

T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI İLAÇLARIN İNSAN ERİTROSİT GLUTATYON REDÜKTAZ  
ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yusuf ATILGAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**

**BİNGÖL - 2024**

**BAZI İLAÇLARIN İNSAN ERİTROSİT GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ  
ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTCİ danışmanlığında, Yusuf ATILGAN tarafından hazırlanan bu çalışma 05/09/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTCİ *İmza* :  
Üye : Doç. Dr. Ebru AKKEMİK *İmza* :  
Üye : Doç. Dr. Yusuf TEMEL *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

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

**Prof. Dr. Zafer ŞİAR**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Çalışma ortamının sağlanması ve yüksek lisans tezimi yazmam için gerekli şartları oluşturan Bingöl Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Mahmut TOPRAK başta olmak üzere kimya anabilim dalında görev yapan öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince sabır ve sevgiyle bana yol gösteren, insani değerlerini örnek aldığım, yüksek lisans tezimi onunla yapmaktan gurur duyduğum ve çalışmalarında tecrübelerini paylaştığı için saygıdeğer danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ başta olmak üzere sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL ve sayın Doç. Dr. Adnan AYNA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aileme ve hemodiyaliz birimindeki iş arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

**Yusuf ATILGAN**

**Bingöl 2024**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Enzimler .....	1
1.1.1. Enzim İnhibisyonu .....	3
1.1.2. Glutasyon .....	5
1.1.3. Glutasyon Redüktaz .....	6
1.2. Serbest radikaller .....	6
1.3. Antioksidanlar .....	7
1.4. Kinetik Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar .....	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	9
2.1. Çalışmanın Amacı .....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	12
3.1. Kimyasallar .....	12
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	12
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	12
3.3.1. Hemolizatin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler .....	13
3.3.2. Eritrositlerin Yıkanmasında Kullanılan Çözeltiler .....	13
3.3.3. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler .....	13
3.3.4. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler .....	13
3.3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler .....	14
3.3.6. Diyaliz İçin Kullanılan Çözeltiler .....	15
3.3.7. Amonyum Sülfat Çökeltisinin Çözünmesi İçin Kullanılan Tampon: .....	15

3.3.8. İlaç Ve Kimyasal Maddelerin Stok Çözeltileri: .....	16
3.4. GR Enziminin Aktivite Ölçümü.....	16
3.5. Protein Tayini .....	17
3.5.1. Kalitatif Protein Tayini.....	17
3.5.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini.....	17
3.6. İnsan Kanının Temini ve Hemolizat Hazırlanması. ....	18
3.7. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	18
3.8. Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	19
3.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	20
3.10. Kinetik Çalışmalar .....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	22
4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Ait Sonuçlar.....	22
4.2. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları.....	23
4.3. 2', 5' -ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisinin Elüsyon Sonuçları.....	23
4.4. Saflaştırma Çalışmalarının Sonuçları .....	24
4.5. SDS-PAGE Yöntemi ile GR Enziminin Saflık Kontrolü Sonuçları.....	25
4.5.1. Kinetik Çalışmaların Sonuçları .....	25
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	30
KAYNAKLAR .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BSA	: Bovin serum albümin
DTT	: Ditiyotreititol
E	: Enzim
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EC	: Enzim kodu
ES	: Enzim substrat kompleksi
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforez
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
V <sub>max</sub>	: Maksimum hız
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Lineweaver-Burk Grafiği.....	5
Şekil 1.2.	Glutasyonun indirgenmiş formu.....	5
Şekil 1.3.	Glutasyonun yükseltgenmiş formu.....	6
Şekil 4.1.	İnsan Eritrosit GR enziminin amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	22
Şekil 4.2.	Kantitatif protein tayini için hazırlanan grafik.....	23
Şekil 4.3.	İnsan Eritrosit GR enziminin afinite kolonundan elüsyonu.....	24
Şekil 4.4.	SDS-PAGE fotoğrafı.....	25
Şekil 4.5.	Tylosin ilacının GR enzimi üzerine etkisi.....	28
Şekil 4.6.	Levoflaksasin ilacının GR enzimi üzerine etkisi.....	28
Şekil 4.7.	Vitamin C ilacının GR enzimi üzerine etkisi.....	29
Şekil 4.8.	Vitamin C için 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	29

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Aktivite ölçümü kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	16
Tablo 4.1.	Amonyum sülfat çöktürme sonuçları.....	22
Tablo 4.2.	Saflaştırma sonuçları.....	24
Tablo 4.3.	Tylosin ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları.....	26
Tablo 4.4.	Levoflaksasin ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları.....	26
Tablo 4.5.	Vitamin C ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları.....	26
Tablo 4.6.	Vitamin C için $K_i$ sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve inhibitör konsantrasyonları.....	27
Tablo 4.7.	Vitamin C için elde edilen $IC_{50}$ değeri ve $K_i$ sabiti.....	27



# BAZI İLAÇLARIN İNSAN ERİTROSİT GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

## ÖZET

Glutasyon redüktaz enzimi hemen hemen bütün canlı hücrelerde yükseltgenmiş olan glutasyonu (GSSG) özellikle NADPH üretiminde kullanılan indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştüren hayati öneme sahip antioksidan bir enzimdir. Bu öneminden dolayı enzim bu tez kapsamında insan eritrositlerinden 2', 5' ADP Sepharose-4B jelinin kullanıldığı afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırıldı. Saflaştırmanın olup olmadığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve fotoğraflandı. Daha sonra saf glutasyon redüktaz enzimi kullanılarak bazı ilaçların enzim üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu kapsamda daha önce çalışılmamış askorbik asit, beloc, tylosin, prednol ve levofloksasin ilaçları tercih edildi. Yapılan kinetik çalışmalarda beloc ve prednolun çalışılan konsantrasyon aralığında enzim üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı tespit edildi. Tylosin ve levofloksasin ilaçlarının ise çalışılan derişim aralıklarında enzimi aktive ettikleri belirlendi. C vitamini ile yapılan kinetik çalışmalarda ise enzimin önemli derecede inhibisyona uğradığı gözlemlendi. C vitamini için  $IC_{50}$  değeri 115,5 mM,  $K_i$  sabiti ise  $243,143 \pm 54,95$  mM olarak hesaplandı.

**Anahtar Kelimeler:** Glutasyon redüktaz, insan eritrosit, inhibisyon.

# INVESTIGATION OF THE *IN VITRO* EFFECTS OF SOME DRUGS ON HUMAN ERYTHROCYTE GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME

## ABSTRACT

Glutathione reductase enzyme is a vital antioxidant enzyme that converts oxidized glutathione (GSSG) in almost all living cells into reduced glutathione (GSH), which is especially used in NADPH production. Due to this importance, the enzyme was purified from human erythrocytes within the scope of this thesis with the help of affinity chromatography using 2', 5' ADP Sepharose-4B gel. Purification was checked by SDS-PAGE and photographed.

Then, the effects of some drugs on the enzyme were investigated using pure glutathione reductase enzyme. In this context, previously unstudied drugs such as ascorbic acid, beloc, tylosin, prednol and levofloxacin were preferred. In the kinetic studies, it was determined that beloc and prednol did not have any effects on the enzyme in the concentration range studied. It was determined that the drugs tylosin and levofloxacin activated the enzyme in the concentration ranges studied. In kinetic studies conducted with vitamin C, it was observed that the enzyme was significantly inhibited. The  $IC_{50}$  value for vitamin C was calculated as 115.5 mM, and the  $K_i$  constant was calculated as  $243.143 \pm 54.95$  mM.

**Keywords:** Glutathione Reductase, Human Erythrocytes, Inhibition.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzimler

Biyolojik kataliz 18.yüzyılın sonlarında mide salgısının et sindirimi üzerine çalışması ile keşfedildi. 1800'lerdeki çalışmalar ise bitki özleri ve tükürük nişastanın şekere çevrilmesi ile ilerledi. Louis Pasteur ise 1850'lerde fermentler tarafından şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin gerçekleştiğini ortaya koydu. Sonraki çalışmalarda Eduard Buchner, şekerin maya özütleri tarafından alkole dönüştürüldüğünü ve bu fermentelerin hücreden ayrıldığında bile işlevine devam eden bazı moleküller tarafından sağlandığını 1897'de keşfetti. Daha sonra Fredic W. Kühne bu molekülleri enzim olarak isimlendirdi (Lehninger *et al.* 2005).

Enzimler de diğer proteinler gibi canlı hücrelerde sentezlenirler ve metabolizmadaki kimyasal reaksiyonların kontrollü bir şekilde % 100 verimle yan ürünler oluşturulmadan hızlanmalarına sebep olurlar. Genel olarak enzimlerin önemli özelliklerinden biri de katalizleme gücü ve spesifik olmalarıdır. Katalitik RNA'nın ufak bir grubu dışında hemen hemen enzimlerin tamamı protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu 2015). Bu nedenle enzimin yapısındaki proteinin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapısının bozulmaması önemlidir. Bu yapı korunmazsa; enzim aktivitesini yerine getiremez ve hücrede büyük metabolik problemler ortaya çıkar.

Yukarıda da belirtildiği gibi enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır ve bundan dolayı enzimler prteinlerin tüm özelliklerine sahiptirler. Büyük yapılarından dolayı moleküller kolodyum zarından geçemezler. Isı ve ortam pH'sına karşı duyarlıdırlar ve denatüre olabilirler. 40°C'in üzerindeki sıcaklıklarda genellikle denatüre olurlar. Ayrıca enzimler, 0°C'den 40°C'ye doğru olan sıcaklık artışlarında reaksiyon hızlarının daha fazla artmalarına sebep olur. Sonraki sıcaklıklarda ise denatürasyondan dolayı reaksiyon hızlarında düşme söz konusudur (Gözükara 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına ‘‘Turnover Sayısı’’ denir. Bu kavram katalizleme gücü olarak ifade edilir. Enzimlerin bir kısmı katalizleme olayını kendileri yapabilir. Bazılarının ise ‘‘Kofaktör’’ diye adlandırılan gruplara gereksinimi vardır. Kofaktör, metal iyonu olabildiği gibi organik bir bileşikte olabilir. Bu organik kompleks bileşiğe ‘‘koenzim’’ denir. Bazı durumlarda aktivite için her iki gruba da ihtiyaç duyulur. Kofaktörler ısıya dayanıklı olan maddelerdir. Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksine ‘‘holoenzim’’ adı verilir. Kofaktörsüz proteine apoprotein, enzime ise ‘‘apoenzim’’ denilir. Apoenzim, katalitik olarak inaktiftir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzimlerin genel özellikleri; çoğunluğunun protein yapısında olmaları, reaksiyonlarda değişmeden çıkabilmeleri, katalizledikleri reaksiyon için spesifik olmaları, reaksiyonların aktivasyon enerjilerinin düşürmeleri, reaksiyonların daha kısa sürede dengeye ulaşmaları ve *in vivo* ortamda olduğu gibi *in vitro* ortamda da görev yapabilmeleri şeklinde sıralanabilir.

Günümüzde birçok enzim tanımlanmış, çok büyük bir kısmı saf halde elde edilip kinetik özellikleri incelenmiş ve kristallendirilmiştir. Fakat yapılan çalışmalar daha tespit edilememiş enzimlerin varlığını göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzimlerin, etkiledikleri ve ürüne çevrilen bileşikler ‘‘Substrat’’ olarak adlandırılır. Enzimlerin bir kısmı kendi substratlarının adının sonuna ‘‘-az’’ son eki getirilerek isimlendirilirken, bazıları da keşfedenlerin verdikleri isimle bilinir. Örneğin; fosfataz, üreaz, tripsin ve pepsin gibi. Ancak bu isimler çoğunlukla enzimlerin işlevleri hakkında yeterlibilgi sağlayamadığından Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmada her enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası atanmıştır. Oluşturulan sınıflandırmaya göre enzimler altı ana sınıfa ayrılmıştır.

Bu gruplar aşağıdaki gibidir.

1. **Oksidoredüktazlar:** Bu sınıf enzimler oksidasyon- redüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar.

2. **Transferazlar:** Bu sınıfa giren enzimler ise iki molekül arasında bir atom veya grubun transferine sebep olurlar.
3. **Hidrolazlar:** Hidroliz reaksiyonlarında görev alırlar.
4. **Liyazlar:** Substrattan hidroliz yolu dışındaki bir yolla bir grubun ayrılmasında reaksiyonlarını katalizler.
5. **İzomerazlar:** Metabolizmadaki izomerizasyon reaksiyonlarının katalizlenmesinde bu enzimler görev alır.
6. **Ligazlar:** ATP veya diğer nükleotit tri fosfatın yıkımı ile birlikte yeni bağın sentezi gibi reaksiyonlarda görev alırlar.

Bu sınıflandırmada ki kriterler; enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göredir (Lehninger *et al.* 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzimler metabolizmada olağanüstü katalizme vazifelerini yerine getirirken aktiviteleri; ortamdaki substrat konsantrasyonu, ortamdaki enzim konsantrasyonu, ortamın pH'sı, ortamın iyonik şiddeti, ortamda inhibitör veya aktivatörlerin varlığı, ortamın sıcaklığı gibi faktörlerden etkilenebilir. Bu durum çoğunlukla enzimin ve dolayısı ile reaksiyonların kontrol altında tutulması ile ilgilidir.

### 1.1.1. Enzim İnhibisyonu

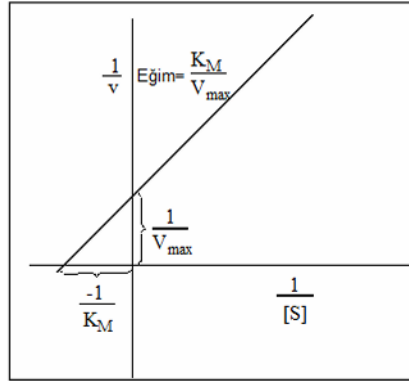
Enzim aktivitesinin bazı bileşikler tarafından düşürülmesi veya tamamen ortadan kaldırılması "inhibisyon" olarak adlandırılır. Bu olaya neden olan bileşikler "inhibitor" olarak adlandırılır. Genelde inhibitörler büyük olmayan molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Bu tip maddeler biyolojik sistemlerde olumlu ya da olumsuz manada önemli etkilere sahiptirler. Çünkü bazı ilaç ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını inhibisyon yolu ile gerçekleştirirler. Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki grupta sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin en az bir fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kolay ayrışmayan bir yapı meydana getirir. Bu tür inhibisyonlarda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır,  $K_M$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) sabit kalır. Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Enzim inhibitör kompleksi nisbeten birbirine zayıf çekimlerle bağlanırlar. Bu inhibisyon türü yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon şeklinde üç grupta incelenir. Yarışmalı (kompetitif)

inhibisyonda inhibitör yapı olarak substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substratla yarış halindedir. Böylece substratın enzimin aktif bölgesine bağlanma oranı düşürülmüş olur. Ancak substrat konsantrasyonunun artırılması ile inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabılır. Bu inhibisyon tipinde enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_M$  değeri büyür. Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülünün farklı bölgelerine aynı anda bağlanabilir. Bu tip inhibisyonda enzimin turnover sayısı, yani katalitik aktivitesi azalır. Burada substrat ve inhibitör aynı bölgeye bağlanmadıklarından herhangi bir yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunun artırılması ile enzimin inhibe edilme durumu değişmez. Bu durumda enzimlerin maksimum hız değerleri azalırken,  $K_M$  denge sabitleri değişime uğramaz. Çünkü yarışmalı olmayan inhibisyonlarda enzimlerin substratları ve kullanılan inhibitörler üç boyutlu yapıdaki proteinin farklı bölgelerine bağlandığından iki çeşit kompleks meydana gelir. İnhibisyonun başaka bir tipi de yarı yarışmalıdır. Bu tip inhibisyonda dönüşümlüdür. Bu inhibisyon tipinde inhibisyona sebep olan madde direk olarak enzime bağlanamaz. Enzim substrata etkileştikten sonra enzim-substrat (ES) ikilisine bağlanır. Nadir olarak görülen bu durumda maksimum hız azalırken  $K_M$  değeri küçülür.

Lineer karışık tip inhibisyon adı verilen inhibisyon çeşidi yarışmasız olup dönüşümlü inhibisyon tipleri arasında yer almaktadır. Bu çeşit inhibisyonlarda reaksiyonun denge sabitleri değişmektedir. Bununla beraber birçok multi enzim sistemlerinde otomatik düzenlenme kapasitesi yaratılmıştır ve bu sistemlerde otomatik inhibisyon meydana gelmektedir. Örneğin seri tepkimelerin son ürünü belirli bir derişime geldiğinde serinin ilk enziminin ve dallanma noktasındaki enzimin inhibe edilmesine sebep olur. Bu çeşit enzimler allosterik enzim, inhibisyon tipi de “feed-back” inhibisyonu olarak adlandırılır. Allosterik inhibisyonda görev alan enzimler çok sayıda polipeptid içerirler ve inhibitör enzime bağlandığında alt birimler etkilenerek üç boyutlu yapının değişmesi sonucu inhibisyon meydana gelir. Bu tip enzimlerin aktivitelelerin arttıran veya azaltan maddelere “modülatör” denir. Bu enzim kinetiği Michaelis–Menten kinetiğinden farklılık gösterir.

Kinetik çalışmalarda inhibisyon denge sabitlerinin ( $K_i$ ) belirlenmesinde en çok kullanılan metod Lineweaver–Burk metodudur (Şekil 1.1). Bu metotta inhibitörlerin derişimleri sabit tutularak üç farklı inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivitele

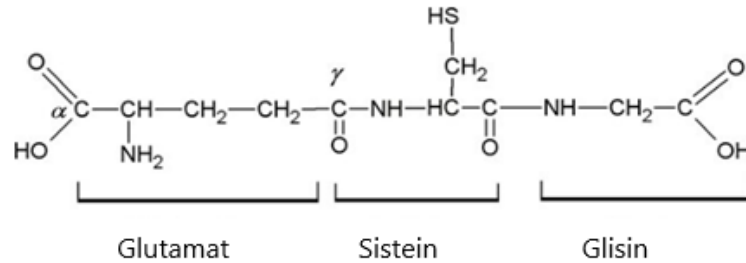
ölçülür ve daha sonra  $1/V-1/[S]$  grafikleri çizilir. Bu grafiklerden faydalanılarak ilgili parametreler hesaplanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.1. Lineweaver-Burk Grafiği (Keha ve Küfrevioğlu 2009)

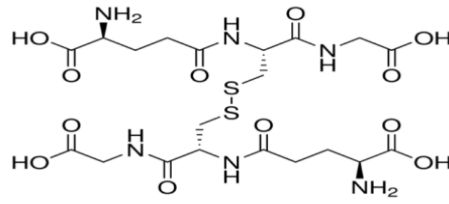
### 1.1.2. Glutasyon

Glutasyon, glutamat yan zincirinin karboksil grubu ile sistein aminoasidinin amin grubu arasında gama peptit bağı içeren bir tripeptittir. Adlandırılması ise  $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin şeklinde yapılmaktadır. Glutasyonun okside ve redükte olmak üzere iki formu mevcuttur (Şekil 1.2 ve 1.3). Ray-Pailhade 1988 yılında glutasyonu maya hücrelerinde keşfederek “filothion” şeklinde isimlendirmiştir. Daha sonra Hopkins 1921’de glutasyonu saflaştırarak günümüzde kullanılan ismi vermiştir. Glutasyon başlıca karaciğerde sentezlenerek gerekli yerlere gönderilir. Bazı bakteri ve amipler hariç hemen hemen tüm canlı hücrelerde mevcuttur (Zubay 1988, Açıan 1990, Erat, 2002).



Şekil 1.2. Glutasyonun indirgenmiş formu (L- $\gamma$ -glutamil-L-Sisteinil-glisin)

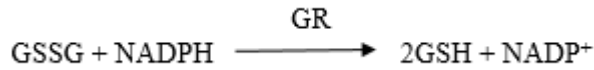
([https://www.researchgate.net/publication/332774758\\_Current\\_Developments\\_in\\_Antioxidant\\_Therapies\\_for\\_Spinal\\_Cord\\_Injury](https://www.researchgate.net/publication/332774758_Current_Developments_in_Antioxidant_Therapies_for_Spinal_Cord_Injury))



Şekil 1.3. Glutatyonun yükseltgenmiş formu 2(L-γ-glutamyl-L-Sisteinil-glisin) (<https://www.scientificlabs.co.uk/product/G4501-100MG>)

### 1.1.3. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz enziminin (GR; E.C.1.8.1.7) tanımı ilk defa 1951 yılında Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından yapılmıştır. Aşağıdaki reaksiyondan da görüldüğü gibi glutasyon redüktaz enzimi metabolizmada ve *in vitro* şartlarda okside glutasyon (GSSG) ve NADPH varlığında redükte GSH oluşmasına sebep olur.



GR enzimi hücredeki GSH/GSSG oranının korunmasında rol alır. İnsan eritrositlerde bu 500/1'dir. Bu dengenin bozulması durumunda eritrosit hücreleri hemolize uğrayarak ciddi sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına sebep olur (Taşer, 2010). Glutasyon redüktaz enziminin normal şartlarda sağlıklı çalışması durumunda bu oran sürekli korunarak bu tür sağlık problemlerinin ortaya çıkması önlenmiş olur (Torinibo, 1996).

Glutasyon redüktaz enzimi klinik biyokimyada malign tümör ve karaciğer hastalıklarının tespit edilmesinde, genetik eksikliklerin tespit edilmesinde ve riboflavin yetersizliğinin ölçümünde kullanılmaktadır. Hücre içinde GR ve GSH eksikliğinde oksidatif hasar meydana gelmektedir. Dolayısıyla GR ve GSH eksikliği akciğer ve karaciğer hastalıkları, parkinson, alzheimer, diyabet, hemipleji (felç), HIV, AIDS, epilepsi gibi birçok hastalığa neden olabilir (Erat, 2002).

### 1.2. Serbest radikaller

Bir veya birden çok eşlenmemiş elektron içeren atomik ya da moleküler yapıdaki maddelere Serbest Radikal denir. Bu tür maddeler eşlenmemiş elektron



bulundurduklarından reaksiyon istekleri son derece yüksektir. Bundan dolayı kendi çevrelerinde bulunan diğer maddelerle etkileşerek o maddelerin bozulmasına sebep olurlar. Örneğin bu kapsamda lipitleri, nükleik asitleri ve proteinleri oksitleyerek yapılarının bozulmasına neden olurlar (Stadtman, 2002).

Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklar olarak ikiye ayrılır. Endojen kaynaklar arasında; redoks reaksiyonları, mitokondriyal elektron transport zinciri, oksidatif reaksiyonlar, fagositik ve endotelial hücrelerdeki otooksidasyon reaksiyonları, enzimler ve araşidonik asit metabolizması, eksojen kaynaklar ise; diyet faktörleri, pestisitler, sigara dumanı, ilaçlar, zararlı ışınlar, organik çözücüler ve ksenobiyotikler sayılabilir (Aksoy 2002). Yukarıda çeşitleri verilen serbest radikallerin metabolizmada oluşturduğu oksidan maddeler ile metabolizmadaki antioksidan maddeler arasındaki dengenin bozulması durumunda çok fazla reaktif oksijen türleri oluşur ve bu durum oksidatif hasara sebep olur. Oluşan bu oksidatif hasar da oksidatif stresi oluşturur (Dündar ve Aslan, 1989).

### **1.3. Antioksidanlar**

Hücrelerde oksidatif ajanları zararsız hale getiren maddeler antioksidan olarak adlandırılır. Bu maddelerin bazıları metabolizmada sentezlenirken bazılarının da diyetle dışarıdan alınması gerekmektedir (Fridovich 1999). Antioksidan olarak görev yapan başlıca enzimler antioksidan enzimler olarak adlandırılır. En önemlileri süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit redüktaz enzimleridir. Enzim yapısında olmayan antioksidan maddelerinden en önemli olanlar ise A,E ve C vitaminleri, proteinler (albumin, transferin, bilirubin, ferritin), hormonlar (melatonin, serotonin), fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoidler), ürik asit, lipoik asit ve redükte glutatyonudur (Fridovich 1999, Gülçin, 2005).

### **1.4. Kinetik Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar**

Askorbik asit: Çalışmada kullanılan askorbik asit ampul formunda olup 5 mL'sinde 0,5 g askorbik asit içermektedir. Bu ilaç C vitamini eksikliğinin giderilmesinde kullanılır. C vitamini eksikliğinde skorbüt ve preskorbütik hastalıkları meydana gelebilir. Bu hastalığın belirtileri anemi, hareket kısıtlılığı, astenia, kanamalar, üst ve alt

ekstremitelerde ağrı, vücutta şişlik, cilt sorunları, diş eti problemleri ve diş yitimi gibi olumsuzluklardır. Ayrıca gingival kanama, yara onarımı, cerrahi opeasyonlar, kronik enfeksiyon, ateş, enterik hastalıkları, malabsorbsyon bozuklukları, hemodiyaliz, peritonal diyaliz, gastrektomi ve tütün kullanımında C vitamini takviyesi yapılması gerekebilir (Farmalist, 2005).

Tylosin: Tylosin, daha çok hayvanlarda kolit tedavisi için kullanılır. Anti-enflamatuar ve antibiyotik özelliklere sahiptir. Ayrıca solunum sistemi ve cilt enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılabilir. Tylosin de eritromisin gibi ribozomların 50S alt birimine bağlanarak protein üretimini engellediği belirlenmiştir. Dolayısıyla bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Tylosin ayrıca immünomodülatör etkilere de sahip olabilir. Tylosin hem gram-pozitif ve hem de gram-negatif mikroorganizmalar, mikoplazma, spiroketlere ve vibrio'ya karşı etkilidir. Tylosin ilacını dozajı genelde 42 güne kadar her 8-12 saatte bir kilogram başına 10-20 mg'dır (<https://www.veteriner.blog/2018/06/tylosin/>).

Prednol: Çalışmamızda kullanılan prednolün derişimi 40 mg/2 mL metilprednizolondur. Bu ilaç sistemik glukokortikoid tedavisi alan hastalarda kullanılır. Acil tedavi durumunda glukokortikoidler damar yolu ile uygulanabilir. Prednol daha çok alerjik reaksiyon ve romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılır. Ayrıca astım, ilaç alerjisi, alerjik rinit, kurdeşen, egzema, deri iltihabı gibi deri hastalıkları, kas romatizması ve akut romatizma tedavisinde de kullanılabilir (Farmalist, 2005).

Beloc: Çalışmamızda kullanılan ampul formundaki ilaç 1 mg/mL derişiminde metoprolol tartarat ihtiva etmektedir. Bu ilaç kalp damar hastalıkları, migren, yüksek tansiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Farmalist, 2005).

Levofloksasin: Bu çalışmada kullanılan levofloksasin 100 mL'lik infüzyon solüsyonu içeren flakonlarda bulunmaktadır ve 5 mg/mL derişime sahiptir. Akut sinüzit, akut bronşit, pnömoni, akut piyelonefrit, prostatit, üriner sistem enfeksiyonları ve deri enfeksiyonları tedavisinde kullanılmaktadır. Genellikle günde tek doz olmak üzere 10-14 gün arasında 500 mg olarak intravenöz olarak uygulanır (Farmalist, 2005).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Glutasyon redüktaz (GR) enzimi, [Glutasyon: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz (EC 1.8.1.7)] okside glutasyonun redükte glutasyona dönüşümünü sağlayan, flavo protein disülfür oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir (Calberg ve Mannervik 1981, Rendon *et al.* 1986).

Literatür kaynakları incelendiğinde glutasyon redüktaz enziminin farklı kaynaklardan saflaştırıldığı, karakterize edildiği ve amino asit dizilerinin ortaya çıkarıldığı görülmektedir. İnsan eritrositleri ve *E. Coli*'den elde edilen glutasyon redüktaz enziminin yapısı x-ray kristalografisi yardımıyla belirlenmiştir. Glutasyon redüktaz enzimi genellikle dimerik bir yapıya sahiptir ve her alt birim bir FAD bulundurur (Danielson *et al.* 1999).

İnsan eritrosit glutasyon redüktaz enzimi yaklaşık olarak 50 kilodaltonluk alt birimlere sahiptir. GR, okside glutasyonu indirgenmiş formuna dönüştürürken, ilk olarak NADPH'dan gelen elektronlar FAD'ye transfer edilir. Sonrasında alt birimdeki 2 sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne transfer edilerek okside glutasyona aktarılır. Alt birimler 3 tane yapısal alan bulundurur. Bu yapısal alanlar: FAD ve NADPH bağlayıcı alanlar olup, diğer alan ise ara yüz alanıdır. Okside glutasyon için bağlayıcı alan, alt birimin FAD alanı ile diğer bir alt birimin ara yüz alanında meydana gelmektedir. Reaksiyon iki basamakta gerçekleşir (Siegel *et al.* 1998, Patel *et al.* 1998, Iribarne *et al.* 2000).

Glutasyon redüktaz enziminin NADPH substratına afinitesi oldukça fazladır. *In vitro* ortamda NADH düşük bir afinite ile elektron ve proton vericisi olarak kullanılabilir fakat NADPH fizyolojik şartlarda aktiviteyi sağlayan tek koenzimdir. Glutasyon redüktazın katalizlediği tepkime dönüşümlüdür. Bu ters yönde ilerlemenin gerçekleşmesi için ortamda belirli bir konsantrasyonda NADP<sup>+</sup> ve GSH olmalıdır. Fizyolojik şartlarda tepkime tek yönlüdür ve GR bu şekilde hücre içinde GSH/GSSG oranının yüksek kalmasını sağlar (Douglas 1987, Açıan, 1990).

GR, nispeten ısıya dayanıklı bir enzimdir. Enzim için en uygun optimum pH ise 6,5-8,0 arasındadır (Açan, 1990).

İnsan eritrost hücrelerinden GR enzimini elde etmek için heparinli veya EEDTA'lı tüpler kullanılır. Tüpler santrifüj edilerek plazma ve lökosit tabakaları birbirinden ayrılır. Mevcut eritrosit hücreleri yıkama yapılarak temizlenir. Sonrasında uygun tampon çözelti veya soğuk saf su ile hemoliz edildikten sonra saflaştırma basamakları uygulanır (Worthington ve Rosemayer, 1976).

Farklı dokulardan kromatografi öncesi, sonikasyon, homojenizasyon, osmotik şok, organik çözücülerle muamele ve deterjanlarla muamele gibi yöntemler uygulanarak glutatyon redüktaz enzimi içeren çözeltiler elde edilebilir (Toribio *et al.* 1996).

Glutatyon redüktaz enzimin kısmi saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden biri de amonyum sülfat çöktürmesidir. İnsan eritrositlerinde %30-70 arası konsantrasyon en doygun aralık olarak belirlenmiştir. Uygun bir ekstrat elde edilmesi için ultrasantrifüj (100.000xg'de) yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen nümuneyi kromatografik kolonlara tatbik etmek ve konsantre etmek amacıyla aseton ve alkol ile muamele sonrasında ise liyofilizasyon yöntemleri uygulanabilir (Toribo *et al.* 1996)

478 amino asitten oluşan insan GR enzimi mitokondrial ve sitozolik olmak üzere iki izoenzimden oluşur. Bu izoenzimler tek gen tarafından şifrelenmektedir. İnsan ve fare GR enzimleri benzerlik göstermekte ve her biri 13 adet ekzon içermektedir. İnsan GR geninin hemen hemen tamamının yapısı ortaya konmuştur (George and Franke 1976; Tutic *et al.* 1990; Tamura *et al.* 1996; Becker *et al.* 1998; Kelner and Montoya, 2000).

Yapılan bir çalışmada sağlıklı hücrelerde insan GR enziminin ortalama aktivitesi  $5,63 \pm 0,58$   $\mu\text{mol/mg}$  protein iken bu değer tümörlü hücrelerde ise  $1,07 \pm 0,11$   $\mu\text{mol/mg}$  protein olarak ölçülmüştür (Yang *et al.* 2006).

Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği tepkimede NADPH sürekli azaldığından dolayı ve ayrıca NADPH 340 nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğundan enzim

aktivitesi NADPH'ın azalmasından faydalanılarak ölçülebilir. Bu tez kapsamında bu yöntem kullanılmıştır. İkinci bir yöntem ise tepkimede oluşan GSH miktarı baz alınarak yapılan ölçüm metodudur. Bu metotta ise 5, 5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) kullanılır ve 412 nm'de spektrofotometrede artan DTNB miktarı dikkate alınır (Carlberg and Mannervik 1985; Toribio *et al.*1996).

Koyun karaciğeri GR enzimi ile yapılan bir çalışmada enzim %18,76 verimle 1850 kat saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat, tiyamfenikol, oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin antibiyotiklerinin enzimi yarışmalı bir şekilde inhibie ettiği belirlenmiştir (Erat ve Çiftci, 2003).

## **2.1. Çalışmanın Amacı**

Glutasyon redüktaz enzimi flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir ve metabolizmadaki indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılan NADPH molekülünün varlığında okside glutasyonu, radikal gidermede kullanılan indirgenmiş glutatyona dönüşümünü sağlayan çok önemli antioksidan bir enzimdir. Yaptığımız literatür taramalarında doktorlar tarafından sıklıkla reçete edilen askorbik asit, beloc, tylosin, prednol ve levofloksasin ilaçlarının insan eritrosit glutasyon redüktaz enzimi üzerine etkilerinin incelenmediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu tez kapsamında bu ilaçların yukarıda da önemi belirtilen glutasyon redüktaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kimyasallar**

SDS-PAGE çalışmalarında kullanılan protein standartları, Applied Biological Materials Inc (Richmond, BC, Canada), GSSG, CDNB, GSH, EDTA, TEMED, elektroforez kimyasalları, diğer kimyasal ve numuneler Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) veya Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.

#### **3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar**

Elektroforez tankı: BIO RAD (dikey)

Soğutmalı satrifüj: (HETTICH UNİVERSAL 320 R)

Spektrofotometre: (SHIMADZU/JASCO)

pH metre: (HANNA HI221)

Karıştırıcı (Vorteks): ( IKA MS3 BASİC)

Karıştırıcı (Shaker): Termal N11340

Otomatik pipet: EPPENDORF

Magnetik karıştırıcı (IKAC-MAG HS7)

Saf su cihazı: GFL 2004

Peristaltik pompa: (ATTA SJ1220)

Su banyosu: Termal H11960/ Nüve

Homojenizatör: IKA

Hassas terazi: (PRECISA /DENVER SI34)

Derin dondurucu: (-20)

#### **3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması**

Kullanılan çözeltileri hazırlamak için kullanılan su, deiyonize su ve saf sudur. Çözeltilerin bir kısmındaki su sterilize edilmiştir.

### 3.3.1. Hemolizatın Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

1. 0,789 g EDTA (2,699 mmol) bir miktar suda çözüldü ve daha sonra 0,05 ml  $\beta$ -merkaptotanol ilave edildi, pH= 7,0'a ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.2. Eritrositlerin Yıkanmasında Kullanılan Çözeltiler

1. 11,92 g (0,16 M) KCl alındı ve hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.3. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M Tris (pH= 8,0): 12,14 g Tris, 0,186 g (6,36 mM) EDTA ve 0,952 g (100 mM) MgCl<sub>2</sub> alınarak 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH= 8,0'a ayarlandı ve daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 20 mM GSSG Çözeltisi: 0,0618 g GSSG alınarak toplam hacim 5 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

3. 2 mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH alınarak hacmi saf suyla 5 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.4. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler

1. Rejenerasyon tamponu 1 (0,1 M Na-asetat, 0,5 M NaCl, pH= 4,5) : 4,1 g Na-asetat ve 14,61 g NaCl alınıp 250 mL suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2. Rejenerasyon tamponu 2 (0,1 M Tris/ HCl, 0,5 M NaCl, pH= 8,5) : 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl alınıp 250 mL suda çözüldü, pH= 8,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3. Dengeleme tamponu (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH= 6.0): 1,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,073 g EDTA ve 0,0385 g DTT alınarak 200 ml suda çözüldü ve pH=6,0'a ayarlandıktan sonra saf su ile toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.

4. Kolonunun yıkanması için kullanılan 1. tampon: (0,1 M K-asetat, 0,1 M K-fosfat, pH=7,85) : 1,225 g K-asetat ve 1,7 g K-fosfat karışımı 100 mL saf suda çözüldü ve pH=6,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 125 mL'ye tamamlandı.

5. Kolonunun yıkanması için kullanılan 2. tampon: (0,1 M K-fosfat, 0,1 M KCl, pH=7,85): 1,7 g K-fosfat ve 1,225 KCl karışımının hacmi saf su ile 100 mL'de çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 125 mL'ye tamamlandı.

6. Kolonunun yıkanması için kullanılan 3. tampon: (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, pH=7,85): 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,0292 g EDTA alınıp hacmi saf su ile 50 mL'de çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

7. Elüsyonu için kullanılan tampon (50 mM K-fosfat, 1 mM EDTA, 1 mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH=7,3): 0,34 g K-fosfat, 0,015 g EDTA, 0,0307g GSH ve 0,021 g NADPH alınıp 30 mL suda çözüldü ve pH=7,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH= 8,8): 6,055 g Tris alınıp 25 mL suda çözüldü ve pH =8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH= 6,8): 6,055 g Tris alınıp 25 mL suda çözüldü ve pH =6,8'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid - %0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid alınarak toplam hacim saf su ile 50 mL 'ye tamamlandı.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat alınarak toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 2 g SDS alınıp hacmi saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.



6. Yürütme tamponu: 6,04 g Tris ve 30,04 g glisin alınarak 1000 mL saf suda çözüldü. Daha sonra %10'luk SDS'den 20 mL ilave edildi ve pH=8,3'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 2 L'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: pH= 8.0 olan 1 M Tris-HCl'den 0,5 mL, %10'luk SDS'den 1 mL alınıp üzerine %100'lük gliserinden 1 mL ilave edildi. Daha sonra %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak eklendi ve son hacim saf suyla 10 mL'ye tamamlandı. Oluşturulan bu karışımdan 950 µL alınıp üzerine 50 mL β-merkaptoetanol ilave edildi. Böylece numune tamponu hazırlanmış oldu.

8. Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti: 50 mL izopropanol, 10 mL TCA alınıp toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 30 mL su karıştırılarak içerisine 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi eklenip çözüldü ve daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit alınarak toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.6. Diyaliz İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA (pH: 7,5): 1,211 g Tris, 0,29225 g EDTA alınarak 975 mL saf suda çözüldü ve pH 7,5'a ayarlandı ve daha sonra toplam 1000 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.7. Amonyum Sülfat Çökeltisinin Çözünmesi İçin Kullanılan Tampon:

1. 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,5): 0,68 g potasyum fosfat alınarak 80 mL saf suda çözüldü ve pH'ı 7,5'e ayarlanarak toplam saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### 3.3.8. İlaç ve Kimyasal Maddelerin Stok Çözeltileri:

1. **Beloc:** 5 mg beloc içeren 5 mL'lik hazır solüsyon belirli oranlarda seyreltilerek kullanıldı.
2. **Prednol:** 40 mg prednol 2 mL saf suda çözüldü ve belirli oranlarda seyreltilerek kullanıldı.
3. **Vitamin C:** 5 mL'de 0,5 g vitamin C içeren hazır solüsyon belirli oranlarda seyreltilerek kullanıldı.
4. **Levofloksasin:** 5 mg/mL oranında 100 mL'lik infüzyon solüsyonu içeren flakonlar kullanıldı.
5. **Tylosin:** 0,05 g alınarak toplam hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı.

### 3.4. GR Enziminin Aktivite Ölçümü

GR enzimin aktivitesi, enzimin katalizlediği



340 nm'de maksimum absorbans verdiğinden dolayı, harcanan NADPH'nin 340 nm'deki absorbans azalışı dikkate alınarak hesaplandı (Calberg ve Mannervik 1985). Aktivite ölçümünde için kullanılan çözeltiler ve miktarları Tablo 3.2.1'de gösterildi.

Tablo 3.2.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözelti	Numune (µl)	Kontrol (µl)
6,36 mM EDTA ve 100 mM MgCl <sub>2</sub> içeren 1 M Tris, (pH= 8,0)	200	200
20 mM GSSG	100	100
2 mM NADPH	100	100
Saf su	595	600
Enzim numunesi	5	-

Enzim ünitesi,

EÜ/mL :  $\Delta\text{OD}/6,22 \times V_T/V_E \times S_F$  formülüne göre hesaplandı. Formüldeki simgeler

EÜ: mL'deki enzim ünitesi

$\Delta\text{OD}$  : 1 dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri

$V_T$  : Toplam küvet hacmi

$V_E$  : Enzim numunesinin hacmi

$S_F$  : Seyreltme faktörü

### **3.5. Protein Tayini**

#### **3.5.1. Kalitatif Protein Tayini**

Tez çalışmasının ilgili aşamalarında kalitatif protein tayini proteinlerin yapısında yaklaşık olarak 1/3 oranında bulunan ve aromatik özelliklere sahip olan triptofan ve tirozin amino asitlerinin spektrofotometrik olarak 280 nm'de absorbans göstermeleri esasına göre tayin edildi (Segel 1968).

#### **3.5.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini**

Tez çalışmasının ilgili aşamalarında kantitatif protein tayini Bradford metodu dikkate alınarak yapıldı. Bu metot proteinlerin negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G 250 boyası ile 595 nm'de absorbans veren mavi renkli bir kompleksin oluşumuna dayanmaktadır. Bu metodun hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Kompleksin oluşumu hızlıdır ve yaklaşık olarak 2 dk içinde tamamlanır.

Bu metotla kantitatif protein tayinin yapılabilmesi için standart grafiğe ihtiyaç duyulur. Bu amaçla 1 mL'sinde 1 mg standart sığır albümin proteini içeren çözeltiden deney tüplerine 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL çözelti alınarak hacimleri saf su ile 0,1 mL'ye tamamlandı ve daha sonra üzerine beşer mL Coomassie Brilliant Blue G 250 çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı ve 10 dk inkübasyon süresinden sonra 595 nm'de absorbanslar ölçüldü. Kör olarak 0,1 mL enzim çözeltisi kullanıldı. Elde edilen veriler ile µg protein değerlerine karşı absorbans değerleri bulunarak µg protein-absorbans grafiği oluşturuldu (standart grafik) (Bradford, 1976).

### 3.6. İnsan Kanının Temini ve Hemolizat Hazırlanması.

Deneyde kullanılan insan kanı Bingöl Devlet Hastanesi Kan Bankasından temin edildi. Alınan kan soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirildi ve hemen kullanıldı. Kan numuneleri 2'şer mL'lik ependorf tüplerine konarak 2500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Böylece eritrosit peleti elde edilmiş oldu. Elde edilen eritrosit peletleri hacimlerinin 2 katı kadar 0,16 M KCl çözeltisi ile üçer defa yıkandı. Yıkamış eritrosit peletleri daha sonra hacimlerinin 5 katı kadar buzlu su ile muamele edilerek hemolizat elde edildi. Daha sonra elde edilen hemolizat +4 °C'de 23.000 g'de 45 dk santrifüj edilerek hücre zarlarının çöktürülmesi sağlandı. Enzim saflaştırılması çalışmalarında kullanılmak üzere süpernatant damalıkla dikkatli bir şekilde alınarak +4 °C'de muhafaza edildi (Hunaiti ve Soud, 2000).

### 3.7. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Elde edilen hemolizatta safsızlıkların azaltılması ve daha konsantre enzim numunesinin elde edilebilmesi için amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Amonyum sülfat tuzu diğer nötral tuzlarda da olduğu gibi düşük derişimde proteinlerin çözünürlüğünü artırırken (salting in) yüksek derişimlerde proteinleri çevreleyen su moleküllerine kendilerine bağlayarak proteinlerin çökmesine sebep olurlar (salting out). Amonyum sülfat tuzunun bu özelliğinden faydalanılarak hemolizatta %30-70 arasında çöktürme yapılarak GR enzim moleküllerinin çoğunun çökmesi sağlandı (Erat, 2002). Amonyum sülfat çöktürmesi yapılırken karışıma eklenen amonyum sülfat miktarları,

gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$  formülünde hesaplandı. Bu formülde;

V: Enzim çözeltisinin hacmi,

S<sub>1</sub>: 1'in kesri olarak amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğunu simgelemektedir.

Amonyum sülfat çöktürmesi yapılırken numuneler tüpler alındıktan sonra her defasında 13.500 g'de +4 °C'de 15 dk santrifüj işlemi yapılarak çöktürme işlemi gerçekleştirildi.

Her bir numunenin hem süpernatantında hem de çökeltisinde enzim aktivitesi tayin edilerek sonuçlar kayıt altına alındı.

Daha sonra enzimi içeren çökelti minimum K-fosfat tamponunda (50 mM, pH: 7,5) çözüldü. Elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına konarak 2 saat süre ile +4 °C'de 10 mM K-fosfat + 1 mM EDTA (pH: 7,5) tamponuna karşı 2 defa değiştirilmek sureti ile diyaliz işlemi gerçekleştirildi (Smith, 1988).

### **3.8. Enziminin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılması**

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu kısmen saflaştırılmış olan enzim numunesinden GR enziminin tam olarak saflaştırılması için 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite jeli kullanıldı. Bu amaçla öncelikle 10 mL'lik kolon yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP sepharose 4B jeli tartılarak uygun bir behere konuldu. Daha sonra bu jel saf su ile birkaç defa yıkanarak boya gibi safsızlıklar elimine edildi ve bu işlemle beraber jel de şişmiş oldu. Daha sonra su trompu kullanılarak jeldeki hava uzaklaştırıldı. Böylece jel hazır hale getirildi. Hazırlanmış olan bu jel 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA + 1mM DTT (pH: 6,0) tamponu içinde süspanse edildi. Süspanse edilen jel daha önce hazırlanmış olan 1x10 cm ebatlarındaki kapalı sistem oluşturu ve 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA + 1mM DTT (pH: 6,0) tamponunu içeren soğutmalı kolona pipet yardımıyla tatbik edilerek kolona paketlenildi. Kolondan daha sonra yeterli miktarda dengeleme tamponu (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH: 6,0) ve yıkama tamponu (0,1 M K-asetat, 0,1 M K-fosfat, pH= 6,0) geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlandı. Kolonun dengelenmiş olduğu elüatın ve dengeleme tamponunun 280 nm'deki absorbanlarının karşılaştırılması sonucu tespit edildi. Daha sonra dengelenmiş olan kolona diyalize tabi tutulmuş olan enzim numunesi pipet vasıtasıyla kolonun cidarlarına küçük miktarlarda tatbik edildi (Danner et al. 1977, Boggaram et al. 1979, Carlbeg and mannervik 1981). Enzim numunesinin tatbikinden sonra kolon sırasıyla 25'şer mL 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH: 7,85), 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl (pH=7,85) ve 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1 mM EDTA (pH: 7.85) tamponları ile yıkandı. Yıkama işleminin tamamlandığı son yıkama tamponunun absorban değerinin köre eşit ya da yakın (0,05 civarında) olması durumundan anlaşıldı. Yıkama işleminden sonra kolona tutunmuş olan GR enzimi elüsyon tamponu ile (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA, 1mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH 7,3) elüe edildi. Elüsyonlar

1,5 mL'lik tüplere alındı ve aktivite değerleri spektrofotometrik olarak tespit edildi. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere porsiyonlara bölünerek derin dondurucuda inkübe edildi.

### **3.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Enzim saflığının kontrol edilebilmesi için Laemmli metoduna göre SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi yapıldı (Laemmli 1970). Bu iş için elektroferezde kullanılan özel cam plakalar önce saf su ve daha sonra alkol ile yıkanarak temizlendi. Camlardan biri aralık oluşturucu bariyer içerdiğinden iki cam arasında bir aralık oluşmuş oldu. Camlar daha sonra elektroferez aletinin sızdırmayı önleyen bir sünger bulunduran jel dökme aparatına yerleştirildi. Bu arada taze hazırlanmış olan %8'lik ayırma jeli (1 M Tris-HCl (pH: 8,8)'den 5 mL, %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisinden 4,4 mL, %10'luk amonyum persülfat çözeltisinden 0,1 mL, %10'luk SDS'den 0,2 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve saf sudan 3,13 mL karıştırılarak elde edilir) pipet vasıtasıyla üstte 2-3 cm kalıncaya kadar cam plakaların arasındaki boşluğa dolduruldu ve hava kabarcığı oluşmasının önlenmesi için jelin üzerine pipet ile bir miktar izopropanol eklendi ve jel donduktan sonra üstteki propanol döküldü. Sonrasında yine taze hazırlanmış %3'lük yığma jeli (1 M Tris-HCl (pH: 6,8)'den 0,44 mL, %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisinden 0,8 mL, %10'luk amonyum persülfat çözeltisinden 0,03 mL, %10'luk SDS'den 0,03 mL, %5'lik TEMED'den 0,03 mL ve saf sudan 2,45 mL karıştırılarak elde edildi) üstte boş bırakılan 2-3 cm'lik kısma pipet yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde eklendi. Üstteki henüz donmamış olan yığma jelinin içine numune tatbik edilecek olan kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Jelin donmasından hemen sonra tarak dikkatlice çıkarılarak kuyular hazır hale getirildi. Yığma ve ayırma jelleri böylece hazırlanmış oldu. Sonrasında bu jellerin bulunduğu cam plakalar ilgili aparattan çıkarılarak elektroferez tankına yerleştirildi. Elektroferez tankının alt ve üst kısımları yürütme tamponu (bölüm 3.1.3.4'de hazırlanışı anlatıldı) ile dolduruldu. Daha sonra enzim örneğinden 100 µL alındı ve her üzerine bölüm 3.1.3.4'de hazırlanışı anlatılan 100 µL numune tamponu ve 100 µL gliserol eklenip 10 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Böylece denature olmuş proteinler elektroferez tankında yürümeye hazır hale geldi. Bu karışımdan ortalama olarak 20 µg protein içerecek şekilde hazırlanmış enzim örnekleri ve standart protein numunesi kuyulara tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak örnekler önce 80 voltta 20

dakika boyunca yürütüldü. Daha sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin yaklaşık olarak iki saat boyunca yürütüldü mavi boyanın jelin alt kısmına gelmesi sonrası yürütme işlemi durduruldu. Yürütme işlemi bitince akım kesilerek, jel plakalar arasından dikkatlice çıkartıldı ve bölüm 3.1.3.4'de çözeltilerinin hazırlanışı anlatılan sabitleştirme, boyama ve yıkama işlemleri yapıldı. SDS-PAGE jeli sabitleştirme çözeltilisinde yaklaşık olarak 30 dakika bekletildikten sonra boyama çözeltilisinde 3 saat boyunca boyandı, boyanmış olan jel yıkama çözeltilisine alınarak rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar (yaklaşık 1 saat) yıkandı. daha sonra jelin fotoğrafı çekildi ve +4 °c'de muhafaza edildi.

### **3.10. Kinetik Çalışmalar**

Kinetik çalışmalarda enzim aktivitesi üzerine beloc, prednol, tylosin, levoflaksasin ve C vitamini maddelerinin etkileri araştırıldı. Çalışmalarda öncelikle söz konusu bileşikler için ön denemeler yapıldı. Daha sonra uygun bu maddelerden derişimlerde enzimin bulunduğu ortama katılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri sonucu elde edilen aktivite değerleri ve ilgili derişimler kullanılarak % Aktivite-[İlaç] grafikleri çizildi ve bu grafiklerin yardımıyla her bir ilaç için IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Daha sonra C vitamini için 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K<sub>i</sub> sabiti tespit hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

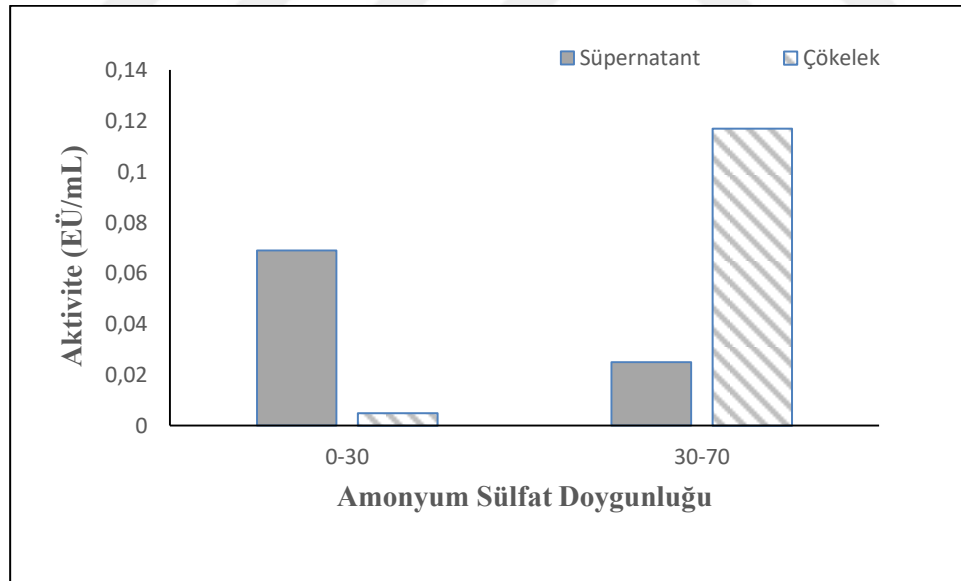
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Ait Sonuçlar

Amonyum sülfat çöktürmesi, bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Amonyum sülfat çöktürme sonuçları

% Amonyum Sülfat	Süpernatant (EÜ/ML)	Çökelti (EÜ/ML)
0-30	0,069	0,025
30-70	0,005	0,117

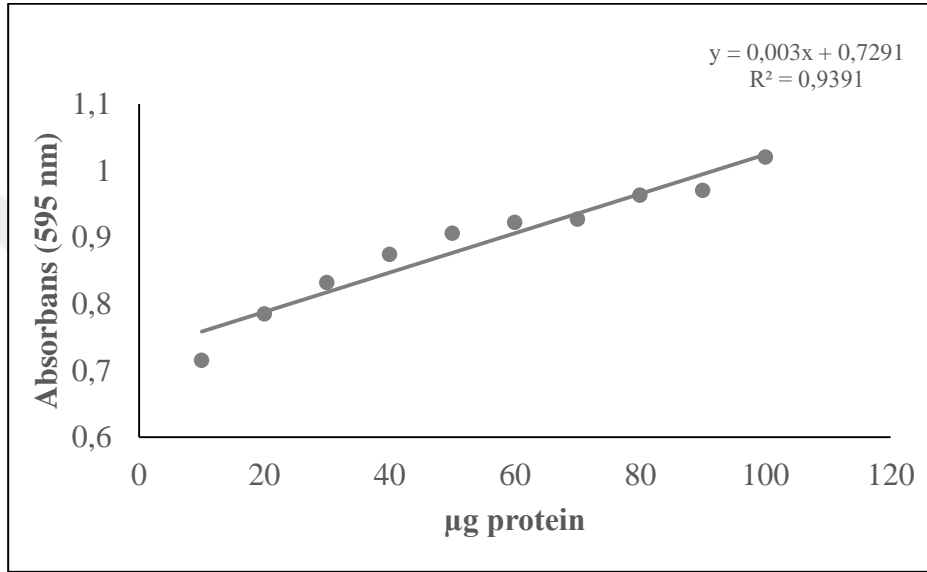


Şekil 4.1. İnsan eritrosit GR enziminin amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları



#### 4.2. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları

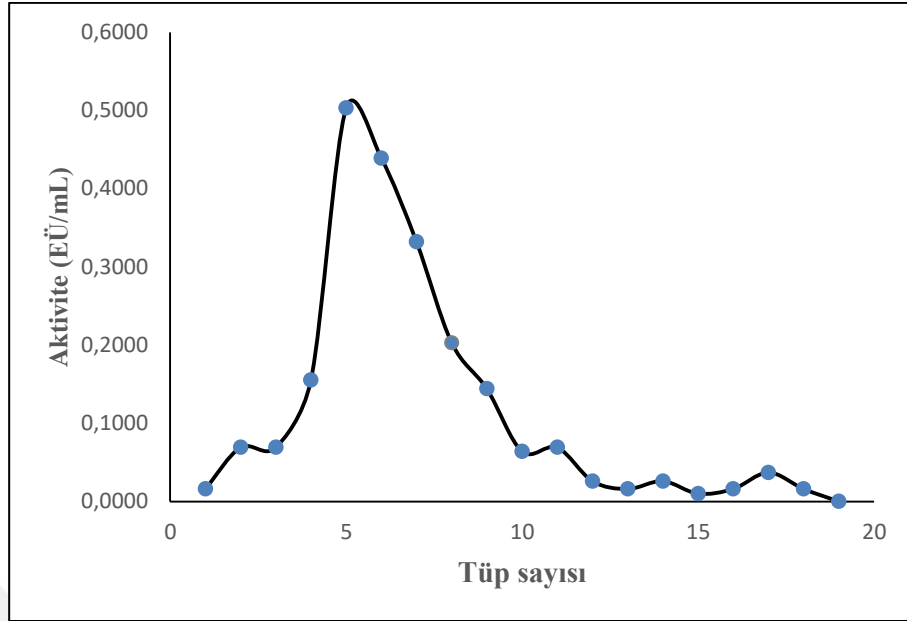
Çalışmanın her aşamasında yapılması gereken kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile belirlendi. Bölüm 3.2.b'de açıklandığı şekilde standart grafik hazırlandı ve Şekil 4.2'de gösterildi. Safılaştırma aşamalarında elde edilen enzim numunelerindeki kantitatif protein tayini bu standart çizelgeye göre hesaplandı.



Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

#### 4.3. 2', 5' -ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisinin Elüsyon Sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim numunesinden GR enziminin tam olarak saflaştırılması amacıyla numune 2', 5' -ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kolonuna tatbik edildi. Daha sonra Bölüm 3.5'te açıklandığı şekilde enzim elüsyonu gerçekleştirildi. Elüatlarda ayrı ayrı aktivite ölçüm yapılarak sonuçlar Şekil 4.3'te gösterildi.



Şekil 4.3. İnsan eritrosit GR enziminin afinite kolonundan elüsyonu

#### 4.4. Saflaştırma Çalışmalarının Sonuçları

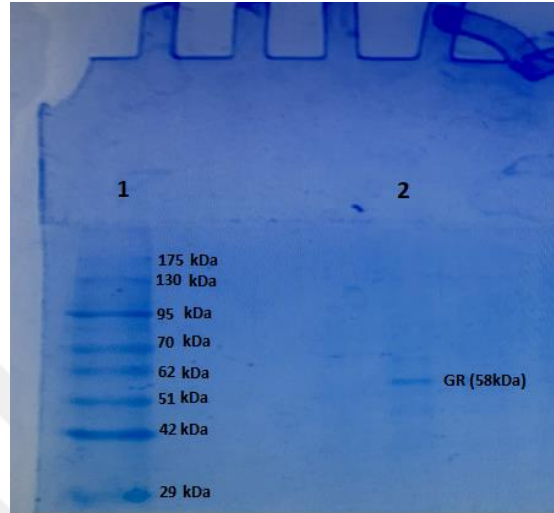
Bu çalışmada insan eritrositlerinden glutatyon redüktaz enzimi, hemojenat hazırlanması amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi sonrası 0,539 EÜ/mg spesifik aktivitesine sahip enzim, %53,73 verimle 34,77 kat saflaştırıldı. Saflaştırma kademelerine ait sonuçlar Tablo 4.4'de gösterildi.

Tablo 4.2. Saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg.p)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	24	0,117	7,536	180,872	2,808	0,0155	100,0	1,0
Amonyum sülfat	10	0,182	6,606	66,06	1,820	0,0275	64,80	1,77
Afinite	3	0,503	0,933	2,799	1,509	0,539	53,73	34,77

#### 4.5. SDS-PAGE Yöntemi ile GR Enziminin Saflık Kontrolü Sonuçları

2', 5' -ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile elde edilen enzimin saflığının kontrolü amacıyla bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE gerçekleştirildi ve elde edilen jelin fotoğrafı çekilerek Şekil 4.4'te verildi.



Şekil 4.4. SDS-PAGE fotoğrafı (1. kuyu: Standart proteinler (29 - 175 kDa), 2. kuyu: afinite kolonundan elde edilen GR enzimi).

##### 4.5.1. Kinetik Çalışmaların Sonuçları

Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi beloc, prednol, tylosin, levoflaksasin ve C vitamini ilaçları için kinetik çalışmalar yapıldı. Yapılan bu çalışmalarda beloc (3,5-4500  $\mu$ M aralığında) ve prednolun (5-53,55 mM aralığında) enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki yapmadığı tespit edildi. Tylosin ve levoflaksasin ilaçları enzimi aktive ederken C vitamininin enzimi inhibe ettiği gözlemlendi. Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi tylosin, levoflaksasin ve C vitamini için Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de gösterildiği gibi en az 5 farklı konsantrasyon kullanılarak %Aktivite-[İlaç] grafikleri çizildi (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). C vitamini için çizilen grafik yardımıyla  $IC_{50}$  değeri 115,5 mM olarak bulundu. Daha sonra C vitamini için Tablo 4.6'de gösterildiği gibi 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek (Şekil 4.8)  $K_i$  sabiti 243,143 mM olarak hesaplandı.  $IC_{50}$  değerleri ve  $K_i$  sabiti Tablo 4.6'de gösterildi.

Tablo 4.3. Tylosin ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su ( $\mu\text{L}$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) ( $\mu\text{L}$ )	NADPH (2 mM) ( $\mu\text{L}$ )	Enzim hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Tylosin ( $\mu\text{L}$ )	Toplam hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki tylosin konsant. ( $\mu\text{M}$ )
500	200	100	100	100	-	1000	-
495	200	100	100	100	5	1000	1,172
485	200	100	100	100	15	1000	3,517
455	200	100	100	100	45	1000	10,552
450	200	100	100	100	50	1000	11,725
420	200	100	100	100	80	1000	18,760

Tablo 4.4. Levoflaksasin ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su ( $\mu\text{L}$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) ( $\mu\text{L}$ )	NADPH (2 mM) ( $\mu\text{L}$ )	Enzim hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Levoflaksasin ( $\mu\text{L}$ )	Toplam hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki levoflaksasin konsant. ( $\mu\text{M}$ )
550	200	100	100	50	-	1000	-
540	200	100	100	50	10	1000	138
537	200	100	100	50	13	1000	179,4
535	200	100	100	50	15	1000	207
530	200	100	100	50	20	1000	276
420	200	100	100	50	30	1000	414

Tablo 4.5. Vitamin C ile yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve inhibitör konsantrasyonları

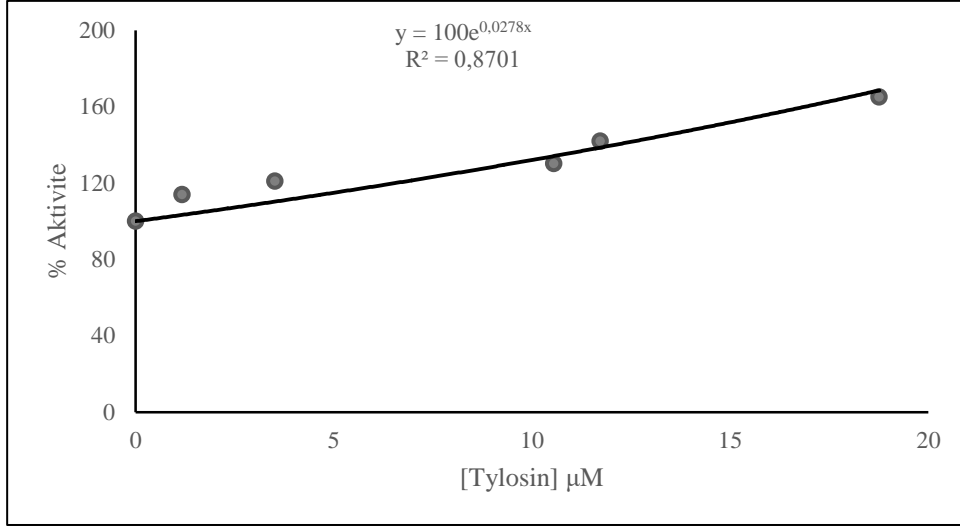
Saf Su ( $\mu\text{L}$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) ( $\mu\text{L}$ )	NADPH (2 mM) ( $\mu\text{L}$ )	Enzim hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Vitamin C ( $\mu\text{L}$ )	Toplam hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki Vitamin C konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
570	200	100	100	20	10	1000	5,6
480	200	100	100	20	100	1000	56
380	200	100	100	20	200	1000	112
280	200	100	100	20	300	1000	168
180	200	100	100	20	400	1000	224

Tablo 4.6. Vitamin C için  $K_i$  sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve inhibitör konsantrasyonları

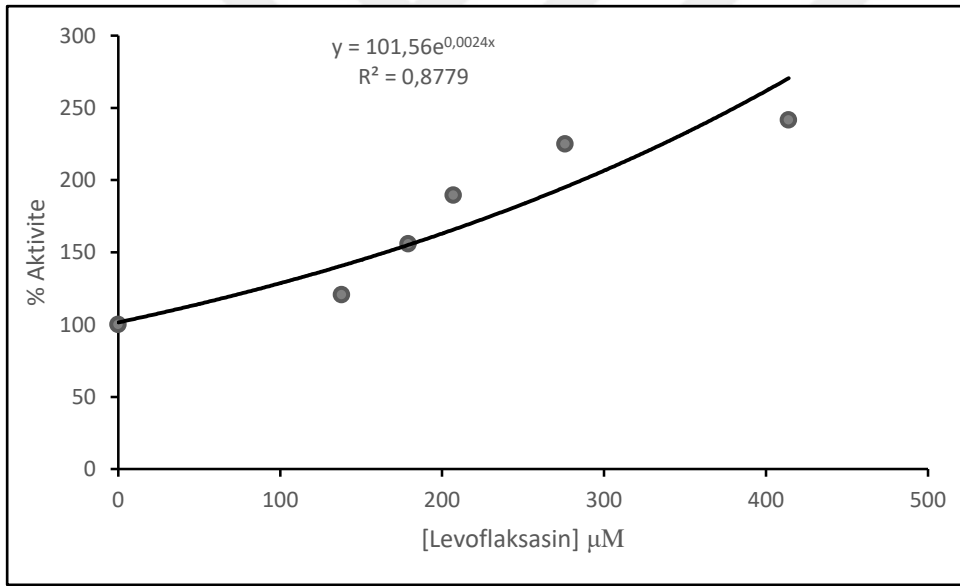
Saf Su ( $\mu\text{L}$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) hacmi ( $\mu\text{L}$ )	NADPH (2 mM) ( $\mu\text{L}$ )	Enzim hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki inhibitör hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Toplam hacim ( $\mu\text{L}$ )	Küvetteki substrat (GSSG) kons. (mM)	Küvetteki inhibitör kons. (mM)
670	200	10	100	20	-	1000	0,2	-
655	200	25	100	20	-	1000	0,5	-
630	200	50	100	20	-	1000	1	-
580	200	100	100	20	-	1000	2	-
530	200	150	100	20	-	1000	3	-
570	200	10	100	20	100	1000	0,2	56
555	200	25	100	20	100	1000	0,5	56
530	200	50	100	20	100	1000	1	56
480	200	100	100	20	100	1000	2	56
430	200	150	100	20	100	1000	3	56
370	200	10	100	20	300	1000	0,2	168
355	200	25	100	20	300	1000	0,5	168
330	200	50	100	20	300	1000	1	168
280	200	100	100	20	300	1000	2	168
230	200	150	100	20	300	1000	3	168
270	200	10	100	20	400	1000	0,2	224
255	200	25	100	20	400	1000	0,5	224
230	200	50	100	20	400	1000	1	224
180	200	100	100	20	400	1000	2	224
130	200	150	100	20	400	1000	3	224

Tablo 4.7. Vitamin C için elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değeri ve  $K_i$  sabiti

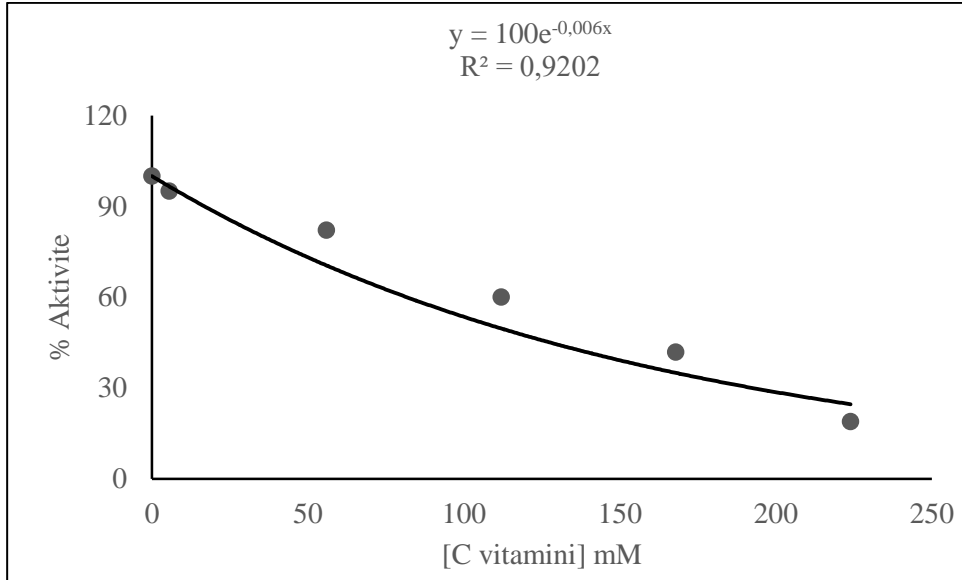
İlaç	$\text{IC}_{50}$ (mM)	[I] (mM)	$K_i$ (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon türü
Vitamin C	115,5	[I <sub>1</sub> ]= 56 mM [I <sub>2</sub> ]= 168 mM [I <sub>3</sub> ]= 224 mM	$K_{i1}$ : 224,89 $K_{i2}$ : 304,90 $K_{i3}$ : 199,64	243,143±54,95	Yarışmasız



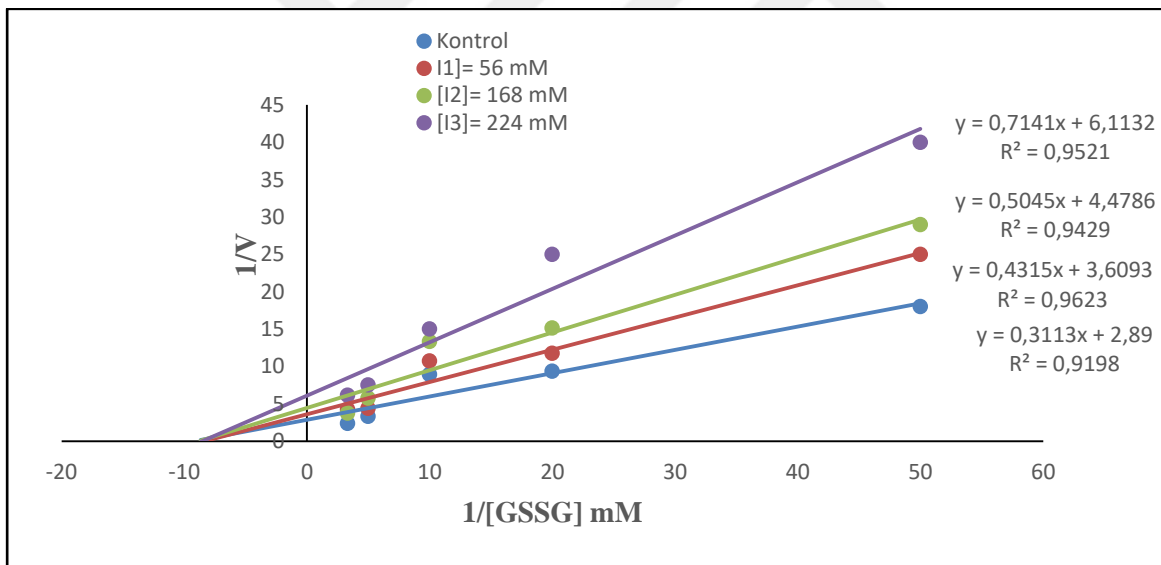
Şekil 4.5. Tylosin ilacının GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.6. Levoflaksasin ilacının GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.7. Vitamin C ilacının GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.8. Vitamin C için 5 farklı substrat ve 3 sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Glutasyon redüktaz enzimi (GR; EC: 1.8.1.4) bir flavo enzimdir ve NADPH varlığında GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizler (Staal and Veigel 1969). Bu indirgenme olayında büyük bir rol oynayan NADPH ise pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonlarında görev alan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimlerinin görev yaptığı reaksiyonlar sonucunda elde edilmektedir (Çiftci vd. 2000).

Glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bu önemli reaksiyon:



Antioksidan bir enzim olarak bilinen glutasyon redüktaz yukarıda verilen reaksiyondan da görüldüğü gibi GSH üretimine sebep olmaktadır. Üretilen bu GSH'ın metabolizmada birçok detoksifikasyon olayında görev aldığı bilinmektedir. Örneğin; eritrositlerde hemoglobindeki demir iyonunun  $\text{Fe}^{+2}$  şeklinde korunması için GSH zorunludur.

Kırmızı kan hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık olarak 500'dür. Bu oranın düşmesi durumunda demir iyonu  $\text{Fe}^{+2}$  şeklinde tutulamayacağından dolayı alyuvarların daha çok hemolize maruz kaldıkları tespit edilmiştir. Kullanılan ilaçların ve ksenobiyotiklerin G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini inhibe etmesi durumunda NADPH ve GSH'ın miktarları azalacağından dolayı eritrositlerin etkilenmesi ve hemolizi söz konusu olur (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

GSH (indirgenmiş glutasyon) metabolizmada enzimatik yapıda olmayan bir molekül olarak görev alır (Saez *et al.*1990). GSH antioksidan bir molekül olmakla beraber reaktif oksijen türlerinin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştürülmesi, diğer peroksitlerin giderilmesi, sülfhidril gruplarının indirgenmiş halde korunması, vücuda giren ilaç ve kimyasallardan kalan ve atılımı zor olan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu reaksiyonlarında da substrat olarak görev alır (Knapen *et al.*1990).



Yukarıda anlatılan metabolik olaylardan da anlaşıldığı gibi antioksidan metabolizmada son derece önemli olan glutatyon redüktaz enzimi fen bilimlerinin her alanında çalışan bilim insanları tarafından önemsenmiş ve çalışılmıştır. Örneğin; insan eritrositlerinden (Martingten and Rosemeyer 1979), domuz eritrositlerinden (Boggaram *et al.* 1979), dana karaciğerinden (Calberg and Mannervik 1981), buzağı karaciğerinden (Le Trang *et al.* 1983), koyun beyninden (Açan and Tezcan 1989), birçok bakteriden (Jiyang *et al.* 1995), çok sayıda bitkiden (Halliwell and Foyer 1978, Belawski and Joy 1986, Mahan and Burke 1987, Madamanchi *et al.* 1992, Lamotte *et al.* 2000) saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Saflaştırılan enzimin amino asit dizilimi ve aktif kısımları belirlenmiştir (Douglas 1987, Krauth-Siegel *et al.* 1998). Ayrıca insan, fare ve bazı bakteri hücrelerinden GR cDNA'ları elde edilmiş ve bazı moleküler çalışmalar yapılmıştır (Jiang *et al.* 1995).

İnsan eritrosit GR enziminin yapısı ile ilgili yapılan çalışmalarda enzimin genelde homodimer olduğu ve her alt birimin 478 adet aminoasitten oluştuğu ve alt birimler arasında disülfid bağı oluşturan aminoasidin 90. sırada bulunan sistein aminoasidi olduğu belirlenmiştir. Enzimin aktif merkezindeki aminoasitlerin tespiti çalışmalarında yapılan çalışmalar sonucu arginin, tirozin, ve histidin aminoasitlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Douglas 1987).

Değişik kaynaklardan elde edilen glutatyon redüktaz enzimleri ile yapılan kinetik çalışmalarda birçok ilaç ve kimyasal kullanılmıştır. Genellikle arsenik içeren bileşiklerin enzim inhibisyonuna sebep olduğu da görülmüştür (Styblo and Thomas 1995, McCallum and Barrett 1995, Styblo *et al.* 1997).

Ayrıca Erat tarafından yapılan doktora tez çalışmasında sefotaksim sodyum, sefodizim disodyum ve metronidazolun gibi antibiyotiklerin insan ve sığır eritrosit GR enzimini inhibe ettiği bulunmuştur (Erat 2002).

### **Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

2', 5' ADP sepharose 4B afinite kromotografisi kolonuna yüklenecek enzim çözeltisinde enzim moleküllerinin konsantrasyonunun yüksekliği saflaştırmanın verimliliği açısından son

derece önemlidir. Bundan dolayı afinite kolonuna yüklenecek karışımdan safsızlıkların giderilmesi için amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bilindiği gibi çok değerlikli elektrolitler olan proteinler yüksek tuz konsantrasyonunda su moleküllerini kaybederler ve çökerler (salting-out). Öncelikle %0 - %30 amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürme işlemi uygulanmış çökelekte aktivite kontrolü yapılarak aktivitenin düşük olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra %30-70 aralığında çöktürme yapılmıştır (Erat 2002).

Elde edilen bu çöktürme aralığı literatürdeki diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin; koyun beyini GR enzimi için bulunan çöktürme aralığı %35-55, bıdırcın karaciğeri için %0-60 olarak bulunmuştur (Açan and Tezcan 1989).

### **Kantitatif Protein Tayini**

Tez çalışmasının her aşamasında yapılan kantitatif protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin esası Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle kompleks oluşturması esasına dayanır. Negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası, ortamda bulunan pozitif yüklü protein molaküllerine bağlanarak bir kompleks oluşturur. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kırmızı renkte iken  $\lambda_{max} = 465$  nm dalga boyunda ve mavi renkte iken ise  $\lambda_{max} = 595$  nm dalga boyunda iki farklı yapıda bulunur. Bu boyanın proteinlerle olan tepkimesi sonucu kırmızı renk mavi renge dönüşür. Ortamda bulunan protein molekülleri bu boya ile çok hızlı bir şekilde kompleks bir yapı oluşturma kabiliyetine sahiptirler. Bu işlemler sonucunda oluşan protein-boya kompleksi 595 nm'de maksimum absorbans gösterdiğinden dolayı spektrofotometrede kantitatif protein tayini 595 nm'de yapıldı. Bu yöntemin hassaiyet sınırları 1-100 mg aralığında olduğundan işlem çok hassas ve sağlıklı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu amaçla öncelikle 1 mL'sinde 1 mg BSA içeren çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu$ L konuldu. Daha sonra saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve her bir tüpün içine 5 mL renklendirme reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı ve 10 dk inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpün absorbansı 595 nm'de ölçüldü. Elde edilen verilerle standart grafik çizildi (Şekil 4.2) ve bu standart grafik yardımıyla tüm aşamalardaki kantitatif protein tayini gerçekleştirildi (Bradford, 1976).

## 2', 5' -ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisinden Elüsyon

Şekil 4.3'ten görüldüğü gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numunenin 2', 5' -ADP Sepharose-4B afinite kromatografisine tatbik edilerek enzimin elüsyonu gerçekleştirildi ve elüatlar 0,5'şer mL'lik 20 adet tüpte toplandı. Şekilde görüldüğü gibi enzim aktivitesinin çok düşük olduğu tüpler 1., 2., 3., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19. ve 20. tüplerdir. Dolayısıyla bu tüplerdeki numuneler işleme alınmadı. Ancak 4., 5., 6., 7., 8. ve 9. tüpler enzim aktivitesinin yüksek olduğu tüpler tespit edildi. Daha sonra bu tüpler kinetik ve SDS-PAGE çalışmalarında kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi.

## Saflaştırma Sonuçları

2', 5' -ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılan GR enziminin spesifik aktivitesi, % verimi ve saflaştırma katsayısının hesaplanması için saflaştırma tablosu çizilerek Tablo 4.1'de gösterildi. Tablo 4.1'den görüldüğü gibi 0,539 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip olan GR enzimi % 53,73 verimle 34,77 kat saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi enzim ya da protein saflaştırma çalışmalarında bilim insanları tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü afinite kromatografisi iyon değişim kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi vb. kromatografi çeşitlerine göre kısa zamanda büyük bir verimle saflaştırmaya izin verdiği için araştırmacılar için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca kullanılan kimyasal madde ve malzeme daha az olacağından ekonomik avantaj da sağlamaktadır. Bu avantajların yanı sıra saflaştırma süresinin diğer metotlara göre çok daha az olması enzimin aktifliğini muhafaza etmesi bakımından da önemlidir. Bu avantajlar dikkate alınarak bu çalışmada 2', 5' -ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanıldı. Bu jel genellikle NADPH/NADP<sup>+</sup> molekülünü substrat olarak kullanan enzimleri geri dönüşümlü olarak bağlamaktadır. Glutatyon redüktaz enzimi de NADPH molekülünü substrat olarak kullandığından dolayı bu jelle ilgisi vardır ve birçok çalışmada bu jel kullanılarak enzim saflaştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında bir boşluk var çok bilim insanının bu jeli kullanmak NADPH bağımlı bazı enzimleri saflaştırarak karakterize ettikleri görünmektedir. Örneğin Erat (2002) bu metotla 46,875 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip insan ve 75,301 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip sıgır eritrosit GR enzimleri sırası ile %28

verimle 4817,5 kat ve %12,86 verimle 31375,5 kat saflaştırmıştır. Yine Sarkat Salim (2017) yaptığı tez çalışmasında bu metotla 22,75 EÜ/mg.protein spesifik aktivitesine sahip bıldırcın karaciğeri GR enzimini %13,6 verimle 142,18 kat saflaştırmıştır. İlaveten Işık (2023) Işık ve Soydan, 2023 olmalı arkdaki kaynakçaya göre iskorpit balığı karaciğer dokusu GR enzimini 10,479 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip GR enzimini %28,3 verimle 25,9 kat saflaştırmıştır. Görüldüğü gibi bu tez kapsamında elde edilen spesifik aktivite yapılan bu çalışmalarla kıyaslandığında düşük bir değere sahiptir. Ancak elde edilen % verim ve saflaştırma katsayısı bu çalışmalarda elde edilen değerlere yakındır.

### **SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Saflaştırılan GR enziminin saflık derecesi SDS-PAGE ile belirlendi. Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi birinci kuyuda molekül kütleleri boşluk koy 29 ile 175 kDa arasında değişen 8 adet standart protein bantları ve ikinci kuyuda afinite kromatografisi sonucu elde edilen saf GR enziminin bandı bulunmaktadır. Şekilden de görüldüğü gibi saf enzimin yüklendiği kuyuda tek bant elde edilmiştir. Elde edilen bu tek bant enzimin tam olarak saflaştırılmış olduğunu ve molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 58 kDa civarında olduğunu göstermektedir. Bu molekül kütlesi literatür ile tam olarak uygunluk göstermektedir.

### **Kinetik Çalışmalar**

Bu tez kapsamında çokça reçete edilen beloc, prednol, tylosin, levoflaksasin ve C vitamini ilaçlarının insan eritrosit GR enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için kinetik çalışmalar yapıldı. Yapılan bu kinetik çalışmalarda beloc 3,5-4500 µM, prednol 5-53,55 mM, tylosin 1,172-18,76 µM, levoflaksasin 138-414 µM ve C vitamini 5,6-224 mM küvet konsantrasyonlarında çalışıldı (Tablo 4.5, 4.6, 4.7). Bu konsantrasyon aralıkları ilgili dalga boyunda spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde olduğundan dolayı tercih edildi. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda beloc ve prednol söz konusu derişim aralıklarında enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir aktivasyon ya da inhibisyon etkisi göstermedikleri tespit edildi.

Tylosin ve levoflaksasin ilaçlarının ise ilgili derişim aralılarında enzimi aktive ettikleri tarafımızdan tespit edildi (Tablo 4.3 ve 4.4, Şekil 4.5 ve 4.6). Şekil 4.5’den olacak görüldüğü gibi kontrol aktivitesi (ilaçsız) 100 iken tylosin 1,172  $\mu\text{M}$ ’da aktiviteyi 113,9’a; 10,552  $\mu\text{M}$ ’da 130,2’ye; 18,76  $\mu\text{M}$ ’da 165’e çıkarmaktadır. Bu sonuçlara göre 18,76  $\mu\text{M}$ ’lık tylosin aktiviteyi 100’den 165’e çıkarmıştır. Şekil 4.6’da olacak görüldüğü gibi kontrol aktivitesi (ilaçsız) 100 iken levoflaksasin 138  $\mu\text{M}$ ’da aktiviteyi 120,8’e; 207  $\mu\text{M}$ ’da 189,5’e; 414  $\mu\text{M}$ ’da 241,6’ya çıkarmaktadır. Bu sonuçlara göre 414  $\mu\text{M}$ ’lık levoflaksasin aktiviteyi 100’den 241,6’ya çıkarmıştır. Dolayısıyla tylosin ve levoflaksasin enzimi önemli dercede aktive etmiştir denilebilir.

Tablo 4.5 ve Şekil 4.7’den olacak görüldüğü gibi C vitamini kontrol aktivitesi (ilaçsız) 100 iken c vitamini 5,6 mM’da aktiviteyi 95’e; 112 mM’da 60’a; 224 mM’da 18,9’a düşürmüştür. Bu sonuçlara göre 224 mM’lık c vitamini aktiviteyi 100’den 18,9’ya indirmiştir. Bilindiği gibi biyokimya ve ilgili bilim sahalarında inhibisyon dereceleri  $\text{IC}_{50}$  değeri ve  $\text{K}_i$  sabitleri ile ifade edilmektedir. Dolayısıyla Şekil 4.3 grafiğinde elde edilen grafik denklemini yardımıyla toplam aktivitenin yarısının inhibisyonuna sebep olan inhibitör konsantrasyonu ( $\text{IC}_{50}$  değeri) 115,5 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca c vitamini için  $\text{K}_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çalışmalarda  $\text{IC}_{50}$  değerinin bulunduğu konsantrasyon aralıkları dikkate alınarak 3 sabit inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği çizilerek (Şekil 4.8) olacak c vitamini için  $\text{K}_i$  sabiti  $243,143 \pm 54,95$  mM olarak bulundu ve ayrıca inhibisyonun yarışmasız olduğu da grafikten anlaşıldı. Dolayısıyla c vitamini için yapılan kinetik çalışmalarda elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değeri ve  $\text{K}_i$  sabiti dikkate alındığında C vitamininin eritrosit GR enzimi için önemli bir inhibitörü olduğu ve enzimi inhibe ederken enzimin aktif bölgesi dışındaki bir bölgeye bağlandığı (yarışmasız) tarafımızdan tespit edilmiştir.

Literatüre bakıldığında GR enzimi ile ilgili birçok bilimsel çalışmanın yapıldığı görülmektedir. Örneğin; söz konusu enzim iskorpit balığı solungaç dokusundan saflaştırılıp enzim aktivitesi üzerine  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Cd}^{+2}$  katyonlarının etkisi araştırılmış ve bu katyonların enzimi inhibe ettiği bulunmuştur (Işık ve Soydan 2023). Yapılan başka bir çalışmada koyun dalak dokusu GR enzimi üzerine diklofenak sodyumun etkisi araştırılmış ve enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çoban, 2022). Diğer bir çalışmada söz konusu enzim insan eritrositlerinden saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine sefotaksim sodyum ilacının etkisi

araştırılmış ve sefotaksim sodyumun enzimi inhibe ettiği ortaya konmuştur (Erat, 2001). Ayrıca Çoban ve arkadaşları insan eritrosit GR enzimi üzerine  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Al^{+3}$  kationlarının etkisini araştırarak tamamının enzim üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduklarını bulmuşlardır (Çoban, 2007). Şentürk ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada bazı salisik asit türevlerinin insan eritrosit GR enzimi üzerine etkileri araştırılmış ve bu türevlerin enzimi inhibe ettiği görülmüştür (Şentürk, 2007). Çoban ve Çiftci tarafından sunulan tam metin bildiride  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $NaCl$  ve  $CH_3COONH_4$  bileşiklerinin koyun dalak dokusu GR enzimini inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Çoban *et al.* 2022).



## KAYNAKLAR

Acan, N. L, and Tezcan, E. F. (1989). Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Letters*, 250 (1),72-74.

Açan, L. (1990). Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara*.

Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22(4), 442-448.

Avdan, Enzymol., Johm, Wiley., and Sons inc., New York. 59, 103-167.bacteriophage T4. Nature, London, 227,680.

Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., and Ielpi, L. J. A. M. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 50, 145-152.

Blewski, W and Joy, K.W. (1986). Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea . *Phytochemistry*, 25, 2261-2265.

Boggaram, V., Brobjer, K. L., and Mannervik, B. (1979). Purufication of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crisitalization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.

Carlberg, I., and Mannervik B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 59, 484-490. doi:10.1016/s0076-6879(85)13062-4

Çiftci, M., Küfrevioğlu, Ö. I., Gündoğdu, M., and Özme, I. (2000). Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological research*, 41(1), 107-111.

Çoban, Ç., ve Çiftci, M. (2022). Bazı Bileşiklerin Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine İn Vitro Etkileri. *1st International Conference on Scientific and Academic Research*, 10-13 Aralık 2022, Konya.

Çoban, Ç., Temel, Y., ve Çiftci, M. (2022). Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine Diklofenak Sodyumun İn Vitro Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, **12**(3), 1624-1634.

Çoban, T. A., Senturk, M., Çiftci, M., and ufrevioglu, O. I. (2007). Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Protein and peptide letters*, **14**(10), 1027-1030.

Danielson, U. H., Jiang, F., Hansson, L. O., and Mannervik, B. (1999). Probing the kinetic mechanism and coenzyme specificity of glutathione reductase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 by redesign of the pyridine- nucleotide- binding site. *Biochemistry*, **38**, 9254-9263.

Danner J, Lenhoff H. M., and Heagy, W. (1977). Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH., *Analytical Biochemistry*, **82**, 586-590

Douglas K. T. (1987). Mechanizm of glutathione-dependent enzymes., Meister, A., (ed). Avdan. *Enzymol.*, John Wiley and Sons inc., New York. **59**, 103-167.

Erat, M., and Çiftci, M. (2003). *In vitro* effects of some antibiotics on glutathione reductase from sheep liver. *Journal of Enzyme and Medicinal Chemistry*, **18**, 545-550.

Erat, M., Şakiroğlu, H., ve Çiftçi, M. (2001). Bazı Antibiyotiklerin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi. *Ulusal Kimya Kongresi*, İstanbul, 2001.

Erat, M. (2002). *İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması*. Doktora tezi, Erzurum. 178 s.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **893**(1), 13-18.

George, D. L. and Franke U.(1976). *Cytogenet.Cell Genet.* **17**, 282-286.

Gözükara, M. E. (1997). *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. s. 1225.

Gülçin, İ. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International journal of food sciences and nutrition*, **56**(7), 491-499.



Halliwell, B. and Foyer, C. H. (1978). Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139, 9-17.

[https://www.researchgate.net/publication/332774758\\_Current\\_Developments\\_in\\_Antioxidant\\_Therapies\\_for\\_Spinal\\_Cord\\_Injury](https://www.researchgate.net/publication/332774758_Current_Developments_in_Antioxidant_Therapies_for_Spinal_Cord_Injury) 10:10 05.02.2024

Hunaiti, A. A., and Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *The Science of The Total Environment*, 248, 45-50.

Iribarne, F., Paulino, M., and Tapia, O. (2000). Hybride-transfer transition structure as a possible unifying redox step for describing the branched mechanism of glutathione reductase. Molecular-electronic antecedents. *Theoretical Chemistry Accounts*, 103, 451-462.

Işık, K., ve Soydan, E. (2023). İskorpit Balığı Solungaç Dokusundan Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Metal İnhibisyonunun İncelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 38(1), 221-233.

Jiang, F., Hellmans, U., Stroga, E., Bergman, B. and Mannervik B. (1995). Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *The Journal of Biological chemistry*, 270(39), 22882-22889.

Keha, E. E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2009). *Biyokimya*, 6. Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul. s. 645

Keha, E. E., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2015). *Biyokimya*. 11. Baskı, 635s. Erzurum: Aktif Yayınevi.

Kelner, M. J., and Montoya, M. A. (2000). Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2), 366-368.

Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., and Steegers, E. A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82(2), 171-184.

Krauth-Siegel, R. L., Arscott, L. D., Schönleben-Janás, A., Schirmer, R. H., and Williams, C.H. (1998). Role of active site tyrosine residues by human glutathione reductase. *Biochemistry*, 37, 13968-13977.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.

Lamotte, F., Vianey-Liaud, N., Duviau, M. P., and Kobrehel, K. (2000). Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4978-4983.

Le, Trang, N., Bhargava, K. K. and Cerami, A. (1983). Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analytical Biochemistry*. 133, 94-99.

Lehninger, A. L. (2005). Principles of biochemistry. Newyork, Worth Publishers Inc. 1248 p.

Lineweaver, H., and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 658-666.

Madamanchi, N. R., Anderson, R. G., Alscher, R. G., Cramer, C. L., and Hess J. L. (1992). Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*pisum sativum* L.) seedlinks and enzyme levels in ozone –fumigated pea leaves. *Plant. Physiol.*, 100, 138-145.

Mahan, J. R., and Burke, J. J. (1987). Purification and characterization of glutathione reductase from corn mesophyll chloroplasts. *Physiol. Plant*, 71, 352-35.

McCallum, M. J., and Barrett, J. (1995). Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27,393-401.

Patel, M. P., Marcinkeviciene, J., and Blanchard, J. S. (1998). Enterococcus faecalis glutathione reductase: purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O<sub>2</sub> conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 155-163.

Rendon, J. L., Calcagno, M, Mendoza-Hernandez, G., and Ondarza, R. N. (1986). Purification, properties and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 248 (1), 215-223.

Saez, G. T., Bannister, W. H., and Bannister, J. V. (1990). Free radicals and thiol compounds- the role of glutathione against free radical toxicity. In: Vina, J. (Ed). *Glutathione: Metabolizm and physiological functions*. CRC Press, Boca Raton. FL, USA, pp.237-254.

Segel, I. H. (1968). *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.

Siegel, R. L. K., Arscott, L. D., Janas, A. S., Schirmer, R. H., and Williams, C. H. (1998). Role of active site tyrsine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*. 37, 13968-13977.

Smith, I. K., Vierheller, T. L., and Thorne A.C. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175, 408-413.

Stadtman, E. R., (2002). Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597-604.

Stýblo, M., and Thomas, D. J. (1995). In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. *Biochemical pharmacology*, 49(7), 971-977.

Styblo, M., Serves, S. V., Cullen, W. R., and Thomas, D. J. (1997). Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chemical research in toxicology*, 10(1), 27-33.

Şentürk, M., Çiftçi, M., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2007). Bazı Salisilik Asit Türevlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi. *21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.*

Tamura, T., Tamura, N., Cejka, Z., Hegerl, R., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1996). Tricorn protease—the core of a modular proteolytic system. *Science*, 274(5291), 1385-1389.

Taser, P. (2010) *Glutatyon redüktaz enziminin hindi karaciğerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek lisans tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya anabilim dalı, s. 14.

Toribio, F., Martinet-Lara, Pascual, P., and Lopez-Barea, J. (1996). Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97.

Tutic, M., Lu, X., Schirmer, R. H., and Werner, D. (1990). Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA. *European journal of biochemistry*, 188(3), 523-528.

Worthington, D. J., and Rosemeyer, M. A. (1975). Glutathione Reductase from Human Erythrocytes: Molecular Weight, Subunit Composition and Aggregation Properties. *European Journal of Biochemistry*, 60(2), 459-466.

Properties. *European.*, and Rosemeyer, M. A. (1976). Glutathione reductase from human erythrocytes: catalytic properties and aggregation. *European Journal of Biochemistry*, 67(1), 231-238.

Yang, M. S., Chan, H. W., and Yu, L.C. (2006). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, 226, 126-130

Zubay, G. (1988). Chapter 5: Lipids. *Biochemistry Second Edition*, Macmillan Publishing Company, 154-175.

