşılık mg protein değerleri bulunarak standart grafik oluşturuldu. Numune çalışmaları için 100 kat seyreltilmiş eritrosit hemolizatu ve affinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim numunelerinden de aynı şekilde tüpler hazırlanarak vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tekrar 595 nm'de absorpsiyon değerlerine bakıldı. 3 defa tekrarlanan bu ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak standart grafik ile protein miktarları tayin edildi.

3.2.3. Eritrosit Temini ve Hemolizat Hazırlanması

İnsan eritrositleri Bingöl Devlet Hastanesi Kan Merkezi'nden taze olarak antikoagülanlı tüplerle temin edildi. Alınan kanlar laboratuvara getirilerek hemen çalışılmaya başlandı. Kanlar tüplerden damlalık aracılığıyla santrifüjleme işlemi için ependorf tüplerine alındı. Başlangıçta 15 dakika olacak şekilde 2500 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplerin üzerinde olan plazma ve lökosit kısmı damlalıkla dikkatli bir şekilde alınıp tüplerin alt kısmında kalan eritrosit peleti 0,16 M KCl çözeltisi ile üç defa yıkanma işlemine

tutuldu. Her defasında 2500 rpm’de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Tüplerdeki plazma tekrar alındıktan sonra hacimlerinin 1/5 oranında hemolizat çözeltisi eritrosit peletine eklenip 5 dk beklendi. Eritrosit içerisindeki hücre zarlarını ayırmak için ise 4 °C’de 13.500 rpm’de 30 dakika santrifüjleme yapıldı. Üst kısma çıkan hemolizat damlalıklarla alındıktan sonra çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C’de buzdobına kaldırıldı. Süpernatant ve çöken kısım ise atıldı.

3.2.4. GST Enziminin Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması

Affinite kolonunu hazırlamak üzere 10 ml’lik yatak için 10 ml glutatyon-agaroz jeli kolona yüklendi. Sonrasında dengeleme tamponu (0,05 M K-fosfat pH:7,4 1 mM EDTA) hazırlanıp yüklenerek jel süspanse edildi. Süspanse edilen jel soğutmalı kolona yüklendi. Çöken jel peristaltik pompa aracılığıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile rejenere edildi. Eluat ve tamponun absorbanslarının ve pH’larının eşitlenmesi ile kolonun dengelenmesi anlaşılmış olundu. Hazırlanan glutatyon agaroz affinite kolonuna önceden hazırlanan hemolizat yüklendi. Hemolizat kolondan geçirildikten sonra, 280 nm’de elüsyonlardaki absorbans farkı 0,05 olana dek kolon dengeleme tamponuyla yıkandı. Dengelenen kolondan sonra gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Elüsyon tamponu ise 2,5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM GSH içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 9,5) çözeltisinin gradientinden oluşturuldu. Elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alınarak 340 nm’deki absorbanslarına bakılarak aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüsyonlar birleştirilerek kinetik çalışmalar ve SDS-PAGE için derin dondurucuda inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Saflaştırılan enzimin saflık derecesi Laemmli yöntemi kullanılarak %3-15 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi (Taysı, 2018). Bu metotta önce elektrofrez plakaları saf su ve alkol le yıkanarak temizlendi. Düz bir plaka ile iki kenarda aralık oluşturan bir plaka üst üste yerleştirilerek kısıkaçlarla sabitlendi. Birbirine sabitleştirilen plakalar jel hazırlama kabineye yerleştirildi. İlk olarak hazırlanan ayırma jeli plakaların arasını dolduracak şekilde üst kısımdan 5 cm kalınlığınca pipetler yardımıyla dolduruldu.

Ayırma jelinin katılaşması beklenerek bu arada yığılma jeli hazırlandı. Daha sonra katılaşan ayırma jelinin üzerine yine üst kısımdan olacak şekilde yığılma jeli eklenerek kalan boşluk dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşmasını sağlayan tarak adı verilen parça dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yığılma jelinin de katılaşması beklendi. Katılaşması tamamlanan yığılma jelinden tarak çıkartılarak numune kuyuları oluşturuldu. Oluşan kuyular önce saf su ile sonra ise yürütme tamponuyla yıkandı. 100 µL enzim, 100 µL numune tamponu ve 50 µL gliserin ile enzim örnekleri hazırlandı. Hazırlanan numuneler 10 dk kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra enzim örnekleri ve standart protein kuyucuklara dikkatlice yüklenmeye başlandı. Jel plakaları da elektroforez tankına yerleştirildikten sonra tanka belirlenen hacimde yürütme tamponu eklendi. Elektroforez tankı kapatılıp üst tarafına - (katot) alt kısmına ise + (anot) yerleştirildi. Kuyularda bulunan numunelerin ilk olarak 80 volt gerilimde 30 dk yürütülerek ayırma jeline gelerek yığılması sağlandı.

Sonrasında ise 120 volt ile çalıştırılarak numunelerin jelin alt tarafına gelene kadar yürütüldü. Numuneler numune tamponuna eklenen brom timol mavisi sayesinde takip edildi. Elektroforez işlemi bittikten sonra akım kesildi ve plakalar arasındaki jeller dikkatlice çıkarılarak önceden hazırlanan sabitleştirme çözeltisine konuldu. Jeller 30 dk bekletilerek proteinlerin sabitleşmesi sağlandı. Sabitleştirme işleminden alınan jeller boyama çözeltisine konularak çalkalayıcı aracılığıyla 2 saat süresince boyama işlemi tamamlanması sağlandı. Boyanan jeller alınarak yıkama çözeltisine konuldu. Çalkalayıcı üzerinde renklerinin açılması ve protein bantlarının belirginleşmesi beklenen jeller daha sonra çıkarılarak fotoğraflandı.

Tablo 3.2.5. Hazırlanan elektroforez jelleri

Ayırma jeli	Yığılma jeli
1 M Tris-HCl pH: 8,8, 5 mL	1 M Tris-HCl pH: 6,8 440 µL
%30'luk akrilamid ve %0,5'lik bisakrilamid 4,4 mL	%30'luk akrilamid ve %0,8'lik bisakrilamid 800 µL
%10'luk SDS 200 µL	%10'luk SDS 30 µL
TEMED 130 µL	TEMED 30 µL
Saf su 3,130 mL	Saf su 2,450 mL
%10'luk PER 100 µL	%10'luk PER 30-50 µL

3.2.6. Kinetik Çalışmalar

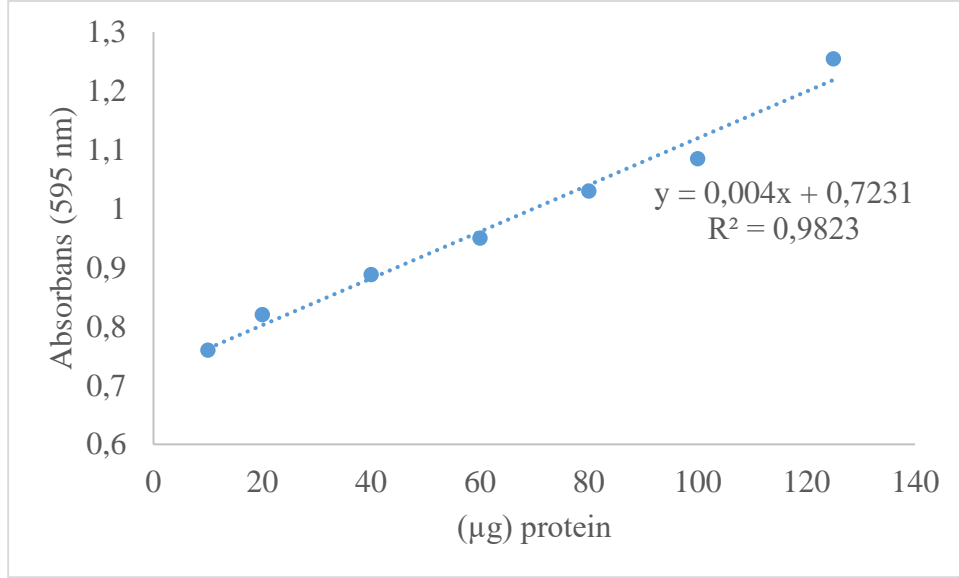
İnsan eritrosit dokularından glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan GST enzim aktivitesi ve AChE enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. Her bir antibiyotik için en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % Aktivite-[inhibitör konsantrasyonu] grafikleri oluşturuldu. Bu grafik denklemlerinden yararlanarak GST ve AChE enzimlerini inhibe eden herbir antibiyotik için enzim aktivitesini %50 oranında düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. Aynı zamanda GST enzim aktivitesinde inhibisyona neden olan herbir antibiyotik için 5 farklı CDNB konsantrasyonu ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonu kullanılarak Lineaweaver-Burk grafikleri oluşturuldu. Söz konusu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türü ve K_i sabitleri hesaplandı. Tüm çalışmalar optimum koşullar altında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında sitoplazmik GST enzimi insan eritrosit dokularından saflaştırıldı. Analizler için kullanılan kan örnekleri Bingöl Devlet Hastanesi Kan Merkezi'nden temin edildi. Temin edilen taze kan örnekleri 10 mL hacimli EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kanlar 2500 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj edildi, eritrosit ve plazmalar ayrıldı ve daha sonra elde edilen eritrosit hücreleri kendilerinin 5 katı hacminde deiyonize su ile hemoliz edildi. Hazırlanan hemolizatta GST enziminin aktivite ölçümü bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirildi. Aktivite gözlenen hemolizat örneğinden bölüm 3.2.4'te açıklanan şekliyle glutatyon-agaroz kolonu kullanılarak GST enzimi saflaştırıldı.

4.1. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları

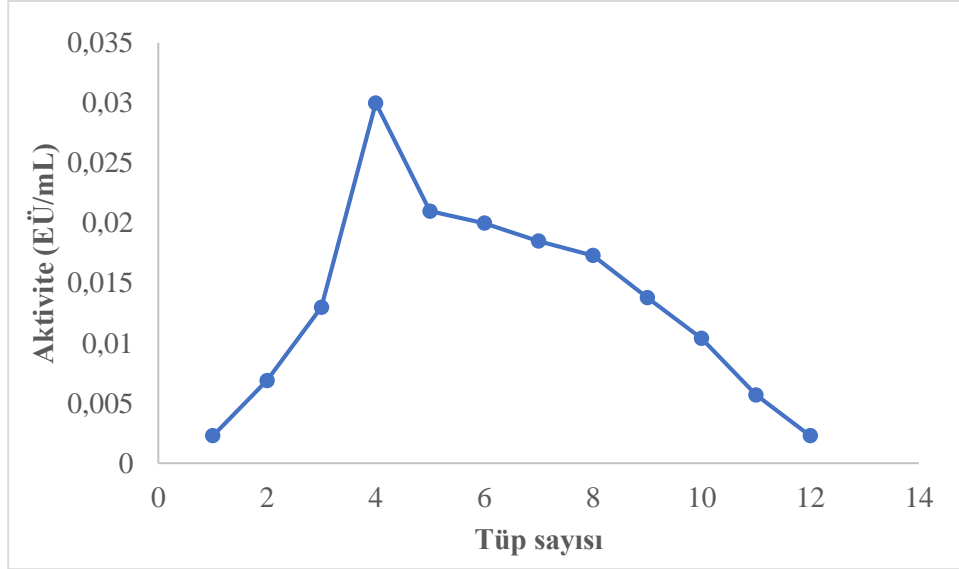
Hazırlanan hemolizatta ve glutatyon-agaroz afinitesi sonucu elde edilen saf enzim numulerinin içerdiği kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi. 595 nm dalga boyunda sığır serum albümin proteini kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile standart grafik hazırlandı. Hemolizat ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi sonucu saflaştırılan GST enzim numunelerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafik kullanılarak belirlendi. Spektrofotometrik yöntemle hazırlana standart grafik ve sığır serum albümin çözeltilerindeki μg proteinine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4,1'de gösterildi.



Şekil 4.1. İnsan eritrosit GST enzimi kantitatif protein tayini için sığır serum albümin proteini kullanılarak hazırlanan standart grafik

4.2. İnsan Eritrosit GST Enziminin Glutasyon-Agaroz Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılmasına ait Sonuçlar

Glutasyon agaroz jeli GST enzimin saflaştırılması için dizayn edilmiştir ve GST enzimi ile spesifik bağlanma gerçekleştirir. İnsan eritrosit dokularından GST enziminin saflaştırılması amacıyla hazırlanan hemolizat numunesi glutasyon-agaroz afinite kolonuna yüklendi. Afinite kolonuna yüklenen hemolizattan GST enziminin saflaştırılması Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi GSH substratı kullanılarak gradientli elüsyon ile gerçekleştirildi. Afinite kolonundan elde edilen elüatlardaki GST enzimlerinin aktivite ölçüm sonuçları Şekil 4.2'te gösterildi.



Şekil 4.2. İnsan eritrosit GST enziminin glutatyon-agaroz afinite kolonundan elüsyonu

4.3. İnsan Eritrosit GST Enzimine Ait Saflaştırma Sonuçları

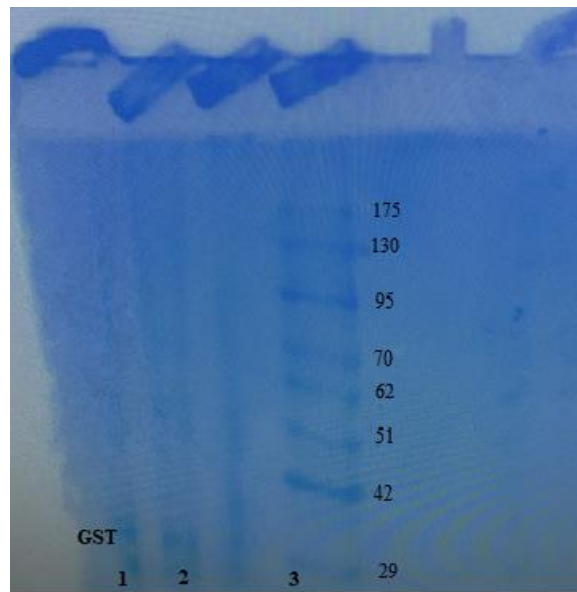
Bu çalışmada insan eritrosit dokularından Glutatyon S-transferaz enzimi, hemolizat hazırlanması ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 2,58 EÜ/mg spesifik aktivite ve %14,7 verimle 161,25 kat saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi glutatyon-agaroz kolonunun 50 mm Tris-HCl ve (1,25 ile 10 mM konsantrasyon aralığında GSH, pH: 9,5) tamponu ile elüsyonu sonucu gerçekleştirildi. Elüatlar fraksiyon toplayıcı vasıtasıyla 1,5 mL lik eppendorf tüplerinde toplandı ve 280 nm'de absorbanları ve 340 nm'de enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen saf enzim ve hemolizat için Bradford yöntemi ile proteyin tayini gerçekleştirildi ve uygulanan saflaştırma basamakları sonucu saflaştırma verimi ve kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği hesaplandı. Saflaştırma kademeleri ve bu kademelerde elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1. İnsan eritrosit dokusu GST enzimine ait saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	5	0,611	37,30	186,5	3,055	0,016	100,00	1,00
GSH-agaroz Afinite kolon kromatografisi	1,50	0,130	0,116	0,174	0,450	2,58	14,7	161,25

4.4. SDS-PAGE Yöntemi ile GST Enziminin Saflık Kontrolü

Bu çalışmada insan eritrosit dokularından sitozolik GST enzimi hemolizat hazırlanması ve afinite kromatografisi kullanılarak iki farklı saflaştırma prosesi kullanılarak saflaştırıldı. Glutasyon-agaroz kromatografisi sonrası elde edilen elüatlardaki GST enziminin saflığının kontrolü için bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde SDS-PAGE metodundan yararlanıldı. Elektroforez sisteminde enzim örnekleri ve standart proteinler kuyulara sırayla uygulanarak yürütüldü. Saf enzim ve standart proteinlerin bantlarını gösteren fotoğraf Şekil 4.4'te verilmiştir.

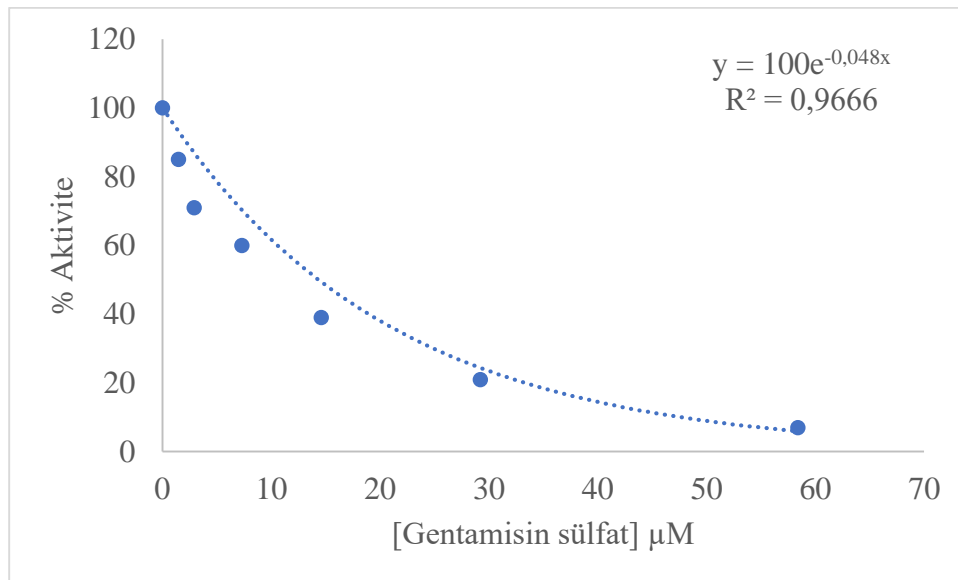


Şekil 4.3. SDS-PAGE fotoğrafı (1. ve 2. kuyu insan eritrosit GST enzimi 3. kuyu: standart proteinler)

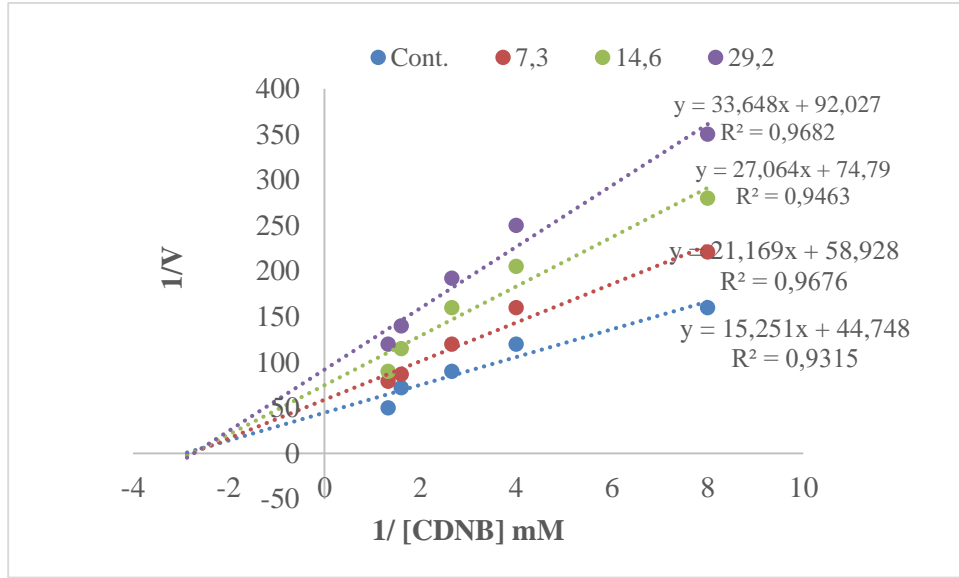
4.5. GST ve AChE Enzim Aktiviteleri Üzerine Bazı Antibiyotiklerin İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları

4.5.1. İnsan Eritrosit Dokusu GST Enzim Aktivitesi Üzerine Gentamisin Sülfat, Streptomisin Sülfat, Linkomisin, Ampisilin ve Klindamisin Antibiyotiklerinin İnhibisyon Etkileri

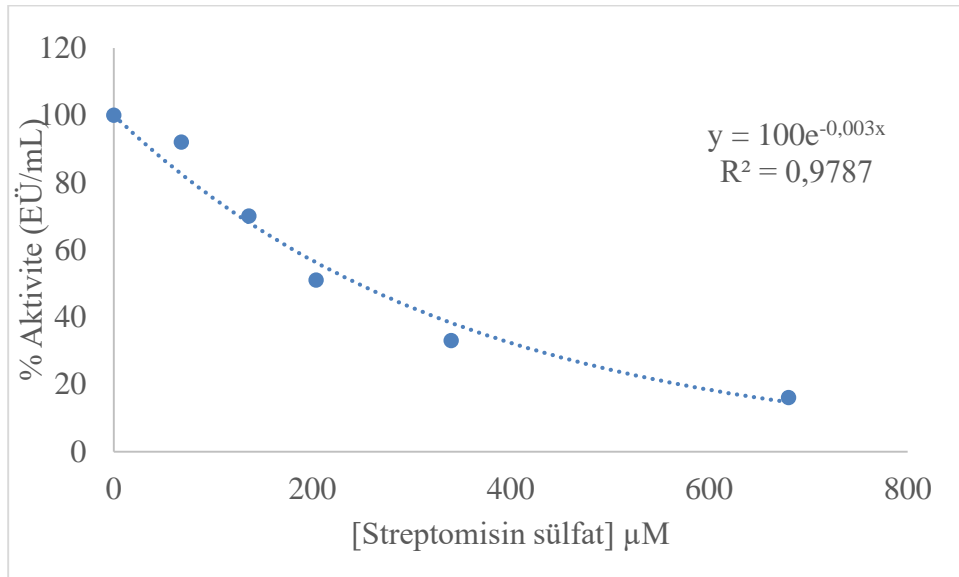
İnsan eritrosit dokularından glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. Her bir antibiyotik için en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % Aktivite-[inhibitör konsantrasyonu] grafikleri oluşturuldu. Bu grafik denklemlerinden yararlanarak GST enzimini inhibe eden her bir antibiyotik için enzim aktivitesini %50 oranında düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. Aynı zamanda GST enzim aktivitesinde inhibisyona neden olan her bir antibiyotik için 5 farklı CDNB konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak Lineaweaver-Burk grafikleri oluşturuldu. Söz konusu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türü ve Ki sabitleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4,4 – 4,13 ve Tablo 4.2’de verildi.



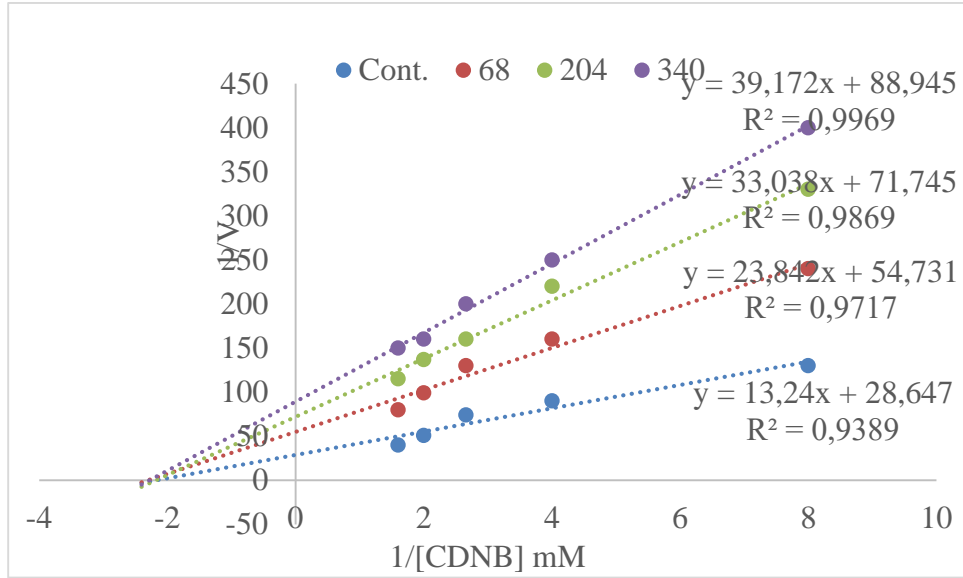
Şekil 4.4. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı gentamisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite-[Gentamisin sülfat] µM) grafiği



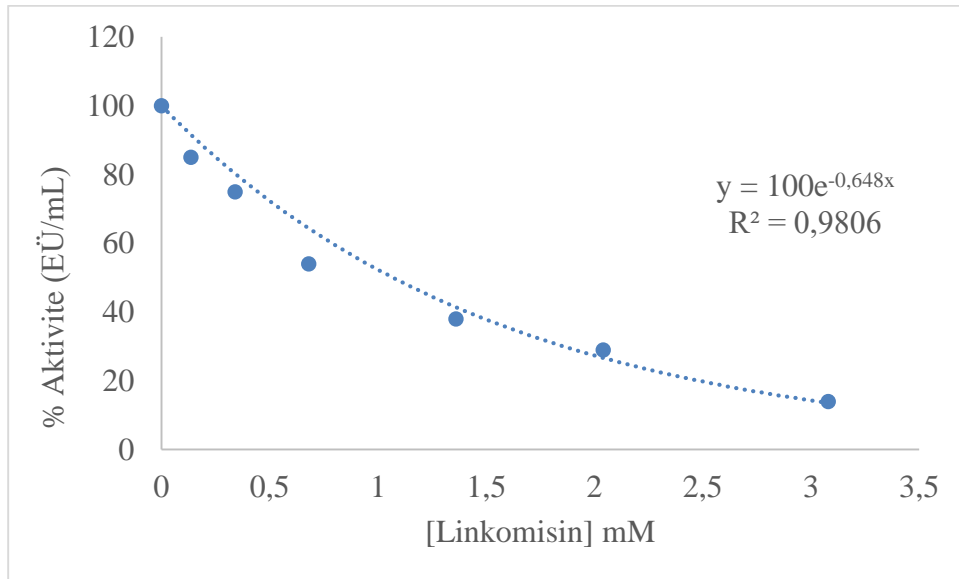
Şekil 4.5. İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı gentamisin sülfat konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



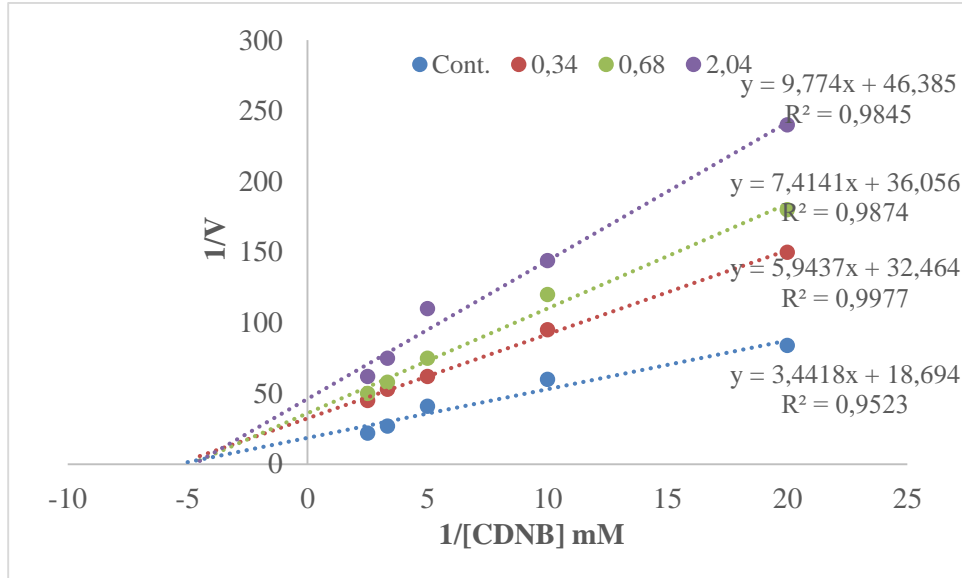
Şekil 4.6. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı streptomisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite -[Streptomisin sülfat] grafiği



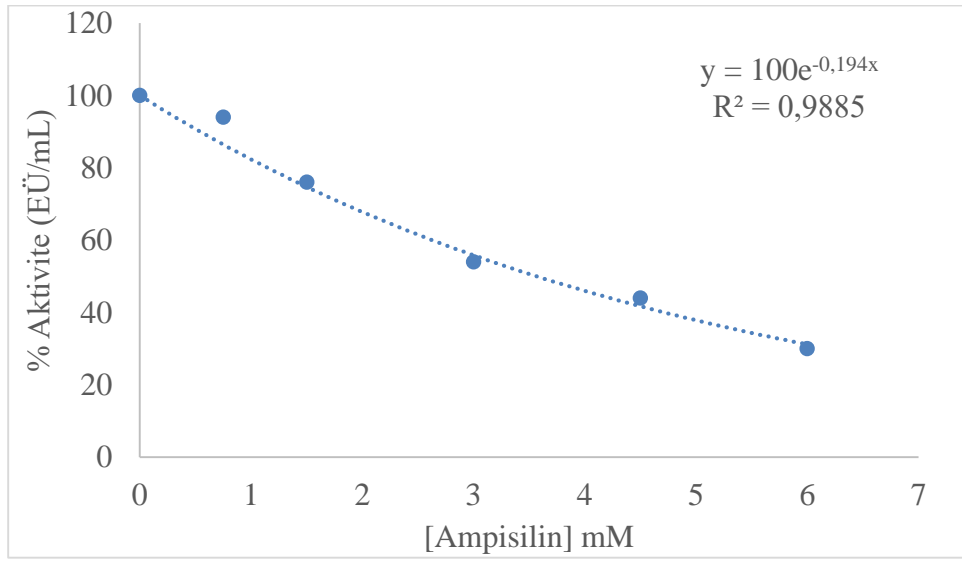
Şekil 4.7. İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı streptomisin sülfat konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



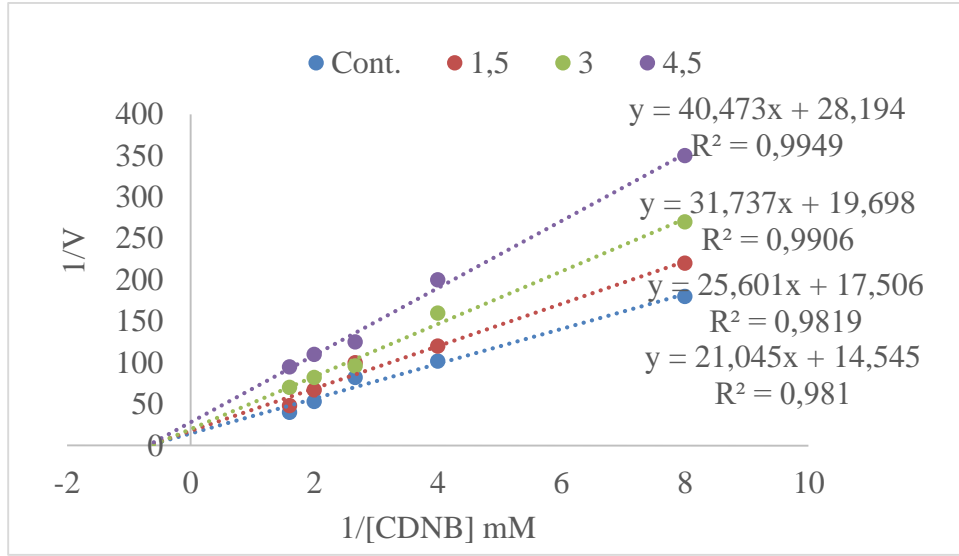
Şekil 4.8. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı linkomisin konsantrasyonlarda çizilen Aktivite -[Linkomisin] grafiği (%)



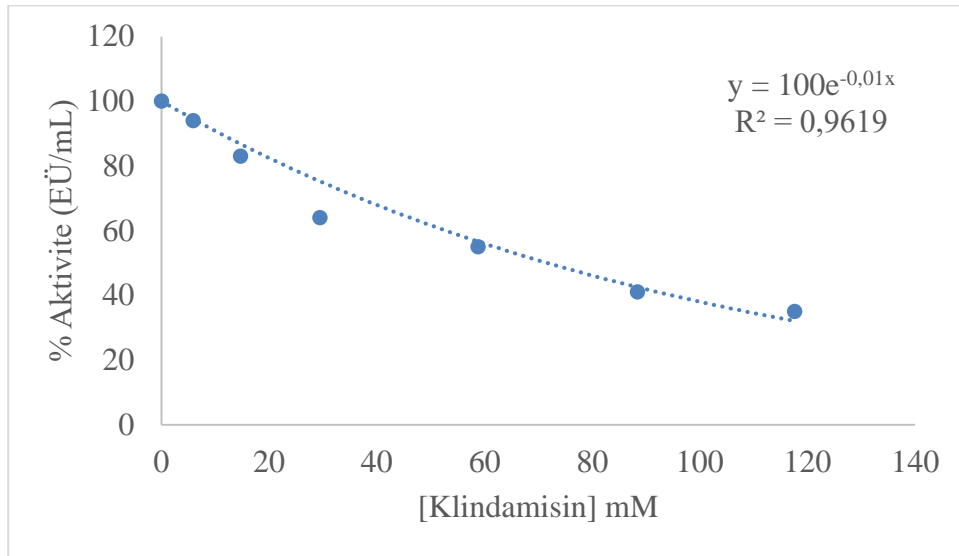
Şekil 4.9. İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı linkomisin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



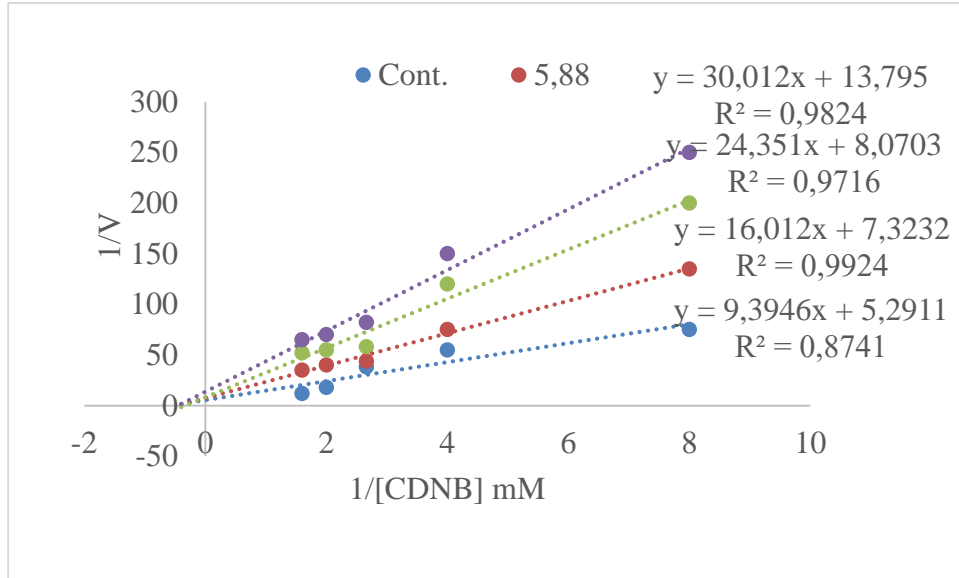
Şekil 4.10. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı ampisilin konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite - [Ampisilin] grafiği



Şekil 4.11. İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı ampisilin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine farklı klindamisin konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite - [Klindamisin] grafiği



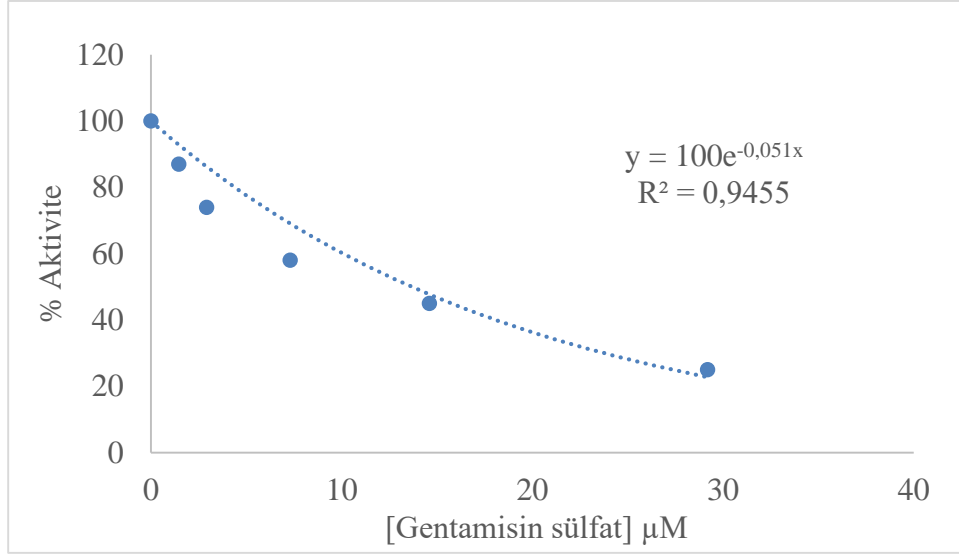
Şekil 4.13. İnsan eritrosit GST izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı klindamisin konsantrasyonu ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.2. İnsan eritrosit GST enzimi aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerin IC₅₀, Ki değerleri ve inhibisyon türleri

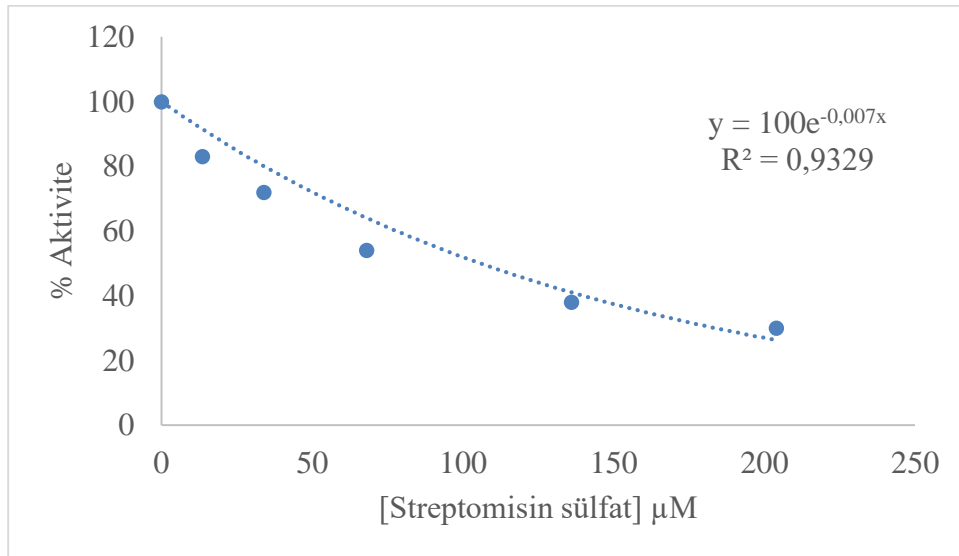
İnhibitör	IC ₅₀	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon türü
Gentamisin sülfat	0,0144 mM	0,0195± 9,44	Yarışmasız
Streptomisin sülfat	0,231 mM	0,124 ± 44,58	Yarışmasız
Linkomisin	1,06 mM	0,85 ± 0,47	Yarışmasız
Ampisilin	3,57 mM	6,87 ± 1,88	Yarışmasız
Klindamisin	69,31 mM	66,80 ± 48,63	Yarışmasız

4.5.2. AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Gentamisin Sülfat, Streptomisin Sülfat, Linkomisin, Ampisilin ve Klindamisin Antibiyotiklerinin İnhibisyon Etkileri

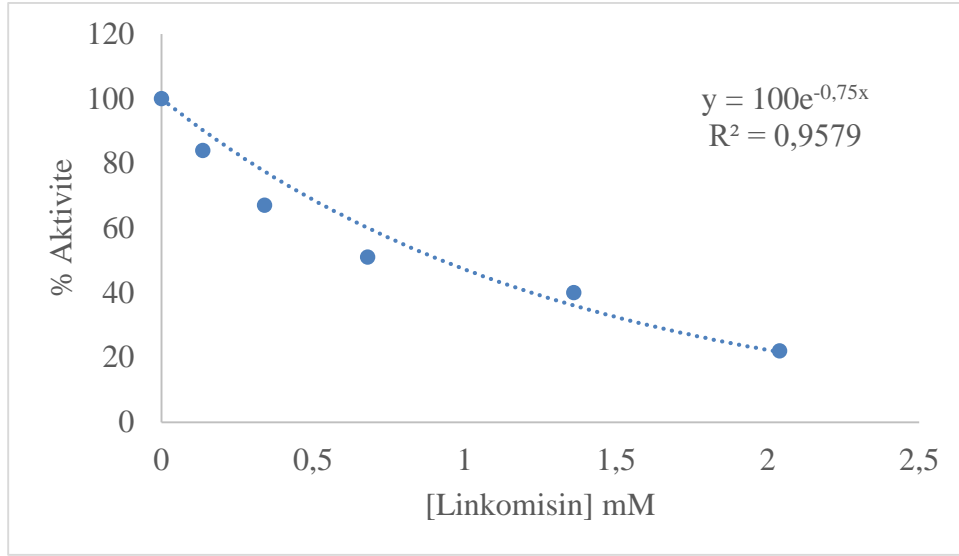
Sigma-Aldrich Chem. Comp. dan ticari olarak temin edilen AChE enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. Her bir antibiyotik için en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % Aktivite-[inhibitör konsantrasyonu] grafikleri oluşturuldu. Bu grafik denklemlerinden yararlanarak AChE enzimini inhibe eden her bir antibiyotik için enzim aktivitesini %50 oranında düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4,14 – 4,19 ve Tablo 4.3'te verildi.



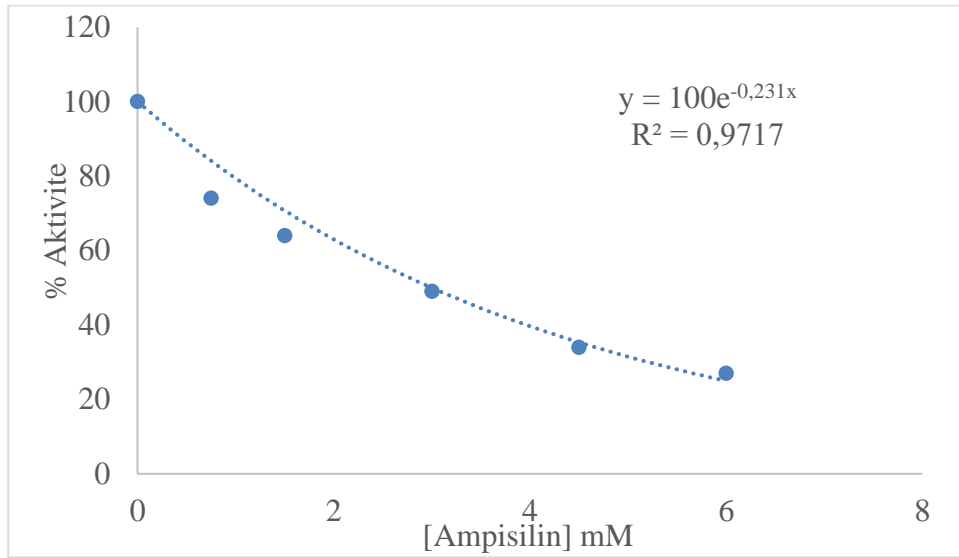
Şekil 4.14. AChE enzim aktivitesi üzerine farklı gentamisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite -[Gentamisin sülfat] grafiği



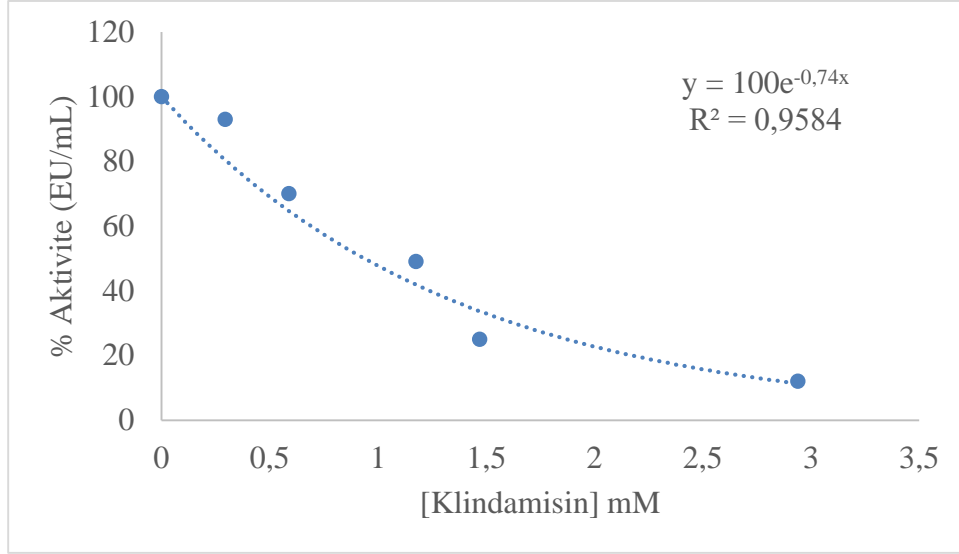
Şekil 4.15. AChE enzim aktivitesi üzerine farklı streptomisin sülfat konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite -[Streptomisin sülfat] grafiği



Şekil 4.16. AChE enzim aktivitesi üzerine farklı linkomisin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite - [Linkomisin] grafiği



Şekil 4.17. AChE enzim aktivitesi üzerine farklı ampisilin konsantrasyonlarda çizilen (%) Aktivite - [Ampisilin] grafiği



Şekil 4.18. AChE enzim aktivitesi üzerine farklı klindamisin konsantrasyonlarda çizilen (% Aktivite - [Klindamisin] grafiği

Tablo 4.3. AChE enzimi aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerin IC₅₀ ve R² değerleri

İnhibitör	IC ₅₀	R ²
Gentamisin sülfat	0,0135 Mm	0,95
Streptomisin sülfat	0,099 Mm	0,93
Linkomisin	0,92 Mm	0,96
Ampisilin	3,01 Mm	0,97
Klindamisin	0,94 Mm	0,96

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir, çalışmanın ilk aşamasında insan eritrosit dokularından sitozolik GST enzimi glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış, AChE enzimi ise ticari olarak temin edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında insan eritrosit dokularından saflaştırılan sitozolik GST ve ticari olarak temin edilen AChE enzim aktiviteleri üzerine gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Oksidasyon işlemi, iki atom arasındaki elektron transferidir ve aerobik yaşamın ve metabolizmamızın önemli bir bölümünü oluşturur. Elektron akışı kesildiğinde, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) ortaya çıkabilir. ROS, ozon (O₃), hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂) gibi serbest radikal olmayan türleri ve hidroksil radikalleri (OH[•]), süperoksit anyon radikalleri (O^{•-2}), peroksil radikalleri (ROO[•]), hidroperoksil radikalleri (HOO[•]) gibi serbest radikal olmayan türleri içerir Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren bir molekül veya moleküler fragman olarak tanımlanabilir. Moleküler oksijenden türetilen bu radikaller, canlı organizmalarda bulunan türlerin en önemli sınıfını temsil eder.

Serbest radikaller, canlı hücreler tarafından patofizyolojik ve biyokimyasal süreçler sırasında meydana gelebileceği gibi çevresel kirleticiler, radyasyon, kimyasallar ve toksinler nedeniyle de oluşabilir. ROS farklı şekillerde ortaya çıkabilir. ROS, X-ışınları, UV ışığı ve γ -ışınları, metal katalizli reaksiyonlarda, iltihaplanma sürecinde makrofajlar ve nötrofiller tarafından üretilebilir (Topal vd., 2016). Antioksidan maddeler oksitlenmiş substratlardan daha düşük konsantrasyonda bulunsa bile substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren bir bileşiklerdir. Antioksidanlar hücreyi serbest radikallerin ve ROS'un olumsuz etkilerinden koruyan özelliklere sahiptirler. Sağlıklı hücreler uygun prooksidan-antioksidan dengesine sahiptir. Bu denge, ROS üretimi aşırı derecede arttığında veya antioksidanların etkinlikleri azaldığında prooksidanlara doğru değiştirilebilir. Bu aşama oksidatif stres olarak adlandırılır (De Koning vd., 2005).

İnsan beyni vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluştururken, toplam oksijenin yaklaşık %20'sini tüketir ve bu oksijenin yaklaşık %90'ı mitokondriler tarafından ATP üretmek için kullanılır. Fakat mitokondride tüketilen oksijenin bir kısmı su yerine reaktif oksijen türlerine dönüştürülür. Mitokondriyal işlev bozukluğunda, elektron taşıma zincirinden elektronların sızması ve ardından oksijenin süperoksite indirgenmesi sonucunda reaktif oksijen türlerine dönüşüm oranı artabilir. Bu genel mekanizma, oksidatif stres, parkinson, huntington ve alzheimer hastalıkları dahil olmak üzere mitokondriyal kusurların bildirildiği nörodejeneratif bozukluklar için önerilen başlıca patojenik mekanizmadır. Bu tür hastalardan alınan numunelerde lipid peroksidasyonu, DNA ve diğer proteinlerde hasar tespit edilmiştir (Richter, 1992).

Glutasyon (GSH, γ -glutamil-sisteinil-glisin) hücreleri, hücre içi ve hücre dışı kaynaklar tarafından oluşturulan serbest radikaller, peroksitler ve ağır metaller gibi reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerine karşı koruyan tripeptid yapısındaki bir antioksidandır. Hücredeki ana görevi antioksidan olarak görev yapmak olan GSH'a pek çok kritik hücresel işlev için de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlevler arasında; hücrenin tiyol-redoks durumunun korunması ve düzenlenmesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptotik hücre ölümü de dâhil olmak üzere hücre ölümünde, yapısal ve metabolik proteinlerin dinamik, posttranslasyonel düzenlenmesi, hücre içi sistemlerinde sinyalleşme ve metabolik yolların düzenlenmesi gibi pekçok kritik işlev sayılabilir. Normal koşullar altında, hücre GSH seviyeleri iki ana mekanizma tarafından kontrol edilir. Bu mekanizmalar hücre içi sentez, beslenme durumu gibi hücre içi GSH seviyelerini artıran mekanizma ve hücre dışı ihraç mekanizması. Bununla birlikte GSH seviyeleri, tiyol redoks durumunu değiştiren, glutasyon S-konjugatları veya komplekslerinin oluşumu, hormonal/stres düzeyleri, gelişimsel varyasyonlar, gebelik ve egzersiz gibi fizyolojik durumlardan da etkilenir. Uygun GSH seviyeleri ve oksidasyon durumunun sürdürülmesi, bir dizi kritik hücre işlevi için de önemlidir. GSH eksikliği hücreyi oksidatif strese karşı savunmasız duruma getirir. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan hasar birçok hastalık durumunun başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir adım olduğu düşünülmektedir.

Yüksek GSH seviyeleri ise antioksidan kapasiteyi ve oksidatif strese karşı direnci artırır (Ballatori vd., 2009; Gill vd., 2013). GSSG, GSH'ın okside formudur. GSSG, pentoz fosfat yolağının oksidatif reaksiyonlarında G6PD ve 6PGD enzimleri tarafından katalizlenen

reaksiyonlar sonucu üretilen NADPH'ların sağladığı elektronlar vasıtasıyla glutatyon redüktaz enzimi tarafından GSH'a indirgenir (Akkemik vd., 2011; Adem ve Ciftci, 2012; Karaman vd., 2020; Temel vd., 2020).

Hücrel GSH düzeylerinden etkilenen bu önemli hücrel süreçler göz önüne alınarak yapılan araştırmalar GSH'ın bir dizi insan hastalığının etiyolojisinde ve/veya ilerlemede rol oynadığını göstermektedir. GSH metabolizmasının bozulması başta kanser olmak üzere çeşitli metabolik hastalıklar, yaşlanma, kistik fibrozis, inflamatuvar hastalıklar, immün hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklara neden olabilmektedir. Doğuştan gelen GSH metabolizması ile ilgili tüm hastalıklarda merkezi sinir sistemi işlev bozukluğu gözlemlenmiştir, bu da beynin GSH homeostazındaki değişikliklere özellikle duyarlı olduğunu düşündürür (Townsend ve Tew, 2003; Ballatori vd., 2009; Işık vd., 2015).

Detoksifikasyon, hücre içi ve hücre dışı kaynaklı toksinleri temizlemek için kullanılan bir terimdir. Vücutumuzdaki detoksifikasyon süreçleri üç aşamada gerçekleşir. İlk aşama, toksinleri daha az zararlı hale getirmek için karaciğerdeki enzim sistemlerinin (sitokrom P450) reaksiyonlarını içerir. İkinci aşamada, toksinler suda çözünebilir hale getirilir. Üçüncü aşama ise toksinlerin vücuttan atılması için bağırsaklarda ve böbreklerdeki süreçleri içermektedir. GST izoenzimleri faz II hücrel detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyen çok işlevli bir enzim sınıfıdır. GST'ler zara bağlı mikrozomal ve sitozolik aile üyeleri olmak üzere iki farklı süper aile üyesine ayrılır.

GST izoenzimleri hücrel substratları olan GSH'ın kimyasal kanserojenler, çevresel kirleticiler ve antitümör ajanlar gibi farklı çeşitteki hücre dışı etmenler ve metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan hücre içi bileşiklere nükleofilik bağlanması reaksiyonlarını katalizlerler. GST izoenzimleri hücre içinde yürüttükleri bu önemli görevlerinin yanısıra hidrofobik bileşiklerin hücre içi bağlanması ve taşınması dâhil olmak üzere ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin metabolizması, lökotrienlerin, prostaglandinlerin ve steroid hormonlarının sentezindeki temel reaksiyonların katalizi, tirozinin bozunması ve hücre sinyalinin düzenlenmesi gibi reaksiyonlarda da görev almaktadır (Townsend ve Tew, 2003; Pljesa-Ercegovac vd., 2018).

Bu çalışmada metabolizma açısından önemi yukarıda vurgulanan GST enzimi, insan eritrosit dokularından glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması ile insan ve hayvan hekimliğinde kullanılan bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla insan kanı önce 2500 rpm’de santrifüj edilerek plazma ve lökosit hücreleri uzaklaştırılmış ve eritrosit dokusu elde edilmiştir. Elde edilen eritrositler deiyonize su ile hemoliz edilerek 13500 rpm’de santrifüj edilerek hemolizat elde edilmiştir. Elde edilen hemolizattan glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak tek adımda GST enzimi saflaştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda GST enzimi; sığan karaciğerinden, insan karaciğerinden (Simons ve Wander, 1977; Jagt, 1985), insan trombositlerinden (Loscalzo ve Freedman, 1986), sığır karaciğerinden (Asaoka, 1984), *E Coli*’den (Izuka ve ark.,1989), kefal balığı karaciğerinden (Martinez ve Lara, 1997), Atlantik somunu ve kahverengi alabalık karaciğer ve böbrek dokuları (Novoa ve Valinas, 2001), maruldan (Hee ve Joong, 2005), insan eritrositlerinden (Erat ve Şakiroğlu, 2012), Van gölü balığının karaciğerinden (Özaslan, 2014) bıldırcın karaciğerinden (Taysi ve Temel, 2021) ve koyun dalak dokusundan (Yüksel ve Temel, 2022) saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işlemleri sırasında, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi metodu (DEAE-selüloz), katyon değişim kromatografisi metodu (CM-selüloz kromatografisi), jel filtrasyon kromatografisi, orange-A agaroz afinite kromatografisi, Sepheroz-6B’ye bağlanmış GSH afinite kolon kromatografisi, GSH-sepharose afinite kromatografisi gibi metodlar kullanılmıştır. Bu çalışmada kapsamında kullanılan glutatyon-agaroz afinite kolon kromatografisi hem diğer yöntemlere göre az zaman alması hemde yüksek saflıkta enzim elde edilmesinden dolayı daha etkili ve avantajlıdır (Türkan, 2015; Temel vd., 2017; Balcı vd., 2019; Taysi ve Temel, 2021; Yüksel ve Temel, 2022).

Alzheimer hastalığı (AH), beyin hücrelerinin zamanla ölümüne bağlı olarak hafıza kaybı, bunama (demans) ve genel anlamda bilişsel fonksiyonların azalması şeklinde gelişen tıbbi bir bozukluktur. Alzheimer hastalığının nedeni henüz kesin olarak belirlenememiştir, ancak yaşlanma, genetik faktörler ve çevresel faktörler gibi bir dizi faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında, beyinde amiloid plakları ve tau proteinleri adı verilen anormal protein birikir. Bu proteinler, beynin sinir hücreleri arasında iletişimi bozarak hafıza, düşünme ve davranış bozukluklarına neden olur. Alzheimer hastalığının günümüzde kesin bir tedavisi yoktur, ancak hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilecek ilaçlar

kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığındaki beyin hasarı, asetilkolin üretimini azaltırken, asetilkolin esteraz enzim aktivitesini artırır. Bu nedenle, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında asetilkolin esteraz inhibitörleri de yer almaktadır (Sensi vd., 2018) .

Asetilkolin, bir nörotransmitterdir ve beyindeki sinir hücreleri arasında iletişimi sağlar. Asetilkolin, kolin asetiltransferaz adı verilen bir enzim yardımıyla asetil-koenzim A ve kolinden sentezlenir. Sinir impulslarını nöron boyunca ilerlemesi sonucunda, aksonlarda asetilkolin nörotransmitter substratı salınır. Asetilkolinin, vücutta birçok önemli işlevi vardır. Kas hareketinde, düşünmede, çalışma belleğinde ve diğer birçok beyin işlevinde görev almaktadır. Asetilkolin esteraz, sinaptik boşluklarda asetilkolinin parçalanmasına neden olan bir enzimdir (Gulçin vd., 2017; Taslimi vd., 2017).

Alzheimer hastalığının başlangıç aşamalarında beyinde nöron ve akson kaybı ile birlikte asetilkolin (ACh) seviyesinin düşmesi gerçekleşir. Bu durum sinir impulslarının iletimini daha güç hale getirir. İmpuls iletiminin devamı için sinapslarda ya nörotransmitter miktarı artırılmalı ya da mevcut seviyenin korunması sağlanmalıdır. Bu yaklaşımların başlıcaları arasında kolinesteraz nörotransmitterlerinin yıkımına neden olan asetilkolin esteraz (AChE) ve butirikolin esteraz (BChE) enzimlerinin inhibisyonu gelmektedir. Günümüzde bu amaçla takrin, donepezil, galantamin ve rivastigmin gibi ilaçlar kullanılmaktadır (Işık vd., 2015; Gulçin vd., 2017; Taslimi vd., 2017; Taslimi ve Mustafa, 2019).

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için geliştirilmiş insan ve hayvan hekimliğinde kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler, bakterilerin hücre duvarı sentez reaksiyonlarını inhibe edebilirler, hücre duvarını parçalayabilirler ya da bakterilerin büyümesini ve çoğalmasını durdurarak etki gösterirler. Ancak, antibiyotikler canlılar üzerinde İshal, bulantı, kusma, mide ağrısı, baş ağrısı, alerjik reaksiyonlar gibi bazı yan etkilere neden olabildikleri gibi, bilinçsiz kullanımları karaciğer hasarı, böbrek hasarı, kan hücrelerinde azalma, kalp damar sistemleri üzerinde hasarlara neden olabilmektedir. Antibiyotiklerin yan etkileri, kişinin yaşı, genel sağlık durumu ve aldığı antibiyotiğin türüne göre değişir (Oscarson, 2003; Poole, 2004; El-Shaboury vd., 2007; Hastal vd., 2008; Hutchings vd., 2019).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine; Gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olan antibiyotikler için öncelikle en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonu ile %Aktivite-[inhibitör konsantrasyonu] grafikleri oluşturulmuş ve bu grafiklerden yararlanılarak enzim aktivitesini %50 oranında inhibe eden inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri sırasıyla gentamisin sülfat için 0,0144 mM, streptomisin sülfat için 0,231 mM, linkomisin için 1,06 mM, ampisilin için 3,57 mM, klindamisin için 69,31 mM olarak hesaplandı. Daha sonra insan eritrosit GST enzimi inhibisyonuna neden olan söz konusu antibiyotikler için 5 farklı substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak Lineaweaver-Burk grafikleri oluşturulmuş ve bu grafikler yardımıyla ortalama K_i sabitleri hesaplandı. Ortalama K_i sabitleri sırasıyla gentamisin sülfat için 0,0195± 9,44 mM, streptomisin sülfat için 0,124 ± 44,58 mM, linkomisin için 0,85 ± 0,47 mM, ampisilin için 6,87 ± 1,88 mM, klindamisin için 66,80 ± 48,63 mM olarak hesaplandı. Söz konusu antibiyotiklerin tamamının insan eritrosit GST enzimini yarışmasız olarak inhibe ettiği belirlendi.. IC₅₀ ve K_i sabitleri analiz edildiğinde insan eritrosit GST enzimi inhibisyonuna neden olan en etkili antibiyotığın en düşük IC₅₀ ve K_i sabitine sahip olan yani en düşük konsantrasyonda enzim inhibisyonuna neden olan gentamisin sülfat olduğu tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda; rat eritrosit dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine gentamisin, klindamisin, ampisilin ve skopolamin antibiyotiklerinin etkileri araştırılmış, gentamisin ve klindamisin'in sırasıyla 1,69 ve 6,9 mM IC₅₀ ve 1,70 ve 2,36 mM K_i sabitleriyle inhibe ettiği, ampisilin ve skopolaminin ise aktivatör olduğu rapor edilmiştir (Ayna vd., 2021). Farklı bir çalışmada gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan GST enzimi üzerine gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum, ampisilin, ornidazol ve metranidazol gibi antibiyotiklerin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları gentamisin, sefuroksim ve amikasinin inhibitör etki gösterdiği ve sırasıyla 0,568, 1,104 ve 7,637 mM IC₅₀ değerleriyle GST enzimi inhibisyonuna neden oldukları rapor edilmiştir (Çomaklı vd., 2011). Türkan ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada sefazolin, sefuroksim, sefoperazon gibi sefalosporin grubu antibiyotiklerin böbrek, karaciğer ve kalp gibi farklı rat dokuları üzerindeki *in vivo* etkileri araştırılmıştır.

Araştırma sonuçları tüm dokularda GST aktivitesinin antibiyotik gruplarında 1. ve 3. saatlerde kontrol grubuna göre artarken, 5. ve 7. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğünü göstermiştir (Türkan vd., 2019). Yine Türkan ve ark. Tarafından yapılan başka bir çalışmada sefazolin, sefuroksim ve sefoperazon antibiyotiklerinin beyin, göz ve kas dokusu GR ve GST enzim aktiviteleri üzerine *in vivo* etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçları söz konusu antibiyotikleri ilk üç saatte GST enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olduğunu göstermiştir (Türkan vd., 2019).

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın devamında AChE enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. AChE enzim aktivitesi üzerinde üzerinde inhibisyona neden olan antibiyotikler için öncelikle en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonu ile %Aktivite-[inhibitör konsantrasyonu] grafikleri oluşturuldu ve bu grafiklerden yararlanılarak enzim aktivitesini %50 oranında inhibe eden inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri sırasıyla gentamisin sülfat için 0,0135 mM, streptomisin sülfat için 0,099 mM, linkomisin için 0,92 mM, ampisilin için 3,01 mM, klindamisin için 0,94 mM olarak hesaplandı. Elde edilen IC₅₀ değerleri analiz edildiğinde AChE enzimi inhibisyonuna neden olan en etkili antibiyotiğin en düşük IC₅₀ değerine sahip olan yani en düşük konsantrasyonda enzim inhibisyonuna neden olan gentamisin sülfat olduğu tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda bazı antibiyotiklerinin AChE ve GST enzim aktiviteleri üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Türkan ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada, sefoperazon sodyum, sefuroksim ve sefazolin antibiyotiklerinin GST ve AChE enzim aktiviteleri üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçları sefoperazon sodyum, sefuroksim ve sefazolin antibiyotiklerinin GST enzimini sırasıyla 0,1392±0,02, 1,5179±0,33 ve 1,006± 0,11 mM K_i sabitleriyle, AChE enzimini ise sırasıyla 0,3010±0,07, 0,3561±0,09 ve 0,3844±0,04 mM K_i sabitleriyle *in vitro* olarak inhibe etmiştir. Aynı zamanda sefoperazon sodyum, sefuroksim ve sefazolin antibiyotiklerinin her iki enzim aktivitesini de *in vivo* olarak inhibe ettiğini göstermiştir (Türkan vd., 2019). Thi Tu ve ark. Tarafından yapılan farklı bir çalışmada siyah kaplan karidesinde (*Penaeus monodon*) kolinesteraz aktivitesi (ChE) üzerine, Vietnam çiftliklerinde yaygın olarak kullanılan 2 antibiyotik (enrofloksasin, furazolidon) ve 2 pestisit (endosulfan,

deltamethrin)'in etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonuçları enrofloksasin veya furazolidon ile beslenen karideslerin kaslarındaki AChE aktivitesinin önemli ölçüde etkilenmediği, furazolidon ile beslenen karideslerin solungaçlarında ise önemli ölçüde (%28'e kadar) düştüğü gözlemlendi (Tu vd., 2009).

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında gentamisin sülfat, streptomisin sülfat, linkomisin, ampisilin ve klindamisin antibiyotiklerinin AChE ve GST enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Çalışmanın sonuçları insan hekimliğinde yaygın olarak kullanılan bu antibiyotiklerin hem AChE hem de GST *in vitro* enzim aktiviteleri üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile etkili inhibitörler olduğunu göstermektedir. Günümüzde farmakolojik çalışmalar multifonksiyonel ilaçlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, söz konusu antibiyotikler üzerine ileride yapılacak biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar için yol gösterici olacağı başta kanser ve Alzheimer olmak üzere birçok metabolik hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli katkı sunacağı değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Adem, S., and Çiftçi, M. (2012). Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step [Elsevier Inc.]. In *Protein Expression and Purification*, 81(1). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.031>.

Akkemik, E., Şentürk, M., Özgeriş, F. B., Taşer, P., and Çiftçi, M. (2011). *In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase*. 41(2), 235–241. <https://doi.org/10.3906/sag-1002-4>.

Akkemik, E., Taser, P., Bayındır, A., Budak, H., and Çiftçi, M. (2012). Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.08.010>.

Aksoy, M., Özaslan, M. S., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2016). Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 546–550. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1046063>.

Aksoy, S. A. (2018). *Bazı flavonoidlerin siğır karaciğer glutatyon s-transferaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması*.(Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi).

Aldridge, B. W. N., and Reiner, E. (1969). Acetylcholinesterase Two Types Of By An Organophosphorus Compound;One The Formation Of Phosphorylated Enzyme and The Other Analogous To İnhibition By Substrate. *Biochemical Journal*, 115, 147–162.

Alscher, R. G. (1989). Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum*, 77(3), 457-464. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05667.x>.

Arabacı, B. (2015). *Kapsaisin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisininin Araştırılması*.(Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Armstrong, R. N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, 10(1) 2–18. <https://doi.org/10.1177/175114370400500315>.

Ayna, A., Khosnaw, L., Temel, Y., and Çiftçi, M. (2021). Antibiotics as Inhibitor of Glutathione S-transferase: Biological Evaluation and Molecular Structure Studies. *Current Drug Metabolism*, 22(4), 308–31. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210118102700>.

Balcı, N., Türkan, F., Şakiroğlu, H., Aygün, A., and Şen, F. (2019). Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01422>.

Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. In *Biological Chemistry*, 390(3), 191–214. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>.

Bayram, T. (2018). *Beyin tümörlü hastalarda glutatyon s-transferaz izoenzimlerinin ekspresyonlarının incelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi).

Bingöl, Z. (2016). *1,1,2,2-Tetrakis(p-Hidroksifenil) Etan: İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri I ve II, Asetilkolinesteraz, Bütilkolinesteraz, Glutatyon S-Transferaz Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkisi ve Antioksidan Kapasitesinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Crop Journal*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>.

Burç, M. (2020). *Siprofloksasin ve Gentamisin Antibiyotikleri için seçici elektrotların geliştirilmesi*. (Yüksek Lisans tezi, İnönü Üniversitesi).

Burkholder, P. R. (1959). Antibiotics; The exploitation of microbial antagonisms is having a challenging impact on medicine and society. *Science*, 129(3361), 1457–1465.

Çağlayan, C. (2017). *Keçi Karaciğer Ve Böbrek Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının, Antibiyotoklerin ve Avermektinlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Çiftçi, B. (2021). *shabut(Barbus grypus) balığının karaciğer dokusundan glutatyon s transferaz enziminin saflaştırılması ve bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisinin in vitro şartlarda araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi).

Çomaklı, V., Çiftçi, M., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011). Purification of Glutathione S-Transferase Enzyme from Rainbow Trout Erythrocytes and Examination of the Effects of Certain Antibiotics on Enzyme Activity. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39(4), 413–419.

Çomaklı, V. (2011). *Glutatyon s-Transferaz Enziminin Gökkuşluğu Alabalık (oncorhynchus mykiss) Eritroitlerinden saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması*. (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Dalkılıç, E. (2016). *Klinik Staphylococcus Aureus İzolatlarında Metisilin, Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B ve Vankomisin Direncinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi).

Daniel, M. Q. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955–979.

De Koning, A. J., De Koning, C. B., and De Koning, P. D. (2005). Antioxidants. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume Set*, 1653–1662. <https://doi.org/10.1159/000142935>.

Demir Çay, D., ve Yörük, İ. H. (2022). *Diplotaenia turcica* Bitkisinde Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon S-transferaz Enzim Aktiviteleri ile Protein Karbonil Düzeyinin Belirlenmesi. 3(2), 165–172.

Demirci, G. (2013). moleküler damgalama yöntemi ile asetilkolin esteraz enziminin(AChE) immobilizasyonu. In *J Conserv Dent*. 16(4).

Dixon, D. P., Laphorn, A., and Edwards, R. (2002). *Protein family review Plant glutathione transferases*. 1–10.

Dönmez, İ. (2011). *Toplum ve hastane kaynakli stafilokok izolatlarında indüklenebilir klindamisin direnci*. (Tıpta Uzmanlık Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi).

Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16(2), 95–107. <https://doi.org/10.1007/PL00006984>.

Eaton, D. L., and Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49(2), 156–164. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.156>.

El-Shaboury, S. R., Saleh, G. A., Mohamed, F. A., and Rageh, A. H. (2007). Analysis of cephalosporin antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.002>.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 137–147. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>.

Galip, D. (2019). Siraz(Capoeta Umbla)'ın karaciğer dokusundan glutasyon s-transferaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi.(Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi) .

Ge, B., Song, Y., Zhang, Y., Liu, X., Wen, Y., and Guo, X. (2015). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) null polymorphisms and the risk of hypertension: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118897>.

Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., ... and Pereira, E. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>.

Göçer, H. (2014). *Sinefrin ve Fenilefrin: Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I VE hCA II) ile Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Gözükara, E. M. (1997). *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.

Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koxsal, Z., Türkan, F., Çetinkaya, S., ... and Bingöl, Z. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1698–1702. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1135914>.

Gülçin, I., Taslimi, P., Ceylan, M., and Gezegen, H. (2017). *Evaluation of acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibition profiles of 1, 2, 3, 4, 6-pentasubstituted-4-hydroxy-cyclohexanes*. May, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21938>.

Güvercin, S. (2006). *Glutasyon S-Transferaz Enziminin Sığır Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8).

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>.

Hastal, E., Mikrobiyoloji, K., ve Dal, A. (2008). *Akilci antibiyotik kullanımı ve ülkemizde antimikrobik maddelere direnç sorunu*. 61, 1–16.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.

Howie, A. F., Hayes, J. D., and Beckett, G. J. (1988). Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. *Clinica Chimica Acta*, 177(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90308-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90308-7).

Hutchings, M., Truman, A., and Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

Işık, M., Demir, Y., Kırıcı, M., Demir, R., Şimşek, F., and Beydemir, Ş. (2015). Changes in the anti-oxidant system in adult epilepsy patients receiving anti-epileptic drugs. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 121(3), 97–102. <https://doi.org/10.3109/13813455.2015.1026912>.

Kamisaka, K., Habig, W. H., Ketley, J. N., Arias, I. M., and Jakoby, W. B. (1975). Multiple Forms of Human Glutathione S-Transferase and Their Affinity for Bilirubin. *European Journal of Biochemistry*, 60(1), 153–161. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb20987>.

Karaman, M. (2016). *Sefazolin Sodyum, Amoksisilin ve Gentamisin Antibiyotiklerinin Fare Testis Dokusundaki Oksidatif Stres ve Fertilité Üzerine Etkisinin Moleküler ve Protein Seviyesinde Araştırılması*. (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Karaman, M., Temel, Y., and Bayındır, S. (2020). Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128700. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128700>.

Keha, E. E., ve Küfrevioğlu, I. Ö. (2012). *biyokimya*. İstanbul: Aktif Yayınevi.

Khoshnaw, L. Q. A. (2018). *Institute of Science Purification , Characterization and Investigation the Effect of Some Drugs on Glutathione S-Transferase (Gst) Enzyme From Rat Erythrocyte*.(Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi).

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers Inc.

Liebman, J. F., and Greenberg, A. (1988). *Mechanistic Principles of Enzyme Activity*. VCH Publishers. New York.

Loscalzo, J., and Freedman, J. (1986). Purification and characterization of human platelet glutathione-S-transferase. *Blood*, 67(6), 1595–1599. <https://doi.org/10.1182/blood.v67.6.1595.1595>.

Manavoğlu, D. C. (2021). *Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing 1846 Gelişimi Üzerine Ampisilin, Gentamisin ve siprofloksasin Antibiyotiklerinin Etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi).

Mazzetti, A. P., Fiorile, M. C., Primavera, A., and Lo Bello, M. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 82, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.01.008>.

Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Russell, R. J., and Robin, G. C. (1999). Carboxyl/cholinesterases: A case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21(12), 1031–1042. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199912\)22:1<1031::AID-BIES7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1031::AID-BIES7>3.0.CO;2-J).

Orhan, B. (2018). *çeşitli aril Kumarin türevlerinin glutatyon s-transferaz aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi).

- Özaslan, M. S. (2014). *Glutasyon s-transferaz Enziminin Van Gölüğü Balığı (chalcaburnus tarichi pallas) Karaciğerinden Saflaştırılması Karakterizasyonu ve Bazı Meal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi).
- Öztaşkin, N., Çetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., and Gülçin, I. (2015). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 60).
- Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., Radic, T., ... and Simic, T. (2018). Glutathione transferases: Potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123785>.
- Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17), 2200–2223. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>.
- Savcı, A. (2016). *Gentamisin Sülfat Amoksisilin Ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Protein Ve Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzeri Etkilerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi, Bingöl Üniversitesi).
- Sayın, Y. (2022). *Glutasyon S-Transferaz Enziminin Kaz (Anser Anser Domesticus) Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Kimyasalların ve Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi).
- Schultz, M., Dutta, S., and Tew, K. D. (1997). Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26(2–3), 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00029-X).
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S., ... ve Friedmann, T. (1986). *Torpedo californica asetilkolinesterazın birincil yapısı, cDNA dizisinden çıkarılmıştır*. 319(6052), 407–409.
- Sensi, S. L., Granzotto, A., Siotto, M., and Squitti, R. (2018). Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(12), 1049–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.001>.
- Tarhan, A. (1988). *Ampisilinden Hareketle Tetrahidro-2H-1,3,5-Tiadiazin-2-Tion Türevi Bileşiklerin Sentezleri Ve Antibakteriyel Etkileri*. (Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi).
- Taslimi, P., Akıncıoğlu, H., and Gülçin, İ. (2017). Synephrine and phenylephrine act as α -amylase, α -glycosidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase enzymes inhibitors. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(11), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21973>.

Taslimi, P., Farzaliyev, V., Alwasel, S. H., Osmanova, S., Sujayev, A., ... and Gülçin, İ. (2017). *Discovery of potent carbonic anhydrase , acetylcholinesterase , and butyrylcholinesterase enzymes inhibitors : The new amides and thiazolidine-4-ones synthesized on an acetophenone base. March, 1–7.* <https://doi.org/10.1002/jbt.21931>.

Taslimi, P., and Mustafa, İ. (2019). *The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide - induced multiple organ toxicity in rats : Pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. September 2018, 1–7.* <https://doi.org/10.1002/jbt.22313>.

Taysı, M. Ş., and Temel, Y. (2021). Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver and the Impact of Some Metal Ions on Enzyme Activity. *BioNanoScience*, 11(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00811-4>.

Taysı, M. Ş. (2018). *Glutasyon s-transferaz(GST) enziminin japon bildircin (Coturnix coturnix japonica) karaciğerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi).

Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y., and Çiftçi, M. (2017). *Purification and Characterization of Glutathion Reductase Enzyme From Japanese Quail (Coturnix coturnix japonica) Er. 7(3).*

Temel, Y., Çiftçi, M., Akkoyun, H. T., and Akkoyun, M. (2017). *Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities in vivo and on erythrocyte G6PD in vitro in rats. 3–7.* <https://doi.org/10.1002/jbt.21954>.

Temel, Y., and Koçyiğit, U. M. (2017). *Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (Rattus norvegicus) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. March.* <https://doi.org/10.1002/jbt.21927>.

Topal, F., Nar, M., Göçer, H., Kalin, P., Koçyiğit, U. M., Gülçin, I., ... and Alwasel, S. H. (2016). Antioxidant activity of taxifolin: An activity-structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 674–683. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1057723>.

Topal, M., Şenel Uslu, G., Topal Arslan, E. I., ve Öbek, E. (2015). *Antibiyotikler ve kullanım alanları. 31(3), 121–127.*

Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.

Tu, H. T., Silvestre, F., Scippo, M. L., Thome, J. P., Phuong, N. T., ... and Kestemont, P. (2009). Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1463–1470. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.008>.

Tuna, G. (2008). *sıçan ince bağırsak glutatyon s-transferaz enziminin saflaştırılması ve izozimlerinin hiperisin bileşiği ile bağlanma özelliklerinin incelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, T.C. Hacettepe Üniversitesi).

Türk, S. (2012). *insan eritrosit glutatyon s-transferaz pi izoenziminin saflaştırılması ve hiperisin ile etkileşiminin incelenmesi* (Vol. 3, Issue September). (Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi).

Türkan, F. (2015). *Karayemiş Meyvesinden (Prunus Laurocerasus L .) Glutatyon s-transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi).

Türkan, F., and Atalar, M. N. (2018). *The Effects of Amoxicillin and Vancomycin Hydrochloride Hydrate on Glutathione S-Transferase Enzyme Activity: An in vitro study Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Amoksilin ve Vankomisin Hidroklorid Hidratın Etkisi : Bir in vitro çalışma*. 8(2), 141–148.

Türkan, F., Huyut, Z., Demir, Y., Ertaş, F., and Beydemir, Ş. (2019). The effects of some cephalosporins on acetylcholinesterase and glutathione S-transferase: an in vivo and in vitro study. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(3), 235–243. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1452037>.

Türkan, F., Huyut, Z., Huyut, M. T., and Calimli, M. H. (2019). In vivo biochemical evaluations of some β -lactam group antibiotics on glutathione reductase and glutathione S-transferase enzyme activities. *Life Sciences*, 231(June), 116572. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116572>.

Vale, J. A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102–103, 649–652. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00277-X).

Yüksel, F., ve Temel, Y. (2022). Glutatyon S-transferaz: Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(4), 2352–2363. <https://doi.org/10.21597/jist.1150868>.

Yusuf, T., Adnan, A., İbrahim, H. S., and Çiftçi, M. (2020). In vitro effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 219–223. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1481083>.