

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP
DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu BULAK

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

BİNGÖL-2025

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitime başladığım ilk günden beri engin tecrübesiyle ve değerli bilgisiyle bana rehberlik yapan tez danışmanın sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, deneysel sürecimi gerçekleştirirken yaşadığım zorlukta sabrı, bilgisi ve desteğiyle bana yardımcı olan değerli hocam sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL'e, hayatım boyunca her daim yanımda olan ve sonsuz sevgisini esirgemeyen canım annem ve babama, aynı zamanda benimle birlikte zor ve stresli dönemlerimi çeken ve desteğini her zaman bana hissettiren canım kardeşim Güner Bulak'a ve canım dostum Büşra Kaya'ya ayrıca BAP-VF.2024.002 nolu tez projemi destekleyen BÜBAP birimine ve elemanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Cansu Bulak

Bingöl 2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	iix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Serbest Radikaller	5
1.3. Antioksidanlar	6
1.3.1. Glutasyon.....	7
1.3.2. Glutasyon Redüktaz.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	16
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	16
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	17
3.1.3.1. Homojenatın Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler.....	17
3.1.3.2. Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler.....	17
3.1.3.3. Afinite Kolonunda Gerekli Olan Çözeltiler	17
3.1.3.4. SDS-PAGE Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	18

3.1.3.5. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Homojenatın Hazırlanması	20
3.2.2. Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	20
3.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	20
3.2.4. 2', 5' ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ile Enzimin	
Saflaştırılması.....	21
3.2.5. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kontrolü	22
3.2.6. SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Kütlesinin Tayini	23
3.2.7. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	23
3.2.8. Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	24
3.2.8.1. Optimum pH Çalışması.....	24
3.2.8.2. Optimum İyonik Şiddet Çalışması	24
3.2.8.3. Stabil pH Çalışmaları	24
3.2.8.4. Optimum Sıcaklık Çalışması	24
3.2.8.5. NADPH ve GSSG Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Yönelik Çalışma Sonuçları	26
4.2. 2', 5' ADP Serharose-4B Afinite Kromatografisi Aktivite Sonuçları	27
4.3. GR Enziminin Saflık Kontrolü ve Alt Biriminin Molekül Kütlesi Sonuçları.....	28
4.4. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....	30
4.5. Karakterizasyon İşlemlerine Ait Sonuçlar	31
4.5.1. Optimum pH Çalışmasının Sonuçları	31
4.5.2. Stabil pH Çalışmasının Sonuçları	32
4.5.3. Optimum İyonik Şiddet Çalışmasının Sonuçları	34
4.5.4. Optimum Sıcaklık Çalışmasının Sonuçları	35

4.5.5. NADPH ve GSSG Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Sonuçları	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

S	: Substrat
E	: Enzim
ES	: Enzim-Substrat kompleksi
P	: Tepkimede oluşan ürün
EC	: Enzim komisyon numarası
ATP	: Adenozin trifosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
K_M	: Michealis Menten sabiti
V_{MAX}	: Maksimum hız
V_0	: İlk hız
[S]	: Substrat konsantrasyonu
ROS	: Reaktif oksijen türü
XO	: Ksantin oksidaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
-SH	: Tiyol
H_2O_2	: Hidrojen peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
NADPH	: Nikotinamidadenindinükleotid fosfat (redükte form)
$NADP^+$	: Nikotinamidadenindinükleotid fosfat (okside form)
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
DTT	: Dithiothreitol
PMSF	: Fenilmetilsülforilflorür
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCA	: Triklor asetik asit

TEMED	: N, N, N'N'-tetrametilenamin
BSA	: Bovine serum albümin
kDa	: Kilodalton
mL	: Mililitre
xg	: Yer çekim ivme birimi
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
M	: Molar
µg	: Mikrogram

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Antioksidanların sınıflandırılması	6
Şekil 1.2.	Glutasyonun metabolizmada bulunma formları a) İndirgenmiş form (GSH), b) Okside form (GSSG).....	7
Şekil 1.3.	Glutasyon döngüsü	8
Şekil 1.4.	Glutasyon redüktazın katalitik merkezi	10
Şekil 1.5.	Pentoz fosfat yolunun metabolik rolleri	11
Şekil 4.1.	Amonyum sülfat çöktürülmesinde elde edilen veriler grafiği	26
Şekil 4.2.	2', 5' ADP Serharose-4B afinite kromatografisinde elde edilen elüatlar aktivite veriler grafiği	28
Şekil 4.3.	Elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı	28
Şekil 4.4.	GR enzimin alt birimlerinin molekül kütlelerinin bulunması çizilen log Mk-Rf grafiği	29
Şekil 4.5.	Kantitatif protein tayini için elde edilen standart grafik	30
Şekil 4.6.	Koyun kalp dokusunda GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunu yönelik pH-Aktivite grafikleri	31
Şekil 4.7.	Stabil pH çalışması için 0,1 M KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri grafiği	32
Şekil 4.8.	Stabil pH çalışması için 0,1 M KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri grafiği	33
Şekil 4.9.	Optimum iyonik şiddetin hesaplanması için KH ₂ PO ₄ tamponunun çeşitli derişimlerinde elde edilen aktivite ölçüm sonuçları grafiği	34
Şekil 4.10	Optimum sıcaklık için optimum pH'da elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği.....	35
Şekil 4.11	NADPH substratının K _M ve V _{max} değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.12	GSSG substratının K _M ve V _{max} değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	37

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	Amonyum sülfat çöktürülmesinde elde edilen sonuçlar.....	26
Tablo 4.2.	2', 5' ADP Serharose-4B afinite kromatografisinden elde edilen elüatlar ve aktivite verileri	27
Tablo 4.3.	Glutasyon redüktaz enziminin saflaştırma basamakları	29
Tablo 4.4.	Kantitatif protein tayini için elde edilen absorbans değerleri.....	30
Tablo 4.5.	0,1 M KH_2PO_4 tamponu kullanılarak farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri.....	31
Tablo 4.6.	0,1 M Tris-HCl tamponu kullanarak tamponu kullanılarak farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri	31
Tablo 4.7.	Stabil pH çalışması için 0,1 M KH_2PO_4 tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi veriler.....	32
Tablo 4.8.	Stabil pH çalışması için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri	33
Tablo 4.9.	Optimum iyonik şiddetin hesaplanması için KH_2PO_4 tamponunun çeşitli derişimlerinde elde edilen aktivite ölçüm sonuçları.....	34
Tablo 4.10.	Optimum sıcaklık için optimum pH'da elde edilen aktivite verileri tablosu	35
Tablo 4.11.	NADPH substratının K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin bulunması için elde edilen veriler	36
Tablo 4.12.	GSSG substratının K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin bulunması için elde edilen veriler	37

GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Glutatyon redüktaz (GR; E.C.1.8.1.7), GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizleyen bir enzim olup flavin koenzimi (FAD) ve piridin-nükleotide (NADPH) bağımlı disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu çalışmada glutatyon redüktaz enzimi koyun kalp dokusundan saflaştırıldı. Bu saflaştırma işleminde %30-70 arası amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri uygulandı. 5,35 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip olan GR enzimi %72,82 verimle 191 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi ve denatüre edici şartlarda molekül kütlesi yaklaşık olarak 70 kDa bulundu. Karakterizasyon çalışmalarında ise enzimin optimum pH, stabil pH, optimum iyonik şiddet ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6,0 (0,1 M KH₂PO₄ tamponunda), 8,0 (0,1 M KH₂PO₄ tamponunda), 240 mM (0,1 M KH₂PO₄) ve 70°C olarak bulundu. Ayrıca NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerleri için sırasıyla 7,776 mM, 0,1678 EÜ/mL ve 0,593 mM, 0,0306 EÜ/mL olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon redüktaz, Koyun, Kalp, Saflaştırma, Karakterizasyon.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM SHEEP HEART TISSUE

ABSTRACT

Glutathione reductase (GR; E.C.1.8.1.7) is an enzyme that catalyzes the reduction of GSSG to GSH and is a member of the flavin coenzyme (FAD) and pyridine-nucleotide (NADPH) dependent disulfide oxidoreductase family. In this study, glutathione reductase enzyme was purified from sheep heart tissue. In this purification process, 30-70% ammonium sulfate precipitation and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography methods were applied. GR enzyme, which has a protein specific activity of 5.35 EU/mg, was purified 191-fold with a yield of 72.82%. The purity of the enzyme was checked by SDS-PAGE method and the molecular mass was found to be approximately 70 kDa under denaturing conditions. In the characterization studies, the optimum pH, stable pH, optimum ionic strength and optimum temperature values of the enzyme were found to be 6.0 (in 0.1 M KH_2PO_4 buffer), 8.0 (in 0.1 M KH_2PO_4 buffer), 240 mM (0.1 M KH_2PO_4) and 70°C, respectively. In addition, the K_M and $V_{\max}$ values for NADPH and GSSG substrates were determined to be 7.776 mM, 0.1678 EÜ/mL and 0.593 mM, 0.0306 EÜ/mL, respectively.

Keywords: Glutathione reductase, Sheep, Heart, Purification, Characterization.

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlı metabolizmalarda kimyasal tepkimelerin gerekli sürelerde gerçekleşmeleri gerekir. Biyokimyasal tepkimeler uygun zamanda ve hızda gerçekleşmediği takdirde devam canlılığın devam etmesi imkânsızdır. RNA yapısında olan küçük bir grup dışında enzimlerin tümü protein yapısındadırlar. Enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını arttıran ve değişikliğe uğramadan çıkan biyolojik katalizörlerdir.

Biyokimya tarihinde enzimlerin önemli yeri vardır. Katalizör kelimesi ilk defa 17. yüzyılın sonlarında mide sekresyonu ve yiyeceklerin sindirimi için kullanılmıştır. 1800’lü yılların başlarında ise alkol fermentasyonu ve sütün ekşimesi gibi olaylarında dile getirilmiştir. 1833 yılında çalışmalar sonucu şekeri parçalayan enzim olan diastaz (amilaz) kısmi olarak saflaştırılmıştır.

1850’lerde mayalar tarafından şekeri alkole dönüştüren madde Louis Pasteur tarafından ferment şeklinde adlandırması, 1878’de Kühne ferment yerine ilk defa enzim kelimesini kullanmış ve önermiştir. 1926 yılında James Sumner soyadan üreazı kristallendirmeyi başararak, 1946 yılında ise John H. Northrop ve Wendell M. Stanley bazı enzim ve virüs proteinlerini saf hallerini elde etmeleri, daha sonra John H. Northrop ve Moses Kunitz pepsin, tripsin gibi bazı enzimleri kristalleştirmeleri bu konudaki gelişmelerin lokomotif olmuştur. Bugüne kadar yapılan tüm çalışmalarda binlerce enzim saflaştırılmış ve birçoğunun yapısı, işlevleri ve kimyasal özelliğine dair bilgiler elde edilmiş ve incelenmiştir (Yarat ve ark., 2019).

Enzimler substratlara karşı oldukça spesifiktir ve kimyasal tepkimeleri olağan üstü bir şekilde hızlandırırlar. Enzimlerin çoğu protein yapısındadır ve her zaman biyolojik aktivite göstermeyebilirler. Enzimler biyolojik aktivite işlevini yerine getirebilmeleri için koenzim ve kofaktörlere ihtiyaç duyarlar ve ayrıca biyolojik fonksiyonları protein konformasyonun bütünlüğüne bağlıdır (Nelson ve Cox, 2013).

Enzimin üzerinde bulunan genelde substratın bağlandığı özel bir kısım vardır. Bu özel kısma aktif bölge denilir. Aktif bölgenin yüzeyinde polar ve nonpolar aminoasit kalıntıları mevcuttur. Enzim substrata bağlanarak enzim-substrat (ES) kompleksi oluşur ve daha sonra ES kompleksindeki bağın kopması sonucu ürün ya da ürünler meydana gelir.

Aktif bölgede enzimin substrata bağlanma mekanizması iki farklı modelle açıklanır. Bunlar Fisher'in anahtar kilit modeli ve Koshland'ın uyarılmış uyum modelleridir. Fisher'in anahtar kilit modelinde substrat enzimin aktif bölgesine şekilsel olarak uygun bir şekildedir ve substrat enzimin aktif bölgesine anahtar kilit örneği gibi bağlanır şeklinde izah edilmiştir. Koshland'ın uyarılmış uyum modelinde ise substrat enzimin aktif bölgesine uygun bir şekilde değildir ve substratın enzimin aktif bölgesine yaklaşması esnasında enzimin üç boyutlu yapısı biçimsel bir şekilde değişikliğe uğrar ve substratın bağlanacağı şekli alır (Yarat ve ark., 2019).

Enzimler önceleri kataliz ettikleri tepkimeye göre etki ettiği substratın isminin son kısmına “az” az eki getirilerek adlandırılmıştır. Örneğin üreyi CO_2 ve NH_3 'e parçalayan enzime üreaz, fosfat esterlerine hidrolizlenmesini katalizleyen enzime fosfataz denilmiştir. Zaman içerisinde çok sayıda enzimin ortaya çıkması nedeniyle sistematik isimlendirmeye ihtiyaç duyulmuştur. Dolayısı ile daha sonraları enzimler katalizledikleri tepkime tipine ve tepkimenin mekanizmasına göre sınıflandırılma yapılmıştır.

Sistematik adlandırılmanın özellikleri şunlardır:

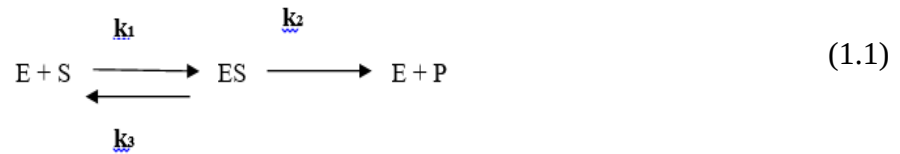
- Katalizlenen tepkimenin tipine göre enzimler 6 gruba bölünmüştür ve her bir grup da kendi içerisinde 4 ile 13 arasına alt gruba ayrılmıştır.
- Enzimin adlandırılması iki bölümden oluşur. İlk bölüm substrat veya substratlardandır. İkinci bölüm ise katalizlediği tepkimenin tipinin sonuna az eki getirilmesidir. Substratların isimleri yazılırken aralarına iki nokta konur.

Her enzimin sistematik bir kod numarası vardır. Bu numaralar E.C. (Enzyme Commission) harfleri ile gösterilir ve 4 rakamdan oluşur. İlk rakam enzimin bağlı olduğu grubu, ikinci rakam alt grubu, üçüncü rakam alt alt grubu, dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını ifade eder.

Enzimlerin sınıflandırıldığı altı grup aşağıda verilmiştir.

- 1) **Oksidoredüktaz:** İki substrat arasındaki yükseltgenme indirgenme tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
- 2) **Transferazlar:** İki substrat arasındaki bir grubun transferinin bir yerden diğer yere aktarılmasını katalize eden enzim grubudur.
- 3) **Hidrolazlar:** Substrat moleküllerine bir molekül suyun katılmasını katalize eden enzim grubudur.
- 4) **Liyazlar:** Substratların gruplardan uzaklaştırılarak çift bağların oluşturduğu reaksiyonları katalize eden enzim grubudur..
- 5) **İzomerazlar:** İzomer olan bileşikleri birbirine dönüşmesini katalize eden enzim grubudur.
- 6) **Ligazlar:** Enerjisi yüksek olan bileşiklerin (ATP ve GTP gibi) fosfat bağının koparılmasıyla elde edilen enerji ile yeni bir bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Kühlevioğlu, 2009).

Enzimatik tepkimelerin incelenmesi amacı ile 1903'de Henri, 1913'de Michaelis ve Menten bazı kinetik modeller önerilmiştir (Kalaycıoğlu ve ark., 2010). Enzimli bir reaksiyonun denklemi aşağıdaki şekilde ifade edilir.



Bu tepkimede öncelikle enzim substrat birleşerek ES kompleksi oluşur. ES kompleksi ise ya ürüne ya da tekrar E ve S'ye dönüşür. Birinci reaksiyonda çift yönlü bir reaksiyon söz konusu iken ikinci reaksiyon tek yönlüdür. Bu tepkime sonucunda Michealis-Menten hız denklemi aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.2)$$

Bu denklemde K_M (Michealis-Menten sabiti) veya k_2+k_3/k_1 şeklinde ifade edilir. Yukarıdaki denklemde gerekli kısaltmalar ve işlemler yapıldığında aşağıda verilen Michealis-Menten denklemi elde edilir.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.3)$$

Burada V_0 = İlk hız, $V_{\max}$ = Maksimum hız, $[S]$ = Substrat konsantrasyonu, K_M = Michaelis-Menten sabitini ifade etmektedir.

K_M ortamda bulunan enzim moleküllerinin aktif bölgelerinin yarısını dolduran substrat konsantrasyonudur. Diğer bir anlamı ise enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Enzimatik tepkimedeki K_M değeri düşük ise enzimin substrata olan ilgisi çok yüksek eğer K_M değeri yüksek ise enzimin substrata olan ilgisi düşük anlamına gelir. $V_{\max}$ (Maksimum reaksiyon hızı) ortamdaki bulunan enzim moleküllerinin substrata tam doygun olduğu anlamına gelir. Ayrıca enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir.

Enzimlerin aktivitelerini ve enzimatik tepkimelerin hızını etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Keha ve Kühlevioğlu, 2009; Lineweaver and Burk, 1934).

- ✓ $[S]$: Substrat derişimi
- ✓ $[E]$: Enzim derişimi
- ✓ pH etkisi
- ✓ Sıcaklık etkisi
- ✓ Toplam iyon derişimi
- ✓ Ortamdaki inhibitör veya aktivatör konsantrasyonu

1.2. Serbest Radikaller

Reaktif ve kararsız olan bu radikallerin ortak özelliği atom ve moleküllerinin en dış kabuklarında eşleşmemiş elektron bulundurmalarıdır (Arslan ve ark., 1995; Walker, 1990). Eşleşmemiş elektronlar manyetik bir çekime sahiptirler (Barlett, 1953).

Serbest radikaller oksijen ve nitrojen türlü kaynaklardan oluşabilir. Bu türlerin oksijen kaynaklı olanlar (ROS) süperoksit, hidroksil, peroksil, lipit peroksil ve alkoksil radikalleri, nitrojen kaynaklı olan türler (RNS) ise nitrik oksit ve nitrojen dioksit radikallerinden oluşur. Bunun dışında nonradikal diye adlandırdığımız H_2O_2 (hidrojen peroksit), O_3 (ozon), 1O_2 (singlet oksijen), HOCl (hipokloroz asit), nitrik asit (HNO_3), peroksinit ve dinitrojen trioksit gibi radikaller canlı organizmasında serbest radikal reaksiyonlarına neden olurlar (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller endojen ve ekzojen reaksiyonlar sonucunda oluşurlar. Ekzojen kaynaklı olanlar ise toksinler (kimyasallar, alkol, sigara) hava kirliliği, güneş ışınları ve x ray ışını gibi etkenlerden oluşmaktadırlar (Karakan ve Nazlıkul, 2017).

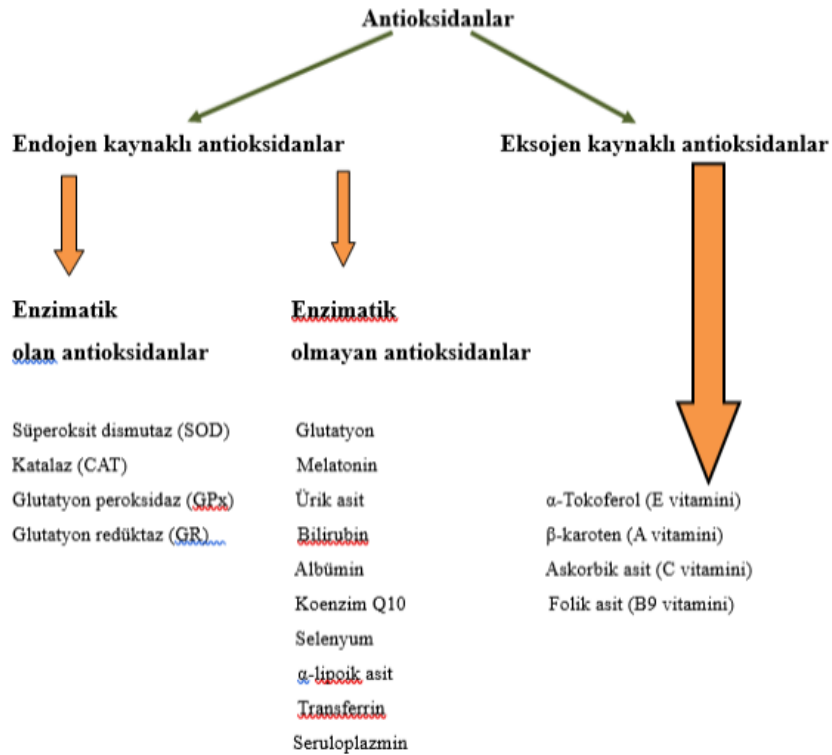
Endojen kaynaklı olanlar ise aerobik metabolizmasına sahip olan canlıların mitokondrilerinde elektron transport sistemi tarafından, lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi enzimatik olaylarda serbest radikaller oluşabilir. Ayrıca otooksidasyon reaksiyon enzimleri olan ksantin oksidaz (XO) ile NADPH, endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde elektron kaçakları oluşması ve zihinsel olarak stres ve vücut yorgunluğunda serbest radikaller üretilebilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Vücudumuzdaki serbest radikaller, bulundukları ortamda konsantrasyonları oranında olumsuz etkilere sebep olabilirler. Düşük konsantrasyonda detoks reaksiyonlar, immün fonksiyonlar ve hücrel içi haberleşme olaylarına uyarım yaparken, yüksek konsantrasyonda ise hücrenin fonksiyonunu bozarak hücrenin ölümüne neden olurlar. Lipit, protein, DNA'ya da zarar verebilirler (Karakan ve Nazlıkul, 2017).

1.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun sınırlanması, oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılması, serbest radikallerin meydana getirdiği hasarın önlenmesi, hasarlı moleküllerin tamir edilmesi ve detoksifikasyonunu sağlayan moleküllere antioksidan maddeler denir (Karabulut ve Gülay, 2016; Gürdöl ve Ademoğlu, 2006). Diğer bir deyişle antioksidanlar serbest radikallere elektron vererek onların etkisizleştiren moleküllerdir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge vardır ve bu denge radikallerin lehine bozulduğu takdirde hücre hasarına yol açar (Eseryel ve ark., 2002).

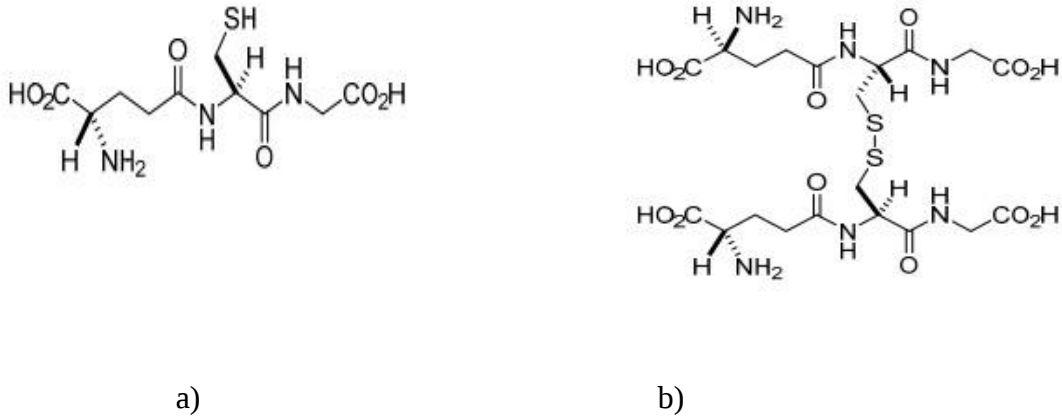
Antioksidanların serbest radikalleri kararlı duruma getirmesi, serbest radikal üreten tepkimeleri durdurmaları gibi baskılayıcı etki ile tepkime hızını azaltması gibi durumlarda canlı organizmada olumlu bir etki gösterirler (Kasapçopuk ve Birdane, 2014). Antioksidan maddeler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Antioksidanların sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay, 2016)

1.3.1. Glutatyon

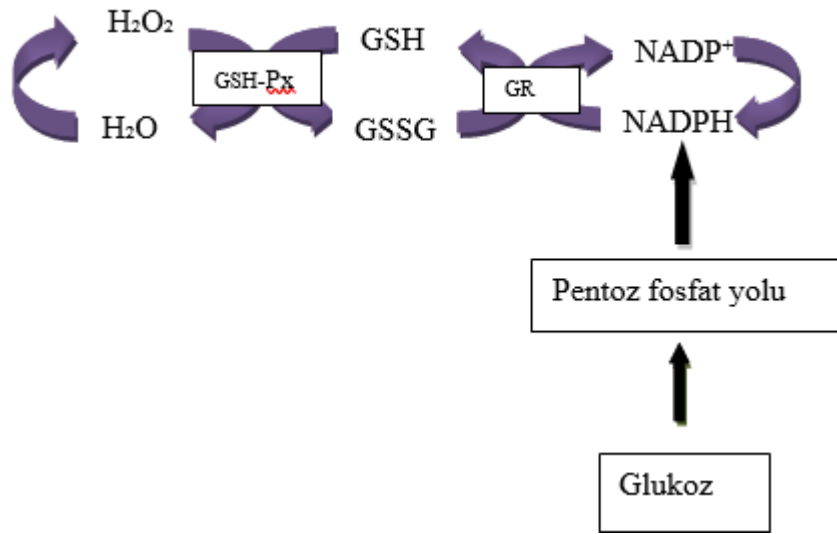
Glutatyon öncü aminoasitlerden sisteinglisin ve glutamattan oluşan bir tripeptit molekülüdür (Flagg et al., 1994; Dwivedi et al., 2020; Lantomasi et al., 1997). 1888'de Rey-Pailhade maya hücrelerinde kükürdün kendiliğinden tepkimeye girmesi sonucunda "philothion" adında bir madde keşfetmiştir. Daha sonra 1921'de Hopkins tarafında kas dokusunda aynı bileşik keşfedildi ve buna geçici bir isimle glutathion adı verildi. Bu bileşikte sistein ve glutamik asit olduğunu bildirdi. Bundan iki yıl sonra yeni bir prosedür hazırlanarak glutatyonun gerçekte sistein, glutamik asit ve glisinden oluşan bir tripeptit olduğu doğrulandı (De Rey-Pailhade, 1928; Hopkins, 1921; Hopkins, 1929). Glutatyon redükte ve okside formlar olarak serbest şekilde mevcuttur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Glutatyonun metabolizmada bulunma formları a) İndirgenmiş form (GSH), b) Okside form (GSSG)

Glutatyonun çok sayıda hayati işlevleri vardır. Örneğin glutatyonun redoks homeostazını korumada, karaciğer fonksiyonunu desteklenmesinde, ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesinde, bağışık sistemini desteklemede ve hücresel onarımda büyük rolü vardır. GSH reaktif oksijen türlerini ve reaktif nitrojen türlerini enzimatik tepkimeler ile nötralize eder. Bu fonksiyonunu yerine getirmede sistein aminoasidin de bulunan sülfidril ve tiyol (-SH) grupları büyük bir rol oynar. Düşük moleküler kütleye sahip olan tiyol, oksidatif strese karşı önemlidir ve proteinleri oksidasyondan korur (Dwivedi et al., 2020; Scire et al., 2019).

GSH sentezi sırasında iki belirleyici unsur vardır. Bunlardan ilki sistein, ikinci ise hız sınırlayıcı enzim olan glutamat sisteinligazın (GCL) aktivitesidir. GSH sentezinde GCL glutamat ve sisteinden oluşan γ -glutamilsistein oluşumunu katalize ederek ilk adım başlamasına sebep olur. Daha sonra γ -glutamilsisteineglisin eklenmesiyle GSH oluşumu gerçekleşir. Bu tepkimelerde ATP hidrolizinde gerçekleşir (Voskava et al., 2023; Iskushnykh et al., 2022; Chen et al., 2024; Ribas et al., 2014).

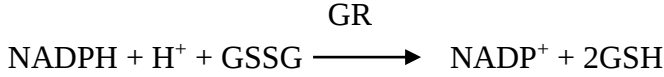


Şekil 1.3. Glutasyon döngüsü

İndirgenmiş glutasyon hücrede önemli bir antioksidan bileşiktir. Metabolizmada bulunan hidrojen peroksit molekülleri glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi tarafından katalizlenen tepkime ile suya dönüştürülür ve zararsız hale getirilir. Bu tepkime esnasında iki GSH molekülü disülfid bağı ile birleşerek GSSG'ye yükseltgenir. Metabolizmada hidrojen peroksit gibi oksidan ajanların söndürülmesi için GSSG'nin tekrar GSH'a dönüştürülmesi gerekir. Bu dönüşüm glutasyon redüktaz enzimi tarafında katalize edilen tepkime ile sağlanır ve elektron verici olan NADPH kullanılır. Sonuçta iki mol GSH meydana gelir. Hücrelerde oksidatif stres arttığında GSH çok kullanıldığından dolayı GSSG seviyesi yükselir ve GSH/GSSG oranında azalma söz konusu olur. Bu durum hücreler için istenen bir durum değildir ve oksidatif stresin tamamen bertaraf edilmesi aksamış olur (Chen et al., 2024).

1.3.2. Glutasyon Redüktaz

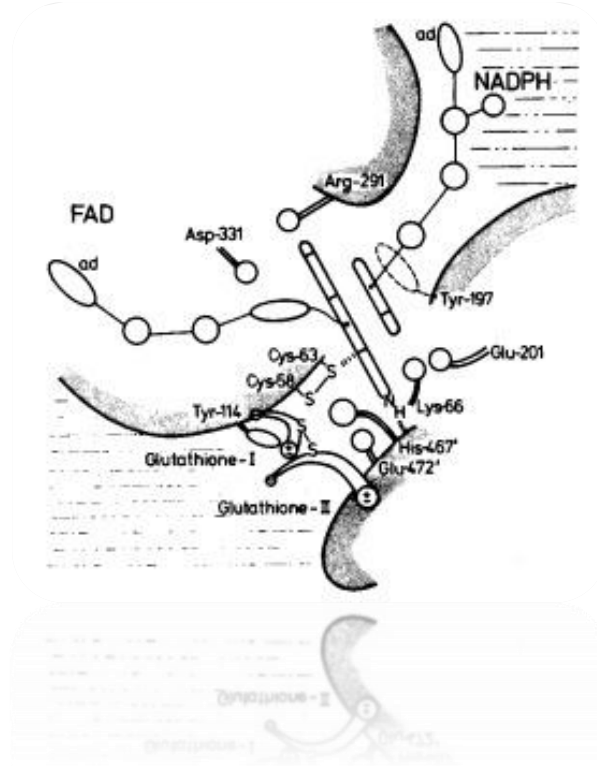
Glutasyon redüktaz enzimi (Glutasyon; NADP⁺ oksidoredüktaz E.C. 1.8.1.7: GR) oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir ve aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Tepkimeden de görüldüğü gibi glutasyon redüktaz enzimi NADPH'ın koenzim olarak görev yaptığı bu reaksiyonda iki mol GSH molekülünün oluşuna vesile olur. Fizyolojik olarak metabolizmada normal olarak [GSSG]/[GSH] oranı 1:100-1000 olmalıdır. Ayrıca glutasyon redüktaz enziminin aktivitesi ve NADPH seviyeleri de uygun değerlerde olmalıdır. Oksidatif strese GSH, GSSG'ye dönüşür. Hücrelerde yüksek miktarda GSSG birikimi hücre için oldukça tehlikeli ve toksiktir. Bu yüzden GSSG birikiminin önlenmesi gerekir. Dolayısıyla normal metabolizmada GSSG'nin NADPH koenzimi eşliğinde GR tarafından GSH'a indirgenmesi hayati bir öneme sahiptir (Karagözoğlu ve Çiftci, 2017; Aksoy ve Kıransan, 2020).

Glutasyon redüktaz enzimi ilk defa 1951'de bezelye ve buğday tohumlarında bulunmuştur. 1955'te Racker mayadan kristal formda glutasyon redüktaz enzimi ilk kez izole etmiştir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda glutasyon redüktaz enziminin hemen hemen tüm canlı dokularında bulunduğu tespit edilmiştir (Mapson and Goddard, 1951; Conn and Vennesl and, 1951; Chang et al., 1978).

GR enziminin üç yapısal alt birimleri vardır ve bunlar FAD, NADPH ve GSSG'dir. Glutasyon redüktazın aktif bölgesinde FAD ve disülfür mevcuttur. Katalitik bölgenin NADPH tarafından indirgenmesi esnasında 1 FAD, 1 kükürt radikali ve bir tiyol(-SH) molekülü üretir. Katalitik merkezin bir kısmı NADPH'e diğer bir kısmı ise GSSG'ye bağlanan iki parçaya ayrılır. Bu ayrımlar iki adımlık reaksiyonlara gerçekleşir ve her bir bölüm proteinde ligand olmadığından çözücülerle doldurulan derin bir cebe karşılık gelir. Bu iki cep alt birim merkezinde bir araya gelirler ve böylece substratın enzime bağlanmasıyla elektron transfer sürecinde zarar verebilecek moleküllere karşı reaksiyon merkezi optimum şekilde korunur (Şekil 1.4) (Schulz et al., 1978; Worthington and Rosemeyer, 1976; Pai and Schulz, 1982).



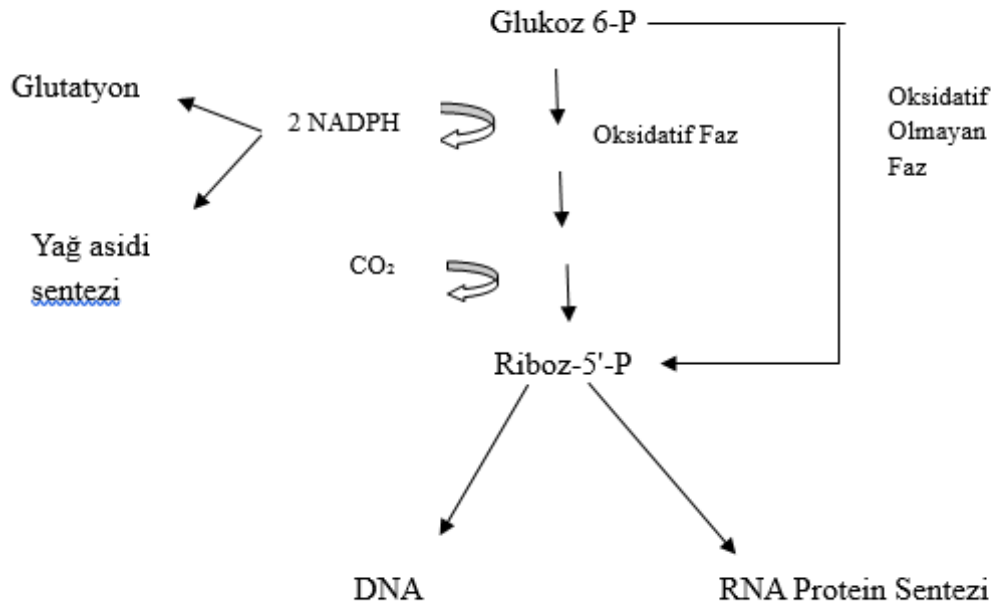
Şekil 1.4. GR enziminin aktif bölgesi (Pai and Schulz, 1982)

Glutasyon redüktaz eritrositlerde pentoz fosfat yolu süresince metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir enzimdir. Pentoz fosfat yolu altı karbonlu glukozun beş karbonlu şekerlere dönüştüğü anabolik bir yoldur. Karaciğerde, böbrek üstü bezlerde, yağ dokusunda, gonadlarda ve eritrosit gibi NADPH'a ihtiyaç duyulan dokularda oldukça etkindir.

Pentoz fosfat yolun temel görevleri:

- Hücreler içinde meydana gelen indirgeyici biyosentez tepkimeleri için NADPH üretmek
- Nükleotidler ve nükleik asit sentezinde kullanılmak üzere riboz-5'-fosfat sağlamaktır.

Pentoz fosfat yolu oksidatif ve oksidatif olmayan iki fazdan oluşur. Oksidatif fazda NADPH, oksidatif olmayan fazda ise riboz-5- fosfat üretilir.



Şekil 1.5. Pentoz fosfat yolunun metabolik rolleri (Beutler, 1969; Cabezas et al., 1999; Yarat ve ark., 2019)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hücre metabolizmasında meydana gelen biyokimyasal tepkimeler oldukça karmaşık bir şekilde cereyan eder. Bu tepkimeler karmaşık ve kompleks olsa bile her zaman dengeli bir şekilde hücrenin ihtiyaçlarına göre şekillenir. Bazı olumsuz durumlarda (örneğin radikal oluşumu vb.) bu denge bozulur ve hücrede hasar meydana gelebilir. Canlı organizmalarda solunum yoluyla alınan oksijenin enerji metabolizmasında önemi çok büyüktür. Oksijen kullanan canlılarda serbest radikallerin oluşumunu sağlayan en önemli kaynak O_2 'dir. Moleküler oksijen, bir elektronu eksik olan iki oksijen atomundan meydana gelir. Metabolizmada moleküler oksijenin büyük bir kısmı suya indirgenirken diğer kısmı ise süperoksit (O_2^-) radikaline dönüşür. Hücrede hem reaktif oksijen türleri hem de reaktif nitrojen türleri yüksek düzeyde olduğu zaman oksidatif stres meydana gelir. Serbest radikallerin oluşturduğu hücresel hasarın önlemesi için savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemine antioksidan sistem denilir. Antioksidan mekanizmada radikal madde miktarının düşürülmesi ve ortamdan uzaklaştırılmasının sağlanması görevini üstlenir. Antioksidan maddeler enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki grupta toplanır. Enzimatik grupta olan önemli enzimler süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon s-transferaz; diğer gruptaki önemli maddeler ise glutatyon, vitamin E, vitamin C, NADH ve NADPH sayılabilir.

Redükte glutatyon (GSH) hücreler için en önemli antioksidan moleküllerinden biridir ve indirgeyici tiyol grubu bulundurmaktadır. Bu grup radikal maddelerin indirgenmesinde çok önemli bir role sahiptir. Aşırı oksidatif stres sonucunda GSH düzeyi azalabilir ve bu tür durumlarda patolojik tablolarda görülebilir (Aksoy, 2002; Vaskova et al.,2023).

1935 yılında Mel-drum ve Tarr tarafından sıçan kanından GSSG'nin indirgendiğini ve TPNH'nın (NADPH) bir kofaktör olduğunu görmüşlerdir. İlk defa 1955 yılında GR enzimini *Escherichia Coli* bakterisinde saflaştırılmıştır. GR'nin saflaştırmasında DEAE-Sephadex, Sephadex G-100, Hyroxyapatite, Sephadex G-75, CM-selüloz, Sephacryl S-200, DEAE-Sephadex, 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite, Reactive Red-120-agaroz ve Sephacryl S-300 kromatografiler yöntemi kullanılmıştır (Tandoğan ve Ulusu, 2006).

Glutasyon redüktaz çok önemli bir antioksidan enzim olduğundan dolayı çeşitli memelilerin eritrositlerinden, karaciğerinden, böbrek korteksinden, beyninden, böbreğinden, *Escherichia Coli*, parazitler, bakteri, alg ve mayalar da dahil olmak üzere birçok canlı dokusundan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Temel ve ark., 2018).

Glutasyon redüktaz enzimi ilk defa kapsamlı olarak 1967 yılında *Escherichia Coli* bakterisinden saflaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 525 EU/mg. protein ve saflaştırılma oranının %80 olduğu gösterilmiştir (Williams et al., 1967).

Staal ve arkadaşları (1969), insan eritrosit GR enzimini kolon kromatografisi ile 47.000 kat saflaştırmış ve jel filtrasyon kromatografisi (JFK) yöntemiyle tabii molekül kütlelerini 115 ± 4 kDa olarak tespit etmiştir.

Barea ve Lee (1979) yaptıkları çalışmada fare karaciğeri GR enzimini amonyum sülfat çöktürmesi 8-(6-aminohekzil)-amino-2'-fosfoadenozin difosforiboz, N⁶-(6-aminohekzil)-adenozin ve 2', 5'-bisfosfatsepharose kromatografi yöntemlerini kullanılarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 158 EU/mg. protein ve molekül kütlesi 105 kDa olarak bulunmuştur.

Zanetti'nin (1979) yaptığı çalışmada tavşan karaciğeri GR enziminin SDS (Sodyum dodesil sülfat) elektroforezi ile enzimin molekül kütlelerini 56 kDa olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada dana karaciğeri GR enzimi DEAE Sephadex, Sephadex G-200 ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B kromatografileri yöntemleriyle saflaştırılmış ve molekül kütlesi 100 kDa olarak bulunmuştur (Carlberg and Mannervik, 1981).

Carlberg ve Mannervik (1975) tarafından yapılan bir diğer bir çalışmada sıçan karaciğeri GR enzimi %20 verimle 5000 kat saflaştırılmıştır. Bu çalışmada saf enzimin alt birim ve tabii molekül kütleleri sırasıyla 60 ve 125 kDa olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca Açı ve Tezcan (1989), koyun beyin GR enzimini %40 verimle 11000 kat saflaştırmışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesi, ısı denatürasyonu ve 2', 5'-ADP

Sepharose 4B kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 193 EU/mg. protein ve tabii moleküler kütlesi 116 kDa olarak bulunmuştur.

At karaciğeri GR enzimi N6-(6-aminohekzil)-adenozin-1'5'-bisfosfat Sepharose, Reactive Red-120-agoroz afinite, DEAE-Sephadex ve Sephacryl-S-300 kromatografileri tekniğini kullanarak %47 verim ile 11174 kat saflaştırılmıştır. Bu saflaştırılan enzimin tabii molekül kütlesi 107 kDa olarak hesaplanmıştır (Alfonso et al., 1993).

Ulus ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir başka çalışmada koyun karaciğeri GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sonuçta 47 EU/mg. protein spesifik aktivitesine sahip olan enzim %14,1 verimle 1477 kat saflaştırılmış ve enzimin optimum pH'sı, stabil pH'sı ve optimum sıcaklığı sırasıyla 8,0, 5,5 ve 60°C olarak bulunmuştur.

Erat ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan başka bir çalışmada tavuk karaciğeri GR enzimi 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite ve Sephadex G-200 kromatografileri kullanılarak %38 verimle 1714 kat saflaştırılmıştır. Aynı çalışmada saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 120 EU/mg. protein, molekül kütlesi 43 kDa, optimum pH'sı 7,0, stabil pH'sı 7,4, optimum iyonik şiddeti 0,75 M Tris-HCl tamponu ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur.

Ulus ve Tandoğan'ın (2007) yaptığı çalışmada sığır karaciğeri GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite ve DEAE-Sepharose Fast Flow kromatografileri kullanılarak %38,4 verim ile 5456 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 185,5 EU/mg. protein, molekül kütlesi 55 kDa, optimum pH'sı 7,0 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur.

Ulus ve Tandoğan'ın (2010) yaptığı diğer bir çalışmada sığır böbrek korteksi GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite, DEAE Fast Flow ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılarak enzim %85 verim ile 34806 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 727 EU/mg. protein ve molekül kütlesi 56 kDa olarak bulunmuştur.

Farklı bir kaynak olarak deve eritrosit GR enziminde iyon değişim ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografileri tekniğini kullanılarak %43,3 verim ile 1547,4 kat saflaştırılmıştır. Bu saflaştırılan enzimin alt birim molekül kütlesi, tabii molekül kütlesi, optimum pH'sı ve optimum sıcaklığı sırasıyla 60, 105 kDa, 7,5 ve 50-55°C olarak hesaplanmıştır. Enzimin kinetik özelliklerine yönelik çalışmanın sonucunda NADPH'ın ve GSSG'nin K_M değerleri sırasıyla 7,06 ve 35,5 μM olarak hesaplanmıştır (Senaidy, 2010).

Taşer ve iftci'nin (2012) yaptığı çalışmada ise hindi karaciğer GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak %10,75 verim ile 2476 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 606,67 EU/mg. protein, molekül kütlesi 65 kDa, optimum pH'sı 7,5, stabil pH'sı 8,5 ve optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hazırladığımız çözeltilerde kullanılan potasyum fosfat, etilen diamin tetraasetikasit (EDTA), dithiothreitol (DTT), fenilmetilsülforilflorür (PMSF), trihidroksimetil aminometan (Tris), magnezyum klorür, β -nikotinamitadeninükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH), okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), amonyum sülfat, sodyum asetat, sodyum klorür, potasyum klorür, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, akrilamid, N,N'- metilen bisakrilamid, amonyum persülfat, sodyum dodesil sülfat (SDS), brom timol mavisi, glisin, gliserin, trikloroasetikasit (TCA), izopropanol, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, asetik asit, metanol, β -merkapt etanol, Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol, fosforik asit, bovine serum albümin (BSA) Sigma Chemical Comp.ve E.Merc AG'den 2', 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Hassas terazi	: Denver Instrument SI-234
Homojenizatör	: IKA T25 Digital Ultra-Turrax
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 320R
pH metre	: Thermo
Magnetik karıştırıcısı	: IKA C-MAG HS7
Isıtıcı tabla	: IKAC-MAG HS7
Dijital termometre	: IKA-ETS-D5
Otomatik pipet	: Eppendorf
Spektrofotometre	: Shimadzu
Peristaltik pompa	: Shenchen
Elektroforez güç kaynağı	: BIO-RAD

Elektroforez tankı	: BİO-RAD
Karıştırıcı (Vorteks)	: Velp Scientifica SK-300
Çalkalayıcı	: Lab. Companion SK-300
Kar makinesi	: Hoshizaki Ice Marker FM-80EE
Buzdolabı	: Arçelik

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.1.3.1. Homojenatın Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 50 mM KH_2PO_4 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF (pH: 7.0) = 1,02 g KH_2PO_4 , 0,0438 g EDTA, 0,0231 g DTT ve 0,0267g PMSF tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 120 mL saf suda çözünüp pH'ı 7,0'a ayarlanıp toplam hacim saf su 150 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2. Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 1 mM Tris/ 1 mM EDTA/ 1 mM MgCl_2 (pH:8.0) = 12,1407 g Tris, 0,1863 g EDTA ve 0,9523 g MgCl_2 tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 80 mL saf suda çözünüp pH 8,0'a ayarlanıp toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. 20 mM GSSG Çözeltisi = 0,0623 g okside olan glutatyon tartılıp saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
3. 2 mM NADPH Çözeltisi = 0,0083 g NADPH tartılıp saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Afinite Kolonunda Gerekli Olan Çözeltiler

1. Afinite kolonunda rejenerasyon tampon 1 çözeltisinin hazırlanışı (0,1 M CH_3COONa + 0,5 M NaCl pH:4,5) = 2,05 g sodyum asetat (CH_3COONa) ve 7,305 g NaCl tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 200 mL suda çözünüp pH'ı 4,5'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. Afinite kolonunda rejenerasyon tampon 2 çözeltisinin hazırlanışı (0,1 M Tris + 0,5 M NaCl pH:8,5) = 3,02 g Tris ve 7,305 g NaCl tartılarak beherin içine konuldu. Daha

sonra mezür yardımıyla 200 mL suda çözünüp pH'ı 8,5'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3. Elüsyon tampon çözeltisinin hazırlanışı (50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM GSH + 0,5 mM NADPH pH:7,3) = 0,34 g KH_2PO_4 , 0,0146 g EDTA, 0,0307 g GSH ve 0,0207 g NADPH tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 40 mL saf suda çözünüp pH'sı 7,3'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
4. Yıkama tamponu 1 çözeltisinin hazırlanışı (50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT pH:7,3) = 3,400 g KH_2PO_4 , 0,1464 EDTA ve 0,0773 g DTT tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 450 mL saf suda çözünüp pH'sı 7,3'e ayarlanarak toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
5. Yıkama tampon 2 çözeltisinin hazırlanışı (50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 80 mM KCl pH:7,3) = 1,7005 g KH_2PO_4 , 0,0736 g EDTA, 0,0385 g DTT ve 0,0745 g KCl tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 200 mL saf suda çözünüp pH'sı 7,3'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. SDS-PAGE Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH: 8,8) = 6,0055 g Tris tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 40 mL suda çözünüp pH'sı 8,8'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8) = 6,0055 g Tris tartılıp beherin içine konuldu. Daha sonra mezür yardımıyla 40 mL suda çözünüp pH'sı 6,8'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid Çözeltisi = 0,4 g bisakrilamid 15 g akrilamid tartılıp beherin içine alınıp 35 mL suda çözünüp toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
4. %10'luk Amonyum Persülfat Çözeltisi = 1 g amonyum persülfat tartılıp toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi = 3 g SDS tartılıp toplam hacim saf su ile 30 mL'ye tamamlandı.
6. Yürütme Tamponu = 6,04 g Tris ve 30,04 g glisin tartılıp 1500 mL saf suda çözüldü. Daha sonra %10'luk SDS'den 20 mL eklenip pH'sı 8,5'e ayarlanıp toplam hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı.

7. Numune Tamponu = 0,5 mL pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl, 1mL %10'luk SDS, 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisinde çözeltileri eklenerek ve üzerine 1 mL saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
8. Sabitleşme Çözeltisi = 10 mL TCA çözeltisinden, 50 mL izopropanol çözeltisinden ve 40 mL saf su ilave edilerek toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
9. Jel Boyama Çözeltisi = 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi tartılıp beherin içine konulur ve 10 mL asetik asit çözeltisi içinde çözünür. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 50 mL metanol ve 40 mL saf su eklenerek hazırlanır.
10. Jel Yıkama Çözeltisi = 10 mL asetik asit çözeltisi, 50 mL metanol çözeltisi ve 40 mL saf su karıştırılıp hazırlanır.
11. Ayırma Jel Çözeltisi = 1 M Tris-HCl (pH:8,8) çözeltisinden 5 mL, %30'luk akrilamid ve %0,8'lik bisakrilamid çözeltiden 4,4 mL, %10'luk SDS çözeltisinden 200 µL, TEMED çözeltisinde 130 µL, 3,30 mL saf su ve %10'luk amonyum persülfat 100 µL eklenerek bir beherin içinde hazırlandı.
12. Yığma Jel Çözeltisi = 1 M Tris-HCl (pH:6,8) çözeltisinden 440 µL, %30'luk ve %0,8'lik bisakrilamid çözeltiden 800 µL, %10'luk SDS çözeltiden 30 µL, TEMED çözeltiden 30 µL, 2,450 mL saf su ve %10'luk amonyum persülfat çözeltisinden 50 µL konularak bir beherin içinde hazırlandı.

3.1.3.5. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

1. BSA (Bovine Serum Albumin) = 0,01 g BSA tartılıp beherin içine konulup üzerine 10 mL saf su konularak hazırlanır.
2. Coomassie Brilliant Blue G-250 Hazırlanışı = 0,01 g Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılıp beherin içine konulur. Daha sonra 5 mL etanol çözeltisi alınarak çözünür sonra üzerine 10 mL fosforik asit eklenerek toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Homojenatın Hazırlanması

Bingöl Et ve Süt Kurumundan temin edilen ve -20°C’de porsiyonlar halinde saklanan koyun kalp dokusundan 5g alındı ve küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra 15 mL homojenat tamponu ilave edilerek homojenizatörle süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon ependorf tüplerine konularak 15.000xg’de +4°C’de 45 dakikada santrifüj edildi. Daha sonra çökelek kısmı atılarak süpernatant kısmı kullanılmak üzere bir behere alındı. Böylece homojenat hazırlanmış oldu.

3.2.2. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesi $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GR}} 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ tepkimesine göre NADPH miktarındaki azalma dikkate alınarak spektrofotometrede 340 nm’de 3 dk boyunca ölçüldü. Çalışmada 1 mL kuvartz küvetler kullanıldı.

Kör küvet için = 200 µL Tris-Cl tamponu + 100 µL GSSG + 100 µL NADPH + 600 µL saf su, numune küvet için = 200 µL Tris-Cl tamponu + 100 µL GSSG + 100 µL NADPH + 575 µL saf su + 25 µL enzim çözeltisi kullanıldı. Enzim ünitesi hesaplaması aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\text{EÜ/mL} = (\Delta\text{OD} / 6,22) \times (V_T / V_E) \times S_F$$

EÜ /mL: 1 mL’deki enzim ünite sayısı

ΔOD : 1 dakikadaki absorbans değişimi

6,22: Ekstinksiyon katsayısı (1 mM NADPH’ın oluşturduğu absorbans sayısı)

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Küvete eklenen enzim numune hacmi

S_F : Seyreltme faktörü

3.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Amonyum sülfat su içinde yüksek çözünürlüğe sahiptir ve proteinler denatürasyona uğramadan çökme gerçekleşir. Sulu ortamda bulunan proteinlerin çevresi üç boyutlu bir şekilde bir hidrasyona uğrar. Yüksek tuz konsantrasyonunda suyun yüzey gerilimi artar.

Protein su ile temas yüzeyini azaltmak için yüzey alanını küçültür ve bunun sonucunda protein çöker. Hazırladığımız süpernatant kısmı behere alındıktan sonra sırayla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60 ve %60-70 aralığında çöktürme yapıldı. Her aralıkta aşağıdaki formülü kullanılarak amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2} \quad (3.1)$$

Burada;

V: Süpernatantın hacmini

S₁: Başlangıç doygunluk yüzdesini

S₂: Son doygunluk yüzdesini göstermektedir.

Her aralık için amonyum sülfat miktarı hesaplandıktan sonra magnetik karıştırıcı ile azar azar amonyum sülfat eklenmesi yapılarak çözünmesi sağlandı. Her aralık için +4°C’de 10.000 xg’de 15 dakika santrifüj yapılarak çökelek ve süpernatantın aktivitelerine bakıldı ve enzimin çökme aralığı belirlendi. Çöktürme işleminden sonra behere 20 mL homojenat tamponu alındı ve üzerine 180 mL saf su eklenerek 200 mL’ye tamamlandı. Daha sonra elde edilen çökelek beherin içine konularak 2 saat süreyle diyaliz yapıldı. Küçük molekül kütleli moleküller uzaklaştırıldı.

3.2.4. 2', 5' ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

2', 5' ADP sepharose-4B afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılabilmesi için öncelikle 2', 5' ADP sepharose-4B jeli ile paketlenmiş ve dengelenmiş olan kolon sırasıyla 45 mL 0,1 M Sodyum asetat + 0,5 M NaCl pH: 4,5, 45 mL 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl pH: 8,5 tamponları ile rejenere edildi. Daha sonra kolon tekrara dengelem tamponu ile dengelendi. Dengeleme sonrası kolona enzim numunesi yüklenerek yıkama işlemine geçildi. Yıkama işlemi sırası ile 20 mL 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT pH: 7,3 + 20 mL 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 80 mM KCl pH: 7,3 tamponları ile gerçekleştirildi. Yıkama işleminin tamamlandığı spektrofotometrede 280 nm’de elüat ve yıkama tamponlarının absorbanslarının yaklaşık olarak eşitlenmesinden anlaşıldı. Kolonun yıkama işlemi yapıldıktan sonra kolona elüsyon tamponu (50 mM

KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1 mM GSH + 0,5 mM NADPH pH: 7,3) tatbik edilerek enzim elüe edildi. Elüatlar 1,5 mL olacak şekilde tüplere alındı ve daha sonra her bir tüpteenzim aktivitesi ölçüldü. Aktif tüpler birleştirilerek aliküitlere ayrıldı ve -20 °C’de inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kontrolü

SDS-PAGE yöntemi ile enzim saflığının kontrolü Laemmli metodu kullanılarak yapıldı (Laemmli, 1970). Bu metot proteinlerin elektriksel alanda yürütülmesi ve moleköl büyüklüklerine göre ayrılması söz konusudur. Bu iş için öncelikle Laemmli metoduna göre %3’lük yığma ve %8’lik ayırmayı içeren bir SDS-PAGE jeli hazırlandı. Hazırlanan ayırma jeli 20x10 cm ebadındaki elektroforez camlarının arasına üst taraf 1-2 cm kalana kadar tatbik edildikten sonra kalan kısma yığma jeli tatbik edildi ve kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı. Böylece SDS-PAGE jeli hazırlanmış oldu.

2', 5'ADP Sepharose-4B afinite kromatografisinde elde edilen elüsyon çözeltilerini 100 µL alınarak numaralandırılmış tüplere konulur ve üzerine 100 µL numune tamponu ve 50 µL glisin eklenir. Daha sonra tüplerin ağızlarını kapatıp su dolu bir beherin içerisinde kaynatılır ve böylece proteinler primer yapıya dönüşür. Oluşturulan kuyulara denatüre edilmiş enzim çözeltilerinden 20 µL ve standart protein numunesinden de 10µL yüklendi ve camlar ilgili yere kondu. Daha sonra tanka yürütme tamponu çözeltilisi eklenip elektroforez hazır hale getirildi. Başlangıçta 25 dk kadar 80 volt akım uygulandı ve daha sonra proteinler tamamen yürüyene kadar (yaklaşık olarak 2 saat) akım miktarı 120 volta çıkarıldı. İşlem sonunda akımı durdurup jel dikkatli bir şekilde plakaların arasından çıkarılarak jel sabitleyici çözeltilisine kondu. Jel sabitleyici çözeltilisine konulan jel çalkalama cihazında 40 rpm’de yaklaşık olarak 30 dakikada bekletildi. Daha sonra çıkarılıp boyama çözeltilisine kondu ve sonra yaklaşık olarak 40 rpm’de 2 saat kadar bekletildi. Boyama işleminden sonra jel çıkarılıp protein bantları belirginleşene kadar yıkama çözeltilisi ile yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra yıkanan jelin fotoğrafı çekildi.

3.2.6. SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Kütlesinin Tayini

GR enziminin molekül kütlesini bulmak için 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180 ve 245 kDa molekül kütlelerine sahip 8 adet standart proteinden oluşan kit kullanıldı. SDS-PAGE’de elde edilen jel fotoğrafı yardımıyla R_f -log M_k grafiği çizildi. Grafik yardımıyla elde edilen doğru denklemi yardımıyla GR enziminin molekül kütlesi bulundu.

3.2.7. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Bradford yöntemi bir çözeltideki protein miktarının bulunabilmesi için gerçekleştirilen en önemli metotlardan biridir (Bradford, 1976). Bradford yönteminde eksi yüklü olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının sülfonik asit grubuyla proteindeki amino asidin pozitif yük kısmı olan NH_3^+ grubuna stabil bir şekilde bağlanır. Oluşan boya ve protein kompleksi mavi renk verir. Protein konsantrasyonunu belirlemek içinde spektrofotometrede 595 nm’de ölçüm yapılır. Öncelikle standart grafiğin hazırlanması için 10 mL’de 0,01 g bovine serum albümin (BSA) çözeltisi hazırlandı ve sırasıyla tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L BSA çözeltisi konuldu. Daha sonra her bir tüpe 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası eklendi. Her tüpün toplam hacmi 5 mL olacak şekilde saf su eklendi. Kör için kullanılan tüpte 100 μ L saf su ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası diğer tüplere ise 10 kat seyreltilmiş homojenat, 10 kat seyreltilmiş amonyum sülfat çöktisi ve 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen enzim çözeltisi için tüpler hazırlandı. Her bir tüp vortekslenip 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında spektrofotometrede 3 mL’lik küvetlerde köre karşı 595 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen bu değerlerle standart grafik çizildi ve bu grafikten elde edilen doğru denklemi yardımıyla ilgili numunelerin protein miktarları belirlendi.

3.2.8. Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.8.1. Optimum pH Çalışması

Bu iş için pH'ları 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 KH_2PO_4 ve pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 Tris-HCl tamponu çözeltileri hazırlandı. Potasyum fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltilerinin her birinin pH aralığındaki enzim aktivitelerinin ölçümleri yapıldı ve grafik edildi.

3.2.8.2. Optimum İyonik Şiddet Çalışması

Belirlenen optimum pH'da optimum iyonik derişiminin belirlenmesi için 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2 ve 1,4 M'luk KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak enzim aktivitelerine bakıldı.

3.2.8.3. Stabil pH Çalışmaları

Enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için pH'ları 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 KH_2PO_4 ve pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl çözeltilerinden 150 μL alınıp ependorf tüplerine konuldu ve her birinin üzerine 150 μL enzim çözeltisi eklenerek 24 saatte bir, 6 gün boyunca aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.8.4. Optimum Sıcaklık Çalışması

Enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 0°C ile 90°C aralığında 10'ar °C'lik artırımlarla aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.8.5. NADPH VE GSSG Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik alışmalar

Enziminin substratlarının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için NADPH ve GSSG substratlarının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Öncelikle substratlardan NADPH'ın konsantrasyonu sabit tutularak 5 farklı GSSG konsantrasyonu ölçüm yapıldı. Daha sonra aynı şekilde GSSG konsantrasyonu sabit tutularak 5 farklı NADPH konsantrasyonu ölçüm gerçekleştirildi ve Lineweark-Burk grafikleri elde edilerek K_M ve V_{max} verileri elde edildi.

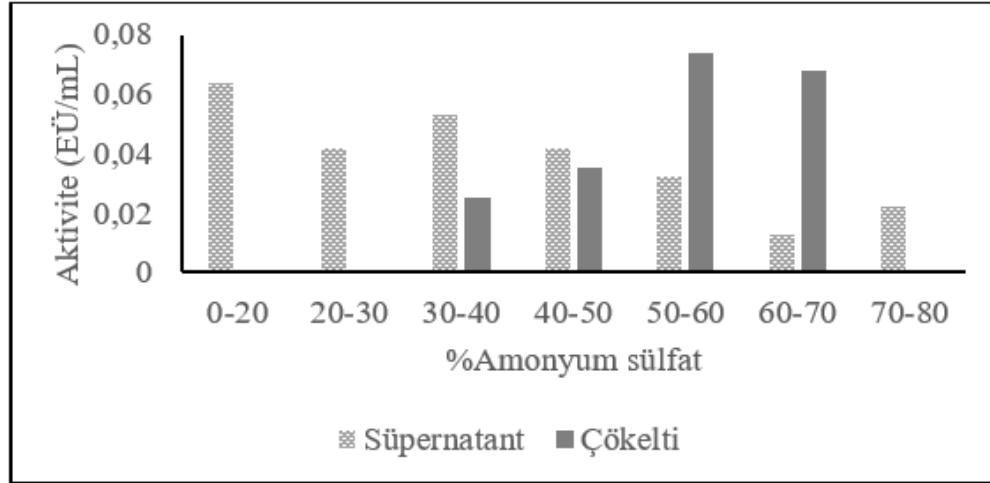
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.2.3’de açıklandığı gibi yapılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesine yönelik elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1. Amonyum sülfat çöktürülmesinde elde edilen sonuçlar

Amonyum Sülfat (%)	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelek (EÜ/mL)
0-20	0,064	-
20-30	0,042	-
30-40	0,053	0,025
40-50	0,042	0,035
50-60	0,032	0,074
60-70	0,013	0,068
70-80	0,012	-



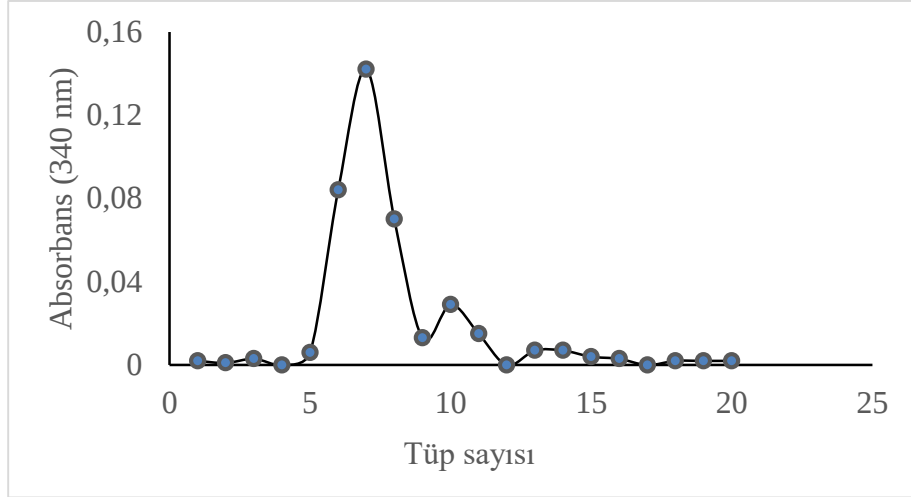
Şekil 4.1. Amonyum sülfat çöktürülmesinde elde edilen veriler grafiği

4.2. 2', 5' ADP Serharose-4B Afinite Kromatografisi Aktivite Sonuçları

Bölüm 3.2.4'de izah edildiği şekilde 2', 5' ADP Serharose-4B afinite kromatografisi esnasında enzim elüsyonu gerçekleştirildi ve elüatlardaki sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.2. Saflaştırma işleminde elde edilen tüpler ve aktivite verileri

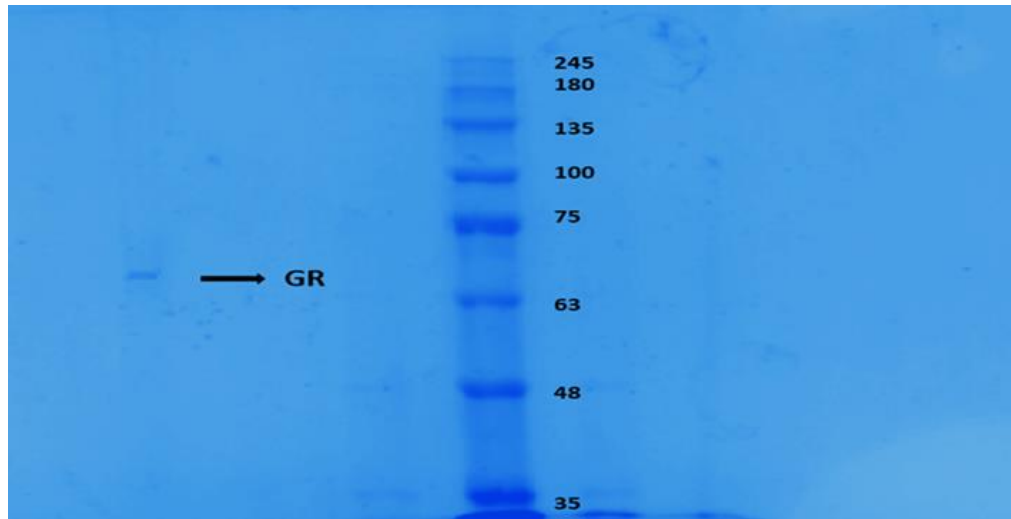
Tüp Sayısı	Aktivite (EÜ/mL)
1	0,002
2	0,001
3	0,003
4	0,000
5	0,006
6	0,084
7	0,142
8	0,070
9	0,013
10	0,029
11	0,015
12	0,000
13	0,007
14	0,007
15	0,004
16	0,003
17	0,000
18	0,002
19	0,002
20	0,002



Şekil 4.2. 2', 5' ADP Serharose-4B afinite kromatografisinden elde edilen elüatlar aktivite verileri grafiği

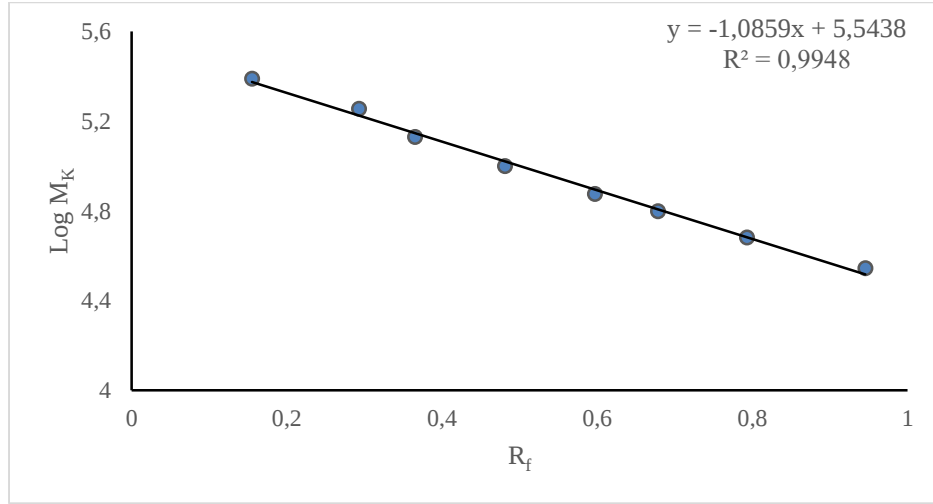
4.3. GR Enziminin Safılık Kontrolü ve Alt Biriminin Molekül Kütle Sonuçları

Bölüm 3.2.5'te izah edildiği şekilde amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisinden elde edilen saf GR enziminin saflığı SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edildi. Sonuçlar Şekil 4.3'te verildi.



Şekil 4.3. Elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı (Protein Marker PS11(Standartlar): 35 kDa, 48 kDa, 63 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 135 kDa, 180 kDa ve 245 kDa)

Elektroforezde saflaştırılan GR enzimin alt birimlerinin molekül kütesinin bulunması için Şekil 4.3'teki veriler kullanılarak log M_k - R_f grafiği çizildi. Çizilen grafik yardımıyla saflaştırılan koyun kalp dokusundaki GR enziminin alt birimlerinin mol kütesi ~70 kDa olarak bulundu (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. GR enzimin alt birimlerinin molekül kütesinin bulunması çizilen log M_k - R_f grafiği (Saf enzim için R_f : 63)

Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde 2', 5' ADP Serharose-4B afinite kromatografisi esnasında enzim saflaştırılan enzimin saflaştırma basamakları ve bazı özelliklerinin sonuçları Tablo 4.3'te gösterildi.

Tablo 4.3. Enzimin saflaştırılması ile ilgili elde edilen tablo

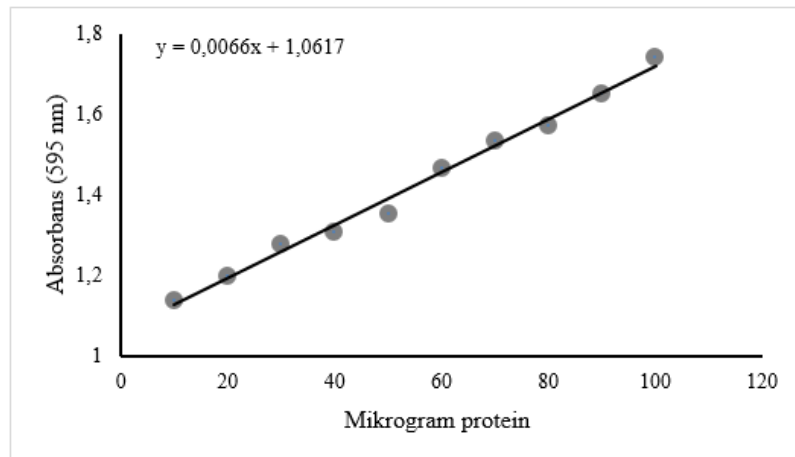
Numune türü	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ/mg. protein)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
<u>Homojenat</u>	10	0,160	0,876	8,760	1,600	0,183	100	1
<u>Amonyum sülfat çöktürmesi</u>	2	0,614	0,568	1,136	1,228	1,080	76,75	5,9
<u>Afinite kromatografisi</u>	9	0,077	0,0144	0,1296	1,166	5,35	72,87	191

4.4. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi saflaştırma esnasında elde edilen numunelerde protein tayinlerinin yapılabilmesi için öncelikle BSA kullanılarak standart grafik elde edildi. İlgili veriler Tablo 4.4’te ve elde edilen grafikte Şekil 4.5’te gösterildi.

Tablo 4.4. Kantitatif protein tayini için elde edilen absorbans değerleri

µg protein	Absorbans
10	1,137
20	1,199
30	1,277
40	1,306
50	1,353
60	1,463
70	1,533
80	1,569
90	1,650
100	1,739



Şekil 4.5. Kantitatif protein tayini için elde edilen standart grafik

4.5. Karakterizasyon İşlemlerine Ait Sonuçlar

4.5.1. Optimum pH Çalışmasının Sonuçları

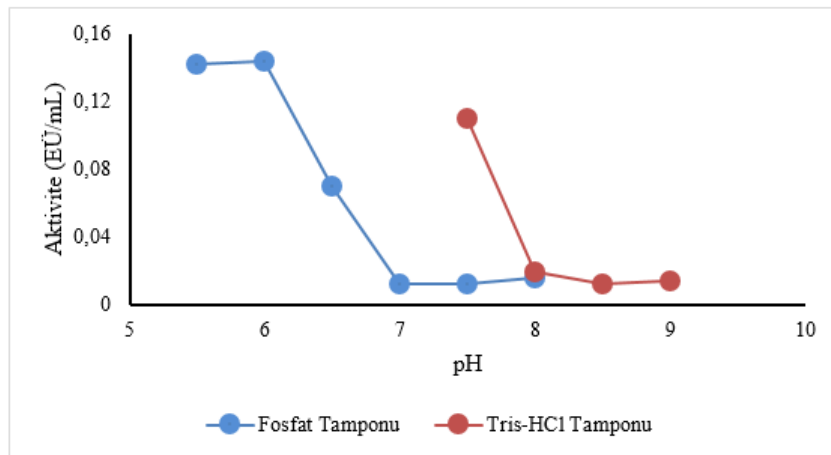
Bölüm 3.2.8.1’de izah edildiği gibi farklı pH’larda 0,1 M KH_2PO_4 ve 0,1 M Tris-HCl tamponları kullanarak hesaplanan değerler Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Şekil 4.6’da gösterildi.

Tablo 4.5. 0,1 M KH_2PO_4 tamponu kullanılarak farklı pH’larda ölçülen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,5	0,142
6,0	0,144
6,5	0,070
7,0	0,012
7,5	0,012
8,0	0,016

Tablo 4.6. 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanarak tamponu ile farklı pH’larda ölçülen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,5	0,110
8,0	0,019
8,5	0,012
9,0	0,014



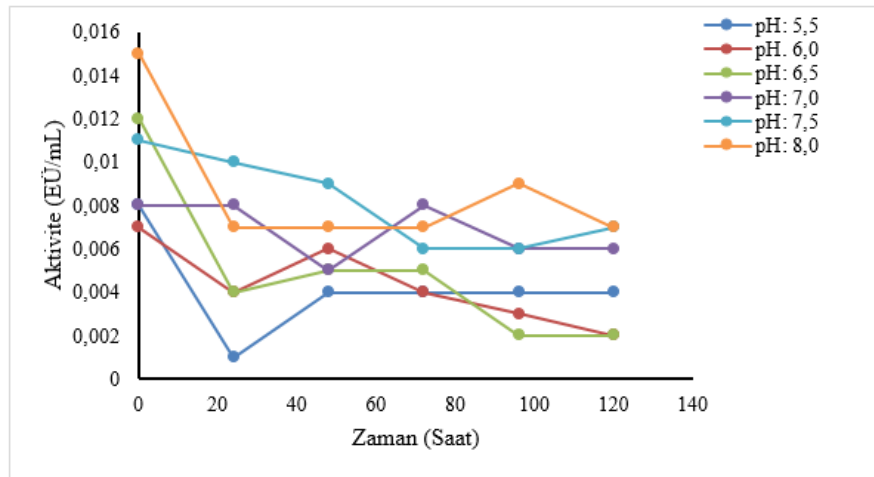
Şekil 4.6. Koyun kalp dokusunda GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunu yönelik pH-Aktivite grafikleri

4.5.2. Stabil pH Çalışmasının Sonuçları

Bölüm 3.2.8.3’de anlatıldığı gibi koyun kalp dokusunda GR enziminin stabil pH’sını bulmak için pH’ları 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, ve 8,0 olan 0,1 M KH_2PO_4 ve pH’ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen veriler Tablo 4.7, Tablo 4.8, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’te gösterildi.

Tablo 4.7. Stabil pH çalışması için 0,1 M KH_2PO_4 tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri

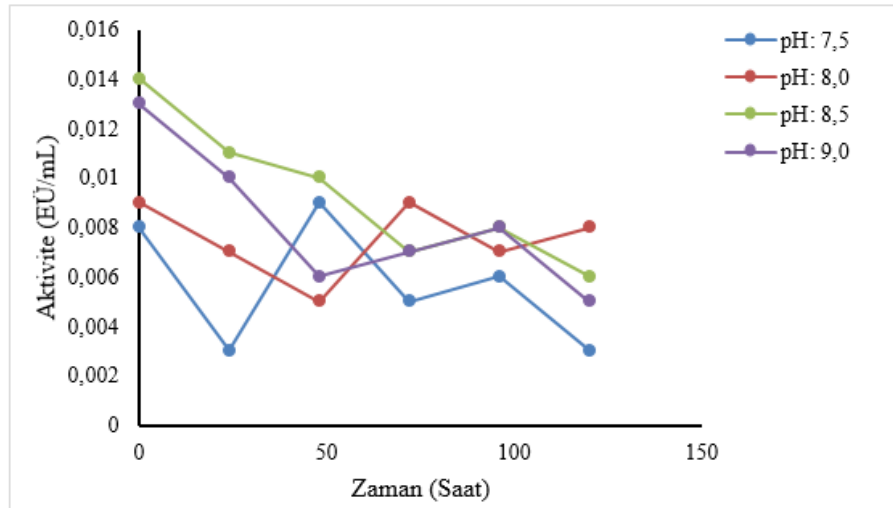
Zaman (Saat)	pH= 5,5 (EÜ/mL)	pH= 6,0 (EÜ/mL)	pH= 6,5 (EÜ/mL)	pH= 7,0 (EÜ/mL)	pH= 7,5 (EÜ/mL)	pH= 8,0 (EÜ/mL)
0	0,008	0,007	0,012	0,008	0,011	0,015
24	0,001	0,004	0,004	0,008	0,010	0,007
48	0,004	0,006	0,005	0,005	0,009	0,007
72	0,004	0,004	0,005	0,008	0,006	0,007
96	0,004	0,003	0,002	0,006	0,006	0,009
120	0,004	0,002	0,002	0,006	0,007	0,007



Şekil 4.7. Stabil pH çalışması için 0,1 M KH_2PO_4 tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri grafiği

Tablo 4.8. Stabil pH çalışması için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri

Zaman (Saat)	pH= 7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH= 8,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH= 8,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH= 9,0 Aktivite (EÜ/mL)
0	0,008	0,009	0,014	0,013
24	0,003	0,007	0,011	0,010
48	0,009	0,005	0,010	0,006
72	0,005	0,009	0,007	0,007
96	0,006	0,007	0,008	0,008
120	0,003	0,008	0,006	0,005



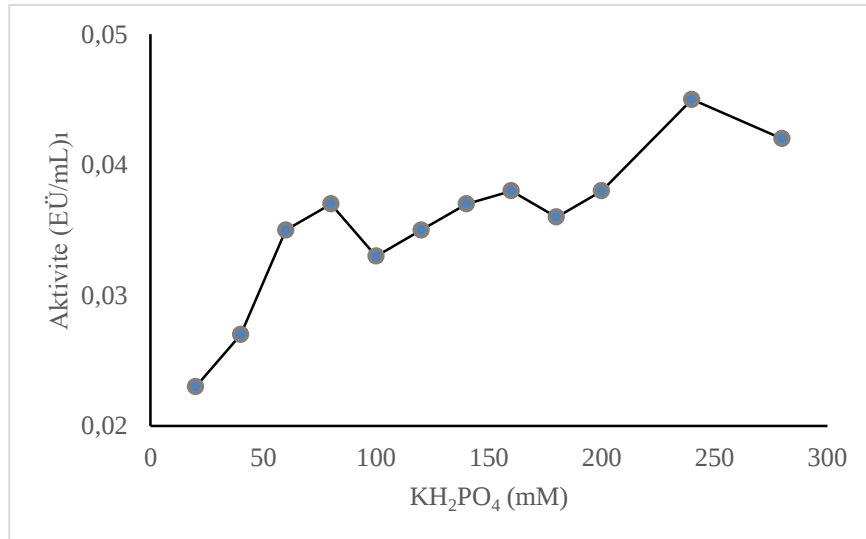
Şekil 4.8. Stabil pH çalışması için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen enzim aktivitesi verileri grafiği

4.5.3. Optimum İyonik Şiddet Çalışmasının Sonuçları

Bölüm 3.2.8.2’de izah edildiği gibi koyun kalp dokusunda GR enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için optimum pH’da (pH: 6,0) potasyum fosfat tamponunu farklı konsantrasyonunda aktiviteler ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.9 ve Şekil 4.9’da gösterildi.

Tablo 4.9. Optimum iyonik şiddetin hesaplanması için KH_2PO_4 tamponunun çeşitli derişimlerinde elde edilen aktivite verileri

KH_2PO_4 (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
20	0,023
40	0,027
60	0,035
80	0,037
100	0,033
120	0,035
140	0,037
160	0,038
180	0,036
200	0,038
240	0,045
280	0,042



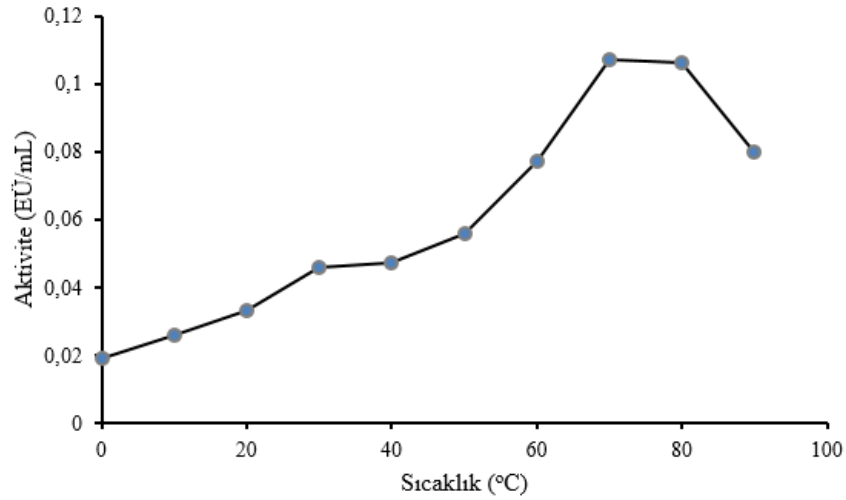
Şekil 4.9. Optimum iyonik şiddetin hesaplanması için KH_2PO_4 tamponunun çeşitli derişimlerinde elde edilen aktivite ölçüm sonuçları grafiği

4.5.4. Optimum Sıcaklık Çalışmasının Sonuçları

Bölüm 3.2.8.4'te anlatıldığı gibi koyun kalp dokusunda GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 0°C-90°C arasında her 10°C'de bir aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10 ve Şekil 4.10'da gösterildi.

Tablo 4.10. Optimum sıcaklık için optimum pH'da elde edilen aktivite verileri tablosu

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,019
10	0,026
20	0,033
30	0,046
40	0,047
50	0,056
60	0,077
70	0,107
80	0,106
90	0,080



Şekil 4.10. Optimum sıcaklık için optimum pH'da elde edilen aktivite-sıcaklık grafiği

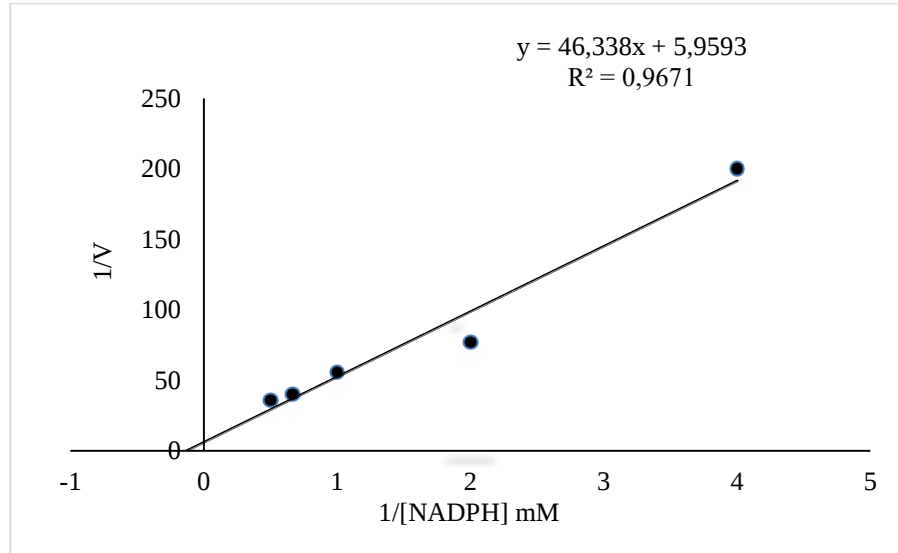
4.5.5. NADPH ve GSSG Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Sonuçları

Bölüm 3.2.8.5'te izah edildiği gibi GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için GSSG'nin sabit konsantrasyonda ve 5 farklı NADPH konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile $1/\text{NADPH}-1/V$ (Lineweaver-Burk) grafiği çizildi. Sonuçlar Tablo 4.11 ve Şekil 4.11'de gösterildi.

Benzer şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda ve GSSG 5 farklı konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla $1/\text{GSSG}-1/V$ (Lineweaver-Burk) grafiği çizildi. Sonuçlar Tablo 4.12 ve Şekil 4.12'de gösterildi.

Tablo 4.11. NADPH substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için elde edilen veriler

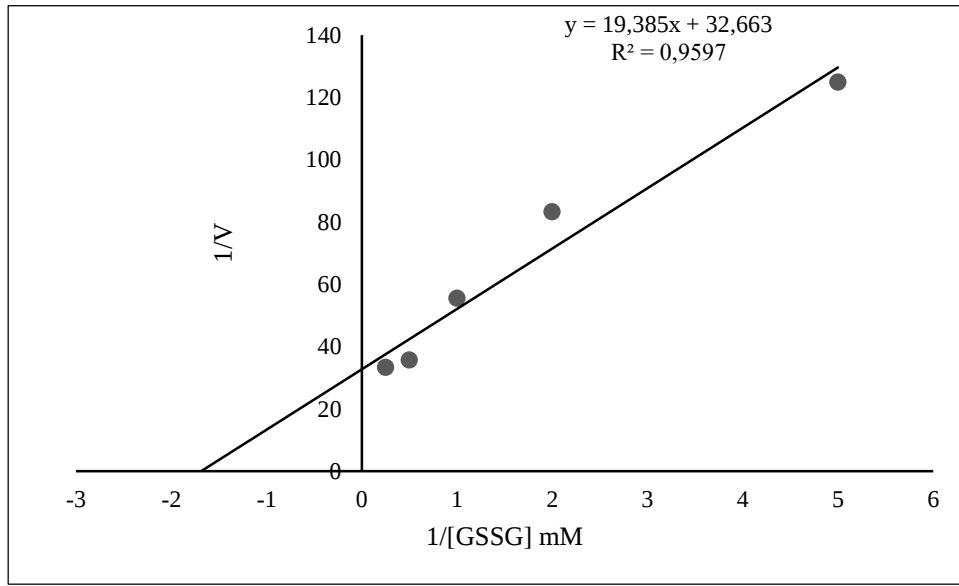
NADPH (mM)	1/NADPH (mM)	V	1/V
0,25	4	0,050	200
0,50	2	0,013	76,923
1	1	0,018	55,555
1,5	0,666	0,025	40
2	0,5	0,028	35,714



Şekil 4.11. NADPH substratının K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.12. GSSG substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için elde edilen veriler

[GSSG] (mM)	1/[GSSG] (mM)	V	1/V
0,2	5,0	0,008	125
0,5	2,0	0,012	83,33
1	1,0	0,018	55,555
2	0,50	0,028	35,714
4	0,25	0,030	33,333

Şekil 4.12. GSSG substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller olarak tanımlanır. Eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküller başka maddeler ile kolaylıkla tepkimeye girebilirler. Bu tür atom ve moleküller serbest radikal olarak adlandırılır. Serbest radikalleri detoksifiye edebilen ve oluşturdıkları hasarı giderebilen maddelere antioksidan maddeler denir. Organizmada oluşan radikaller ile antioksidan maddeler arasında bir dengenin olması gerekir. Bu denge bozulduğu takdirde oksidatif stres gerçekleşebilir. Oksidatif stres hücre içinde hem lipidlerin membran yapısını hem de enzimlerin yapısını bozar. Aynı zamanda proteinlerin peptit bağını da etkiler ve DNA ile tepkimeye girerek DNA'daki zincirin kırılmasına neden olabilirler. Oksidatif stresin oluşması sonucunda dokuda hasar, kanser oluşumu, Parkinson, Alzheimer, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve diyabet gibi hastalıklar gelişebilir. Bu konularla ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Demir ve Yörük, 2022; Sies, 1991; Gutteridge, 1995).

Glutasyon (GSH) hücre içinde önemli bir antioksidan moleküldür. Bu molekül hücre döngüsünün düzenlenmesi, gen ekspresyonu ve bağışıklık fonksiyonu gibi birçok hayati olayda rol oynar. Bir tripeptit olan glutasyon, yapısında bulundurduğu -SH (tiyol) grubu sayesinde antioksidan mekanizmada önemli bir role sahiptir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi glutasyon mekanizmasında çok önemli bir role sahip olan glutasyon redüktaz (E.C 1.8.1.7), NADPH varlığında okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlar. Hücre içinde GSH/GSSG oranı da çok önemlidir. Oksidatif stresin artmasıyla GSSG miktarı yükselir ve sonuç olarak bu oranın azalmasına neden olur. Bu durum da hücreler içinde radikal madde sayısının artması söz konusudur (Dudak ve ark., 2023; Karadağ, 2019; Carlberg and Mannervik, 1985)

Çalışmamızda koyun kalp dokusundan GR enziminin saflaştırılması için %30-70 arasında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı (Şekil 4.1, Tablo 4.1). Yapılan literatür araştırmalarında koyun beyini GR enzimi için %35-55(Acan and Tezcan, 1989), tavuk karaciğeri GR enzimi için %30-70 (Erat et al., 2005), fare karaciğeri GR enzimi için %40-80 (Lopez Barea and Lee, 1979), koyun karaciğeri GR enzimi için %0-70 (Ulus et al., 2003) ve sığır eritrosit GR enzimi için %30-70 (Erat et al., 2003) olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi koyun kalp dokusu GR enzimi için bulduğumuz bu sonuç ile Erat ve arkadaşlarının tavuk karaciğerinde ve sığır eritrositlerinde buldukları doygunluk aralığı ile aynıdır. Ancak diğer çalışmalarda bulunan sonuçtan farklıdır.

Sonraki aşamada ise koyun kalp dokusu GR enziminin saflaştırılması için 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografi yöntemi kullanıldı. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi substratı NADPH olan enzimleri daha kolay bağlama yeteneğine sahiptir. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırma yapılırken Tablo 4.3'ten elde edilen elüatlar ve elüatların enzim aktivesi Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen saflaştırma sonuçları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Tablo 4.3'ten görüldüğü gibi 5,35 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip GR enzimi % 72,87 verimle 191 kat saflaştırıldı.

Ulus ve Tandoğan (2007), 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve DEAE Sepharose Fast Flow kromatografisi kullanarak sığır karaciğerinde 185 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip GR enzimini %38,4 verimle 5456 kat saflaştırmışlardır. Yapılan bir başka çalışmada ise Ulus ve arkadaşları tarafından (2003) 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve Sephadex G-200 Jel kromatografisi yöntemlerini kullanılarak 47,27 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip koyun karaciğeri GR enzimi %14,1 verimle 1477 kat saflaştırılmıştır. Ulus ve Tandoğan (2010) yaptıkları başka bir çalışmada 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve DEAE Sepharose kolon kromatografisi kullanarak 727 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip sığır böbrek korteksi GR enzimini %85 verimle 34806 kat saflaştırmıştır.

Enzimin saflık derecesinin kontrol edilmesi ve alt birimlerinin molekül kütlelerinin bulunması için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elde edilen jel fotoğrafı Şekil 4.3'te gösterildi. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi birinci kolonda tek bant mevcuttur ve bu da

enzimin saf olarak elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca Şekil 4.3.'teki jel fotoğrafından faydalanılarak log M_k -Rf grafiği çizildi. Çizilen grafik yardımı ile koyun kalp dokusu GR enziminin alt birimlerinin molekül kütlesi 70 kDa olarak bulundu (Şekil 4.4). Literatür araştırmalarına göre sığır karaciğeri (Ulus ve Tandoğan, 2007) için GR enzimin mol kütlesi 55 kDa, sıçan böbreği (Can et al., 2010) için GR enzimin mol kütlesi 53 kDa, hindi karaciğeri (Taşer and Çiftci, 2012) için GR enziminin mol kütlesi 65 kDa, tavuk karaciğeri (Erat et al., 2005) için GR enziminin mol kütlesi 45 kDa ve sığır eritrosit (Erat et al., 2003) için GR enziminin mol kütlesi 66 kDa olarak bulunmuştur. Tarafımızdan bulunan molekül kütlesi değeri Taşer ve Çiftci'nin (2012) hindi karaciğeri GR enzimi, Erat ve arkadaşları (2003) sığır eritrosit GR enziminin mol kütlelerine yakın bir değerdedir. Ulus ve Tandoğan'ın (2007) sığır karaciğeri GR enzimi, Erat ve arkadaşları (2005) tavuk karaciğeri GR enzimi ve Can ve arkadaşları (2010) sıçan böbreği GR enzimi için bulduğu değerden farklıdır.

Karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH'sının bulunabilmesi için 0,1 M KH_2PO_4 (pH: 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0) ve 0,1 M Tris-HCl (pH: 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0) tamponları ile parantez içinde verilen pH'larda aktiviteler ölçüldü ve Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Şekil 4.6'da gösterildi. Şekil 4.6'dan görüldüğü gibi en yüksek aktivite KH_2PO_4 tamponunda pH: 6,0 olarak elde edildi. Dolayısıyla enzimin optimum pH'sı 6,0 olarak kabul edildi. Yapılan literatür taramasında sığır eritrosit GR enziminin optimum pH'sı 7,3 (0,05 M KH_2PO_4 tamponundan) (Erat et al., 2003), koyun karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı 8,0 (0,05 M Tris-HCl tamponundan) (Ulus et al., 2005), tavuk karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı 7,0 (0,075 M Tris-HCl tamponundan) (Erat et al., 2005), hindi karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı 7,5 (0,1 M KH_2PO_4 tamponunda) (Taşer ve Çiftci, 2012) ve sığır böbrek korteksi GR enziminin optimum pH'sı ise 7,2 (0,1 M KH_2PO_4 tamponunda) (Tandoğan ve Ulus, 2010) olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi tarafımızdan bulunan koyun kalp dokusu GR enziminin optimum pH'sı söz konusu literatürlerde verilen optimum pH'lardan farklıdır. Bu farklılık koyun kalp dokusu GR enziminin sözü edilen enzimler ile izoenzim olma ihtimali ile açıklanabilir.

Enzim için stabil pH'nın belirlenmesi amacıyla 0,1 M KH_2PO_4 ve 0,1 M Tris-HCl tamponları kullanılarak 6 gün boyunca 24 saatte bir enzim aktivitesi ölçüldü ve elde

edilen aktivite değerleri Tablo 4.7, Tablo 4.8, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterildi. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’den görüldüğü gibi enziminin aktivitesinin 6 gün boyunca en çok korunduğu pH, pH: 8,0 (0,1 M KH_2PO_4 tamponundan) olarak görünmektedir. Söz konusu enzimin stabil pH’sı hindi karaciğeri (Taşer ve Çiftci, 2012), sığır eritrosit (Erat et al., 2003), tavuk karaciğeri (Erat et al. 2005) ve koyun karaciğerinde (Ulus et al., 2005) sırasıyla 8,5, 7,3, 7,4 ve 5,5 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre koyun kalp dokusu GR enziminin stabil pH’sı hindi karaciğerinin pH’sına yakın bir değerdayken diğerlerinden farklıdır.

Koyun kalp dokusunda optimum iyonik şiddetin bulunabilmesi için 20-280 mM KH_2PO_4 aralığında (Tablo 4.9) enzim aktivitesi ölçüldü ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da gösterildi. Şekil 4.9’dan görüldüğü gibi enzimin maksimum aktivite gösterdiği KH_2PO_4 derişimi 240 mM’dır. Dolayısıyla enzimin optimum iyonik şiddeti 240 mM KH_2PO_4 olarak kabul edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda sığır eritrosit GR enzimi için 435 mM (KH_2PO_4 tamponunda) (Erat et al., 2003), tavuk karaciğeri için 750 mM (Tris-HCl tamponunda) (Erat et al., 2005), koyun karaciğerinde 50 mM (Tris-HCl tamponundan) (Ulus et al., 2005) ve hindi karaciğerinde 100 mM (KH_2PO_4 tamponunda) (Taşer ve Çiftci, 2012) olarak tespit edilmiştir. Bulduğumuz sonuç bu sonuçlarla karşılaştırdığında farklı bir sonuç olduğu görülmektedir.

Koyun kalp dokusu GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacı ile 0-90°C aralığında 10’ar °C aralıklarla enzim aktivitesi ölçüldü ve Tablo 4.10 ve Şekil 4.10’da gösterildi. Şekil 4.10’dan görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 70°C elde edildi. Dolayısıyla enzimin optimum sıcaklığı 70°C olarak kabul edildi. Literatür taramalarında sığır böbrek korteksi (Tandoğan ve Ulus, 2010), tavuk karaciğeri (Erat et al., 2005), koyun karaciğeri (Ulus et al. 2005), sığır karaciğeri (Tandoğan ve Ulus, 2007) ve sıçan böbreği (Can et al., 2010) GR enzimleri için elde edilen optimum sıcaklık değerleri sırası ile 50, 50, 60, 50 ve 65°C olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi tarafımızdan bulunan koyun kalp dokusu GR enziminin optimum sıcaklığı yukarıda sıralanan optimum sıcaklık değerlerinden daha yüksektir ve genelde beklenmeyen bir sonuçtur. Bu durum söz konusu enzimin diğer enzimlerin bir izoenzimi olduğu fikrini kuvvetlendirmektedir.

Enzimin substratları olan NADPH ve GSSG substratlarının K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanabilmesi için çizilen Lineawear-Burk grafiklerinden yararlanıldı. NADPH için K_M değeri 7,776 mM, V_{max} değeri 0,1678 EÜ/mL (Tablo 4.11 ve Şekil 4.11); GSSG için ise K_M değeri 0,593 mM, V_{max} değeri ise 0,0306 EÜ/mL (Tablo 4.12 ve Şekil 4.12) olarak hesaplandı. Elde edilen K_M değerlerine göre enzimin GSSG'ye olan ilgisinin NADPH'a göre daha fazla olduğu sonucuna varıldı. Söz konusu enzimin substratları için daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin fare karaciğeri GR enzimi için (Lopez Borea and Lee, 1979) elde edilen NADPH ve GSSG'ye ait K_M değerleri sırasıyla 5,9 ve 107 μ M'dır. Yapılan bir diğer çalışmada sığır eritrosit (Erat et al., 2003) GR enziminin NADPH substratı için K_M değeri 71,4 mM, V_{max} değeri ise 0,9314 EÜ/mL; GSSG substratı için elde edilen K_M değeri 149,7 mM, V_{max} değeri ise 0,6766 EÜ/mL'dir. Yine Erat ve arkadaşları (2005) tarafından tavuk karaciğerinde yapılan bir çalışmada NADPH ve GSSG substratları için elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,1252 mM, 0,1542 mM ve 1,2656 EÜ/mL, 0,6677 EÜ/mL olarak bulunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada Ulusu ve arkadaşları (2005) koyun karaciğeri GR enziminin substratları olan NADPH ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,0258 mM, 0,0239 mM ve 0,266 EÜ/mL, 0,255 EÜ/mL olarak tespit edilmiştir. Söz konusu enzim ile hindi karaciğerinde yapılan (Taşer ve Çiftci, 2012) diğer bir çalışmada NADPH ve GSSG substratları için elde edilen K_M ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,170 mM, 0,030 mM ve 0,550 EÜ/mL, 0,228 EÜ/mL olarak verilmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi tarafımızdan saflaştırılan GR enziminin GSSG'ye olan ilgisinin büyük olması durumu koyun karaciğeri (Ulus et al., 2005) GR enzimi ve hindi karaciğer (Taşer ve Çiftci, 2012) GR enzimi için de söz konusudur. Ancak fare karaciğeri (Lopez Borea and Lee, 1979), sığır eritrositleri (Erat et al., 2003) ve tavuk karaciğeri (Erat et al., 2005) GR enzimlerinin ilgilerinin NADPH'a daha fazla yatkın olduğu görülmektedir. Yine tarafımızdan bulunan V_{max} değerleri yukarıda verilen söz konusu literatürlerdeki V_{max} değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak tez çalışmasında koyun kalp dokusundaki GR enziminin;

- ✓ Amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-70,
- ✓ 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile 5,35 EÜ/mg. protein spesifik aktivitesine sahip GR enzimi %72,82 verimle 191 kat saflaştırılmıştır.
- ✓ Alt birim molekül kütlesi 70 kDa
- ✓ Optimum pH, 0,1 M KH_2PO_4 tamponundan 6,0
- ✓ Stabil pH, 0,1 M KH_2PO_4 tamponundan 8,0
- ✓ Optimum iyonik şiddet, 0,1M KH_2PO_4 tamponundan 240 mM
- ✓ Optimum sıcaklık 70°C
- ✓ NADPH için K_M değeri 7,776 mM ve V_{max} değeri 0,1678 EÜ/mL
- ✓ GSSG için K_M değeri 0,593 mM ve V_{max} değeri 0,0306 EÜ/mL olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

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

Aksoy, M. and Kıranşan, K. D. (2020). The constructon and testing of an amperometric biosensor for oxidized glutathione with glutathione reductase immobilized on reduced graphene oxide paper modified with cobalt sulphur. *Chemistry Select.*, 5, 13925-13935.

Aksoy, Y. (2002). Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 22, 442-448.

Al-Senaıdy, A. M. (2010). Purfication and characterization Of glutathione reductase from camel (*Camelus Dromedaries*) erythrocytes. *Eur. J. Sci. Res*, 48, 142-154.

Arslan, R., Şekeroğlu, R. ve Bayıroğlu, F. (1995). Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Yüüüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimler Derg.*, 2, 137-142.

Barea, J. L. and Lee C. Y. (1979). Mouse liver glutathione reductase purification, kinetics and regulation. *Eur. J. Biochem*, 98, 487-499.

Barlett, P. D. (1953). Free radicals. *Scientific American*, 189, 74-79.

Beutler, E. (1969). Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: invivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 48, 1957-1966.

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, 248-254.

Cabezas, H., Raboso, R. R. and Hevia, E. M. M. (1999). Activity and metabolic roles of the pentose phodphateb cycle in several rat tissue. *Molecular and Celluar Biochemistry*, 201, 57-63.

Can, B., Kulaksız Erkmn, G., Dalmızrak, Ö., Ogus, I. H. and Özer, N. (2010). Purification and characterization of rat kidney glutathione reductase. *Protein J.*, 29, 250-256.

Carlberg I. and Mannervik, B. (1981). Glutathione reductase. 116-531.

Carlberg, I. and Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the glutathione reductase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5475-5480.

Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985). Reduction of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate by glutathione reductase and effect of NADP⁺ on the electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(4), 1629-1635.

Chang, C. J., Van Der Hoeven, L. H., M. D., Haddox, C. H. and Ph. D. (1978). Glutathione reductase in the red blood cells. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 8(1), 23-29.

Chen, T. H., Wang, H. C., Chang, C. J. and Lee, S. Y. (2024). Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 1314.

Conn, E. E. and Vennesland, B. (1951). Glutathione reductase of wheat germ. *The Journal of Biological Chemistry*, 192, 17-28.

De Rey-Pailhade, J. (1928). Le philothion diatase D'hydrogenation. *C. R. Soc. Biol. XCIX*, 1700.

Demir, D. ve Yörük, İ. H. (2022). Diplotaenia turcia bitkisinde glutatyon redüktaz ve glutatyon s-transferaz enzim aktiviteleri ile protein karbonil düzeyinin belirlenmesi. *BÜSAD*, 3(2), 165-172.

Dudak, S. B., Işık, K., Mitrović B., Soydan, E. and Ekinci, D. (2023). Purification of glutathione reductase enzyme from whiting fish gill tissue and investigation of metal inhibition. *Open Access Journal*, 6(6), 610-614.

Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R. and Mandal, P. K. (2020). Glutathione in brain: overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation, and potential therapeutic role in brain disorders. *Neurochem Res.*, 45, 1461-1480.

Erat, M., Demir, H. and Şakiroğlu, H. (2005). Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties. *Applied biochemistry and biotechnology*, 125, 127-138.

Erat, M., Şakiroğlu, H. and Çiftçi M. (2003). Purification and characterization of glutathione reductase from bovine erythrocytes. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 33(4), 283-300.

Eseryel, S. A., Alakborava, N., Avcılar, C., Altınoluk, T., Güven, Ü., Sarı, D., ... ve Yalçın, A.S. (2022). *Serbest radikaller ve antioksidanlar*. Marmara Üniversitesi Yayınevi, 38-47.

Flagg, E. W., Coates, R. J. and Eley, J. W. (1994). Dietary glutathione intake in humans and the relationship between intake and plasmatotal glutathione level. *Nutr Cancer*, 21, 33-46.

Garcia-Alfonso, C., Martinez-Galisteo, E., Liobell, A., Barcena, J. A. and Lopez-Barea J. (1993). Horse liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int. J. Biochem*, 25(1), 61-8.

Gutteridge, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of Damage. *Clin Chem*, 41/12, 1819-1828.

Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E. (2006). *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 832.

Hopkins, F. G. (1921). On an autooxidisable component of the cell. *Biochem. J.*, 15, 286-303.

Hopkins, F. G. (1929). On glutathione a reinvestigation. *J.Biol. Chem.*, 84, 269-320.

Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A. and Pathak, D. (2022). Glutathione in brain disorders and aging. *Moleculus*, 27, 324.

Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamoğlu, M. ve Tiftif, A. (2010). *Biyokimya*. Ankara: Nobel Yayın Dağılım, 213-224.

Karabulut, H. ve Gülay M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimler Enstitü Dergisi*, 4(1), 50-59.

Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet. Fak. Derg.*, 1(1), 65-76.

Karadağ, H. (2019). The in vitro effect of neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam on glutathione reductase enzyme activity from Baker's Yeast (*Saccharomyces Cerevisia*). *ADYUJSCI*, 9(2), 266-273.

Karagözoğlu, Y. ve Çiftci M. (2017). Bazı metal iyonlarının tavuk böbreğinde saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine in vitro etkilerinin araştırılması. *Tr. Doğa ve Fen Derg.*, 6(1), 24-30.

Karakan, M. ve Nazlıkul, H. (2017). Oksidatif stres ve serbest radikallerin vücut üzerindeki etkisi. *Bilimsel Tamamlayıcı tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi*, 11(2), 7-11.

Kasapçopuk Özel, G. S. ve Birdane, Y. O. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 7(2), 41-52.

Keha, E. ve Küflelioğlu, İ. (2009). *Biyokimya*. İstanbul: Aktif Yayınevi, 89-107.

Laemmli, D. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriaophage T4. *Nature London*, 227, 680.

Lantomasi, T., Favilli, F., Marraccini, P., Magaldi, T., Bruni, P. and Vincenzini, M. T. (1997). Glutathione transport system in human small intestine epithelial cells. *Biochim Biophys. Acta.*, 1330, 274-283.

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

Mapson, L. W. and Goddard, D. R. (1951). The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochemical Journal*, 49(5), 592-601.

Nelson, D. and Cox, M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Ankara: Palme Yayıncılık, 183-185.

Pai, E. F. and Schulz, G. E. (1982) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-Ray diffraction analyses of reaction intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(3), 1752-1757.

Ribas, V., Garca A Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Front. Pharmacol*, 5, 151.

Schulz, G. E., Schirmer, R. H., Sachsenheimer, W. and Pai, E. F. (1978). The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature Publishing Group*, 273, 120-124.

Scire, A., Cianfrualia, L., Minelli, C., Bartolini, D., Torquato, P., Principato, G., and Armeni, T. (2019). Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. *Bio Factors*, 45, 152-168.

Sies, H. (1991). Oxidative stress from basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, 91, 31-38.

Stall, G. E. J., Visser, J. and Veeger, C. (1969). Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 39-48.

Tandoğan, B. and Uluşu, N. N. (2006). Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 31, 230-237.

Tandoğan, B. and Uluşu, N. N. (2010). Purification and kinetics of bovine kidney cortex glutathione reductase. *Protein & Peptide Letters*, 17, 667-674.

Taşer, P. ve Çiftci, M. (2012). Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 36(5), 546-553.

Temel, Y., Taher, S. S. M., Hamza, M. A., Shafeeq, İ. H., Koçyiğit, U. M. ve Çiftci, M. (2018). Bazı metal iyonlarının japon bıldırcın (*Coturnix Coturnix Japonica*) karaciğer glutatyon redüktaz enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması. *Cumhuriyet Scie. J.*, 39(3), 679-687.

Uluşu, G., Erat, M., Çiftci, M., Şakiroğlu, H. and Bakan, E. (2003). Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1109-1117.

Uluşu, N. N. and Tandoğan, B. (2007). Purification and kinetic of glutathione reductase from bovine liver. *Mol. Cell. Biochem*, 303, 45-51.

Voskava, J., Kocan, L., Vasko, L. and Perjesi, P. (2023) Glutathione related enzymes and proteins: a review. *Molecules*, 28, 1447.

Walker, R. W. (1990). Free radicals in combustion chemistry. *Sci. Progress Oxford*, 74, 163-188.

Williams, H. C., Zanetti, G., Arscott, L. D. and Mcallister, J. K. (1967). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and thioredoxin a simultaneous purification and characterization of the four proteins from *escherichia coli*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 242(22), 5226-5231.

Worthington, D. J. and Rosemeyer, M. A. (1976). Glutathione reductase from human erythrocytes catalytic properties and aggregation. *Eur. J. Biochem*, 67, 231-238.

Yarat, A., Akbay, T. T. ve Alturfan, E. I. (2019). *Biyokimyada temel ve özel konular*. Ankara: Akademisyen kitapevi, 133-135, 285.

Zanetti, G. (1979). Rabbit liver glutathione reductase purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 198(1), 241-246.

