

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN DALAK
DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
ÇİĞDEM ÇOBAN

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

BİNGÖL 2022

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, hoşgörüsünü, anlayışını, babacanlığını esirgemeyen ve öğrencisi olmamın ayrıcalığını her daim hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Araştırmalarım boyunca gerek labaratuvar çalışmalarında gerekse her türlü sorumda bilgisinden istifade ettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Doç Dr. Yusuf TEMEL hocama değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayattaki birçok zorluğa rağmen bana inanıp her türlü fedakarlığı yapan, dualarını her daim hissettiğim canım annem ve babama büyük bir minnetle saygılarımı sunuyorum.

Tanıştığım ilk günden itibaren her anımda özellikle en zor zamanlarımda desteğini hep hissettiğim, yanımdayken daha güçlü kalabildiğim, yapabileceklerime beni hep inandıran kıymetli eşim Mahmut ÇOBAN'a canı gönülden teşekkür ediyorum.

Varlıklarıyla her daim bana ilham kaynağı olan, masumiyetleriyle kim olduğumu ve gerçek insan kimliğimi hatırlatan gözümün nurları, cennet kokulu yavrularım Çiğdem Almin ÇOBAN ve Çiğdem Mila ÇOBAN'a hayatıma kattıkları anlamlar için çok ama çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca bu çalışmada Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BÜBAP)'ne BAP-FEF-2019.00.007 nolu proje ile sağladıkları maddi destekten dolayı teşekkür ederim.

Çiğdem ÇOBAN
Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	ixi
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.2. Glutasyon	5
1.3. Glutasyon Redüktaz	7
1.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler ve ilaçlar	9
1.4.1 Amoksisilin	10
1.4.2. Tylosin.....	10
1.4.3. Ampisilin	11
1.4.4. Streptomisin Sülfat	12
1.4.5. Gentamisin	12
1.4.6. Sefuroksim sodyum	13
1.4.7. Sefazolin Sodyum	14
1.4.8. Sefoperazon Sodyum	15
1.4.9. Linkomisin-HCl.....	15
1.4.10. Klindamisin-HCl.....	16
1.4.11. Novamizol.....	17

1.4.12. Ketojezik	18
1.4.13. Prekort-Liyo	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	21
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	21
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.1. Homojenatın Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.3. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	30
3.1.3.5. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler	31
3.1.3.6. Antibiyotik ve ilaçların ana çözeltileri	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Koyun Dalak Dokusunun Temini	32
3.2.2. Glutasyon Redüktaz Enziminin Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması ...	33
3.2.2.1. Homojenat Hazırlanması	33
3.2.2.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	33
3.2.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	34
3.2.2.4. 2', 5' ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ile enzim saflaştırılması	35
3.2.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü	36
3.2.2.6. GR Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini	37
3.2.3. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	37
3.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları	38

3.2.4.1. Optimum pH Çalışmaları.....	38
3.2.4.2. Optimum İyonik Şiddet Çalışmaları.....	38
3.2.4.3. Stabil pH Çalışmaları	39
3.2.4.4. Sıcaklığın Enzime Aktivitesine Etkisinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar.....	39
3.2.4.5. NADPH ve GSSG Substratları İçin K_M sabitinin ve V_{max} Değerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar.....	39
3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Araştırılması.....	39
3.2.6. Koyun Dalak GR Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bazı İlaç ve Antibiyotiklerin K_i Sabitlerinin Bulunması	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	54
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Protein Grafiği.....	54
4.2. Koyun Dalak Dokusu GR Enziminin Saflaştırılmasına Ait Bulgular.....	55
4.2.1. Afinite Kromatografisi Bulguları	55
4.2.2. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü.....	57
4.2.3. Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE ile Alt Biriminin Molekül Kütesinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular	58
4.3. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Bulgular.....	58
4.3.1 Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Bulgular	58
4.3.2. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	60
4.3.3. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi İçin Stabil pH	

Bulunmasına Yönelik Bulgular.....	61
4.3.4. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular.....	64
4.3.5. NADPH ve GSSG Substratları İçin K_M Sabiti ve V_{max} Değerinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular.....	64
4.4. İnhibitör Etkisi Gösteren İlaçlar İçin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Belirlenmesine Yönelik Bulgular.....	66
4.5. Koyun dalak GR Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Sabitlerinin Belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışmaların Bulguları.....	74
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

GR	: Glutasyon redüktaz
GSSH	: Oksitlenmiş glutasyon
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
TCA	: Triklor asetik asit
DTT	: Ditiyotreitöl
PER	: Amonyum per sülfat
BSA	: Bovin serum albumin
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
Da	: Dalton
EÜ/mL	: 1 mL'deki enzim ünitesi sayısı
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
kDa	: Kilodalton
M _K	: Molekül kütlesi

R_f	: Oransal hız
K_M	: Michaelis-Menten sabit V_{max} : Maksimum hız
mL	: Mili Litre
μL	: Mikrolitre
mg	: Mili gram
mM	: Mili mola
O_2^-	: Süperoksit radikali
OH	: Hidroksil radikali



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver– Burk grafiği	3
Şekil 1.2. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver–Burk grafiği	4
Şekil 1.3. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver–Burk grafiği	4
Şekil 1.4. Redükte glutatyonun molekülü	6
Şekil 1.5. Okside glutatyonun molekülü	6
Şekil 1.6. Glutatyon redüktazın antioksidan savunma sistemindeki önemi.....	8
Şekil 1.7. Amoksisil molekülünün yapısal formülü.....	10
Şekil 1.8. Tylosin molekülünün yapısal formülü.....	11
Şekil 1.9. Ampisilin molekülünün yapısal formülü	12
Şekil 1.10. Streptomisin Sülfat molekülünün yapısal formülü	12
Şekil 1.11. Gentamisin molekülünün yapısal formülü.....	13
Şekil 1.12. Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü	14
Şekil 1.13. Sefazolin Sodyum molekülünün yapısal formülü.....	14
Şekil 1.14. Sefoperazon Sodyum molekülünün yapısal formülü.....	15
Şekil 1.15. Linkomisin-HCl molekülünün yapısal formülü	16
Şekil 1.16. Klindamisin molekülünün yapısal formülü	17
Şekil 1.17. Metamizol molekülünün yapısal formülü.....	18
Şekil 1.18. Ketoprofen molekülünün yapısal formülü	18
Şekil 1.19. Metilprednisolon molekülünün yapısal formülü.....	19
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart Grafik	54
Şekil 4.2. Koyun dalak dokusu GR enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği.....	56
Şekil 4.3. GR enzimi için elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı.....	57

Şekil 4.4. Saflaştırılan GR enzimi için LogMK/Rf grafiği	58
Şekil 4.5. Koyun karaciğer dokusu GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunu gösteren pH-Aktivite grafiği	60
Şekil 4.6. Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak koyun dalak dokusunun GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği	61
Şekil 4.7. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun dalak dokusu GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	61
Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun dalak dokusu GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	63
Şekil 4.9. Koyun dalak dokusu GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği	64
Şekil 4.10. GSSG için K_M sabiti ve V_{max} değerinin belirlenmesi grafiği	65
Şekil 4.11. NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değerinin belirlenmesi grafiği.....	66
Şekil 4.12. Ampisilin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.13. Streptomisin sülfat'ın koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	67
Şekil 4.14. Gentamisin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	68
Şekil 4.15. Sefoperazon sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	68
Şekil 4.16. Prekort-liyo'nun koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	69
Şekil 4.17. Amoksisilin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	69
Şekil 4.18. Tylosin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	70
Şekil 4.19. Sefuroksim sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi.....	70
Şekil 4.20. Cefazolin sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	71
Şekil 4.21. Linkomisin-HCl'nin koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	71
Şekil 4.22. Metamizol'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	72
Şekil 4.23. Ketojezik'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi	72
Şekil 4.24. Klindamisin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.25. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin ilacının etkisi	74
Şekil 4.26. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin ilacının etkisi.....	75
Şekil 4.27. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat ilacının etkisi	76
Şekil 4.28. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefoperazon sodyum ilacının etkisi	76
Şekil 4.29. Koyun dalak GR enzimi üzerine precort-liyo ilacının etkisi	76

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Tez kapsamında GR enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılan ilaçlar ve dahil olduğu sınıflar	9
Tablo 3.1. Koyun dalak GR enzimi üzerine amoksisilin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	40
Tablo 3.2. Koyun dalak GR enzimi üzerine tylosin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör	41
Tablo 3.3. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	41
Tablo 3.4. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.	42
Tablo 3.5. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	43
Tablo 3.6. Koyun dalak GR enzimi üzerine cefuroksim sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	44
Tablo 3.7. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	44
Tablo 3.8. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefoperazon sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	45

Tablo 3.9. Koyun dalak GR enzimi üzerine linkomisin-HCl antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	46
Tablo 3.10. Koyun dalak GR enzimi üzerine novamizol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	46
Tablo 3.11. Koyun dalak GR enzimi üzerine ketojezik ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	47
Tablo 3.12. Koyun dalak GR enzimi üzerine prekort-liyo ilacı ile yapılan çalışmalarda Kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	47
Tablo 3.13. Koyun dalak GR enzimi üzerine klindamisin-HCl antibiyotiği ile yapılan Çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	48
Tablo 3.14. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör ve substrat konsantrasyonları	49
Tablo 3.15. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör ve substrat konsantrasyonları.....	50
Tablo 3.16. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör ve substrat konsantrasyonları	51
Tablo 3.17. Koyun dalak GR enzimi üzerine prekort-Liyo ilacının K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör ve substrat konsantrasyonları	52
Tablo 3.18. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefaperazon sodyum ilacının K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör ve substrat konsantrasyonları	53
Tablo 4.1. Koyun dalak dokusu GR enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon verilerini gösteren tablo	55
Tablo 4.2. Glutatyon redüktaz enziminin saflaştırma basamakları.....	56

Tablo 4.3. 0,1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak koyun dalak dokusu GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	59
Tablo 4.4. 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak koyun dalak dokusu GR enziminin Optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	59
Tablo 4.5. Koyun dalak dokusu GR enziminin optimum iyonik şiddet için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	60
Tablo 4.6. Koyun dalak dokusu GR enzimi için 0,1 M KH_2PO_4 kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçlarına yönelik tablo	62
Tablo 4.7. Koyun dalak dokusu GR enzimi için 0,1 M Tris-HCl kullanılarak yapılan Stabil pH çalışmasının sonuçlarına yönelik tablo	63
Tablo 4.8. Koyun dalak GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları tablosu	64
Tablo 4.9. Koyun dalak dokusu GR enzimi için K_M sabiti ve $V_{\max}$ değerinin bulunmasına yönelik elde edilen GSSG denemeleri ve aktivite değerleri....	65
Tablo 4.10. Koyun dalak dokusu GR enzimi için K_M sabiti ve $V_{\max}$ değerinin bulunmasına yönelik NADPH derişim tablosu	66
Tablo.4.11. Bazı ilaçlar için bulunan IC_{50} değerler	73
Tablo.4.12. GR enzimi için bulunan k_i sabitleri ve inhibisyon tipleri	77

GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN DALAK DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada antioksidan metabolizmasının kilit enzimi olan Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7; GR, Glutasyon: NADP⁺ oksidoredüktaz) enzimi koyun dalak dokusundan saflaştırıldı. Bu işlem %20-70 arası amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi uygulanarak gerçekleştirildi. Neticede enzim %40,61 verimle ve 1564,8 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE ile enzimin saflık derecesi kontrol edilip karakterizasyonu yapıldı. Karakterizasyon çalışmalarında; optimum pH : 8,0 (KH₂PO₄ tamponu), optimum iyonik şiddet : 100 mM (KH₂PO₄ tamponu), stabil pH : 7,0 (KH₂PO₄ tamponu), optimum sıcaklık : 40⁰C, alt birim molekül kütlesi : 91 kDa olarak tespit edildi. Ayrıca enzimin GSSG ve NADPH substratlarına olan ilgisini belirlemek amacı ile substratların K_M sabiti ve V_{max} değerleri tespit edildi. NADPH için ; K_M sabiti : 0,0061 mM, V_{max} değeri 0,259 EÜ/mL, GSSG için ise, K_M sabiti : 0,351 mM, V_{max} değeri 0,604 EÜ/mL olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre; GR enziminin substratları olan NADPH'a afinitesinin GSSG'ye olandan daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca koyun dalak GR enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkileri araştırıldı. Ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin, sefoperazone sodyum ve prekort-liyo'nun inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Bu ilaçların IC₅₀ (mM) değerleri; prekort-liyo :1,27 mM, ampisilin : 3,22 mM, streptomisin sülfat : 7,95 mM, sefoperazon sodyum : 16,97 mM, gentamisin :17,20 Mm, K_i sabitleri; ampisilin : 1,057 ± 0,110, gentamisin : 20,770 ± 8,169, streptomisin sülfat : 3,386 ± 1,305, sefoperazon sodyum : 4,910 ± 0,960 ve prekort-liyo : 0,466 ± 0,387, inhibisyon türleri ise; ampisilin ve gentamisin yarışmasız, streptomisin sülfat, sefoperazon sodyum ve prekort-liyo yarışmalı olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon redüktaz, koyun, dalak, karakterizasyon, ilaçlar, inhibisyon.

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF GLUTATHION REDUCTASE ENZYME FROM SHEEP SPLEN TISSUE AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME CHEMICAL SUBSTANCES ON ENZYME ACTIVITY

ABSTRACT

In this study, the enzyme Glutathione reductase (Glutathione: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.8.1.7; GR), which is the key enzyme of antioxidant metabolism, was purified from sheep spleen tissue. Purification was carried out using 20-70% ammonium sulfate precipitation and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. As a result, the enzyme was purified in 40.61% yield and 1564.8 fold. The purity level of was checked by SDS-PAGE and characterized. In characterization studies; optimum pH: 8.0 (KH₂PO₄ buffer), optimum ionic strength: 100 mM (KH₂PO₄ buffer), stable pH: 7.0 (KH₂PO₄ buffer), optimum temperature: 40°C, subunit molecular mass: 91 kDa. In addition, K_M constant and V_{max} values of the substrates were determined in order to determine the affinity of the enzyme to GSSG and NADPH substrates. For NADPH; K_M constant: 0.0061 mM, V_{max} value was 0.259 EU/mL, for GSSG, K_M constant: 0.351 mM, V_{max} value was 0.604 EU/mL. According to these results; It was determined that the affinity of the GR enzyme to the NADPH substrate was higher than its affinity to the GSSG substrate. In addition, the effects of some drugs on sheep spleen GR enzyme activity were investigated. It was determined that ampicillin, streptomycin sulfate, gentamicin, cefoperazone sodium and precort-lyo showed inhibitory effects. IC₅₀ values of these drugs; precort-lyo: 1.27 mM, ampicillin: 3.22 mM, streptomycin sulfate: 7.95 mM, cefoperazone sodium: 16.97 mM, gentamicin: 17.20 mM, K_i constants; ampicillin : 1.057 ± 0.110, gentamicin : 20.770 ± 8.169, streptomycin sulfate : 3.386 ± 1.305, cefoperazone sodium : 4.910 ± 0.960 and precort-lio : 0.466 ± 0.387, inhibition types; Ampicillin and gentamicin were determined as non-competitive, streptomycin sulfate, cefoperazone sodium and precort-lyo were determined competitively.

Keywords: Glutathione reductase, sheep, spleen, characterization, drugs, inhibition.

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlı organizmalarda protein tabiatlı biyolojik katalizörler (bazı katalitik RNA'lar dışında) olarak tanımlanan enzimler, hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden hücredeki biyokimyasal reaksiyonları hızlandırırlar. Hücrelerde tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığı ile gerçekleşir ve biyokimya alanındaki araştırmaların büyük çoğunluğu enzimler ile ilgili araştırmalardır. Biyolojik kataliz olayı ilk kez 1760 yılında midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda başlatılmıştır. Sabit bir enzim üzerindeki ilk çalışma ise: 1835 yılında diastas enzimi üzerine İsveçli kimyager olan S.S. Berzelius tarafından yapıldı. Araştırmacı bu enzimin nişastayı sülfirik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini gözlemledi. 1850'lerde Louis Pasteur mayanın şeker ile alkole fermentlenmesinin enzimler için kullandığı "fermentler" ile katalizlendiğini vurgulamış ve yalnızca hücre içinde bu işlemin yapıldığını zannetti. Enzim araştırmalarındaki en büyük gelişme ise 1926-1936 yılları arasında J.Northrop'un bazı enzimleri kristallendirip protein yapısında olduğunu ortaya koymasıyla gerçekleşmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2004). Bugün yapılan genetik çalışmalarda henüz tanımlanmamış birçok enzim olmasıyla beraber 2000'den fazla enzim tanımlanmıştır.

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürmek suretiyle hızlandırırlar. Enzimler bir reaksiyonun hızını $10^5 - 10^{17}$ kat arttırabilmektedir (Radzicka and Wolfenden, 1995). Enzimatik reaksiyonların hızlarının belirlenmesi enzim aktivitesinin belirlenmesi anlamına gelmektedir. Enzim aktivite ölçümünde genellikle spektrofotometrik yöntem kullanılır ve bu yöntemle substratın zamana bağlı azalışı ya da zamana bağlı olarak ürün oluşumu ile aktivite hesaplanır. Enzimatik aktivitenin etkilendiği bazı faktörler vardır. Bunlar; sıcaklık, iyonik şiddet, pH, enzim substrat konsantrasyonu, inhibitörler ve aktivatörlerin varlığıdır.

Enzim aktivitesinin azaltılması veya durdurulması olayına inhibisyon denir. Buna duruma neden olan bileşik veya iyonlara inhibitör denilmektedir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu metabolik olaylarda oldukça önemlidir. Özellikle metabolizmanın kontrol noktalarında meydana gelebilecek bir inhibisyon metabolik bir bozukluğun düzeltilmesini sağlayabilir. Bu da birçok ilacın fonksiyonunu enzim inhibitörü olarak bu yolla gerçekleştirdiği anlamına gelmektedir ve bu durum farmakolojide önemli bir çalışma sahasını oluşturmuştur (Kose vd. 2015).

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitörler, enzimin aktif merkezine kovalent olarak bağlanabildikleri gibi zor ayrılan bir kompleks de oluşturabilirler. Dönüşümsüz inhibitörde reaksiyonda ulaşılabilecek en yüksek hız olan V_{max} azalırken, enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabit kalır. Dönüşümlü inhibisyonunda ise enzimle inhibitör arasında bir denge oluşmakla birlikte yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı tipleri mevcuttur (Yıldırım vd. 2010). Yarışmalı inhibisyonunda inhibitör substrata benzediği için enzimin aktif bölgesine bağlanır ve substratın enzime bağlanmasını önler. Burada substratın konsantrasyonunu artırmak suretiyle inhibisyon etkinliği ortadan kaldırılabilir. Bundan dolayı K_M sabiti artarken V_{max} değeri değişmez. Dönüşümlü inhibisyonun diğer bir tipi olan yarışmasız inhibisyonunda ise substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Burada enzim ve substratın farklı bölgelerde olduğunu anlaşılır. Aslında inhibitör ile substrat arasında bir yarışma söz konusu olmayıp enzimin katalitik aktivitesini düşürmek suretiyle inhibisyon gerçekleşir. Enzimin V_{max} değeri azalır, K_M sabiti değişmez. İnhibisyonun diğer bir tipi olan yarı yarışmalı da ise; inhibitör madde serbest olarak enzime bağlanmayıp enzim-substrat kompleksine bağlanır ve ortamda bu kompleks devamlı olacağından dolayı V_{max} ve K_M azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

İnhibisyon tiplerini ve inhibisyon etkisi gösteren maddeler için hesaplanan K_i sabitlerini belirlemek amacıyla kullanılan yöntem Lineweaver– Burk grafikleridir. Bu yöntemde enzim için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda, en az beş farklı substrat konsantrasyonu ile $1/V - 1/[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için Lineweaver– Burk grafikleri çizilir. Kesim noktalarında değerlendirmeler yapılır. Şekil 1.1, şekil 1.2 ve şekil 1.3’de inhibitör tiplerini gösteren Lineweaver– Burk grafikleri verilmiştir (Keha ve

Küfrevioğlu 2004). Ayrıca; inhibisyonlara ait K_i sabiti ve $V_{\max}$ değerleri aşağıda gösterilen formüllerden faydalanılarak bulunur.

Yarışmasız inhibitör varlığında K_i sabiti bulunurken

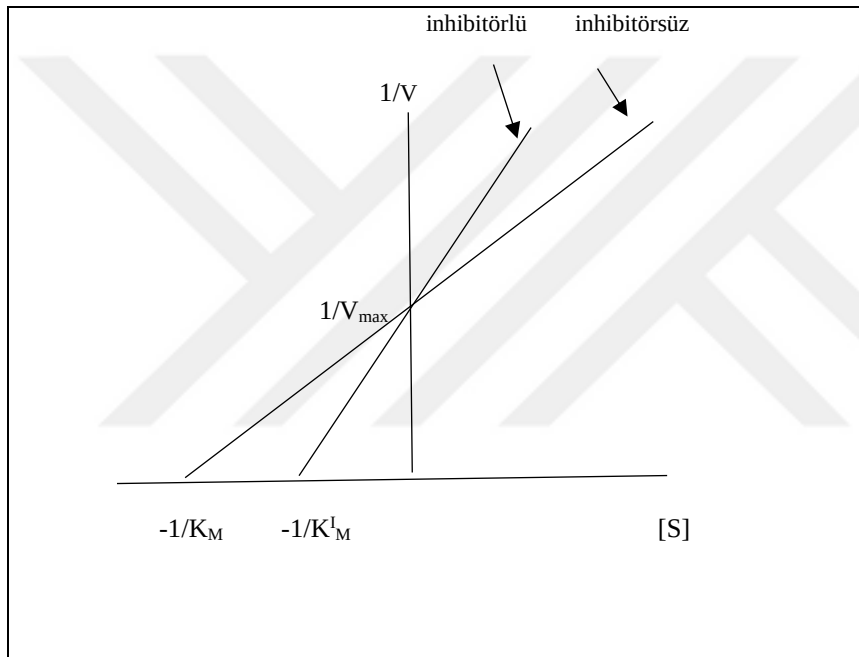
$V_{\max}^I = V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$ formülünden faydalanılır.

Yarışmalı inhibitör varlığında K_i sabiti bulunurken

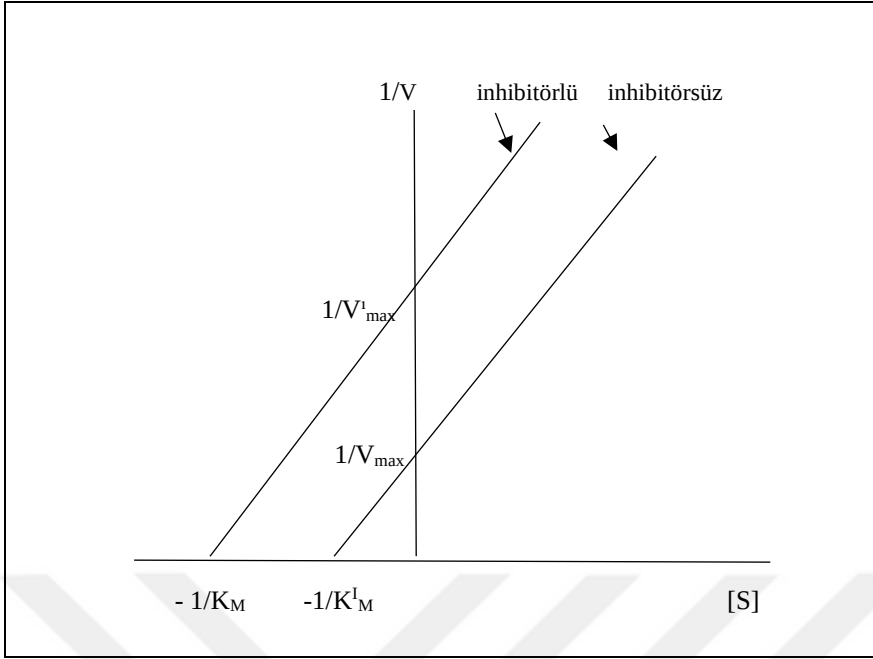
$K_M^I = K_M / (1 + [I] / K_i)$ formülünden faydalanılır.

Yarı yarışmalı inhibitör varlığında K_i sabiti ve $V_{\max}$ değeri bulunurken

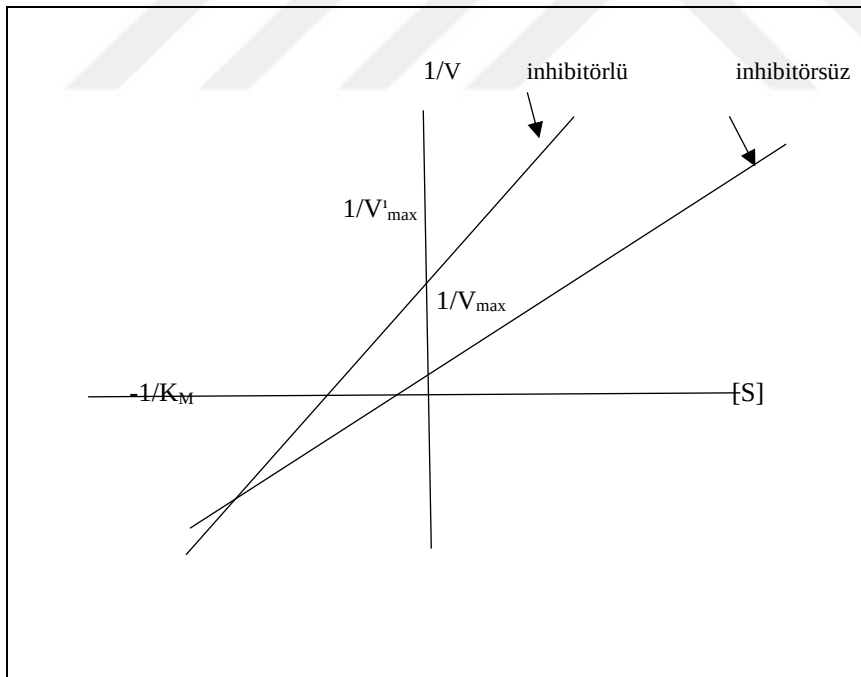
$V_{\max}^I = V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$ ve $K_M^I = K_M / (1 + [I]/K_i)$ formüllerinden faydalanılır.



Şekil 1.1. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver–Burk grafiği



Şekil 1.2. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver–Burk grafiği



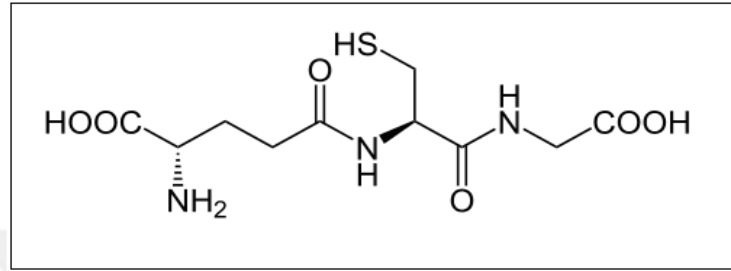
Şekil 1.3. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver–Burk grafiği

1.2. Glutatyon

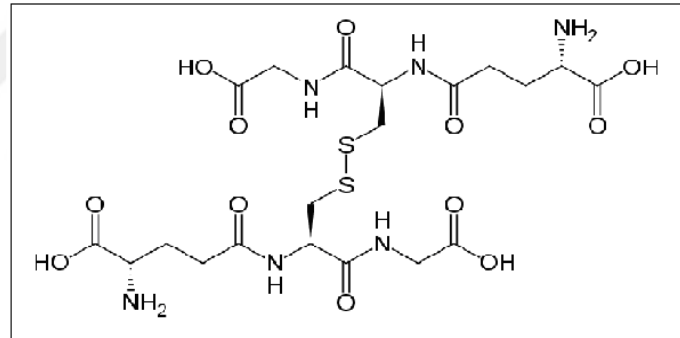
Canlı sistemlerde hücrelerin canlılığının devam edebilmesi için biyokimyasal olayların dengeli ve düzenli yürütülmesi gerekir. Biyokimyasal düzeninin bozulmasına sebep olan sigara, alkol gibi bazı zararlı alışkanlıklar, yeterli ve dengesiz beslenme gibi bazı faktörler hücrede oldukça reaktif olan süperoksit, peroksit ve hidroksil radikallerinin oluşmasına sebep olduğundan hücre hasarına yol açmaktadırlar. Bu radikaller özellikle hücre için hayati önem arzeden protein, fosfolipit, DNA ve RNA gibi moleküllere saldırırlar. Sağlıklı hücrelerde metabolik reaksiyonların dengesi neticesinde antioksidan sistemler devreye girerek bu radikallerin bertaraf edilmesini sağlarlar. Reaktif oksijen türlerine karşı korunmada glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S-transferaz gibi enzimatik veya glutatyon, vitamin E, vitamin C, NADH ve NADPH gibi enzimatik olmayan maddelerin yer aldığı sistemler devreye girer. Özellikle GSH (glutatyon) bir antioksidan molekül olarak hücrede önemli bir yere sahiptir.

Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde mevcut olan glutatyon, γ -glutamin-sistein-glisinden oluşan, hücre içindeki serbest -SH gruplarının büyük bölümünü oluşturan bir tiyoldür. Hücrede %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur. Yapısında γ -glutamin-sistein-glisin bulunmasından dolayı GSH olarak kısaltılmaktadır. Varlığı 1888 yılında ilk olarak maya hücrelerinde tespit edilmiştir. Daha sonra 1921'de Hopkins saflaştırma işlemi ile yapısını karakterize etmiştir (Açan 1990). Glutatyonun yapısında mevcut olan -SH grupları antioksidan etki yaparak hücreyi korumaktadırlar. Özellikle hücrede oluşabilen süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla yarı radikal olan hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Bu aşamadan sonra pentoz fosfat yolu ve malik enzim basamağında üretilen NADPH koenzim molekülünün varlığında glutatyon redüktaz enzimi glutatyonu indirgen forma dönüştürür. Glutatyon molekülü indirgen forma dönüşürken yapısındaki -SH grubunda H'ni hidrojen peroksit'e aktararak bu radikalin parçalanıp suya ve oksijene dönüşümünü gerçekleştirir. Glutatyon hücrede oluşan reaktif oksijen türleri ve diğer radikallerin zararlarının giderilmesinden başka hücrede sistein deposu halinde bulunup bazı enzimlerin ve spektrin gibi hücre zarı proteinlerinin -SH gruplarının korunmasında ve bazı enzimlerin metabolik reaksiyonlarında görev yapar. Ayrıca DNA ve protein sentezinde, bazı metabolik son ürünlerin ve ilaçların detoksifikasyonunun gerçekleştirilmesinde, aminoasitlerin taşınmasında, disülfid bağları içeren insülin gibi bazı

proteinlerin disülfid yapılarının koparılmasında da görevlidir (Demir 1994, Knapen vd. 1999). Bu önemli görevlerden dolayı hücre içinde glutatyonun konsantrasyonunun azalması sonucu metabolizmada bozukluklar meydana gelmektedir (Knapen vd. 1999). Glutatyonun redükte (GSH) ve okside (GSSH) formları şekil 1.4 ve şekil 1.5’de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Redükte glutatyonun molekülü (Taser 2010)



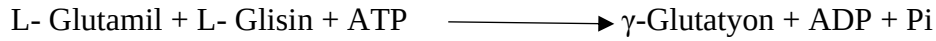
Şekil 1.5. Okside glutatyonun molekülü (Taser 2010)

GSH biyosentezinden γ -glutamil döngüsü sorumlu olmasının yanı sıra bu döngü GSH’ın metabolik ve katalitik aktivitesinin gerçekleşmesinde ve sistenin hücreler arası aktarımında oldukça önemlidir. GSH sentezlenmesinde bazı enzimler görev yapar. Bunlar aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi γ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetazdır (Meister A. 1995).

γ -glutamilsistein sentetaz



Glutasyon sentetaz

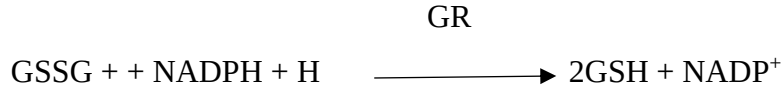


1.3. Glutasyon Redüktaz

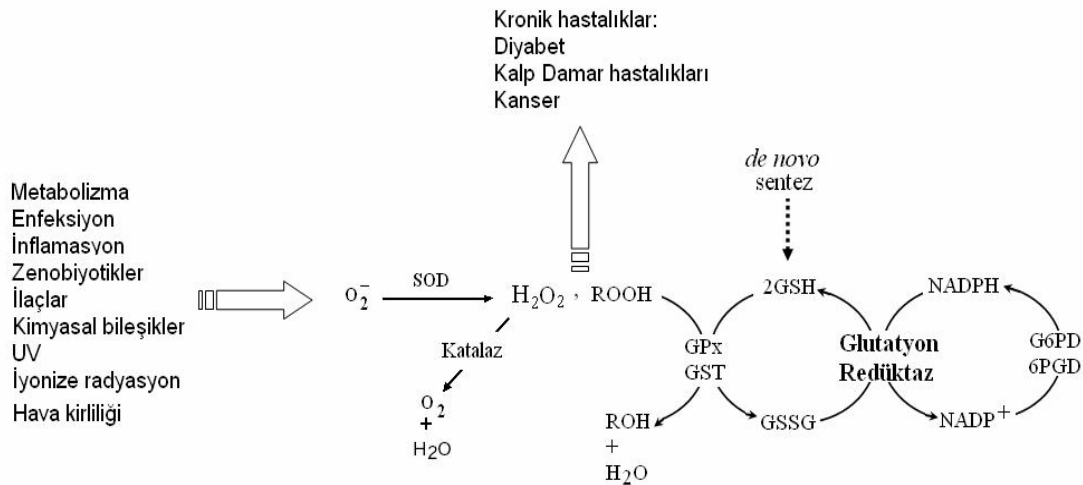
NADPH⁺ oksidoredüktaz olarak adlandırılan glutasyon redüktaz (E.C. 1.8.1.7; GR), oksidoredüktazlar grubundandır (Taser ve Ciftci 2012). Glutasyon redüktaz, aşağıdaki reaksiyona göre okside glutasyonun (GSSG) redükte glutatona (GSH) dönüştürülmesini katalizleyen ve GSH/GSSG oranının belirli bir seviyede kalmasını sağlayan önemli bir enzimdir.



Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın eritrosit hücrelerinde düşmesi hemolize neden olur. GR'nin katalizlediği reaksiyonun meydana gelmesi için pentoz fosfat yolundan temin edilen NADPH'a ihtiyaç vardır. Pentoz fosfat yolu oksidatif ve oksidatif olmayan reaksiyonları içeren kısımlarda incelenir. Oksidatif kısmında oksitlenen her glukoz 6-fosfat molekülünden ribuloz 5-fosfat, CO₂ ve iki molekül NADPH oluşur. Yolun bu kısmı özellikle, NADPH bağımlı steroid sentezinin aktif olduğu adrenal korteks ve glutasyonu indirgenmiş halde tutmak için NADPH gereken eritrositlerde önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu 2010). Kısaca pentoz fosfat yolunun hücrede iki önemli işlevi vardır. Bunlardan ilki; riboz-5-fosfatı sentezlemektir. Bu şeker RNA, DNA ve nükleotid sentezinde için gereklidir. Diğeri ise; indirgeyici biyosentez olaylarında indirgeyici güç görevi gören NADPH'ları sentezlemektir (Krebs ve Eggleston 1978). Oluşan NADPH organizmada bir H⁺ vericisi olarak görev alır. NADPH ihtiyacının fazla olduğu karaciğer, yağ dokusu, böbrek üstü bezi, gonadlar, eritrositler gibi dokularda pentoz fosfat yolu aracılığı ile birçok indirgeyici biyosentez olayları gerçekleşmektedir. Bunlar genel olarak; yağ asitlerinin sentezi, peroksitlerin ortadan kaldırılması, bazı aminoasit sentezi, indirgenmiş glutasyon sentezi, ilaç detoksifikasyonu, ve DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi sayılabilir (Levy 1979). Aşağıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile glutasyon redüktaz enzimi bağlantılıdır.



Yukarıdaki formüllerden de anlaşılacağı gibi, NADPH üretimindeki bir azalma G6PD enziminin çalışmamasını gösterir. Bu durum GR'inde çalışmasını olumsuz etkiler. GR'inde çalışmasındaki olumsuzlukta GSH oluşumunu doğrudan etkilemektedir (Ciftci vd. 2000, Keha ve Küfrelioğlu 2004). NADPH sayesinde oluşturulan GSH molekülü ve buna bağlı enzimler hücreyi reaktif oksijenler gibi toksiklerden korur (Siems vd. 2000). Sonuç olarak NADPH'ın kullanılmasıyla GSSG'nin GSH'a dönüştüğü reaksiyon GR tarafından katalizlenir (Montgomery 1996). Bu biyokimyasal süreç DNA biyosentezi, çeşitli oksidatif stres tiplerine karşı hücrenin korunması, reaktif oksijen tiplerinin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunun yanı sıra hücre içi sinyal iletimi ve gen regülasyonu için de gereklidir (Tunc vd. 2015). Şekil 1.6'da glutatyon redüktaz enziminin antioksidan sistemle bağlantısı gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Glutatyon redüktazın antioksidan savunma sistemindeki önemi (Tandoğan Ereser 2010)

Bu tez çalışmasının amacı, hücrede glutatyon metabolizmasının düzenlenmesinde ve buna bağlı olarak antioksidan sistemin işleyişinde önemli etkisi olan ve çeşitli hayvansal

dokulardan saflaştırılıp karakterizasyonu yapılan glutatyon redüktaz enziminin koyundalağından saflaştırılıp karakterizasyonunu gerçekleştirmek ve enzim üzerine bazı antibiyotik ve ilaçların etkilerini araştırmaktır.

1.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler ve İlaçlar

Tablo 1.1. Tez kapsamında GR enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılan ilaçlar ve dahil olduğu sınıflar

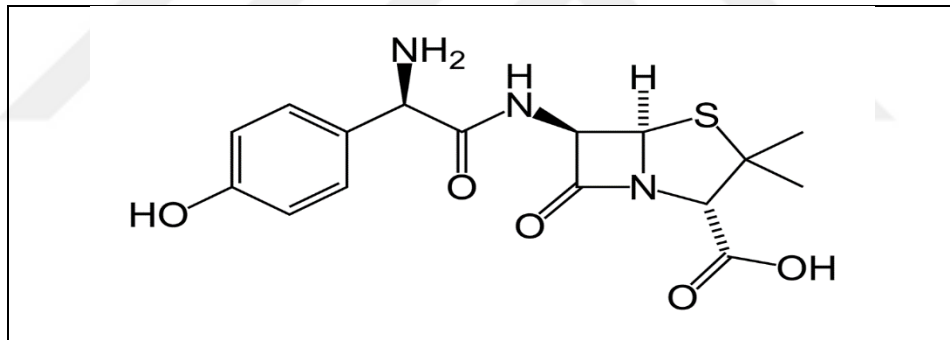
İlaç isimleri	Sınıflar
Amoksisilin	Penisilin (Antibiyotik)
Tylosin	Makrolid (Antibiyotik)
Ampisilin	Penisilin (Antibiyotik)
Streptomisin Sülfat	Aminoglikozid (Antibiyotik)
Gentamisin	Aminoglikozid (Antibiyotik)
Sefuroksim sodyum	Sefalosporin (Antibiyotik)
Sefazolin Sodyum	Sefalosporin (Antibiyotik)
Sefoperazon Sodyum	Sefalosporin (Antibiyotik)
Linkomisin-HCl	Linkozamid (Antibiyotik)
Klindamisin-HCl	Linkozamid (Antibiyotik)
Novamizol	Antiinflamatuvar
Ketojezik	Antiinflamatuvar
Prekort-Liyo	Kortikosteroid

Antibakterial ilaç grubu içinde özel bir yeri olan antibiyotikler, bakteri, fungus ve aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve başka mikroorganizmaların sentezini durduran veya ölmelerine sebep olan kimyasal maddelerdir. Bütün dünyada kemoterapötikler olarakta bilinen antibiyotikler, geniş veya dar spektrumlu olabilir. Bir kısım kemoterapötikler bazı bakteri türlerine karşı etkili olmalarından dolayı bunlar dar spektrumlu kemoterapötikler olarak adlandırılırlar. Geniş spektrumlu kemoterapötikler özellikle bakteri türlerine karşı etkilidir (Kayaalp 2002).

Antibakteriyel ilaçlardan çok yönlü etkinin elde edilmesi için ilacın etki spektrumunun, etki şeklinin, bakteri türlerindeki direnç durumunun ve vücutta uğradığı metabolik değişiklikler gibi ilacın çok yönlü analizinin iyi yapılması gerekmektedir.

1.4.1 Amoksisilin

Amoksisilin, ampisilinin analogu olup fenil yan zinciri üzerine bir hidroksil grubu ilavesiyle oluşan, gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmalara karşı bakterisid etki gösteren penisilin türüdür. Amoksisilin plazma proteinlerine penisilin G ve V' ye göre çok az bağlanır. Absorbe edilen dozun büyük bölümü değişmeden böbreklerden geri atılır. Amoksisilin veteriner hekimlikte duyarlı enfeksiyonlara karşı sık kullanılır. Özellikle çocuklarda akut otitit media, üriner enfeksiyonlar, bakteriyel menenjit ve diğer indikasyonlarda kullanılmaktadır. Çocuklarda otitmedia tedavisinde penisilin V'ye göre daha etkili bulunmuştur (Kayaalp 2002). Açık formülü şekil 1.7'de gösterilmiştir.

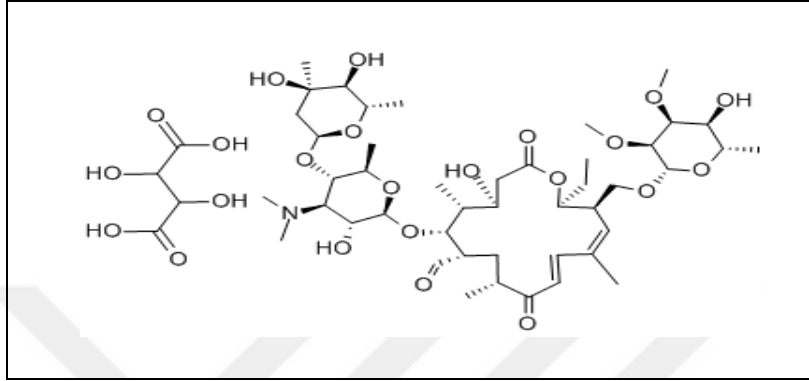


Şekil 1.7. Amoksisil molekülünün yapısal formülü (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Amoksisilin>)

1.4.2. Tylosin

Makrolid bir antibiyotik olan tylosin streptomyces fradiae kültürlerinden elde edilir. Bu ilaç veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılır. İlaç duyarlı bakterilerin ribozomlarının 50S alt birimine dönüşümlü bağlanarak ribozomlarda oluşan peptit zincirinin uzamasını önler ve bakteri hücresinin protein sentezlemesini engeller. Tylosin ve diğer makrolitler genellikle sadece bakterisid etki gösterirler. Penisilin G'ninkine benzer şekilde en güçlü etkinliklerini gram- pozitif kokus ve basillere karşı gösterirler. E.coli gibi bazı enterobacteriaceae türleri makrolitlere doğal rezistan gösterirler. Yani ilacın sitoplazmaya

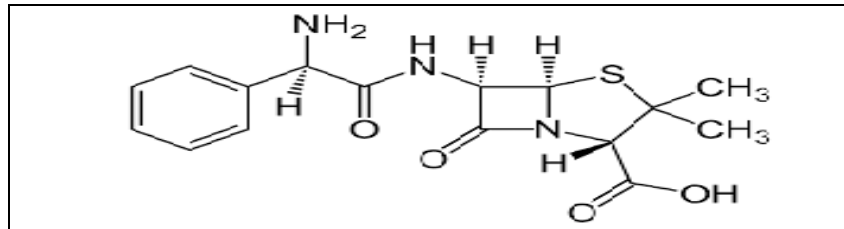
geçip ribozomlara ulaşması gerekirken kalın olan hücre çeperi dış duvarını aşamazlar. Gram pozitif bakterilere göre sitoplazmaya girme oranı 100 kat daha düşüktür. Ayrıca plazma proteinlerine de bağlanmazlar (Kayaalp 2002). Tylosinini açık formülü şekil 1.8’de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Tylosin molekülünün yapısal formülü (<https://stringfixer.com/tr/Tylosin>)

1.4.3. Ampisilin

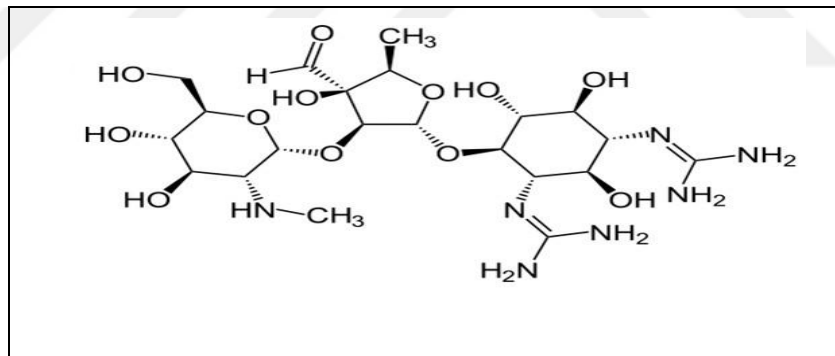
Bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılmış olan penisilin türü ilk ilaçtır. Özellikle E.coli, salmonella, shigella, proteusmiribalis gibi negatif basillerin suşlarına karşı bakterisid etki gösterir. E.Coli gibi duyarlı bakterilerin neden olduğu üriner enfeksiyonlarda, duyarlı bakterilerin birçoğunun birlikte neden olduğu akut otitismedia’da ve kronik bronşitte kullanılır. Pnömonoklara ve meningokokların sebep olduğu menenjitte ampisilin, penisilinle beraber eşit klinik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olmakla beraber penisilin G tercih edilmektedir. Menenjit gibi ciddi enfeksiyonlarda yüksek dozda ve enjeksiyonla verilmesi gerekmektedir. Ampisilin yaklaşık %15-28 oranında serum proteinlerine bağlanır. (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.9’da verilmiştir.



Şekil 1.9. Ampisilin molekülünün yapısal formülü (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Ampisilin>)

1.4.4. Streptomisin Sülfat

Streptomisin, aminoglikozid sınıfına ait ilk keşfedilen antibiyotik olup bakterilerin 30S alt birimlerine dönüşümsüz bağlanarak onların protein sentezinin başlama aşamasının durdurulmasına ve mRNA kodlarının yanlış okunmasına ve kısmende anormal proteinlerin sentezlenmesine neden olur. Aminoglikozidler streptomyces veya mikromonospora türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı sentetik maddelerdir. Hem gram pozitif hemde gram negatif etkinliği güçlü olup hızlı bakterisid etki yapmaktadır. Streptomisin, aktinomisetler grubundan olan *Streptomyces griseus*'dan elde edilmiştir. Tüberküloz (verem) tedavisinde kullanılan ilk ilaç olmakla beraber ripampisin, pirazinamid ve etambutol gibi ilaçların çıkışıyla kullanımı önemini kaybetmiştir. Ayrıca bruselloz, veba, tularemi ve E.coli'ye bağlı idrar infeksiyonlarda da kullanılır. Terapötik indeksleri küçük olması sebebiyle toksisiteyi önlemek için plazma ilaç düzeylerinin incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca plazma proteinlerine bağlanımları az miktarda olmaktadır (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.10'da gösterilmiştir.

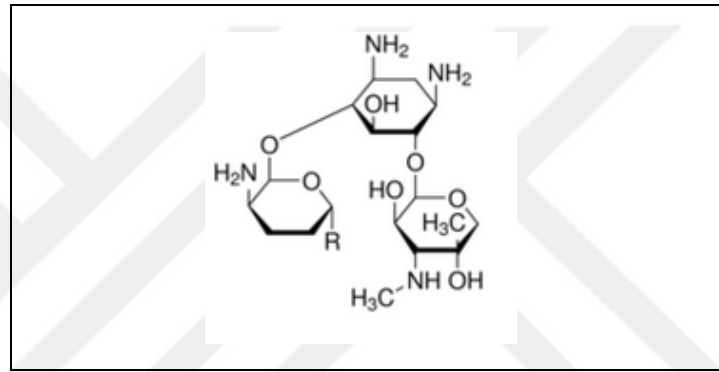


Şekil 1.10. Streptomisin Sülfat molekülünün yapısal formülü (<https://tr.taylrrenee.com/zdorove/113347-streptomicina-sulfat-instrukciya-po-primeneniyu-analogi-i-otzyvy.html>)

1.4.5. Gentamisin

Gentamisin, gram negatif bakterilerin neden olduğu önemli hastalıkların tedavisinde kullanılır. Özellikle pseudomonas aeruginosa basilleri, enterobacteriaceae grupları ve staph. aureus suşları üzerinde etkili olan gentamisin micromonosporo purpurea'dan elde edilen aminoglikozid bir antibiyotiktir. Sayılan bakteriler üzerinde yüksek etkiye sahip olup 6 µg /mL 'den daha düşük konsantrasyonda bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt

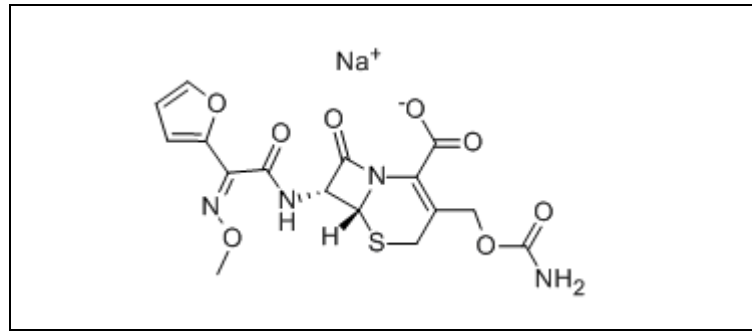
birimlerine bağlanıp protein sentezini inhibe ederler. Bu bağlanma irreversibl olduğundan dolayı hızlı bakterisid etki yaparlar. Aminoglikozidler içinde etken gücü amikasininden sonra en kuvvetli ve spektromu en geniş olandır. Plazma proteinlerine bağlanma oranları düşüktür. Fizikokimyasal olarak fazla polar yapıya sahip olmaları nedeniyle lipofilik özellikleri oldukça azdır. Bundan dolayı mide-bağırsak kanalından çok az absorbe edilirler. Ayrıca polar özellikleri nedeniyle bakteri hücrelerine pasif difüzyonla giremezler. Porin kanallarını aşarak periplazmik aralığa girerler ve hücre içine transfer edilirler. Transfer işlemi enerji gerektirir. Bundan dolayı anaerob bakterilerde etkisizdirler (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.11’de gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Gentamisin molekülünün yapısal formülü (https://tr.tnjchem.com/gentamicin-sulfate-cas-1405-41-0_p310.html)

1.4.6. Sefuroksim sodyum

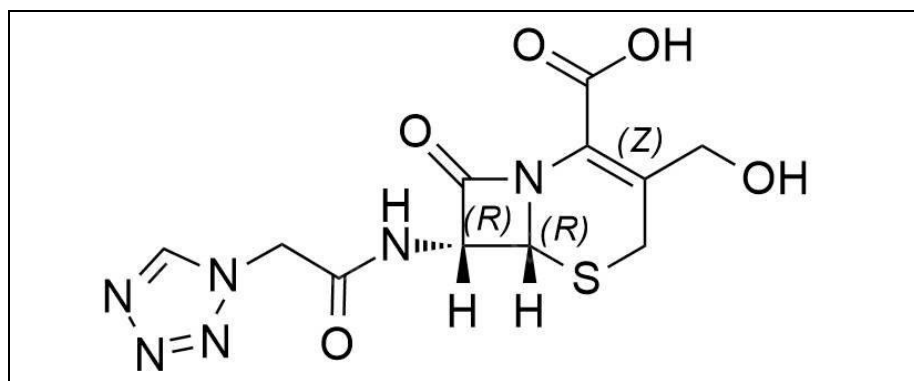
Sefuroksim sodyum, in vitro mükemmel aktiviteye sahip, birçok enterobakteriyel özellikle *H. influenzae* ve *neisseria*’ya karşı geliştirilmiş, enjekte edilebilir ikinci kuşak, yarı sentetik bir sefalosporin antibiyotiktir. Ayrıca yapısında sefam türevi olan 7-aminosefalosporanik asid (7-ASA) bulunduran, penisiline yakınlık gösteren beta-laktam türevi ikinci kuşak sefalosporin grubundan bir antibiyotiktir. 7-amino grubu birinci kuşak sefalosporinlere göre daha polardır. Bundan dolayı antibakterial spektrumları daha geniştir. Beyin omirilik sıvısına fazlaca girerken mide-bağırsak kanalından emilimleri yetersizdir. Ayrıca plazma proteinlerine az miktarda bağlanır. Sefuroksim, çocuklarda menenjit, çocuklarda ve bebeklerde pnemoni, orta kulak iltihabı, eklem ve idrar yolu enfeksiyonları ve Lyme hastalığı yer alır (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.12’de verilmiştir.



Şekil 1.12. Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü (<https://www.chemwhat.info.tr/sefuroksim-sodyum-kas-56238-63-2/>)

1.4.7. Sefazolin Sodyum

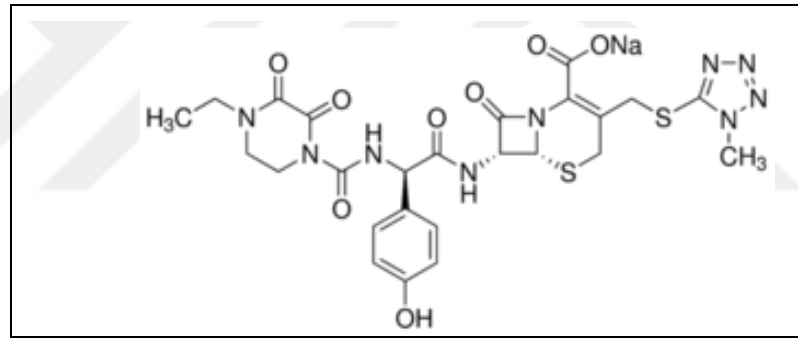
Sefazolin sodyum plazma proteinlerine en fazla bağlanan ve büyük bölümü böbrekten az bir kısmı da karaciğerden safra içine atılan birinci kuşak sefalosporindir. Yarılanma ömrü birinci kuşak ilaçlar arasında en uzun olanıdır. Bundan dolayı cerrahide diğer sefalosporinlere göre tercih edilir. Dar spektrumlu bir antibiyotik olup özellikle gram-pozitif bakterilerin sebep olduğu solunum yolu, safra yolu, idrar yolu enfeksiyonları ile yumuşak doku ve deri enfeksiyonları ayrıca kemik ve eklem enfeksiyonlarının tedavisinde intramüsküler ya da intravenöz kullanılır. Ayrıca perioperatif profilaksi (ameliyat öncesi koruma önlemleri için)'de de kullanılır (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.13'de verilmiştir.



Şekil 1.13. Sefazolin Sodyum molekülünün yapısal formülü (<https://www.chemwhat.info.tr/sefazolin-usp-safs%C4%B1zl%C4%B1k-e-cas-25953-19-95/>)

1.4.8. Sefoperazon Sodyum

Sefoperazon Sodyum, Enterobacteriaceae grubu gram-negatif basillere karşı güçlü bakterisid aktiviteye sahip yarı sentetik, geniş spektrumlu, beta-laktamaz dirençli, üçüncü nesil sefalosporin antibiyotiktir. BOS içine sızamazken plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır. Bundan dolayı menenjit tedavisinde kullanılmaz. Diğer sefalosporinlerden farklı olarak büyük bir kısmı karaciğerden safra içine atılır. Sefoperazon sodyum, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eder ve böylece bakteri hücre duvarlarının bir bileşeni olan peptidoglikan birimlerinin çapraz bağlanması için gerekli olan son transpeptidasyon aşamasına müdahale eder. Bu durum hücre duvarı stabilitesinin azalmasına ve hücre lizisine neden olur. Cerrahi infeksiyonlarda, hastanede gelişen pnömonilerde ve cilt yumuşak doku infeksiyonlarında önemli etkiye sahip olup tifo'ya karşı da kullanılabilir (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.14'de verilmiştir.

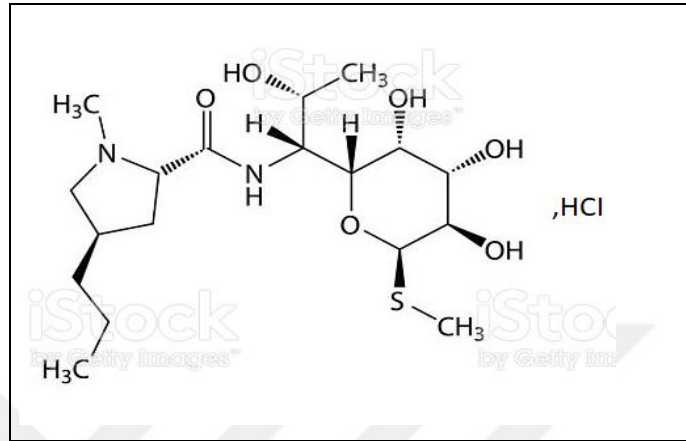


Şekil 1.14. Sefoperazon Sodyum molekülünün yapısal formülü (<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/substance/cefoperazonesodiumsalt6676562893203>)

1.4.9. Linkomisin-HCl

Linkozamid grubu dar spektrumlu antibiyotiklerden olup tıbbi kullanıma ilk giren Streptomyces lincolnensis'ten elde edilen, doğal bir antibiyotiktir. Bakterilerin protein sentezini onların 50S ribozomal alt ünitelere bağlanmak suretiyle inhibe eder. Esas itibarıyla gram-pozitif ve gram-negatif anaerob patojen bakterilerin karşı etkili olup etkinliğin büyük bölümünü gram-pozitif bakteri türleri oluşturur. Linkomisinin mide-bağırsak duvarından emilimi klindamisin gibi tama yakın ve hızlı bir şekilde olur. Plazma proteinlerine bağlanmaz. BOS'a ise yetersiz derecede girer. Linkomisin alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında, penisilin allerjisi bulunanlarda penisilin alternatifi olarak, diş

kaynaklı enfeksiyonlarda, akciğer absesi, çeşitli yumuşak deri enfeksiyonlarında, kemik ve eklem enfeksiyonlarında ve ülserde kullanılır ancak klinik uygulamalarda klindamisin tercih edilir (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.15’de verilmiştir.

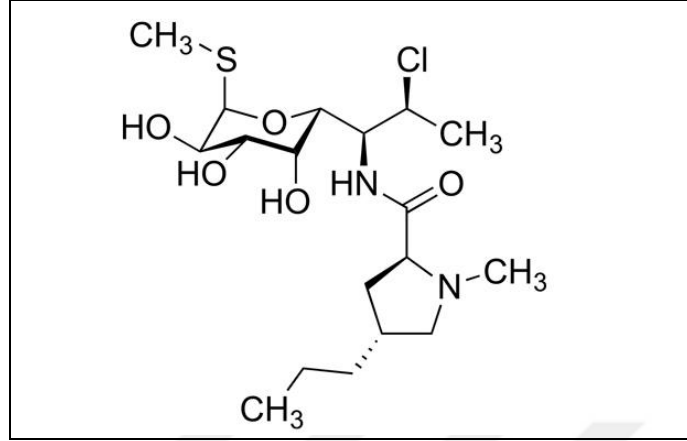


Şekil1.15. Linkomisin-HCl molekülünün yapısal formülü (<https://www.istockphoto.com/tr/vekt%C3%B6r/lincosamides-structures-of-lincomycin-clindamycin-antibiotic-gm474710692-65024001>)

1.4.10. Klindamisin-HCl

Klindamisin, lincomisin molekülüne bir hidroksil grubu yerine bir klor atomu bağlanmasıyla oluşan linkozamid grubu antibiyotiktir. Klindamisin ile linkomisin arasındaki bu farklılık klindamisinin bağırsaktan daha kolay absorbe edilmesine ve bakterisid etkisinin daha güçlü olmasına olanak sağlar. Dar spektrumlu antibiyotik olan klindamisin, gram pozitif türlerin çoğuna ve bazı patojen bakterilerin gram negatif anaerob türlerine karşı etkili olup onların 50S ribozomal alt birimlerine bağlanmak suretiyle inhibe ederler. Kemik veya eklem enfeksiyonları, pelvis inflamatuvar hastalık, strep boğaz, pnömoni, orta kulak enfeksiyonları ve endokardit dahil olmak üzere bir dizi gram-pozitif kokusların yaptığı bakteriyel enfeksiyon tedavisinde kullanılan penisiline alternatif bir ilaçtır. En önemli kullanım yeri ise *Bacteroides fragilis*' in neden olduğu karın içi ve pelvis enfeksiyonlarıdır. *Bacteroides fragilis* bu enfeksiyonlara aerobik gram-negatif basillerle birlikte sebep olur. Klindamisinin mide-bağırsak duvarından emilimi hızlı olup besinlerle alındığında yararı önemli derecede azalır. %90 oranında plazma proteinlerine bağlandığından dolayı İltihap hücrelerine ve vücut sıvılarına iyi nüfus eder. Ancak

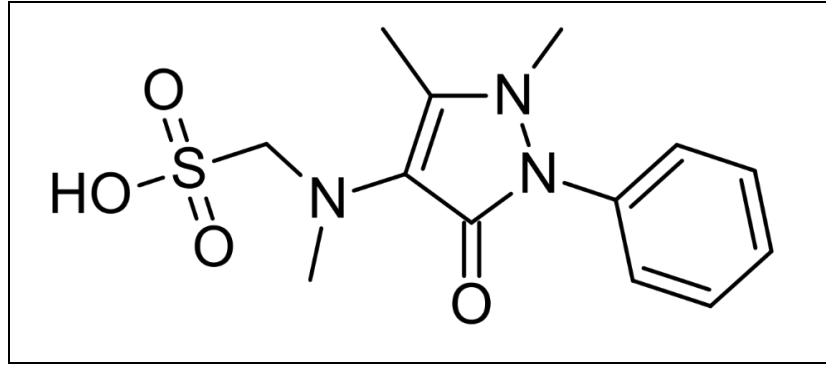
menenjitte bile BOS içerisine yeterli giremez (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.16’de verilmiştir.



Şekil 1.16. Klindamisin molekülünün yapısal formülü (<https://neurologystatus.ru/tr/klindamicin-opisanie-klindamicin---instrukciya-po-primeneniyu-forma-vypuska.html>)

1.4.11. Novamizol

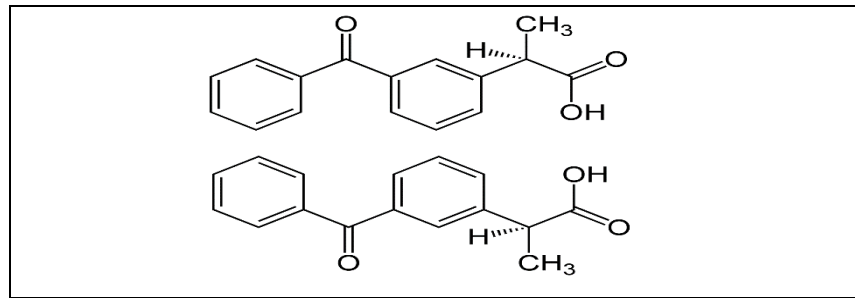
Novamizolun, pirazolon türevi olan piramidon molekülünün değiştirilmesiyle oluşturulmuş metamizol etken maddesine sahip bir ilaçtır. Antiinflamatuar ilaç grubundan olup güçlü analjezik, antipiretik, antiromatizmal ve düşük antiinflamatuar etkinliğe sahiptir. Ağızdan alındığında mide suyu içerisinde hızlı bir şekilde çözülür ve mide-bağıarak duvarından absorbe edilir. Plazma proteinlerine bağlanmaz. İlaç oldukça hızlı bir şekilde emilir, mss’deki ağrı merkezlerini etkiler ve ağrı eşliğini yükselterek ağrı kesici etkinliğini gösterir. Suda kolaylıkla çözülür. Metabolitin büyük bir kısmı böbrekten atılır. Novamizol, aminopirine ve propifenazona benzerlik gösteren yan etkileri mevcuttur. Kemik iliği depresyonu, su ve tuz rotasyonu, gastroenteropati yan etkileri arasında gösterilmektedir (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.17’de verilmiştir.



Şekil 1.17. Metamizol molekülünün yapısal formülü (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Metamizol>)

1.4.12. Ketojezik

Etken maddesi ketoprofen olan ketojezik, fenilpropiyonik asit (profen) grubuna bağlı antiinflamatuvar, analjezik, antipiretik, etkili bir ilaçtır. Ketoprofen, siklooksijenaz (COX) enzimlerini baskılayarak ağrılı dokuda prostaglandinlerin sentezini engellemek suretiyle antienflamatuvar etki yapar. Gruptaki diğer ilaçlar gibi gastrointestinal sistemde bozukluk, kemik iliği depresyonu, akut akciğer ödemi, laterji ve unutkanlık yapabilir. Ketojezik %99 oranında plazma proteinlerine bağlanır (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.18’de verilmiştir.

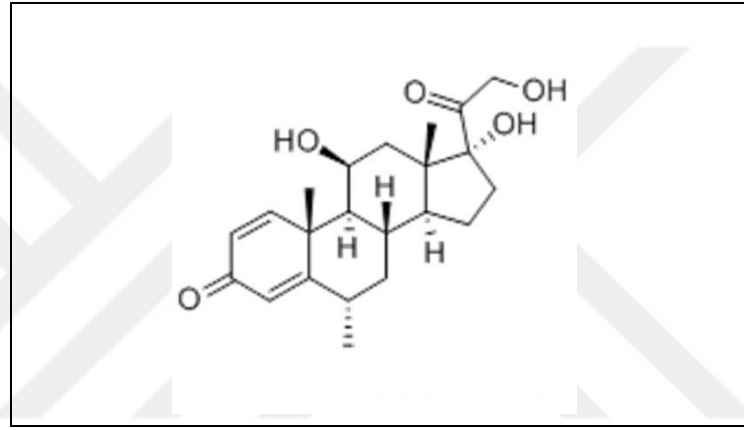


Şekil 1.18. Ketoprofen molekülünün yapısal formülü (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Ketoprofen>)

1.4.13. Prekort-Liyo

Prekort-Liyo etkin maddesi bir kortikosteroid olan metilprednisolon sodyum süksinatıdır. Bu etken madde bazı dokularda hücrelerin protein sentezini kontrol altında tutar. Kortikosteroidler genel olarak adrenal korteks tarafından salgılanan steroid yapılı

aldesteron ve kortizol gibi protein tabiatlı hormonları etkilerler. Kortikosteroidler akut iltihap olayını da inhibe etmelerinden dolayı antiinflamatuvar etki gösterirler. Özellikle iltihap alanında iltihap hücrelerini ve diğer proteinleri eriterek lökositlerin bu alana girmelerini kolaylaştırır. Kortikosteroidler, karaciğerde glukojeni artırmak suretiyle glukoz metabolizmasında rol oynarlar. Bu durum protein sentezini inhibe etmelerinin bir sonucudur. Ayrıca bağ dokusu ve çizgili kaslar başta olmak üzere birçok yerde protein yıkımına sebep olurlar. Kortikosteroidler yağ hücrelerine glukoz girişini azaltmak suretiyle lipolizi yani yağ asidi ve gliserol çıkışını artırır. Bu durum yağ metabolizmasında da etkili olduğunu gösterir (Kayaalp 2002). Yapısal formülü şekil 1.19’de verilmiştir.



Şekil 1.19. Metilprednisolon molekülünün yapısal formülü (https://tr.bossgoo.com/member_tianfu-chem/fine-chemical/methylprednisolone-cas-83-43-2-57187180.html)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan glutatyon redüktaz enzimi birçok farklı kaynaktan saflaştırılmış olup günümüzde halen özellikleri hakkında çalışmalar yapılmaktadır. Yapısı 1935 yılında belirlenmiş olan enzimin, ilk olarak Meldrum ve Tarr (1935) tarafından deney yoluyla, kanda GSSG'nin indirgenme reaksiyonunu gerçekleştirdiği ve NADPH'ın bu reaksiyonda kofaktör olduğu saptanmıştır. Ayrıca Müller tarafından da (1992) GR enziminin NADPH'ı bir indirgeyici olarak kullanıp okside glutatyonu indirgenmiş glutatyon katalizlediği tespit edilmiştir.

GR enziminin aktivite ölçümü karışımdaki NADPH'ın azalması veya GSH'nin oluşması esasına dayanarak yapılmaktadır. NADPH oranının azalmasına dayanan aktivite ölçüm 340 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. GSH oluşumuna dayanan yöntemlerde ise 5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrede belirlenir (Carlberg and Mannervik 1985, Toribio et al. 1996).

Yapılan karakterizasyon çalışmalarında GR enziminin ısıya dayanıklı olduğu ortaya koyulmuştur. Buna göre; GSSG ile yapılan ölçümlerde fare karaciğer GR enzimi 80°C'ye kadar aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Lopez and Lee 1979). Ayrıca GR enziminin; sığır eritrosit için 55°C, koyun karaciğer için 60°C, sığır karaciğeri için 55°C, alabalık karaciğeri için 10°C olarak optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir (Erat 2002, Ulusu vd. 2005, Ulusu ve Tandogan 2007, Tekman vd. 2008).

GR enziminin en önemli görevi hücreyi oksidatif strese karşı korumaktır. Hücrelerin hayati metabolik işlevlerini yerine getirebilmeleri için, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve metabolizması ile reaksiyon ürünlerinin dengesinin iyi korunması gereklidir (Gechev et al. 2006, Gill and Tuteja 2010, Anjum et al. 2012, Gill et al, 2012). Hücrelerdeki

dengeinin bozulması sonucu oksidatif stres meydana getiren reaktif oksijen türleri (ROS); genel olarak oksijenin (O_2) uyarılması sonucunda süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge 2011). Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin membran lipidleri, nükleik asitleri ve proteinleri oksidatif yıkıma uğratarak, hücre bileşenlerinin yapısını bozdukları bilinmektedir (Davies 1987, Wise and Naylor 1987). Hasanuzzaman ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmalarda GR, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ve GSH yenilenmesinde önemli rol oynadığını ve bu durumun hücrelerde stres toleransının sağlandığını göstermişlerdir. Ayrıca Hasanuzzaman GR enziminin saflaştırılması için farklı teknikler kullanmıştır.

Antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada güney Asya sazanının beyin, solungaç, karaciğer ve kas dokularında incelemeler yapılmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimlerinde endosülfan LD_{50} (toksik maddenin %50 öldürücü dozu) seviyesinde balıkların sularına katılarak verilmiştir. Ullah vd. (2015) yaptığı bu çalışma sonucuna göre; zamanla orantılı olarak GR ve GSH seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Başta afinite kromatografisi olmak üzere iyon değişim, jel filtrasyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi, GR enzimini saflaştırmak için kullanılan tekniklerdir (Brodellius et al. 1974, Mannervik et al. 1976). Ayrıca GR saflaştırılmasında kullanılan kolonlar, CM-selüloz, dekstran S-200, DEAE-dekstran, dekstran G-100, hidroksiapatit, dekstran G-75, ve DEAE-Sepharose'dur (Carlberg and Mannervik 1981, Ulusu ve Tandogan 2007). bu kolonlardan 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite kolonu enzimi en hızlı ve en yüksek verimle saflaştırmaktadır (Carlberg and Mannervik 1975, Carlberg and Mannervik 1981, Ulusu ve Tandogan 2007). Bunların yanı sıra Reactive Red-120-Agarose, Sephacryl S-300, FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi ve hızlı protein iyon kromatografisi (FPLC)-anyon değiştirici ile de saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Madamanchi et al. 1992, Garcia et al. 1993).

Saflaştırma işlemi ise; ilk olarak Asnis (1955) tarafından *Escherichia coli*'den yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda ise; *Cyanobacterium anabaena*, insan alyuvarları, sıçan karaciğeri, sığır eritrositi, koyun karaciğeri, alabalık karaciğeri, sığır beyni gibi bakteri ve memeli olmak üzere birçok canlıdan farklı saflaştırma yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır

(Boggaram et al.1979, Scott et al. 1963, Serrano et al. 1984, Erat vd. 2003, Ulusu vd. 2005, Tekman vd.2008).

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan enzimlerden biri adenozin deaminazdır. Kavutçu (1995) yaptığı çalışmasında adenozin deaminaz enzimini koyun dalağından saflaştırılarak enzimin bir takım karakteristik ve kinetik özelliklerini incelemiştir. Saflaştırma işleminden sonra ilk olarak substratıyla enzimin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizmiş ve K_M değerini 106 μM bulmuştur. Daha sonra sıcaklık ve pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Sonuçta optimum pH aralığının 6.0-7.4 olduğu, optimum sıcaklık aralığının 35-50 °C olduğunu tespit etmiştir. Daha sonraki çalışmalarda Na-sakkarin, magnezyum dimetil glioksim, sistein, histidin ve kafein gibi kimyasalların enzimin inhibisyon kinetiğine etkileri incelenmiştir. Kinetik çalışmalar neticesinde ise; Dimetil glioksiminin GR enzimini yarışmasız, histidin'in yarışmalı, sistein'in yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği tespit etmiştir. Ayrıca kafein, Na-sakkarin ve magnezyumun enzimin aktivitesi üzerinde etkisinin bulunmadığını da belirlemiştir.

Buzağı karaciğerinden saflaştırılan GR enzimin PAGE'de yürütülmesi sonucu büyük bir band ve onu takip eden küçük bir band olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, ultrasantrifüj ile enzimin mol kütlelerinin 100 kDa civarında, iki alt birimli, prostetik grup 1 FAD/alt birim, izoelektrik pH'sı 6,1, K_M değeri GSSG için 101 ± 7 mM, NADPH için 21 ± 1 mM, optimum pH 7,0 olarak belirlenmiş ve ayrıca enzimin amino asit dizilimi ortaya çıkarılmıştır. Buzağı karaciğerinden elde edilen GR, domuz ve insan eritrositinden elde edilen enzim ile kinetik ve elektroforetik özellikleri açısından benzerlik göstermektedir (Carlberg and Mannervik 1981).

Sığır karaciğerinden 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile DEAE-Sepharose iyon değişim kromatografisi kullanılarak GR enzimini %38,4 verimle 5456 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sığır karaciğer GR enziminin optimum sıcaklığı 50 °C, optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur. Enzimin mol kütleleri SDS-PAGE ile 55 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin kinetik özelliklerine yönelik çalışmanın sonucunda ise NADPH için K_M değeri $0,063 \pm 0,008$ mM, GSSG için bu değer $0,154 \pm 0,015$ mM olarak bulunmuştur. GR enziminin ürün inhibisyonu incelenmiş ve sonucunda $NADP^{+}$ 'nın K_i

sabiti $0,043 \pm 0,003$, GSH'nin K_i sabiti ise $8,506 \pm 0,563$ olarak bulunmuştur. NADP⁺'nin inhibisyon türü yarışmalı, GSH'nin inhibisyon türü yarışmasız olarak tespit edilmiştir (Ulus ve Tandoğan 2007).

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak %41 verimle 1654 kat saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH'sı 8,0, optimum sıcaklığı 10 °C, optimum iyonik şiddeti 50 mM Tris/HCl ve stabil pH ise 8,0 olarak bulunmuştur. Gökkuşığı alabalık karaciğeri GR enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucunda ise GSSG için K_M değerinin 0,025 mM, V_{max} değerinin 0,089 EU/ml, NADPH için K_M değerinin 0,055 mM ve V_{max} değerinin 0,143 EU/mL olduğu bulunmuştur. Böylece enzimin GSSG'ye olan ilgisinin NADPH'a olandan daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimin mol kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık 105 kDa, SDS-PAGE ile 52 kDa olarak hesaplanmıştır (Tekman vd. 2008).

Gökkuşığı alabalığı karaciğerinde GR enzimi saflaştırılması üzerine yapılan başka bir çalışma, Ekinci ve Şentürk (2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar enzim üzerine Mn^{+2} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Mg^{+2} iyonu dışındaki iyonların enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Enzimler üzerine yapılan kinetik çalışmalarda çeşitli ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. İlaçlar enzimlerle etkileşime girerek onları inhibe veya aktive edebilirler. Yapılan araştırmalarda bazı ilaçların enzimleri *in vivo* ve *in vitro* olarak farklı etkilediği tespit edilmiştir (Beydemir vd. 2000, Erat vd. 2005).

Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine birçok kimyasal maddenin etkilerini inceleyen çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bizim çalışmamızda enzim aktivitesi üzerine amoksisilin, tylosin, ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, sefaperazon sodyum, linkomisin, ve klindamisin antibiyotikleri ile novamizol, ketojezik ve prekort-liyo ilaçları kullanılmıştır.

Yapılan araştırmalarda insan eritrosit GR enzimini bazı moleküllerin inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu molekül $-COOH$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-CONHCH_2CH_3$ gibi yapıların

2-(5'-nitrofurilvinil)-quinolin bileşiğinin 4 nolu karbonuna takılarak türetilen moleküldür. Başka bir çalışmada da nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin (nitrofurantion, 5-nitro-2-furoik asit, 5-nitroindol ve 2, 4, 6-trinitrobenzensülfonat gibi)'de enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Barrett 1995, Grellier et al. 2001).

Ayrıca insan eritrosit GR enzimi aktivitesi üzerine bazı antibiyotik ilaçların etkisi de araştırılmıştır. Bu antibiyotiklerden bazıları sefotaksim sodyum, meropenem, streptomisin sülfat, penisilin G, teikoplanin, gentamisin sülfat, ampisilin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, ofloksasin, sefepim, metronidazol, sefodizim disodyum ve tiamfenikol'dur. Yapılan *in vitro* çalışmalarda insan GR enzimini aktive eden antibiyotiklerin; tiamfenikol, penisilin G, streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, teikoplanin ve ampisilin olduğu tespit edilmiştir. Enzimi aktivitesini inhibe eden antibiyotikler ise metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum'dur. Bu ilaçlardan K_i sabitleri ve IC_{50} değerleri belirlenenler sefotaksim ve sefodizimin'dir. Sefodizim için IC_{50} 1,682 mM ve K_i 0,7446±0,2216 Mm, sefotaksim için IC_{50} 12,179 mM ve K_i 6,5123±4,1139 mM, olarak belirlenmiştir (Erat 2002, Erat vd. 2005).

İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan GR enzimi üzerine yapılan başka bir inhibisyon çalışmasında Şentürk vd. (2009) enzim üzerine bazı analjezik ve anestetik ilaçlarla yapılmıştır. Bu ilaçlar diklofenak sodyum, ketoprofen, lornoxicam, tenoxicam, etomidate, morphine ve propofol ilaçlarıdır. Araştırma sonucunda Propofol yarışmasız inhibisyon gösterirken diğerlerinin yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir.

Melatonin hormonu ile yapılan bir çalışmada hormonun insan eritrositlerinden saflaştırılan GR enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Erat ve Çiftçi'nin (2006) yaptıkları bu çalışmada % 24 verimle, 5.823 kat saflaştırılan enzimin aktivitesi 0.02 mM melatonin tarafından aktive ettiği, 0.08 mM da ise inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Sığır eritrositleri ile yapılan bir çalışmada ise Erat vd. (2003) GR enzimini amonyum sülfat ile kısmi olarak çöktürüp, afinite kromatografisi (2',5'-ADP Sepharose 4B) ve jel filtrasyon kromatografisi (sephadex G-200) yöntemlerini de kullanılarak tam saflaştırma yapmışlardır. Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine; streptomisin sülfat, gentamisin sülfat,

netilmisin, teicoplanin, thiamfenikol, ampisillin, sefotaxim ve sefodizim enzim antibiyotiklerinin etkilerini araştırmışlardır. Araştırma neticesinde sefotaxim ve sefodizim, enzimi inhibe ederken diğerleri aktive etmiştir. İnhibitörlere ait olan inhibisyon çeşidinin ise yarışmalı olduğu belirlenmiştir.

Tavuk karaciğerinden elde edilen GR enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi araştırılmıştır. %35 verim ile 1636 kat saflaştırılan enzim üzerine ofloksasin, levofloksasin, sefsazolin, sefepim ilaçlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Levofloksasin, ofloksasin, ve sefazolin'in yarışmasız, sefepim'in ise yarı yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Demir vd. 2006). Ayrıca koyun karaciğerinden %18,76 verimle 1850 kat saflaştırılan GR enzimi üzerine gentamisin sülfat, tiyamfenikol, oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin ilaçlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin antibiyotiklerinin enzimi yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Erat ve Çiftci 2003).

Yapılan literatür taramalarında enzim kinetiği çalışmaları için sıçanlar oldukça fazla kullanılmıştır. Bu çalışmaların birinde Adem'in (2011) sıçan kalp ve akciğer dokularından G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini saflaştırıp bu enzimlerin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların etkileri araştırılmıştır. Adem'in bu çalışmasında sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin furosemid, gentamisin, seftazidim, digoksin, dopamin, furosemidin, Adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl, levofloksasin, sefazolin ve kotin ilaçlarını enzimlerin aktiviteleri üzerine olan etkilerini incelemiştir. Bu ilaçlardan sefazolin, seftazidim, sefuroksim furosemid, gentamisin, levofloksasin, metilprednisol, teikoplanin sıçan akciğer dokusu GR enzimini inhibe etmiştir. Digoksin, dopamin, furosemidin ise sıçan kalp dokusu GR enzimini inhibe etmiştir. Ayrıca adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının ise her iki dokudan da saflaştırılan GR enzimi üzerine inhibisyonu gözlenmemiştir.

Sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada, sıçanların kas, kalp, akciğer, testis, böbrek, mide, beyin ve karaciğer dokularında nikotin ve nikotin+E vitamininin GR aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre nikotin beyin dokusu hariç diğer dokulardaki GR enzim aktivitesini inhibe ettiği, beyin dokusu GR enzimini ise aktive ettiği

belirlenmiştir. E vitamini takviye edildiğinde ise testis dokusu hariç GR aktivitesindeki nikotin kaynaklı inhibisyonun engellendiği bulunmuştur (Erat vd. 2007).

Budak vd. (2014) yaptıkları bir çalışmada, sıçanların içme suyuna $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,87;3;30 ve 300 ppm konsantrasyonunda) karıştırmış 100. gün sonunda sıçanların karaciğer dokularından GR enzim aktiviteleri incelenmiştir. Kontrol gruplarıyla kıyaslandığında enzim aktivitesinde önemli oranda azalmalar saptanmıştır.

Başka bir çalışmada Ray vd. (2014) sıçanlardan izole ettikleri hepatositleri arsenik $10 \mu\text{M}$ (As_2O_3) ile muamele etmişlerdir. 1, 2, 4 ve 6 saat boyunca yaptıkları aktivite ölçümlerinde GR enziminde azalış tespit etmişlerdir.

Görüldüğü gibi enzimler ilaç ve kimyasal maddelerden etkilenmektedirler. Özellikle günümüzde sıkça kullanılan antibiyotiklerin genlerin ekspresyonu üzerine etkileri de araştırma konusu olmuştur. Genlerde meydana gelebilecek genetik bozuklukların yol açtığı hastalıklarda dokulardaki spesifik enzimin eksikliğinden kaynaklı olabileceği araştırılmıştır. Bu nedenle hastalık tanısı için bazı doku örneklerindeki belirli enzimlerin ayrıca kan plazması ve eritrositlerdeki bazı enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesi önemlidir (Lehninger et al. 2007).

Yapılan çalışmalarda GR ve GSH eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stress Alzheimer, ateroskleroz, felç, epilepsi, Parkinson, orak hücre anemisi, HIV, kanser, karaciğer ve akciğer rahatsızlıkları, AIDS ve diyabet gibi birçok hastalıklara yol açmaktadır (Townsend et al. 2003, Wu et al, 2004). GR eksikliğinin en belirgin rahatsızlıkları neonatal sarılık, favizm ve hemolitik anemi olduğunu Kamerbeek ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarla ortaya koymuşlardır (Kamerbeek et al. 2007).

Antioksidan sistemler, ilaçlar, beslenme ve oksidatif stres gibi nedenlerden dolayı bozulmasına bağlı olarak hücre yaşlanması üzerine yapılan çalışmalarda eritrosit hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu hücrelerin yaşlanması lipid peroksidasyon indikatörü olan malondialdehid (MDA) artışı belirlemiştir (Stocks J et al. 1972). GSH/GSSG dengesinin bozulmasına neden olan bu durum glutatyon bağımlı enzimlerin (Glutatyon redüktaz,

Glutasyon-S transferaz, Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz, Glutasyon Peroksidaz, γ -Glutamil sistein sentataz) azalmasıyla kendini göstermiştir (Mieyal JJ et al. 1991).

Yapılan literatür taramalarında antioksidan sistemin önemli bir parçası olan glutasyon molekülü çalışmalarında eksojen toksinlere direk maruz kaldığından dolayı karaciğer dokusu araştırılmıştır. Bu organ hücreleri olan hepatositler GSH'ın en fazla depolandığı hücrelerdir. Yapılan hayvansal deneylerde GSH biyosentezini inhibe etmek için butiyonin, sulfoksimin, asetaminofen ve bromobenzen gibi çeşitli ksenobiyotikler kullanılmaktadır. Bunlara maruz kalan hepatositlerde GSH tükenmekte ve karaciğer hasarları ortaya çıkmaktadır. Bu durumu düzeltmek içinde glutasyon kaynaklarının artırılması gerektiği belirtilmiştir (Atamer vd. 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Araştırmamızda kullanılmak üzere; indirgenmiş formu NADPH olan β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat, okside formu NADP^+ olan β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat, indirgenmiş glutatyon (GSH), oksideglutatyon (GSSG), standart protein olarak serum albümini, kısaca TEMED olarak adlandırılan N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin, sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA), amonyum sülfat, hidroklorik asit, sodyum klorür, glisin, sodyum hidroksit, fosforik asit, asetik asit, gliserin, potasyum fosfat, potasyum klorür, etanol, metanol, potasyum bisfosfat, sodyum asetat, izopropanol Sigma Chemical Comp.'den, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, potasyum asetat E.Merc AG'den temin edilmiştir. Ayrıca bu kimyasallardan farklı olarak kullandığımız akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, amonyum persülfat, Coomessie Brilliant Blue G-250, β -merkapt etanol, sodyum dodesilsülfat (SDS) ve dithiothreitol (DTT) Acros Organics'den, 2', 5'-ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Elektroforez tankı: BIO RAD (dikey)

Soğutmalı satrifüj: (HETTICH UNIVERSAL 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)

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Homojenatın Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

1. 2,04 g KH_2PO_4 , 0,1116 g EDTA, 0,0462 g DTT ve 0,052 g PMSF karışımı (50 mM KH_2PO_4 / 1 mM EDTA/ 1 mM DTT/ 1 Mm PMSF (pH=8)) alınıp 200 mL saf suda çözülür ve pH=8'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 300 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,1 M KH_2PO_4 (pH=8): 0,34 g KH_2PO_4 tartılarak 40 mL saf suda çözöldükten sonra pH=8'e ayarlandı ve toplam hacim 25 mL olacak şekilde saf suda çözöldü.
2. 20 mM GSSG Çözeltisi: 0,0618 g okside glutatyon (GSSG) alınarak toplam hacim 5 mL olacak şekilde saf suda çözöldü.
3. 2 mM NADPH Çözeltisi: 0,0087 g NADPH alınarak hacmi saf suyla 6 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler

1. Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon (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 çözöldü, pH=4,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2. Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon (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. Kolonun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH=6): 1,7 g KH₂PO₄, 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. Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 1. tampon: (0,1 M K-asetat, 0,1 M K-fosfat, pH=6,0) : 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. Numune tatbik ettikten sonra afinite 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. Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 3. Tampon: (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH=7): 0,68 g KH₂PO₄ 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. Afinite jeline tutunmuş olan glutasyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon (50 mM K-fosfat, 1 mM EDTA, 1 mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH=7,5): 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.

3.1.3.4. 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: 1 g SDS alınıp hacmi saf su ile 10 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 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: İzopropanol'den 50 mL, TCA'dan 10 mL 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.

3.1.3.5. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: %95'lik etanolden 50 mL alınıp üzerine 100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi eklenerek çözülerek hazırlandı. Bu çözeltiye %95'lik fosforik asitten 100 mL ilave edildi. Toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.3.6. Antibiyotik ve İlaçların Ana Çözeltileri

1. **Amoksisilin:** 0,01 g amoksisilin alındı ve toplam hacim 1,2 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (22,80 mM).
2. **Tylosin:** 0,01g tylosin alındı ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (9,38 mM).

3. **Ampicilin:** 0,01 g ampisilin alındı ve toplam hacim 1,5 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (19,08 mM).
4. **Streptomisin Sülfat:** 0,01 g streptomisin sülfat alındı ve toplam hacim 0,05 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (34,38 mM).
5. **Gentamisin:** 0,08 g gentamisin alındı ve toplam hacim 2 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (83,75 mM).
6. **Cefuroksim sodyum:** 0,01 g cefuroksim sodyum alındı ve toplam hacim 0,05 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (448,02 mM).
7. **Sefazolin Sodyum:** 0,01 g sefazolin sodyum alındı ve toplam hacim 0,05 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (419,72 mM).
8. **Sefoperazone Sodyum:** 0,01 g sefoperazon sodyum alındı ve toplam hacim 0,3 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (49,92 mM).
9. **Linkomisin- HCl:** 0,6 g linkomisin alındı ve toplam hacim 2 mL olacak şekilde HCl' de çözüldü (737,93 mM).
10. **Novamizol:** 1 g metamizol sodyum alındı ve toplam hacim 2 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (1499,97 mM).
11. **Ketojezik:** 0,1 g ketoprofen alındı ve toplam hacim 2 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (196,63 mM).
12. **Prekort-Liyo:** 0,02 g metilprednisolon alındı ve toplam hacim 3 mL olacak şekilde saf suda çözüldü (17,80 mM).
13. **Klindamisin- HCl:** 0,6 g klindamisin alındı ve toplam hacim 2 mL olacak şekilde HCl'de çözüldü (705,91 mM).

3.2. Yöntem

3.2.1. Koyun Dalak Dokusunun Temini

Bingöl ili Kombine Et ve Süt Kurumundan soğuk zincir kurallarına göre temin edilip laboratuvarında belirli parçalara bölünerek -20°C' de saklandı ve deney çalışmalarında kullanıldı.

3.2.2. Glutasyon Redüktaz Enziminin Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması

3.2.2.1. Homojenat Hazırlanması

15 g dalak dokusu küçük parçalar halinde doğrandı ve 45 mL'lik 50 mM KH_2PO_4 (pH 7,5) tamponu içinde süspanse edildi. Daha sonra 13.000xg de 1 saat santrifüj edilip çökelti atılarak homojenat oluşturuldu.

3.2.2.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

340 nm'de spektrofotometrik olarak GR enziminin aktivite ölçümü yapıldı. Carlberg ve Mannervik'in (1985) tanımladığı bu yöntemde, okside glutasyon (GSSG)'un bulunduğu ortamda NADPH'ın yükseltgenmesine bağlı olarak azalan NADPH miktarı ile aktivite belirlendi. Aktivitenin belirlenmesi için 0,1 M KH_2PO_4 (pH 8,0) tamponu, 20 mM GSSG çözeltisi, 2 mM NADPH çözeltisi hazırlandı ve 1000 μL 'lik küvete 200 μL KH_2PO_4 tamponu, 100 μL GSSG çözeltisi, 100 μL NADPH çözeltisin, 20 μL homojenat ve 580 μL 'de saf su konarak 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı ve aktivite ölçüldü. Bu değerlere göre 0. ve 3. dakikalar arasındaki absorbans farkı değerleri kaydedildi.

Aşağıdaki formül kullanılarak enzim ünitesi değerleri hesaplandı.

$$\text{EÜ/mL} = (\Delta\text{OD}/3/6,22) \times (V_T/V_E) \times \text{SF}$$

Formülde kullanılan simgelerin ifade ettiği anlamlar aşağıda açıklandı;

EÜ/mL: 1 mL'deki enzim ünitesi sayısı

ΔOD : 340 nm'de ölçülen bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22: Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvetteki saf enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltilen örnekler için kullanılan seyreltme faktörü

3.2.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Suda oldukça yüksek oranda çözünme özelliğine sahip olan amonyum sülfat tuzu ile proteinlerin kısmi çöktürme işleminde protein moleküllerinin hidrofilik ve hidrofobik yüzeyleri ile kaynaklanan etkileşim söz konusudur. Proteinlerin etrafında bulunan su molekülleri, amonyum sülfat gibi yüksek tuz konsantrasyonunda buradaki iyonlar tarafından çekilir. Suyun çekilmesiyle onlara tutunan proteinler çökerler (salting-out). Proteinlerin bu özelliklerine dayanarak çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan homojenat için ön denemelerle amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bunun için sırasıyla % 0 - %20, %20 - %30, %30 - %40, %40 - %50, %50 - %60, %60 ve %70 aralıklarında çöktürme yapıldı ve enzimin hangi aralıkta çöktüğü tespit edildi. Homojenata katı amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Aşağıdaki formül kullanılarak çözeltiye katılacak olan amonyum sülfat tuzunun miktarı hesaplandı.

Formülde kullanılan simgelerin ifade ettiği anlamlar aşağıda açıklandı;

$$g(NH_4)_2SO_4 = 1,77 \times V \times (S2-S1) / 3,54 - S2$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S1: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Her defasında tuzlu homojenatlar 15 dakika boyunca 5.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ayrı bir erlene alındı, pelet ise çözünene kadar homojenat tamponu ile muamele edildi ve süpernatant ile pelette ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında işlemler tekrar edilip aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin aktif olduğu aralık belirlendi. Çöktürme sonrası oluşan çözelti pH=7,5'e ayarlanan diyaliz tamponu (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA) ile 2 saat boyunca 2 defa değiştirilerek dializ edildi (Simith 1987).

3.2.2.4. 2', 5' ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Amonyum sülfat ile kısmi olarak çöktürülen enzim numunesinin tam olarak saflaştırılması için 2' , 5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi uygulandı. Burada öncelikle afinite kolonu hazırlandı. Bunun için; 2', 5'-ADP sepharose 4B jeli kuru olarak 2 g tartılarak alındı. Bu miktar 10 mL'lik yatak hacmi için yeterli olan miktardı. Daha sonra bu jelden safsızlıkların uzaklaştırılması için 400 mL destile su ile birkaç defa yıkandı ve bu esnada jel şişirilmiş oldu. Şişirilmeden kaynaklı oluşan hava ise su trompu kullanılarak vakumlama yöntemiyle alındı ve jele dengeleme tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM DTT, pH:6,0) eklenerek süspansiyon yapıldı. Hazırlanan jel kolona pakettendi. Bunun için 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolon kullanıldı ve jelin çökmesi için beklenildi. Kolondan daha sonraki aşamalarda peristaltik pompa yardımıyla bölüm 3.1.3.3'de anlatılan yıkama ve dengeleme tamponları geçirildi. Kolonun dengelenmiş olduğu kolondan geçirilen tampon ile elüatın 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmesine bakılarak kolonun hazırlandığı anlaşıldı (Danner et al. 1977, Boggaram et al. 1979, Carlbeg and mannervik 1981). Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası en yüksek aktivitenin olduğu %20 - %70 aralığındaki 13 mL amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim numunesi kolona tatbik edildi. Daha sonra kolon yıkama çözeltileri ile yıkandı. Burada üç ayrı yıkama çözeltileri hazırlandı ve her birinden sırayla 25'er mL alınarak kolon yıkandı. Kolon ilk olarak 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=7,85) tamponu ile yıkandı. Daha sonra yıkama için 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl (pH=7,85) tamponu kullanıldı. Son olarak 50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA (pH=7) tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrede takip edilerek belirlendi. Yıkama işlemine absorban değerlerinin köre eşit ya da yakın (0,05 civarında) olana kadar devam edildi. Kolonun yıkanmasından sonra kolona yüklenen elüsyon tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH 7,3) ile enzim elüe edildi. Elüsyonlar 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine alınıp aktivite değerlerine bakıldı. Elde ettiğimiz enzim örneklerinin SDS-PAGE yöntemiyle saf olup olmadıkları kontrol edildi.

3.2.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

SDS-PAGE Laemmali metoduna göre yapıldı (Laemmali 1970). Bu metoda göre öncelikle elektroforez plakaları su ve alkol yardımıyla yıkandı. Daha sonra iki plaka üst üste gelecek şekilde konulup kısıkaçlarla tutturuldu ve sızdırmayı önleyen bir sünger bulunduran jel hazırlama kabinine konuldu. Bu plakalardan biri aralık oluşturuvcu diğer ise düz bir plakaydı. Diğer taraftan %8'lik ayırma jeli hazırlandı (ayırma jeli hazırlarken 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) ve enjektörle üstte 2-3 cm kalıncaya kadar plakalara dolduruldu, hemen ardından hava kabarcığı oluşmasını önlemek amacıyla plakalara izopropanol eklendi. Daha sonra jelin donması beklendi. Jelin katılaşmış olduğundan emin olunduktan sonra üstteki propanol döküldü ve %3'lük yığma jeli hazırlandı (yığma jeli hazırlarken 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). 2-3 cm boşluk olan kısma doldurulup hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Hemen ardından numune tatbik edilecek olan kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Katılaşma işleminden sonra tarak dikkatlice çıkartılarak kuyular numune yüklemeye hazır hale getirildi. Daha sonra jel plakaları üzerinde bulundukları jel hazırlama kabiniyle beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısmı yürütme tamponu (bölüm 3.1.3.4'de hazırlanışı anlatıldı) ile dolduruldu. Yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde enzim örnekleri hazırlandı. Enzim örneklerinden 100'er µL alındı ve her birinin üzerine 100 µL numune tamponu (bölüm 3.1.3.4'de hazırlanışı anlatıldı) ve 100 µL gliserol ekleyip 10 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Böylece denature olmuş proteinler elektrofoez tankında yürümeye hazır hale geldi. Oluşan kuyulardan birine önce 5mL protein standardı sonraki kuyulara inkübe edilen enzimden 20 µL eklendi ve tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) anot kablo, üst taraftan ise (-) katot kablo yerleştirildi. Örnekler önce 80 voltta 20 dakika boyunca yürütüldü. Daha sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin iki saat boyunca yürüyüp jelin alt kısmına gelmeleri sağlandı. Yürütme işlemi bitince akım kesilerek, jel plakalar arasından dikkatlice çıkartıldı ve bölüm 3.1.3.4'de hazırlanışı anlatılan sabitleştirme, boyama ve yıkama çözeltilerine çalkalayıcı üzerinde sırasıyla bırakıldı. Sabitleştirme

çözeltisinde yaklaşık 30 dakika, boyama çözeltisinde 3 saat ve yıkama çözeltisinde rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar (yaklaşık 1 saat) bekletildi. Yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

3.2.2.6. GR Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini

Saflaştırılan enzimin muhtemel alt biriminin molekül kütlesini hesaplamak için 175 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 70 kDa, 62 kDa, 51 kDa, 42 kDa, 29 kDa, 22 kDa, 14 kDa ve 10,5 kDa molekül kütlesine sahip 11 standart protein kullanıldı. Her bir standart proteinin R_f değerini hesaplamak için saflaştırılan GR enzimi ile yapılan elektroforez sonucu elde edilen jel fotoğrafı kullanıldı. Daha sonra R_f -log M_K standart grafiği çizildi. Daha sonra aynı jel fotoğrafıyla görüntülenen GR enziminin R_f değeri hesaplandı ve elde edilen değer grafik formülünde yerine konularak çıkan sonucun log M_K değeri bulundu. Bulunan değer antilogaritması alındı ve GR enziminin molekül alt biriminin kütlesi belirlendi. Proteinlerin R_f değerleri aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$R_f = X_e / X_{boya}$$

X_e : Proteinin yürüme mesafesi,

X_{boya} : Boyanın yürüme mesafesi

3.2.3. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Homojenat, 2', 5' ADP-Sepharose 4B anfinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisi ve amonyum sülfat çökteltisindeki protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde proteinler üzerindeki pozitif yüke bağlanmak üzere negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanıldı. 2 dakika gibi kısa bir sürede bu boya proteinlere bağlanır. Proteinin ve boyanın oluşturduğu kompleks 595 nm' de maksimum absorbands gösterir. Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti oldukça azdır (1-100 µg arası). Ayrıca iki saat'in üzerinde protein boya kompleksi kalabilir (Bradford 1976).

Homojenatı, 2', 5' ADP-Sepharose 4B anfinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisini ve amonyum sülfat çökeltisindeki protein miktarlarını belirlemek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Standart grafik oluşturmak için standart sığır albumin (1 mL'sinde 1 mg protein bulunduran) çözeltisi hazırlandı. Tüplere son hacim saf su ile 100 μ L olacak şekilde hazırlanan standart sığır albümin çözeltisinden sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L eklendi ve her bir tüpteki karışımın üzerine 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vortekslendi ve 10 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için bekletildi. Ardından 3 mL'lik küvetlerde 595 nm'de absorbans değerleri köre karşı okundu. Kör olarak, toplamı 5000 μ L olan (100 μ L saf su ve 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250) çözelti kullanıldı. Sonuç olarak standart grafik için absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri belirlendi (Şekil 4.1). Daha sonra elde edilen enzim numunelerinden (koyun dalak dokusu homojenatından, amonyum sülfat çökeltisinden ve afinite kromatografisinden) 0,1 mL, tüplere konularak üzerine 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi katıldı. Vorteks ile karıştırılıp 10 dakika bekletildi. Son olarak bunlarında 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Elde edilen bu sonuçlara göre standart grafikten faydalanılarak protein miktarları belirlendi.

3.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Optimum pH Çalışmaları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enziminin optimum pH'sını tespit etmek için pH'ları 7, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl ve pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan fizyolojik pH'ya yakın tamponlama kapasitesine sahip KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Bu farklı pH'larda ayrı ayrı enzim aktivitelerine bakıldı ve sonuçlar değerlendirilerek optimum pH belirlendi.

3.2.4.2. Optimum İyonik Şiddet Çalışmaları

Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi için belirlenen optimum pH'da 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,8 ve 1 M KH_2PO_4 tamponları kullanılarak sırasıyla aktivite ölçümlerine bakıldı.

3.2.4.3. Stabil pH Çalışmaları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enziminin stabil pH değerini tespit edebilmek için pH'ları 5, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan KH_2PO_4 ve pH'ları 7, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Bu tampon çözeltilerinin 2 mL'sine 1mL enzim çözeltisi eklenerek 24 saat aralıklarıyla 7 gün boyunca ölçümler yapıldı ve enzimin stabil pH'sı belirlendi.

3.2.4.4. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimine sıcaklığın etkisini tespit etmek amacıyla 10'ar °C aralıklarla 0°C ile 90°C arasında aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.4.5. GSSG ve NADPH Substratları İçin K_M sabitinin ve V_{max} Değerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

Koyun dalak dokusundan glutatyon redüktaz enziminin substratlarının K_M sabiti ve V_{max} değerinin belirlenmesi için enzimin substratı olan GSSG ve NADPH'in bulunduğu 5 ayrı konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıldı. Öncelikle NADPH'in sabit konsantrasyonunda GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonunda da ölçüm yapıldı. Aynı şekilde sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH'in 5 farklı konsantrasyonunda ölçümler yapıldı ve çıkan sonuçlara göre Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Lineweaver ve Burk 1934). Sonuçta NADPH ve GSSG için K_M sabiti ve V_{max} değeri belirlendi.

3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Araştırılması

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçlarının etkilerini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda ilaçlar alınarak küvet ortamına eklendi. Bu ilaçlardan bazılarının inhibisyon etki gösterdiği farklı inhibitör konsantrasyonlarında ön denemeler yapılarak belirlendi ve mümkün olan en yüksek inhibitör konsantrasyonuna kadar denemeler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla % Aktivite-[I] grafiği çizilerek IC_{50} değeri hesaplandı. Aktivite ölçümlerinde kullanılan çözelti miktarları ile ilaçların konsantrasyonları ayrı ayrı olmak üzere Tablo 3.1- 3.13'de gösterildi.

Tablo 3.1. Koyun dalak GR enzimi üzerine amoksisilin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Amoksisilin (22,80 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Amoksisilin Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	0,114
570	200	100	100	20	10	1000	0,228
560	200	100	100	20	20	1000	0,456
530	200	100	100	20	50	1000	1,140
480	200	100	100	20	100	1000	2,280
430	200	100	100	20	150	1000	3,420
380	200	100	100	20	200	1000	4,560

Tablo 3.2. Koyun dalak GR enzimi üzerine tylosin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μL)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μL)	NADPH (2 mM) (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Tylosin (9,38 mM) Hacmi (μL)	Toplam Hacim (μL)	Küvetteki Tylosin Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
570	200	100	100	20	10	1000	0,0938
565	200	100	100	20	15	1000	0,1407
560	200	100	100	20	20	1000	0,1876
555	200	100	100	20	25	1000	0,2345
550	200	100	100	20	30	1000	0,2814

Tablo 3.3. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μL)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μL)	NADPH (2 mM) (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Ampisilin (19,08 mM) Hacmi (μL)	Toplam Hacim (μL)	Küvetteki Ampisilin Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	0,0954
570	200	100	100	20	10	1000	0,1908
560	200	100	100	20	20	1000	0,3816
530	200	100	100	20	50	1000	0,9540
505	200	100	100	20	75	1000	1,4310
480	200	100	100	20	100	1000	1,9080
380	200	100	100	20	200	1000	3,8160
330	200	100	100	20	250	1000	4,7700

Tablo 3.4. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μL)	KH_2O_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μL)	NADPH (2 mM) (μL)	Enzm Hacmi (μL)	Streptomisin sülfat (34,38 mM) Hacmi (μL)	Toplam Hacim (μL)	Küvetteki Streptomisin sülfat Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	0,1719
570	200	100	100	20	10	1000	0,3438
530	200	100	100	20	50	1000	1,7190
480	200	100	100	20	100	1000	3,4380
430	200	100	100	20	150	1000	5,1570
380	200	100	100	20	200	1000	6,8760
350	200	100	100	20	230	1000	7,9100
330	200	100	100	20	250	1000	8,6000

Tablo 3.5. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μL)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μL)	NADPH (2 mM) (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Gentamisin (83,75 mM) Hacmi (μL)	Toplam Hacim (μL)	Küvetteki Gentamisin Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	0,42
570	200	100	100	20	10	1000	0,84
560	200	100	100	20	20	1000	1,68
530	200	100	100	20	50	1000	4,19
480	200	100	100	20	100	1000	8,38
430	200	100	100	20	150	1000	12,56
380	200	100	100	20	200	1000	16,76
330	200	100	100	20	250	1000	20,94

Tablo 3.6. Koyun dalak GR enzimi üzerine cefuroksim sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2O_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 M) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzm Hacmi (μ L)	Cefuroksm sodyum (448,02 mM) Hacmi (μ L)	Toplam hacim (μ L)	Küvetteki Cefuroksim sodyum Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
579	200	100	100	50	1	1000	0,44802
578	200	100	100	50	2	1000	0,89604
576	200	100	100	50	4	1000	1,79208
574	200	100	100	50	6	1000	2,68812
572	200	100	100	50	8	1000	3,58416
570	200	100	100	50	10	1000	4,48020

Tablo 3.7. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Sefazolin Sodyum (419,72 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Sefazolin Sodyum Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
579	200	100	100	50	1	1000	0,41972
578	200	100	100	50	2	1000	0,83944
576	200	100	100	50	4	1000	1,67888
574	200	100	100	50	6	1000	2,51832
572	200	100	100	50	8	1000	3,35776
570	200	100	100	50	10	1000	4,19720

Tablo 3.8. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefoperazon sodyum antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Sefoperazon Sodyum (49,92 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Sefoperaon Sodyum Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
575	200	100	100	50	5	1000	0,2496
570	200	100	100	50	10	1000	0,4992
560	200	100	100	50	20	1000	0,9984
530	200	100	100	50	50	1000	2,4960
480	200	100	100	50	100	1000	4,9920
430	200	100	100	50	150	1000	7,488
380	200	100	100	50	200	1000	9,984
280	200	100	100	50	300	1000	14,976
180	200	100	100	50	400	1000	19,968

Tablo 3.9. Koyun dalak GR enzimi üzerine linkomisin-HCl antibiyotığı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH ₂ P ₄ (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Linkomisin-HCl (737,93 mM) Hacmi (μ L)	Toplm Hacim (μ L)	Küvetteki Linkomisin- HCl Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
575	200	100	100	50	5	1000	3,68965
570	200	100	100	50	10	1000	7,37930
560	200	100	100	50	20	1000	14,75860
530	200	100	100	50	50	1000	36,89650
480	200	100	100	50	100	1000	73,79300
430	200	100	100	50	150	1000	110,69000
380	200	100	100	50	200	1000	147,58600
280	200	100	100	50	300	1000	221,37900

Tablo 3.10. Koyun dalak GR enzimi üzerine novamizol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH ₂ PO ₄ (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Novamizol (1499,97 mM) Hacmi (μ L)	Toplam hacim (μ L)	Küvetteki Novamizol Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
578	200	100	100	50	2	1000	2,3
576	200	100	100	50	4	1000	4,6
574	200	100	100	50	6	1000	6,9
572	200	100	100	50	8	1000	9,2
570	200	100	100	50	10	1000	11,5

Tablo 3.11. Koyun dalak GR enzimi üzerine ketojezik ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Ketojezik (196,63 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Ketojezik Konsant. (mM)
580	200	100	100	50	-	1000	-
578	200	100	100	50	2	1000	0,39326
576	200	100	100	50	4	1000	0,78652
574	200	100	100	50	6	1000	1,17978
572	200	100	100	50	8	1000	1,57304
570	200	100	100	50	10	1000	1,96630

Tablo 3.12. Koyun dalak GR enzimi üzerine prekort-liyo ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Prekort-Liyo (17,80 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Prekort- Liyo Konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	0,089
570	200	100	100	20	10	1000	0,178
560	200	100	100	20	20	1000	0,356
530	200	100	100	20	50	1000	0,890
480	200	100	100	20	100	1000	1,780

Tablo 3.13. Koyun dalak GR enzimi üzerine klindamisin-HCl antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	GSSG (20 mM) (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim hacmi (μ L)	Klindamisin- HCl (705,91 mM) Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Klindamisin- HCl konsant. (mM)
580	200	100	100	20	-	1000	-
575	200	100	100	20	5	1000	3,53
570	200	100	100	20	10	1000	7,06
560	200	100	100	20	20	1000	14,12
530	200	100	100	20	50	1000	35,30
480	200	100	100	20	100	1000	70,60
430	200	100	100	20	150	1000	105,90
380	200	100	100	20	200	1000	141,20
180	200	100	100	20	400	1000	282,40
-	200	100	100	20	580	1000	409,43

3.2.6. Koyun Dalak GR Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bazı İlaç ve Antibiyotiklerin K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibisyon çalışmaları için kullandığımız ilaçlar içinden prekort-liyo, ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin ve cefoperazon sodyum koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enzimini inhibe ettiği tespit edildi. K_i sabitlerini belirlemek amacıyla ön denemeler yapılarak en uygun beş substrat konsantrasyonu belirlendi ve en uygun üç inhibitör konsantrasyonu her substrat konsantrasyonu için hazırlandı. Tablo 3.14-3.18’ de gösterilen çözelti miktarları, inhibitör ve substrat konsantrasyonları kullanılarak spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülüp sonuçlar kaydedildi.

Tablo 3.14. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) Hacmi (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Substrat (GSSG) Kons. (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)
677,5	200	2,5	100	20	-	1000	0,05	-
670	200	10	100	20	-	1000	0,2	-
655	200	25	100	20	-	1000	0,5	-
580	200	100	100	20	-	1000	2	-
480	200	200	100	20	-	1000	4	-
527,5	200	2,5	100	20	150	1000	0,05	2,862
520	200	10	100	20	150	1000	0,2	2,862
505	200	25	100	20	150	1000	0,5	2,862
430	200	100	100	20	150	1000	2	2,862
330	200	200	100	20	150	1000	4	2,862
477,5	200	2,5	100	20	200	1000	0,05	3,816
470	200	10	100	20	200	1000	0,2	3,816
455	200	25	100	20	200	1000	0,5	3,816
380	200	100	100	20	200	1000	2	3,816
280	200	200	100	20	200	1000	4	3,816
427,5	200	2,5	100	20	250	1000	0,05	4,770
420	200	10	100	20	250	1000	0,2	4,770
405	200	25	100	20	250	1000	0,5	4,770
330	200	100	100	20	250	1000	2	4,770
230	200	200	100	20	250	1000	4	4,770

Tablo 3.15. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) Hacmi (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Substrat (GSSG) Kons. (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)
647,5	200	2,5	100	50	-	1000	0,05	-
640	200	10	100	50	-	1000	0,2	-
625	200	25	100	50	-	1000	0,5	-
550	200	100	100	50	-	1000	2	-
450	200	200	100	50	-	1000	4	-
497,5	200	2,5	100	50	150	1000	0,05	5,157
490	200	10	100	50	150	1000	0,2	5,157
475	200	25	100	50	150	1000	0,5	5,157
400	200	100	100	50	150	1000	2	5,157
300	200	200	100	50	150	1000	4	5,157
447,5	200	2,5	100	50	200	1000	0,05	6,876
440	200	10	100	50	200	1000	0,2	6,876
425	200	25	100	50	200	1000	0,5	6,876
350	200	100	100	50	200	1000	2	6,876
250	200	200	100	50	200	1000	4	6,876
397,5	200	2,5	100	50	250	1000	0,05	8,600
390	200	10	100	50	250	1000	0,2	8,600

375	200	25	100	50	250	1000	0,5	8,600
300	200	100	100	50	250	1000	2	8,600
200	200	200	100	50	250	1000	4	8,600

Tablo 3.16. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin antibiyotiğinin K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) Hacmi (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Substrat (GSSG) Kons. (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)
647,5	200	2,5	100	50	-	1000	0,05	-
640	200	10	100	50	-	1000	0,2	-
625	200	25	100	50	-	1000	0,5	-
550	200	100	100	50	-	1000	2	-
450	200	200	100	50	-	1000	4	-
497,5	200	2,5	100	50	150	1000	0,05	12,56
490	200	10	100	50	150	1000	0,2	12,56
475	200	25	100	50	150	1000	0,5	12,56
400	200	100	100	50	150	1000	2	12,56
300	200	200	100	50	150	1000	4	12,56
447,5	200	2,5	100	50	200	1000	0,05	16,76
440	200	10	100	50	200	1000	0,2	16,76
425	200	25	100	50	200	1000	0,5	16,76

350	200	100	100	50	200	1000	2	16,76
250	200	200	100	50	200	1000	4	16,76
397,5	200	2,5	100	50	250	1000	0,05	20,94
390	200	10	100	50	250	1000	0,2	20,94
375	200	25	100	50	250	1000	0,5	20,94
300	200	100	100	50	250	1000	2	20,94
200	200	200	100	50	250	1000	4	20,94

Tablo 3.17. Koyun dalak GR enzimi üzerine prekort-liyo ilacının K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) Hacmi (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Hacmi (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Küvetteki Substrat (GSSG) Kons. (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)
677,5	200	2,5	100	50	-	1000	0,05	-
670	200	10	100	50	-	1000	0,2	-
655	200	25	100	50	-	1000	0,5	-
580	200	100	100	50	-	1000	2	-
480	200	200	100	50	-	1000	4	-
642,5	200	2,5	100	50	5	1000	0,05	0,089
635	200	10	100	50	5	1000	0,2	0,089
620	200	25	100	50	5	1000	0,5	0,089
545	200	100	100	50	5	1000	2	0,089

445	200	200	100	50	5	1000	4	0,089
627,5	200	2,5	100	50	20	1000	0,05	0,356
620	200	10	100	50	20	1000	0,2	0,356
605	200	25	100	50	20	1000	0,5	0,356
530	200	100	100	50	20	1000	2	0,356
430	200	200	100	50	20	1000	4	0,356
547,5	200	2,5	100	50	100	1000	0,05	1,780
540	200	10	100	50	100	1000	0,2	1,780
525	200	25	100	50	100	1000	0,5	1,780
450	200	100	100	50	100	1000	2	1,780
350	200	200	100	50	100	1000	4	1,780

Tablo 3.18. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefaperazon sodyum ilacının K_i sabitinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

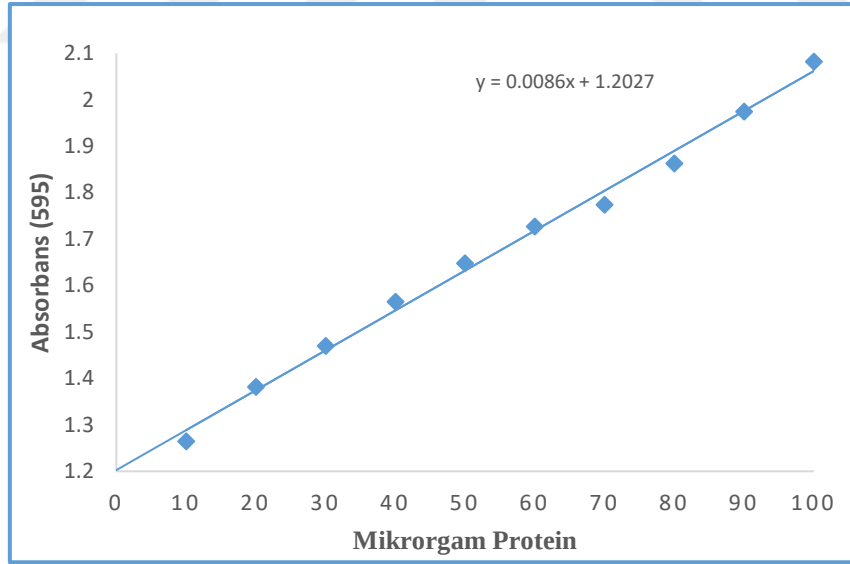
Saf Su (μ L)	KH_2PO_4 (0,1 M) pH= 8	Substrat (GSSG) (20 mM) Hacmi (μ L)	NADPH (2 mM) (μ L)	Enzim Hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Hacmi (μ L)	Toplam hacim (μ L)	Küvetteki Substrat (GSSG) Kons. (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. (mM)
647,5	200	2,5	100	50	-	1000	0,05	-
640	200	10	100	50	-	1000	0,2	-
625	200	25	100	50	-	1000	0,5	-
550	200	100	100	50	-	1000	2	-
450	200	200	100	50	-	1000	4	-

547,5	200	2,5	100	50	100	1000	0,05	4,992
540	200	10	100	50	100	1000	0,2	4,992
525	200	25	100	50	100	1000	0,5	4,992
450	200	100	100	50	100	1000	2	4,992
350	200	200	100	50	100	1000	4	4,992
447,5	200	2,5	100	50	200	1000	0,05	9,984
440	200	10	100	50	200	1000	0,2	9,984
425	200	25	100	50	200	1000	0,5	9,984
350	200	100	100	50	200	1000	2	9,984
250	200	200	100	50	200	1000	4	9,984
247,5	200	2,5	100	50	400	1000	0,05	19,968
240	200	10	100	50	400	1000	0,2	19,968
225	200	25	100	50	400	1000	0,5	19,968
150	200	100	100	50	400	1000	2	19,968
50	200	200	100	50	400	1000	4	19,968

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Protein Grafiği

Çalışmamızın tüm aşamalarında Bradford yöntemiyle belirlenen kantitatif protein tayini kullanıldı. Protein tayinini yapabilmek için öncelikle Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ve standart sığır albümin çözeltisinden yararlanılarak standart grafik için absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri belirlendi. Homojenat, amonyum sülfat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim örneklerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Şekil 4.1’de standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart Grafik

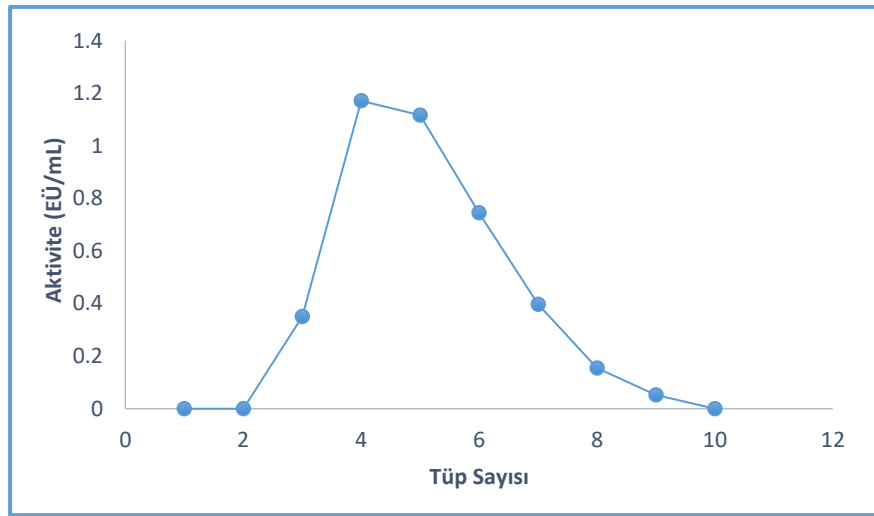
4.2. Koyun Dalak Dokusu GR Enziminin Saflaştırılmasına Ait Bulgular

4.2.1. Afinite Kromatografisi Bulguları

Amonyum sülfat sonrası süpernatantta aktivitenin olmadığı ve pelette maksimum aktivitenin olduğu homojenat aralığı %20 - %70 olarak tespit edildi. Tespit edilen bu homojenat 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Aktivite sonuçları hesaplanarak Şekil 4.2 ve Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1. Koyun dalak dokusu GR enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon verilerini gösteren tablo

Tüp sayısı	Aktivite (EÜ/mL)
1	0
2	0
3	0,351
4	1,171
5	1,117
6	0,745
7	0,397
8	0,155
9	0,053
10	0



Şekil 4.2. Koyun dalak dokusu GR enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği

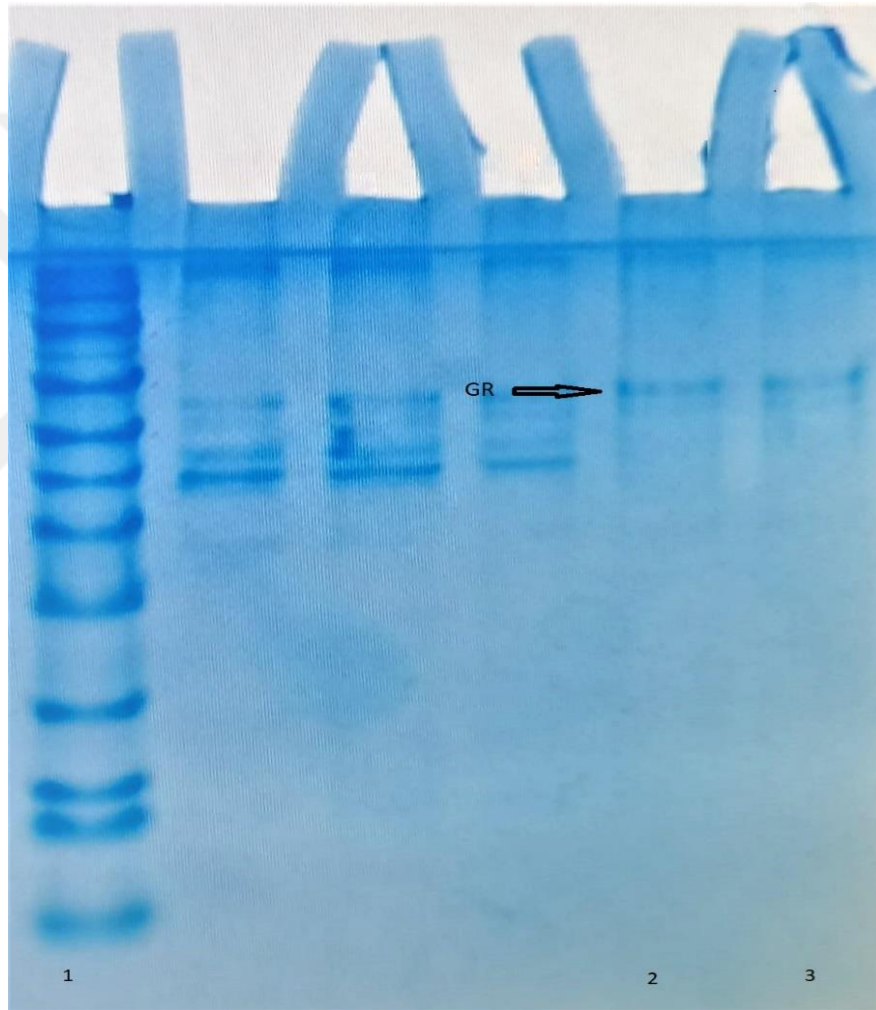
Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve saf enzimde Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafikten yararlanarak protein tayini, toplam protein tayini, spesifik aktivite, verim yüzdesi ve saflaştırma kat sayısı hesaplandı. Bu değerler Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.2. Glutatyon redüktaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	%Verim	Saflaştırma Kat sayısı
Homojenat	25	0,523	40,85	1021	13,075	0,0128	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi % (40-50)	13	0,689	52,94	688	8,957	0,0130	68,50	1,0156
Afinite Kromatografi	9	0,590	0,02945	0,26505	5,31	20,03	40,61	1564,8

4.2.2. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

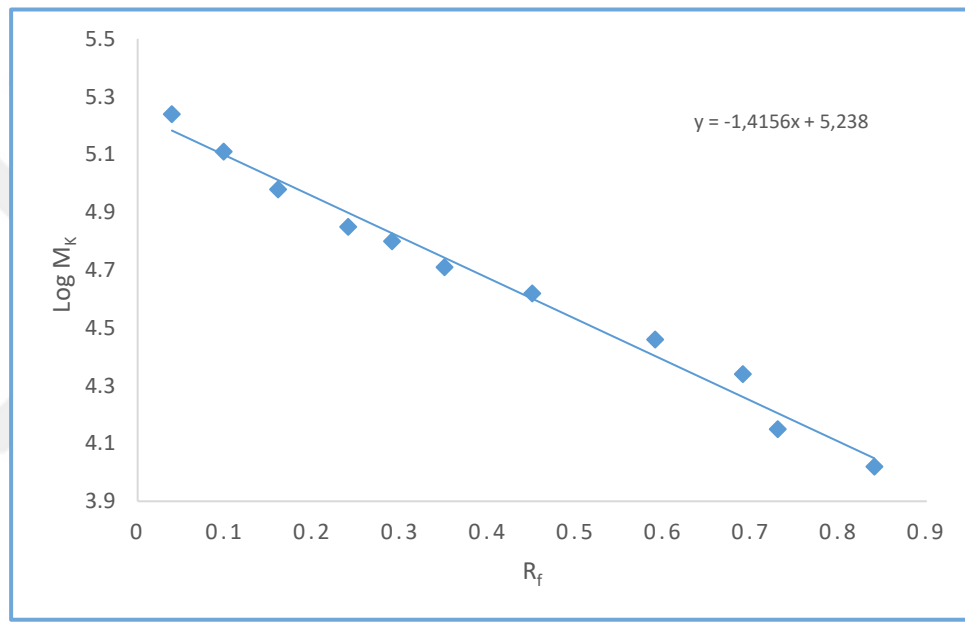
Koyun dalak dokusundan elde edilen GR enzimi numunelerini önce amonyum sülfat çöktürmesi ve daha sonra afinite kolonuna uygulandıktan sonra SDS-PAGE yöntemi ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Bunun için bölüm 3.2.2.5’de anlatılan elektroforez sistemi kuruldu ve enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulanarak yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafı Şekil 4.3’de gösterildi.



Şekil 4.3. GR enzimi için elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı. 1. kuyu: standart protein (175 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 70 kDa, 62 kDa, 51 kDa, 42 kDa, 29 kDa, 22 kDa, 14 kDa ve 10,5 kDa), 2. ve 3. kuyu: Afinite kolonundan alınan saf GR enzimi

4.2.3. Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE ile Alt Biriminin Molekül Kütlesinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Koyun dalak GR enziminin muhtemel alt biriminin molekül kütlesini tayin etmek için bölüm 3.2.2.6’da anlatıldığı gibi enzim SDS-PAGE’de yürütüldü ve bantların fotoğraf görüntüsü Şekil 4.3’de gösterildi. Fotoğraftan yararlanılarak standart proteinlerin ve enzimin R_f değeri ölçüldü. Daha sonra Şekil 4.4’de gösterildiği gibi $\log M_K - R_f$ grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak koyun dalak GR enziminin mol kütlesi 91 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.4. Saflaştırılan GR enzimi için $\log M_K - R_f$ grafiği

4.3. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Bulgular

4.3.1 Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Bulgular

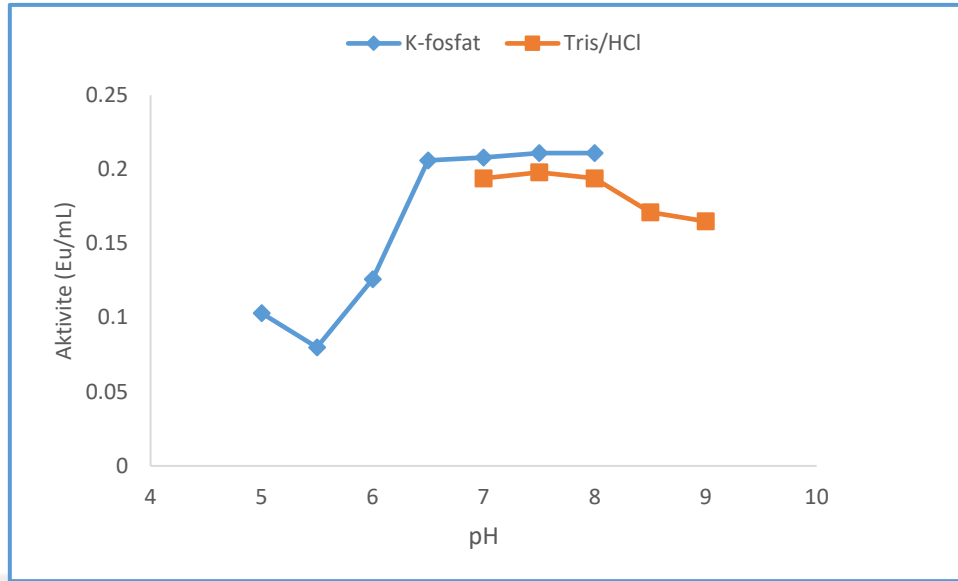
Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH’sı 1.3.1’de anlatıldığı gibi pH’sı 5-8 aralığında 0,1 M potasyum fosfat ve pH’sı 7-9 aralığında 0,1 M Tris-HCl tamponları kullanılarak spektrofotometrik olarak enzimin gösterdiği aktiviteler belirlendi (Şekil 4.5 ve Tablo 4.3-4.4). Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH’sı 0,1 M KH_2PO_4 pH= 8,0 tamponu olarak belirlendi.

Tablo 4.3. 0,1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak koyun dalak dokusu GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5	0,103
5,5	0,080
6	0,126
6,5	0,206
7	0,208
7,5	0,211
8	0,220

Tablo 4.4. 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak koyun dalak dokusu GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7	0,194
7,5	0,198
8	0,194
8,5	0,171
9	0,165



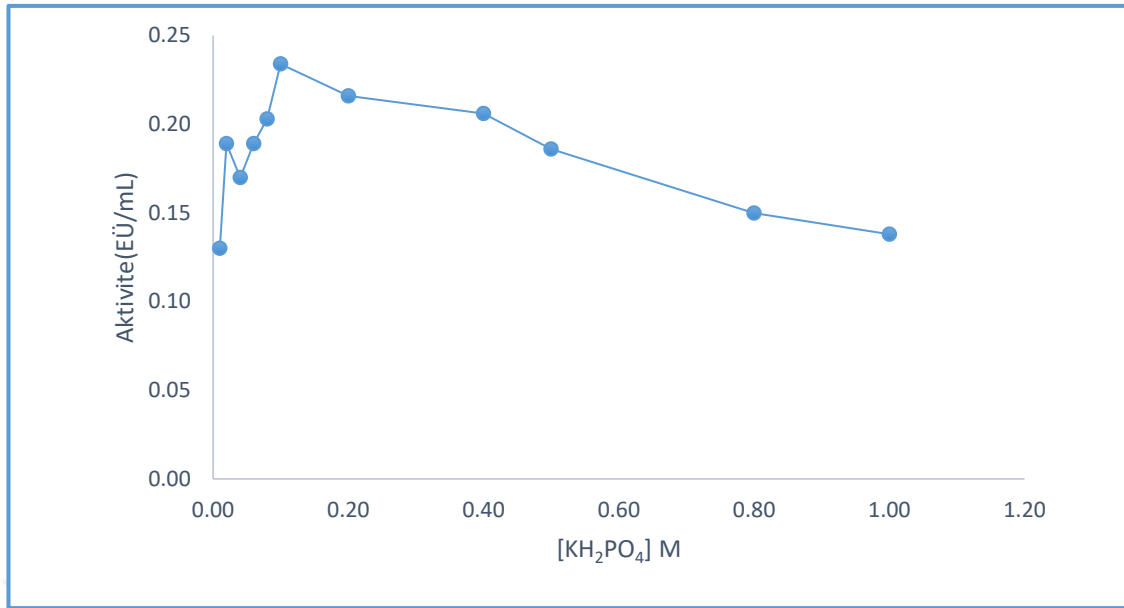
Şekil 4.5. Koyun karaciğer dokusu GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunu gösteren pH-Aktivite grafiği

4.3.2. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için önceki çalışmalarda pH=8,0 olarak uygunluğu belirlenen potasyum fosfat tamponunun farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı ve aktivite ölçümleri her bir konsantrasyon için yapılarak elde edilen değerler ile KH_2PO_4 konsantrasyonundan oluşan grafik çizildi. Koyun dalak dokusu GR enziminin en uygun iyonik şiddetinin 0,1 M KH_2PO_4 pH=8 tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.6 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Koyun dalak dokusu GR enziminin optimum iyonik şiddet için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[KH_2PO_4] (M)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2	0,4	0,5	0,8	1
Aktivite (EÜ/mL)	0,130	0,189	0,170	0,189	0,203	0,234	0,216	0,206	0,186	0,150	0,138



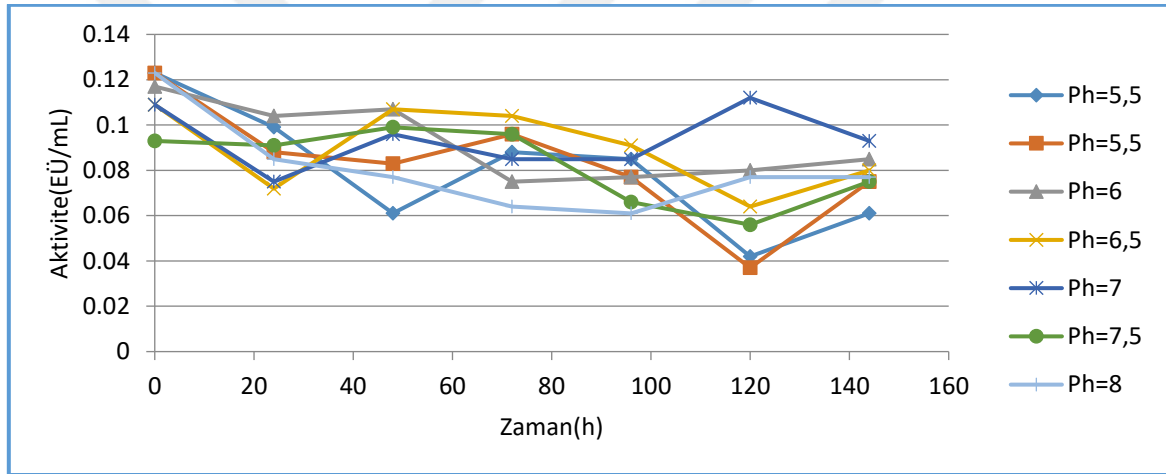
Şekil 4.6. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak koyun dalak dokusunun GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.3.3. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi İçin Stabil pH Bulunmasına Yönelik Bulgular

Koyun dalak dokusu GR enziminin stabil pH'sını tespit etmek için pH'ları 5,0, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 0,1 M KH₂PO₄ ve pH'ları 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponları hazırlandı. Spektrofotometrik olarak enzimin gösterdiği aktiviteler belirlendi (Tablo 4.6- 4.7). Şekil 4.7 ve 4.8'de görüldüğü gibi 7 gün boyunca ölçülen aktiviteler ve aktivitelerin korunurluğu dikkate alındığında stabil pH'nın Şekil 4.7'de çizilen ve pH'sı 7,0 K-fosfat tamponu olduğu görülmektedir.

Tablo 4.6. Koyun dalak dokusu GR enzimi için 0,1 M KH_2PO_4 kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçlarına yönelik tablo

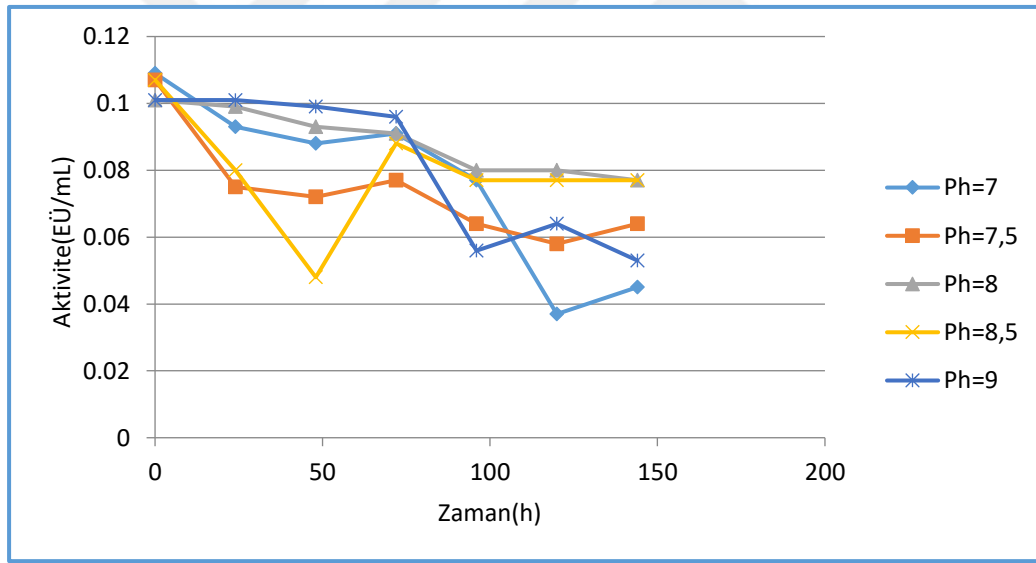
Zaman (Saat)	(pH=5,0) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=5,5) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=6,0) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/mL)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/mL)
0	0,123	0,123	0,117	0,109	0,093	0,093	0,123
24	0,099	0,088	0,104	0,072	0,075	0,091	0,085
48	0,061	0,083	0,107	0,107	0,096	0,099	0,077
72	0,088	0,096	0,075	0,104	0,085	0,096	0,064
96	0,085	0,077	0,077	0,091	0,085	0,066	0,061
120	0,042	0,037	0,080	0,064	0,112	0,056	0,077
144	0,061	0,075	0,085	0,080	0,093	0,075	0,077



Şekil 4.7. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun dalak dokusu GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

Tablo 4.7. Koyun dalak dokusu GR enzimi için 0,1 M Tris-HCl kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçlarına yönelik tablo

Zaman (Saat)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/mL)	(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	0,109	0,107	0,101	0,107	0,101
24	0,093	0,075	0,099	0,080	0,075
48	0,088	0,072	0,093	0,048	0,099
72	0,091	0,077	0,091	0,088	0,096
96	0,077	0,064	0,080	0,077	0,056
120	0,037	0,058	0,080	0,077	0,064
144	0,045	0,064	0,077	0,077	0,053



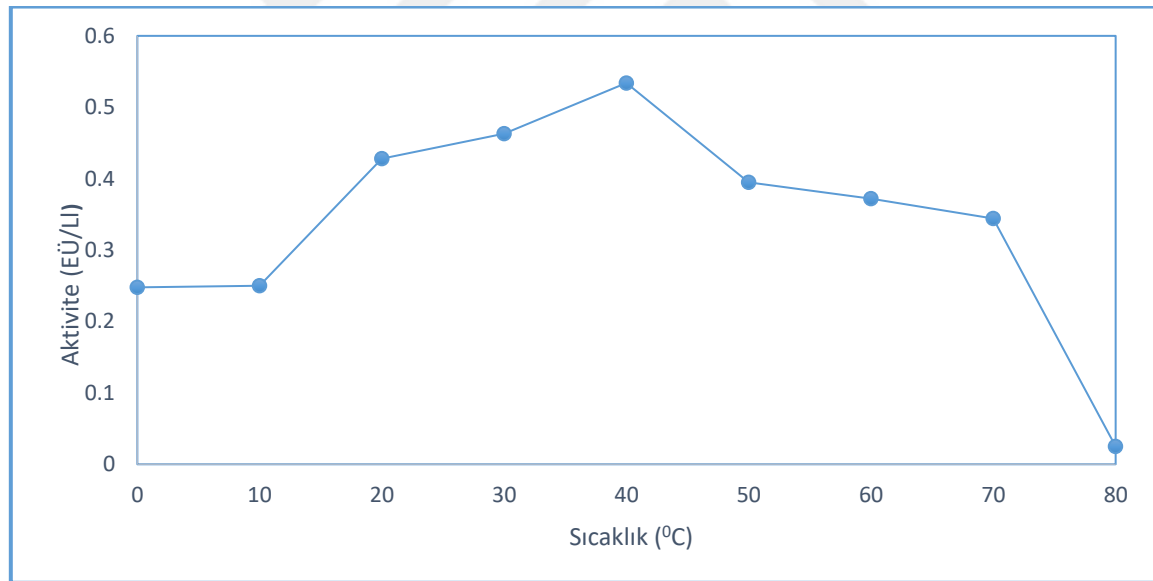
Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun dalak dokusu GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.3.4. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Koyun dalak GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla bölüm 2.2’de anlatıldığı gibi 0°C ile 90°C arasında her 10°C’de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler Şekil 4.9’de ve Tablo 4.8’de gösterildi. Sonuç olarak enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu sıcaklık 40°C olarak tespit edildi.

Tablo 4.8. Koyun dalak GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Aktivite (EÜ/mL)	0,248	0,250	0,428	0,463	0,534	0,395	0,372	0,344	0,00



Şekil 4.9. Koyun dalak dokusu GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği

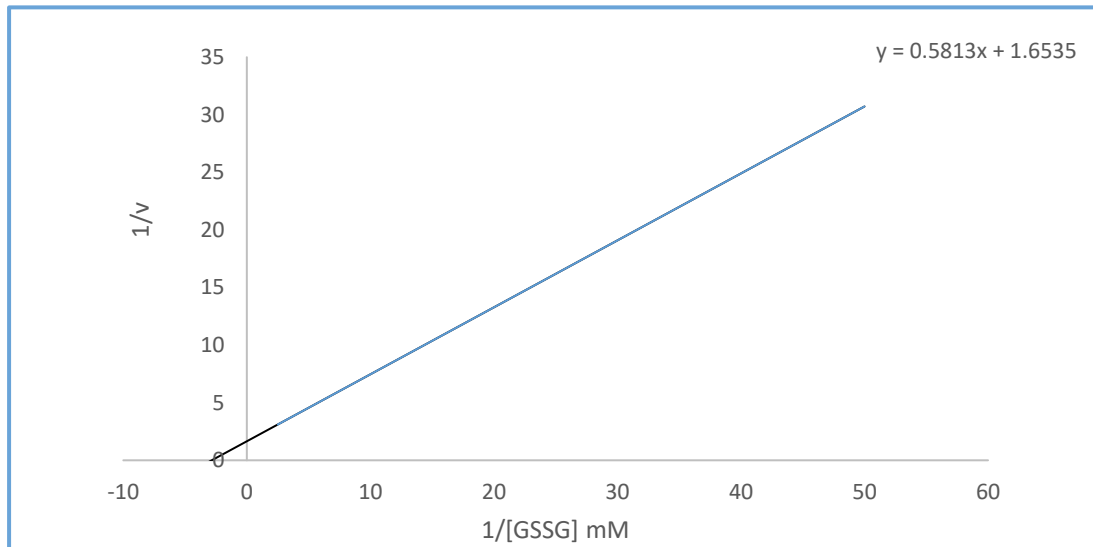
4.3.5. NADPH ve GSSG Substratları İçin K_M Sabiti ve V_{max} Değerinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Koyun dalak GR enziminin substratları olan GSSG ve NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değerini belirlemek amacıyla bölüm 2.3.2’de anlatıldığı gibi öncelikle NADPH’ın 5 farklı

konsantrasyonunda sabit GSSG konsantrasyonu için aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla $1/[NADPH]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değeri bu grafikten faydalanılarak belirlendi. Aynı şekilde GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonunda sabit NADPH konsantrasyonu için aktivite ölçümleri de yapıp oluşturulan $1/[GSSG]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği ile GSSG için K_M sabiti ve V_{max} değeri hesaplandı (Tablo 4.9, Şekil 4.9 ve 4.10). Hesaplamalar neticesinde NADPH için K_M sabiti 0,0061 mM ve V_{max} değeri 0,259 EÜ/mL, GSSG için ise, K_M sabiti 0,351 mM ve V_{max} değeri 0,604 EÜ/mL olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre; GR enzimin NADPH substratına olan afinitesinin GSSG substratına olan afinitesinden daha fazla olduğu tespit edildi.

Tablo 4.9. Koyun dalak dokusu GR enzimi için K_M sabiti ve V_{max} değerinin bulunmasına yönelik elde edilen GSSG denemeleri ve aktivite değerleri

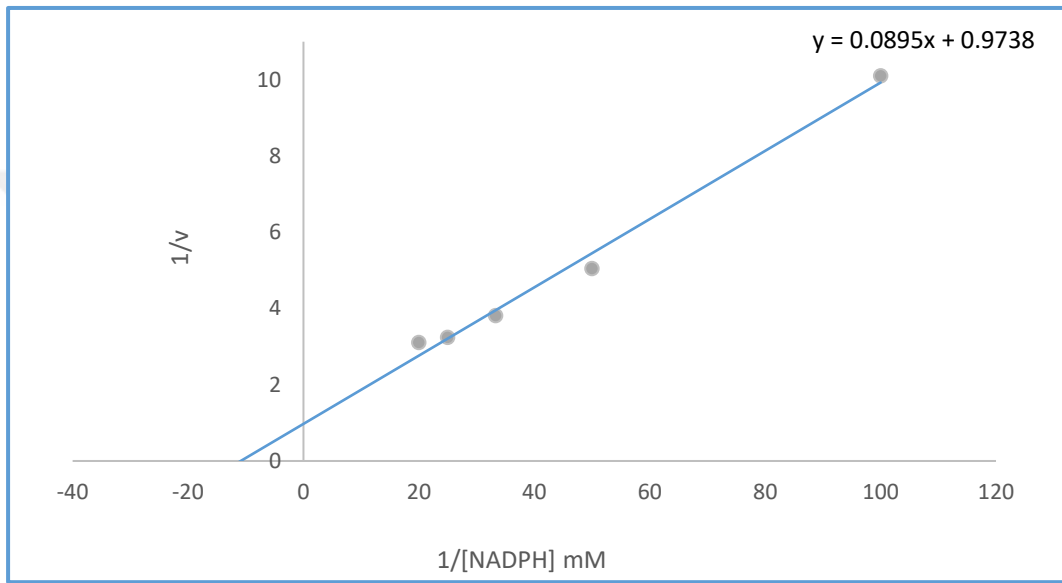
[GSSG] (mM)	0,02	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Aktivite (EÜ/mL)	0,032	0,085	0,133	0,206	0,254	0,292



Şekil 4.10. GSSG için K_M sabiti ve V_{max} değerinin belirlenmesi grafiği

Tablo 4.10. Koyun dalak dokusu GR enzimi için K_M sabiti ve V_{max} değerinin bulunmasına yönelik NADPH derişim tablosu

[NADPH] (mM)	0,002	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Aktivite (EÜ/mL)	0,066	0,099	0,198	0,262	0,308	0,321

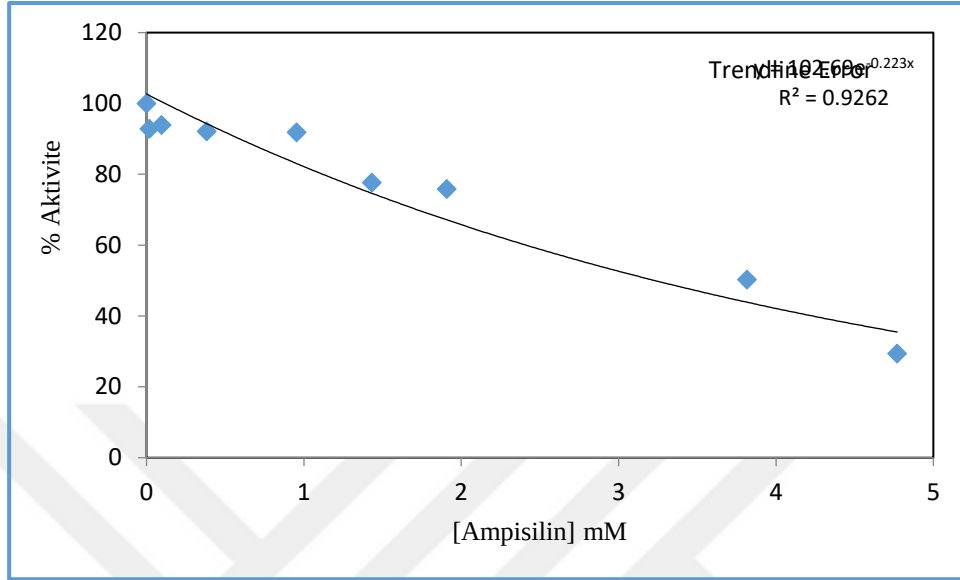


Şekil 4.11. NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değerinin belirlenmesi grafiğı

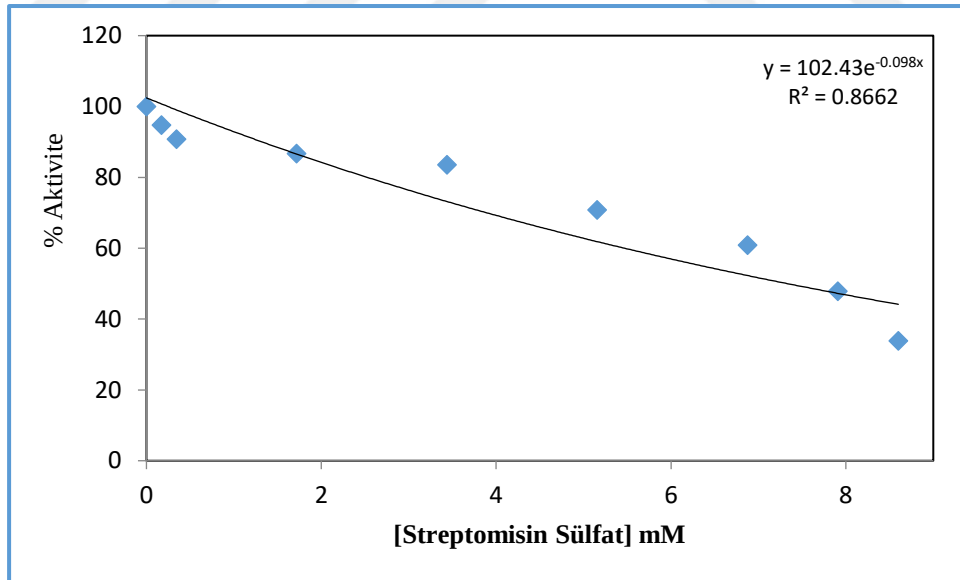
4.4. İnhibitör Etkisi Gösteren İlaçlar İçin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Farklı çözücülerde çözmek suretiyle stok çözeltileri hazırlanan ilaçların farklı konsantrasyonları, küvet ortamına eklenerek koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Öncelikle aktivite ölçümleri yapılarak Bölüm 3.2.2.2’de gösterilen formülden her bir inhibitör konsantrasyonu için enzim ünitesi hesaplandı. Enzim ünitelerinden yararlanarak yüzde aktiviter hesaplandı ve % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bunun üzerine; ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin, cefoperazone sodyum ve prekort-liyo’nun inhibisyon etkisi gösterdiği, amoksisilin, tylosin, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, linkomisin, novamizol, ketojezik ve klindamisin ilaçların ise enzim üzerinde önemli bir aktivasyon ya da inhibisyon

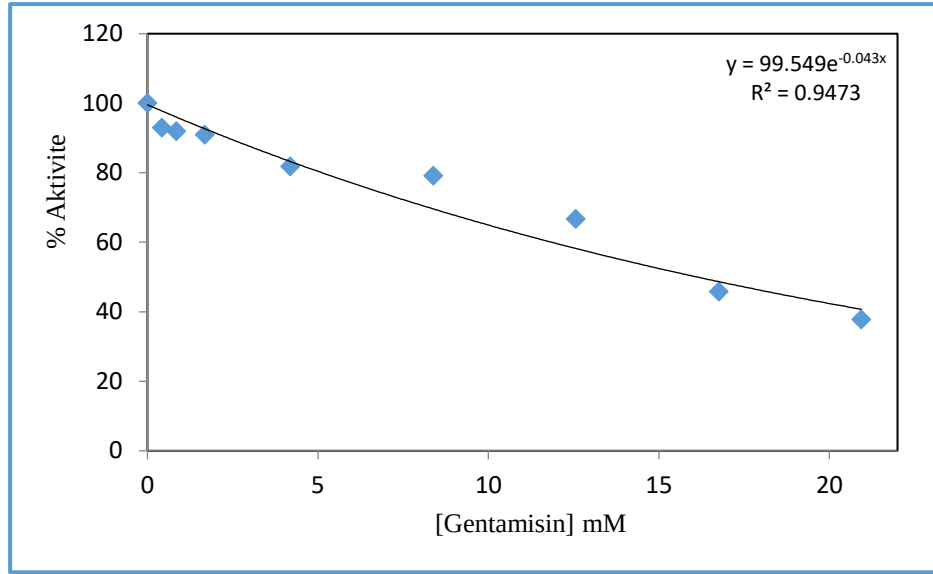
göstermedikleri belirlendi (Şekil 4.12-4.24). Ayrıca IC_{50} değerleri eğim denkleminde hesaplandı (Tablo 4.11).



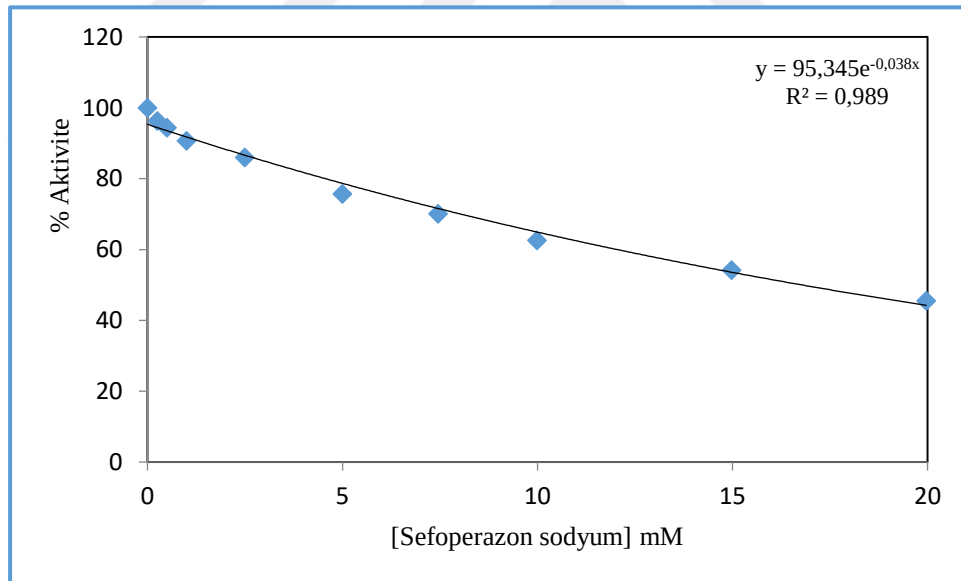
Şekil 4.12. Ampisilin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



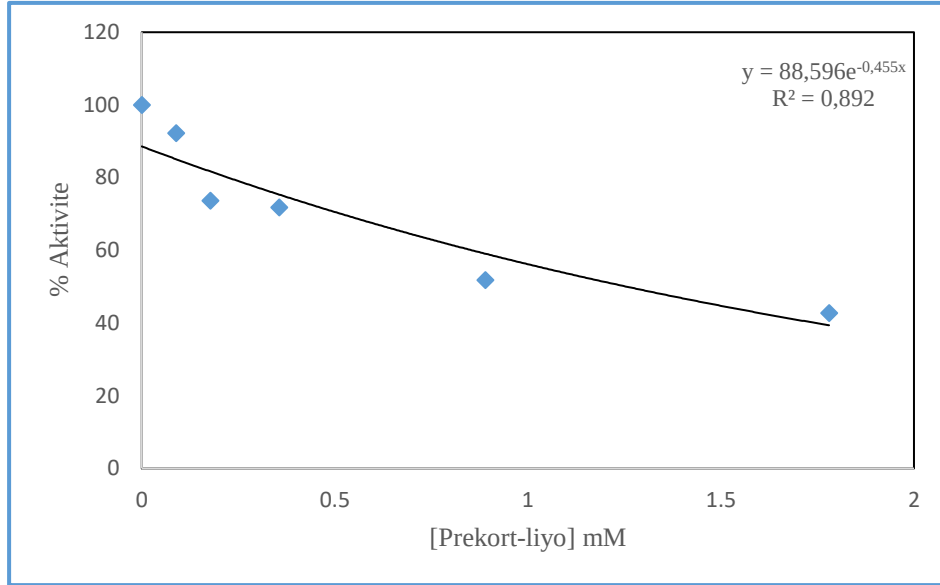
Şekil 4.13. Streptomisin sülfat'ın koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



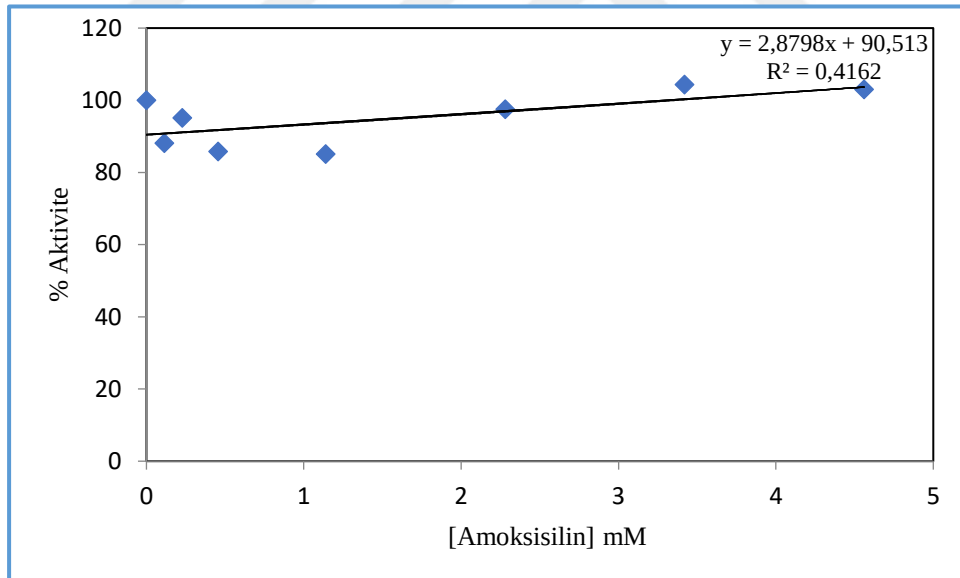
Şekil 4.14. Gentamisin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



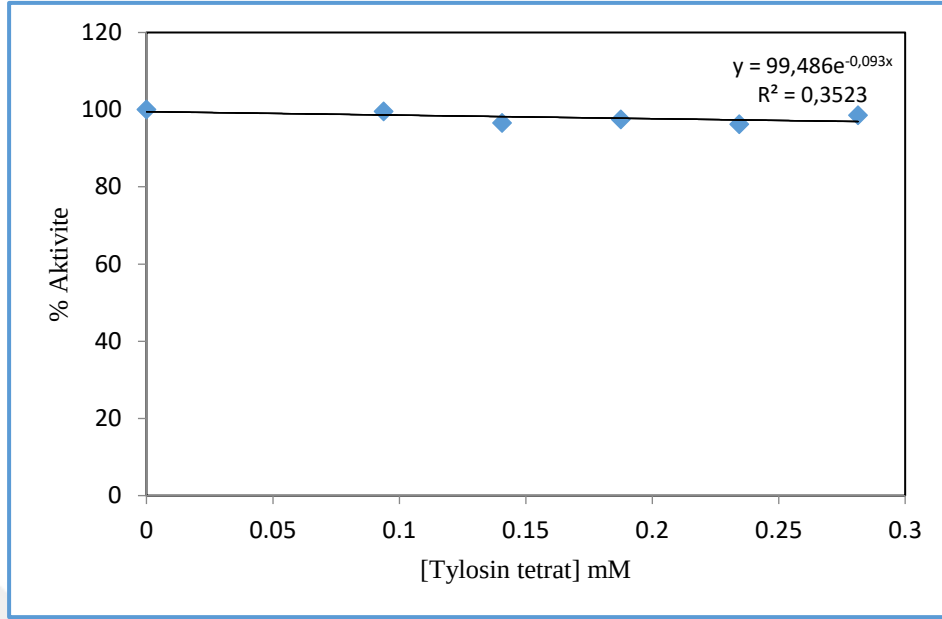
Şekil 4.15. Sefoperazon sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



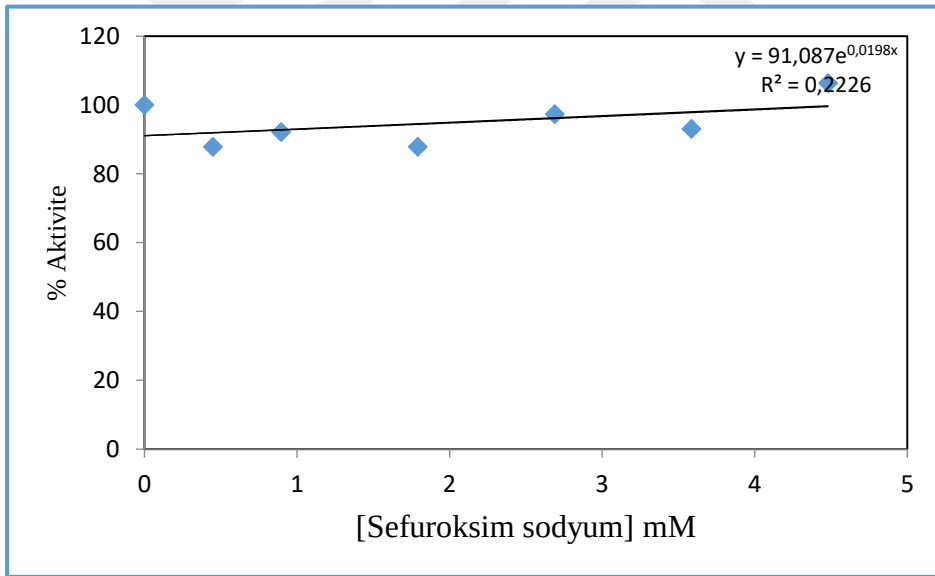
Şekil 4.16. Prekort-liyo'nun koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



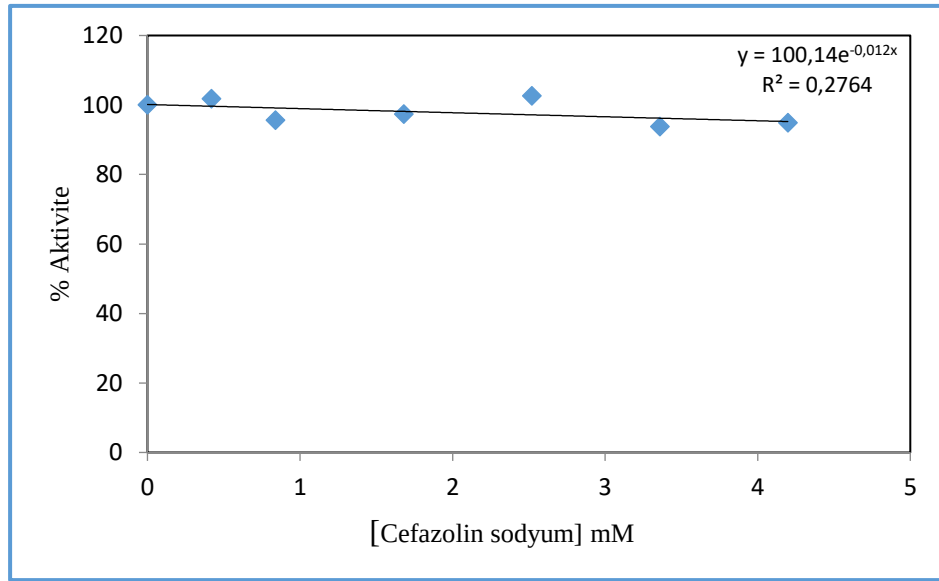
Şekil 4.17. Amoksisilin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



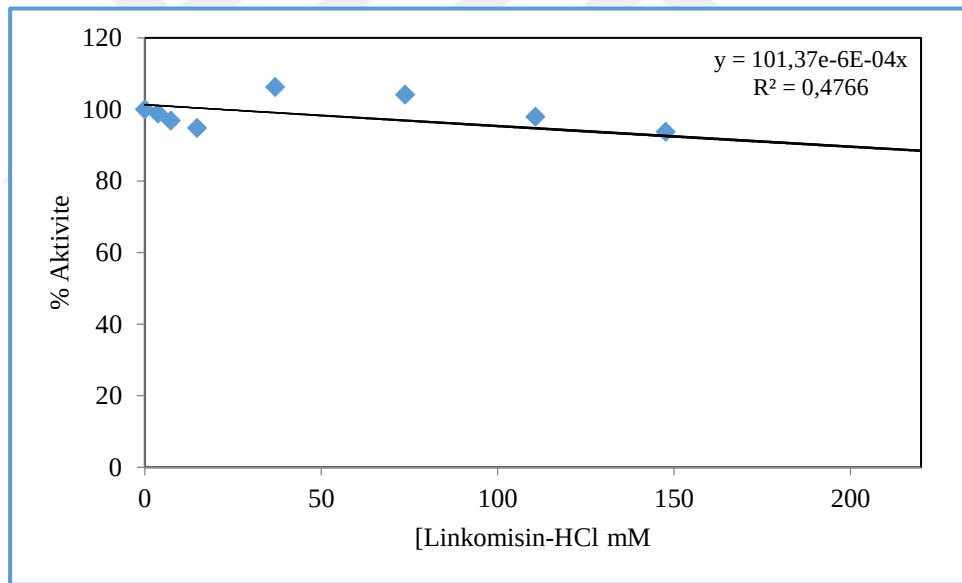
Şekil 4.18. Tylosin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



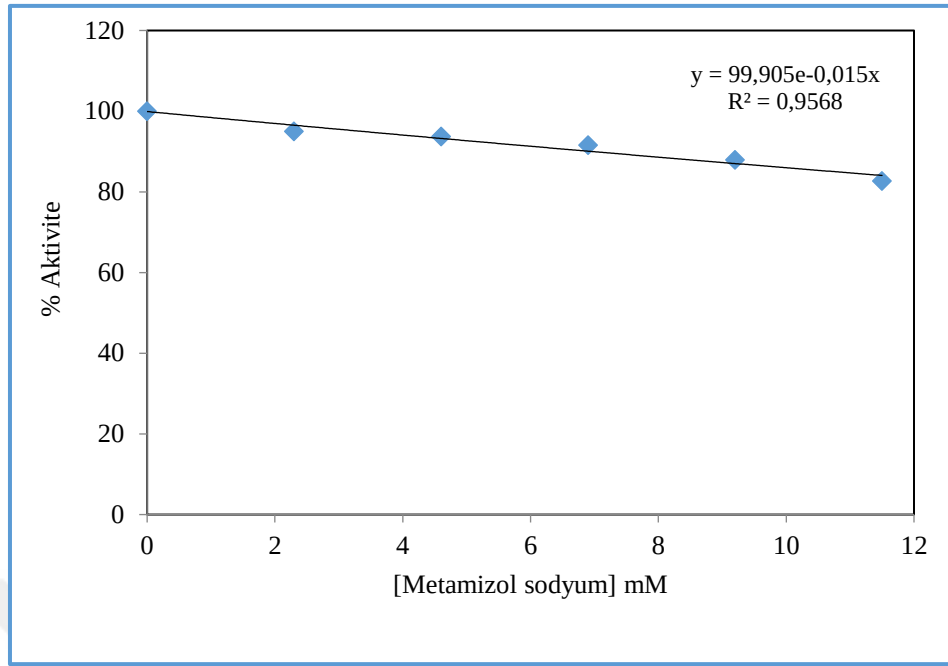
Şekil 4.19. Sefuroksim sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



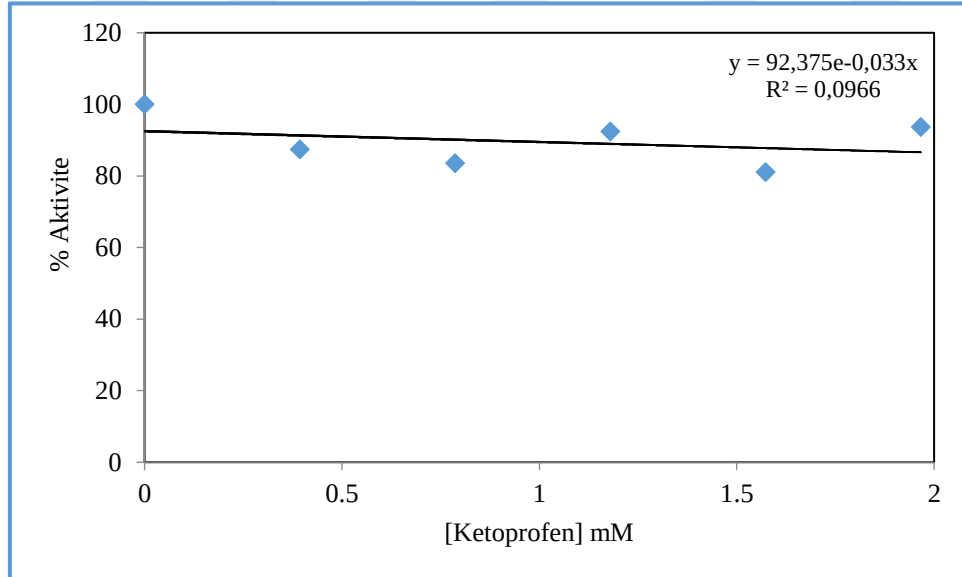
Şekil 4.20. Cefazolin sodyum'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



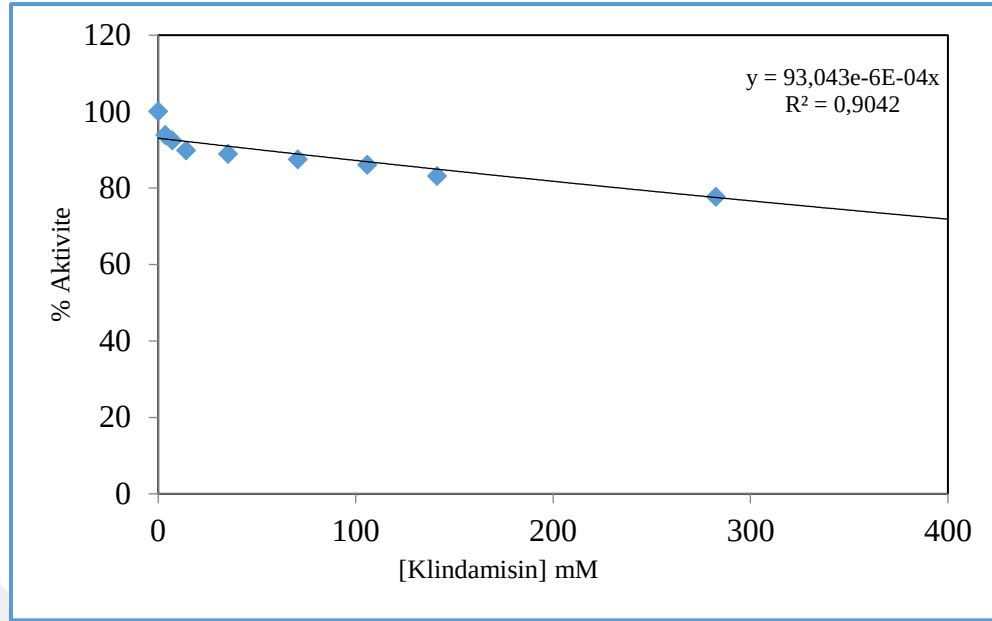
Şekil 4.21. Linkomisin-HCl'nin koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.22. Metamizol'un koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.23. Ketojezik'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi



Şekil 4.24. Klindamisin'in koyun dalak GR enzimi üzerine etkisi

Tablo.4.11. Bazı ilaçlar için bulunan IC50 değerler

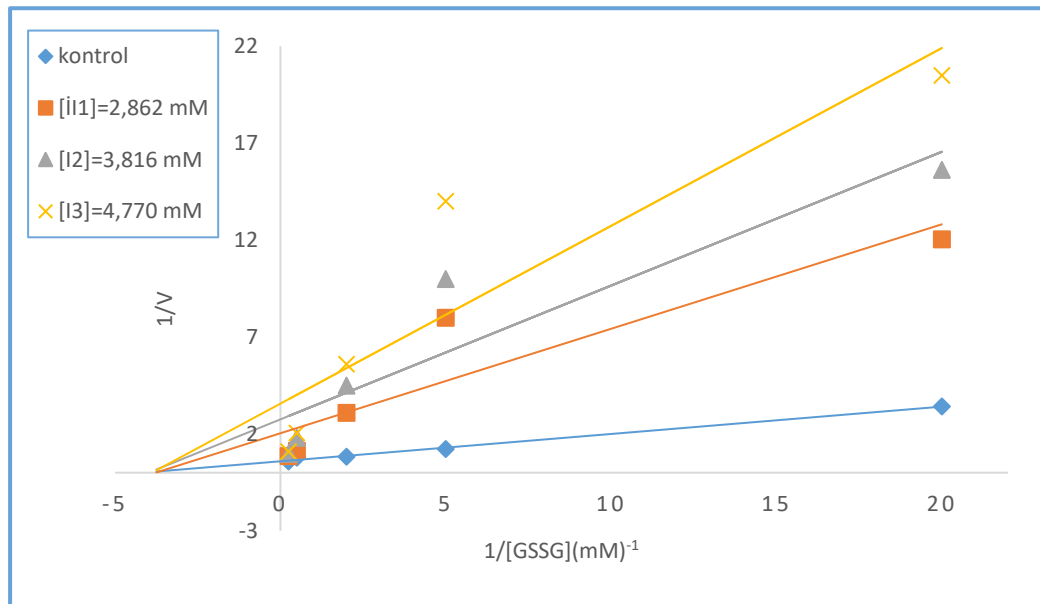
İlaç	IC ₅₀ (mM)
Prekort-liyo	1,27
Ampisilin	3,22
Streptomisin sülfat	7,95
Cefoperazon sodyum	16,97
Gentamisin	17,20

4.5. Koyun dalak GR Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Sabitlerinin Belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışmaların Bulguları

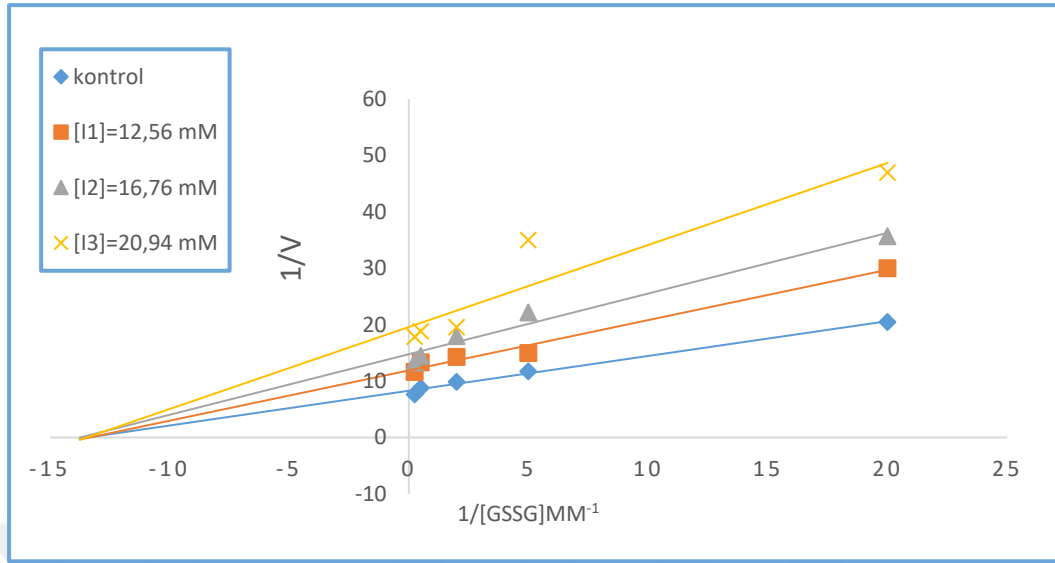
Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enzim aktivitesi üzerine inhibitör etki gösteren ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin, Cefoperazon sodyum ve prekort-liyo ilaçlarının K_i sabitlerinin bulunması için öncelikle inhibitörsüz ortamda V - $[S]$ değerleri bulundu. Bunun için GR enziminin 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivitelere bakıldı. Daha sonra enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde 2 sabit ilaç konsantrasyonu olmak üzere toplam 3 farklı sabit konsantrasyonda substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler ölçüldü. Her bir aktivite değerleri enzim ünitesine çevrilerek $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplandı. Bu sonuçlarla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.25-4.29). X ekseninde kesişen doğruları gösteren grafik yarışmasız inhibisyonu, y ekseninde kesişen doğruları gösteren grafik ise yarışmalı inhibisyonu belirtmektedir. Grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminde aşağıdaki formüllerden yararlanarak K_i sabitleri hesaplandı ve inhibisyon türleri tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4.12’de gösterildi.

Yarışmalı inhibisyonunda: $K_M^I = K_M (1 + [I] / K_i)$

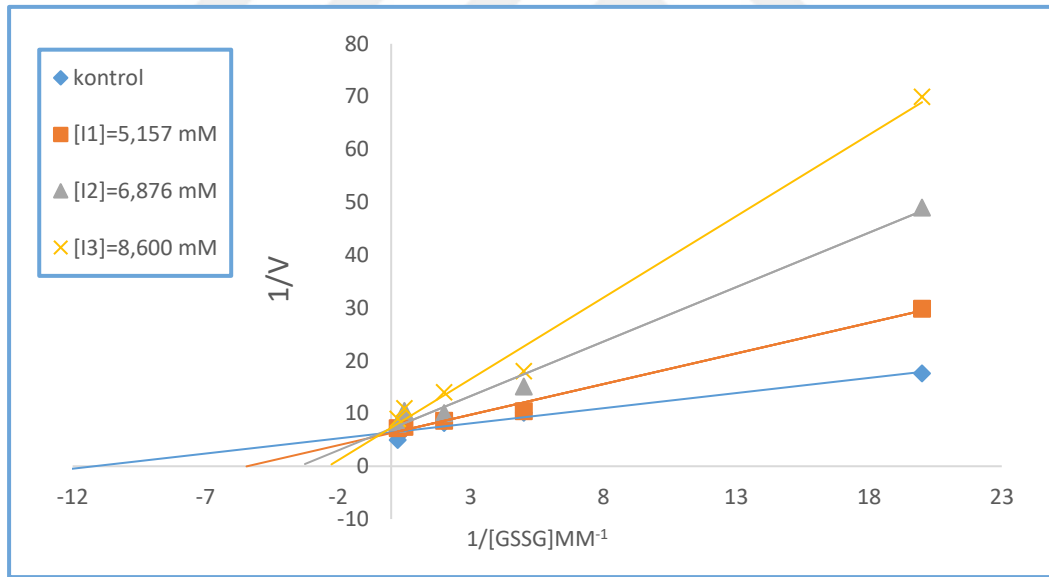
Yarışmasız inhibisyonunda: $V_{max}^I = V_{max} / (1 + [I] / K_i)$



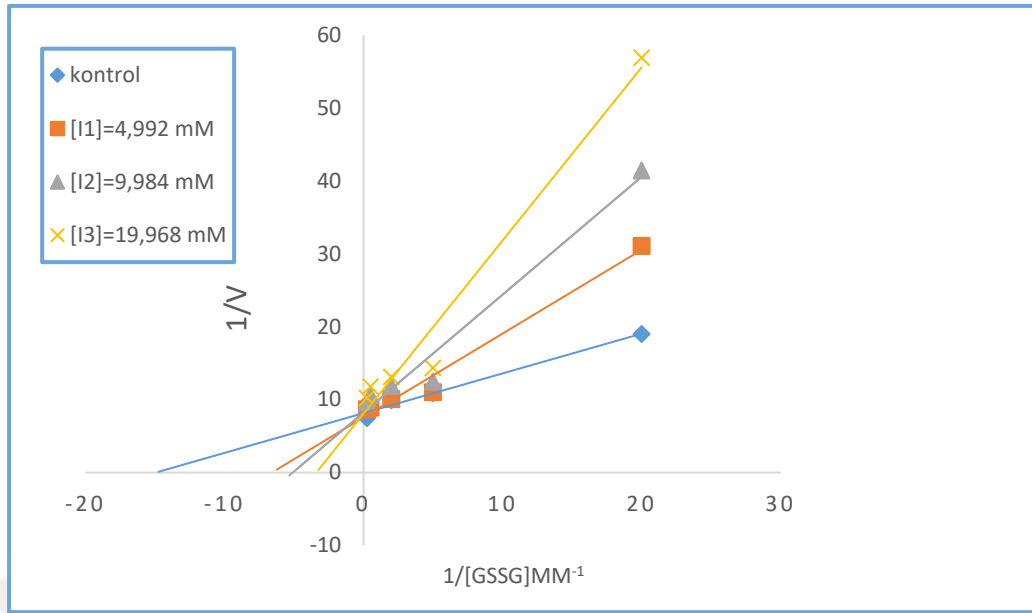
Şekil 4.25. Koyun dalak GR enzimi üzerine ampisilin ilacının etkisi



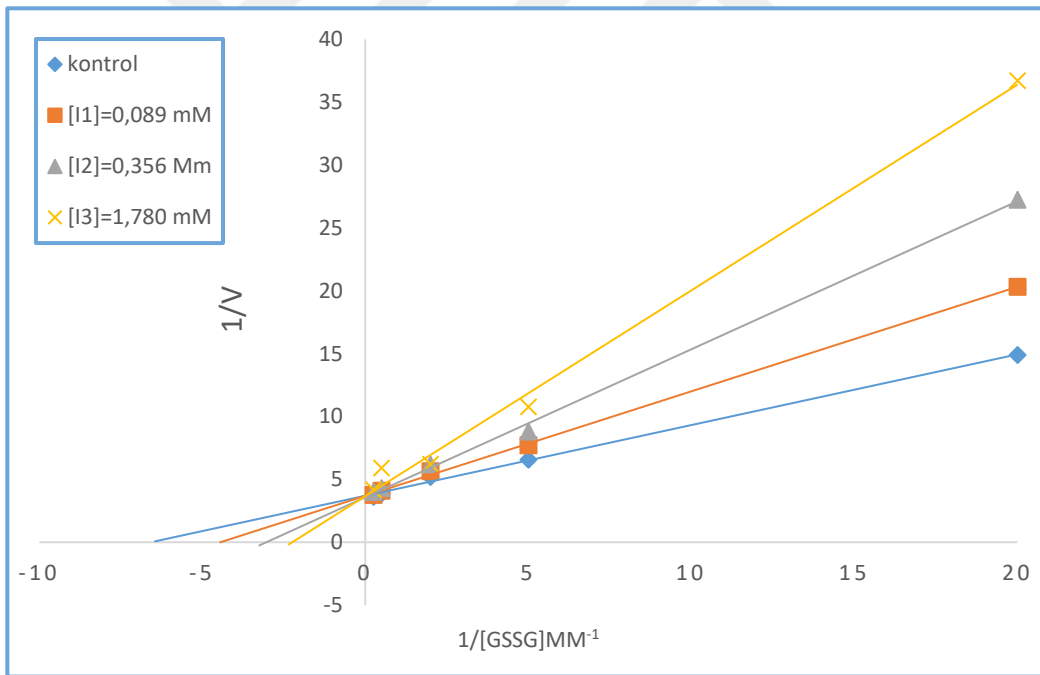
Şekil 4.26. Koyun dalak GR enzimi üzerine gentamisin ilacının etkisi



Şekil 4.27. Koyun dalak GR enzimi üzerine streptomisin sülfat ilacının etkisi



Şekil 4.28. Koyun dalak GR enzimi üzerine sefoperazon sodyum ilacının etkisi



Şekil 4.29. Koyun dalak GR enzimi üzerine precort-liyo ilacının etkisi

Tablo.4.12. GR enzimi için bulunan ki sabitleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	[I] (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon türü
Ampisilin	[I1] = 2,862 mM, [I2] = 3,816 mM, [I3] = 4,770 mM.	[I1] = 1,172 mM, [I2] = 1,048 mM, [I3] = 0,951 mM.	1,057 ± 0,11	Yarışmasız
Gentamisin	[I1] = 12,56 mM, [I2] = 16,76 mM, [I3] = 20,94 mM.	[I1] = 28,55 mM, [I2] = 21,50 mM, [I3] = 12,26 mM	20,770 ± 8,17	Yarışmasız
Streptomisin sülfat	[I1] = 5,157 mM, [I2] = 6,876 mM, [I3] = 8,600 mM.	[I1] = 4,83 mM, [I2] = 3,04 mM, [I3] = 2,29mM.	3,386 ± 1,31	Yarışmalı
Sefoperazon sodyum	[I1] = 4,992 mM, [I2] = 9,984 mM, [I3] = 19,968 mM.	[I1] = 3,88 mM, [I2] = 5,07 mM, [I3] = 5,78 mM	4,910 ± 0,96	Yarışmalı
Precort-liyo	[I1] = 0,089 mM, [I2] = 0,356 mM, [I3] = 1,780 mM	[I1] = 0,19 mM, [I2] = 0,30 mM, [I3] = 0,91 mM	0,466 ± 0,39	Yarışmalı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Oksidoredüktazlar (NADP⁺ oksidoredüktaz) enzim grubuna ait olan GR enzimi (E.C. 1.8.1.7; GR), indirgenmiş piridin nükleotidleri ile disülfür substratları arasında elektron transferini katalizlemektedir.



Katalizlediği reaksiyonda GR enzimi okside glutatyonu (GSSG), hücrede %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunan redükte glutatyon (GSH) molekülüne dönüştürerek hücre içindeki biyokimyasal olayların dengeli ve düzenli yürütülmesinde büyük rol oynayan glutatyon metabolizması için oldukça önemli bir enzimdir. Bu metabolizmada GSH/GSSG oranının belirli bir seviyede kalması hücre için hayati önem arzeder. Örneğin eritrositlerde bu oran 500/1'dir ve bu değerde düşüş olması hemolize yol açmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2010). Ayrıca Erat (2002)'ın doktora tez çalışmasında bildirdiğine göre GR inhibisyonu veya eksikliği bu oranın düşmesine neden olduğu için bazı anemi hastalıklarının enzim ile ilgili olduğu vurgulanmaktadır (Özer A 1985).

Başka bir çalışmada; antioksidan sistemlerin ilaçlar, beslenme ve oksidatif stres gibi nedenlerden dolayı bozulmasına bağlı olarak hücre yaşlanmasında eritrosit hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu hücrelerin yaşlanmasını lipid peroksidasyon indikatörü olan malondialdehid (MDA) artışı belirlemiştir (Stocks J et al. 1972). GSH/GSSG dengesinin bozulmasına neden olan bu durum glutatyon bağlantılı enzimlerin (Glutatyon redüktaz, Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz, Glutatyon Peroksidaz, Glutatyon-S transferaz, γ -Glutamil sistein sentataz) azalmasıyla kendini göstermiştir (Mieyal JJ et al. 1991).

GR'nin ürünü olan GSH molekülünün en önemli görevi oksidatif strese karşı hücreyi korumaktır. Çeşitli sebeplerden dolayı hücrelerde oksidatif stresin meydana getiren reaktif oksijen türleri (ROS); genel olarak oksijenin (O_2) uyarılması sonucunda süperoksit

($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge 2011). Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin membran lipidleri, nükleik asitleri ve proteinleri oksidatif yıkıma uğratarak, hücre bileşenlerinin yapısını bozdukları bilinmektedir (Davies 1987, Wise ve Naylor 1987). Yapılan çalışmalarda oksidatif stresten dolayı bozulan hücre bileşenlerinin GR'nin ürünü olan GSH molekülünün yenilenmesiyle stres toleransının sağlandığı gösterilmiştir (Hasanuzzaman vd. 2012).

Ayrıca GR ve GSH eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stress Alzheimer, ateroskleroz, felç, epilepsi, Parkinson, orak hücre anemisi, HIV, kanser, karaciğer ve akciğer rahatsızlıkları, AIDS ve diyabet gibi birçok hastalıklara da yol açmaktadır (Townsend et al. 2003, Wu et al. 2004).

Bilinen bu önemlerinden dolayı, GR enzimi için tarafımızdan yapılan literatür araştırmalarında enzimin birçok canlı dokusundan saflaştırıldığı, kinetik ve karakterizasyon özelliklerinin araştırıldığı ve enzim aktivitesi üzerine birçok ilaç ve kimyasal maddenin etkilerinin incelendiği tespit edildi. Ancak koyun dalak dokusu GR enzimi hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Dolayısıyla bu tez çalışmasında koyun dalak dokusundan GR enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim üzerine etkileri araştırıldı.

Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümü Carlberg ve Mannervik'in (1985) tanımladığı yöntemle 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemde okside glutasyon (GSSG)'un bulunduğu ortamda NADPH'nin yükseltgenmesine bağlı olarak azalan NADPH miktarı ile aktivite belirlendi.

GR enziminin aktivite ölçümü NADPH'nin azalmasının yanı sıra GSH'nin oluşması esasına dayanarak da yapılmaktadır. GSH oluşumuna dayanan yöntemlerde 5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrede belirlenir (Carlberg

and Mannervik 1985, Toribio et al. 1996). Ancak labaratuvar şartlarımızın NADPH'ın yükseltgenmesine bağlı olarak azalan NADPH miktarı ile aktivite belirlenmesine daha müsait olduğundan dolayı bu yöntem kullanıldı.

Enzimin aktivitesi ölçülürken uygun pH'daki uygun tampon ile beraber enzmin substratları olan GSSG ve NADPH kullanılmaktadır. Bazen GSSG dışında CoASSG, CySSCy ve GSSO₃H molekülleride kullanılabilmektedir. Küvet ortamına son eklenen madde genelde enzim örneğidir. Bazen ölçüm ortamına EDTA ve FAD'de eklenmektedir. Aktivite birimi olarak 1µmol NADPH'ın yükseltgenmesine neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Le Trang et al. 1983; McCallum and Barrett 1995; Lamotte et al. 2000)

Çalışmamızın sonraki aşamasında koyun dalak dokusundan GR enziminin saflaştırılması işlemine geçilmiştir. Bunun için ilk önce amonyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle kısmi olarak saflaştırma yapılmıştır. Enzimin afinite kolonuna yüklenmesinden önce amonyum sülfat yönteminin uygulanması proteinlerin daha derişik hale dönüşmesi, birçok safsızlığın giderilmesi dolayısıyla GR konsantrasyonunun yüksek olması bakımından önemlidir (Ulus ve Tandoğan 2007). Amonyum sülfat çöktürmesinde hazırlanan homojenat ile denemeler yapılarak GR enziminin %20-70 arası çöktüğü tespit edilmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında insan ve sığır eritrositlerinden saflaştırılan GR enzimi için amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-70 olarak (Erat 2002), koyun beyinde saflaştırılan GR enziminin amonyum sülfat aralığı %35-55 olarak (Acan ve Tezcan 1989) ve koyun karaciğerinden saflaştırılan GR enziminin ise amonyum sülfat aralığı %0-60 olarak bulunmuştur (Ulus vd. 2005). Ayrıca soya tohumundan saflaştırılan GR enziminin %40-60 aralığında çöktüğü belirlenmiştir (Bilir 2017). Çalışmamızda bulunan amonyum sülfat çökme aralığı literatürle uygunluk içinde olduğu tespit edildi. GR enzimini amonyum sülfat çöktürmesiyle daha konsantre hale getirdikten sonra ortamdaki iyonların uzaklaştırılması için yaklaşık 2 saat boyunca diyaliz işlemi gerçekleştirildi (Acan ve Tezcan 1989, Erat 2002, Ulus vd. 2005).

Sonraki aşamada kısmi olarak saflaştırılan GR enzimini tam olarak saflaştırabilmek için NADPH bağımlı enzimleri bağlayabilme özelliğine sahip olduğu bilinen ve bu enzimlerin saflaştırılmasında en sık kullanılan yöntem olan 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite

kromatografisi uygulandı. Bu yöntem ile çok hızlı ve yüksek verimde saflaştırma yapılmaktadır (Tandoğan ve Ulusu 2008). Ayrıca bu yöntemde daha az kimyasal kullanılması ve kullanılan materyallerin tekrar kullanılabilmesi, tek seferde saflaştırma yapılması ve yüksek hacimde madde tatbik edilmesi açısından avantaj söz konusudur.

Afinite jeline tutulan proteinler elüsyon çözeltisiyle kolondan elüe edildikten sonra 340 nm’de spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri takip edildi. Saflaştırma işlemleri yapılırken enzim aktivitesinde kayıp olmaması için sıcaklık yaklaşık +4°C’ de kontrol altında tutularak işlemler gerçekleştirildi. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarına göre Bradford yöntemi kullanılarak proteinlerin kantitatif tayini yapıldı (Şekil 4.1). Neticede GR enzimi yaklaşık olarak %40,61 verimle ve 1564,8 kat saflaştırıldı. Yapılan literatür çalışmaları ile elde edilen değerlerin uyumlu olduğu gözlemlendi.

Literatür çalışmaları incelendiğinde kullanılan 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile sığır karaciğerinden GR enzimi %38,4 verimle 5456 kat saflaştırılmıştır (Ulus ve Tandoğan 2007). Ayrıca Gökkuşluğu alabalık karaciğerinden GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile 1654 kat %41 verimle saflaştırılmıştır (Tekman vd. 2008). Başka bir çalışmada melatonin hormonunun insan eritrositlerinden saflaştırılan GR enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada enzim % 24 verimle, 5.823 kat saflaştırılmıştır (Erat ve Çiftci 2006). Demir vd. (2006) tavuk karaciğerinden elde edilen GR enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisini araştırdıkları çalışmalarında enzimi %35 verim ile 1636 kat saflaştırmışlardır. Temel vd. (2017) GR enzimini bıldırcın eritrositlerinden %46.2 verimle, 1028 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca başka bir inhibisyon çalışmasında GR enzimi koyun karaciğerinden %18,76 verimle 1850 kat saflaştırılmıştır (Erat ve Çiftci 2003). Hindi karaciğerinde ise %10,74 verimle ve 2476 kat GR enziminin saflaştırılması gerçekleşmiştir (Taşer 2010). Güller (2015)’in yaptığı çalışmada GR enzimi fare böbrek dokusundan %27,136 verimle 43,74 kat, fare karaciğer dokusundan ise %8,659 verimle 1725,73 kat saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminin ardından enzimin saflık derecesini kontrol etmek ve muhtemel alt biriminin molekül kütlesini belirlemek amacıyla Laemmli (1970) tarafından önerilen SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi uygulandı. Jel fotoğrafı ile tek bant elde edilerek enzimin saf olduğu belirlendi (Şekil 4.3). Fotoğraftan yararlanılarak standart proteinlerin

ve enzimin R_f değeri ölçüldü ve log M_K-R_f grafiği çizildi (Şekil 4.4). Grafik denkleminde yararlanılarak koyun dalak GR enziminin alt birim molekül kütlesi 91 kDa olarak hesaplandı.

Literatür kaynakları araştırıldığında saflaştırılan GR enziminin muhtemel alt birim molekül kütlesinin belirlenmesi ile ilgili bazı çalışmaların olduğu görülmektedir. Buzağı karaciğerinden saflaştırılan GR enzimin PAGE’de yürütülmesi sonucu büyük bir band ve onu takip eden küçük bir band olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin mol kütlesinin 100 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1981). Gökkuşığı alabalık karaciğerinden GR enzimi 2', 5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve enzimin alt birim molekül kütlesi 52 kDa olarak belirlenmiştir (Tekman vd. 2008). Sıçan akciğer ve kalp dokusundan saflaştırılan GR enziminin molekül kütlesi sırasıyla 62,73 kDa ve 61,83 kDa olarak hesaplanmıştır (Adem 2011). Hindi karaciğerinden saflaştırılan GR enziminin alt birim molekül kütlesi ise 65 kDa olarak tespit edilmiştir (Taşer 2010). Başka bir çalışmada Temel vd. (2017) Bildircin eritrositlerinden saflaştırdıkları GR enziminin molekül kütlesini 78,8 kDa olarak belirlemişlerdir.

Güller (2015)’in fare böbrek ve karaciğer GR enzimi üzerine SDS-PAGE ile yaptığı çalışmada enzimin alt birim molekül kütlesini 120 kDa ile 85 kDa arasında (yaklaşık 88 kDa) olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca Ulusu vd. (2003) koyun karaciğerinden saflaştırıp karakterizasyonunu yaptıkları GR enziminin molekül kütlesini yaklaşık 90 kDa civarında olduğunu belirlemişlerdir. Koyun karaciğer GR enzimi üzerine yapılan başka bir çalışmada Erat ve Çiftçi (2003) enzimin muhtemel alt birimini 90 kDa civarında olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Harding (1973) GR enziminin molekül kütlesinin 70-150 kDa arasında olacağını rapor etmiştir. Douglas (1987) tarafından da bazı kaynaklardan saflaştırılan enzimin molekül kütlesinin 70-140 kDa arasında değişeceğini belirtmiştir. Yaptığımız çalışma neticesinde koyun dalak GR enziminin muhtemel alt birim molekül kütlesinin yaklaşık olarak 91 kDa olduğu tespit edildi. Yukarıdaki literatür kaynaklarından özellikle koyun karaciğeri üzerine yapılan çalışmalarla bulduğumuz sonucun benzer olduğu görülmektedir.

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin karakterizasyon araştırmalarında enzimin optimum pH'sı 0,1 M KH_2PO_4 pH= 8,0 tamponu olarak belirlendi. Değişik türlerden saflaştırılan GR'lerin optimum pH'sının 7-8.5 aralığında olduğu yapılan literatür çalışmalarıyla belirlenmiştir. Tekman vd. (2008) Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan enzimin optimum pH'yı 8,0 olarak bulmuştur. Sığır eritrosit GR enziminin optimum pH değeri ise pH: 7,3 olarak bulmuştur (Erat 2002). Sığır karaciğer GR enziminin optimum pH'sı ise 7 olarak bulmuştur (Ulus ve Tandoğan 2007). Hindi karaciğer Optimum pH fosfat tamponunda 7,5 olarak bulunmuştur (Taşer 2010). Ayrıca soya tohum GR'sinin optimum pH'si 8.5 olarak saptanmıştır (Bilir 2017).

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için önceki çalışmalarda pH=8,0 olarak uygunluğu belirlenen potasyum fosfat tamponunun değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı ve her bir konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıp aktivite değerleri ile KH_2PO_4 konsantrasyonundan oluşan grafik çizildi (Şekil 4.6). Koyun dalak dokusu GR enziminin en uygun iyonik şiddetinin 100 mM KH_2PO_4 pH=8 tamponu olarak tespit edildi. İncelediğimiz literatür çalışmalarında koyun karaciğeri için 50 mM Tris tamponu ve sığır eritrositinden saflaştırılan GR enzimi için optimum iyonik şiddet 435 mM fosfat tamponu olarak bulunmuştur (Erat 2002; Ulus vd, 2005). Hindi karaciğerinde optimum iyonik şiddet 100 mM olarak bulunmuştur (Taşer 2010). Ayrıca Tekman vd. (2008) Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan enzimin optimum iyonik şiddet 50 mM Tris/HCl olarak tespit etmiştir.

GR enziminin stabil pH'yı bulmak için farklı pH'larda 0,1 M KH_2PO_4 ve 0,1 M Tris-HCl tamponları hazırlandı ve 7 gün boyunca ölçülen aktiviteler ve aktivitelerin korunurluğu dikkate alındığında stabil pH'nın 7,0 K-fosfat tamponu olduğu belirlendi (Şekil 4.7). Bu pH'nın literatürle uyumlu olduğu yapılan incelemelerde belli olmuştur. Sığır eritrosit GR enziminin stabil pH'sı 7,3 olarak bulunmuştur. (Erat 2002). Gökkuşığı alabalık karaciğerinden GR enzimi stabil pH'sı 8,0 olarak bulunmuştur (Tekman vd. 2008). Ayrıca hindi karaciğerinden saflaştırılan GR enziminin stabil pH 8,5 olarak tespit edilmiştir (Taşer 2010).

Koyun dalak GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C ile 90°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalar sonucu enzim

aktivitelerinin en yüksek olduğu sıcaklık 40°C olarak tespit edildi (Şekil 4.9). Kaynaklarda GR enziminin optimum aktivite gösterdiği bazı sıcaklık değerleri şöyledir; sığır eritrosit için 55°C, koyun karaciğer için 60°C, sığır karaciğeri için 55°C, alabalık karaciğeri için 10°C olarak tespit edilmiştir (Erat 2002, Ulusu vd. 2005, Ulusu ve Tandoğan 2007, Tekman vd. 2008). Hindi karaciğerinde bulduğumuz sonuçla uyumlu olarak 40°C bulunmuştur (Taşer 2010). Koyun dalağında optimum sıcaklık aralığının 35-50 °C olduğunu tespit edilmiştir (Kavutçu 1995).

Koyun dalak GR enziminin GSSG ve NADPH substratlarına olan ilgisini belirlemek amacı ile substratların K_M sabiti ve V_{max} değerleri tespit edildi. V_{max} değeri, enzim bölgesinin substrat ile tam doygunluğa geçince katalizin ulaşabileceği en yüksek hız olarak tanımlanmaktadır. K_M değeri ise; enzim- substrat ilişkisinin bir ölçütü olup enzimin substrata olan ilgisini yansıtmaktadır. K_M 'si düşük olan bir enzim substratına yüksek ilgi gösterirken K_M 'si yüksek olan enzim ise substratına zayıf bağlandığını yani düşük ilgi gösterdiğini yansıtır.

Koyun dalak GR enziminin substratları olan GSSG ve NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değerini belirlemek amacıyla öncelikle NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonunda sabit GSSG konsantrasyonu için aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla $1/[NADPH]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve NADPH için K_M sabiti ve V_{max} değeri bu grafikten faydalanılarak belirlendi. Aynı şekilde GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonunda sabit NADPH konsantrasyonu için aktivite ölçümleri de yapıp oluşturulan $1/[GSSG]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği ile GSSG için K_M sabiti ve V_{max} değeri hesaplandı. Hesaplamalar neticesinde NADPH için K_M sabiti 0,0061 mM ve V_{max} değeri 0,259 EÜ/mL, GSSG için ise, K_M sabiti 0,351 mM ve V_{max} değeri 0,604 EÜ/mL olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre; GR enzimin NADPH substratına olan afinitesinin GSSG substratına olan afinitesinden daha fazla olduğu tespit edildi.

Ulus ve Tandoğan (2007) GR enzim çalışmalarının sonucunda NADPH için K_M sabiti $0,063 \pm 0,008$ mM, GSSG için K_M sabiti $0,154 \pm 0,015$ mM olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada enzimin NADPH substratına olan ilgisinin GSSG substratına olandan daha fazla olduğu tespit edilip çalışmamızla uyumlu olduğu gözlenmektedir. Ayrıca çalışmamızla uyumlu olan başka bir yayın da sığır eritrosit GR enziminde K_M ve V_{max} değerlerini sırası

ile NADPH için 0,0714 mM ve 0,0931 EÜ/mL, GSSG için 0,149 mM ve 0,676 EÜ/mL, bulunmuştur (Erat 2002). Taşer (2010)'in hindi karaciğer GR enzimi için yaptığı kinetik çalışmalarda NADPH için K_M sabiti 0,170 mM ve V_{max} değeri 0,55 EÜ/mL olarak; GSSG için, K_M sabiti 0,03 mM ve V_{max} değeri 0,228 EÜ/mL olarak tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalığı GR enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında Tekman vd. (2008) NADPH için K_M sabitini ve V_{max} değerini sırasıyla 0,055 mM ve 0,143 EU/mL, GSSG için K_M sabitini ve V_{max} değerini sırasıyla 0,025 mM ve 0,089 EU/mL olarak bulmuştur.

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GR enziminin karakterizasyon işlemleri tamamlanarak enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkisi incelendi. Farklı çözücülerde çözmek suretiyle stok çözeltileri hazırlanan 13 ilactan 5 tanesi GR enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdi. Bu ilaçlar; ampisilin, streptomisin sülfat, gentamisin, Sefoperazone sodyum ve prekort-liyo'dur. 7 tanesinin ise enzim üzerinde önemli bir aktivasyon ya da inhibisyon göstermedikleri belirlendi. Bunlar; amoksisilin, tylosin, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, linkomisin, novamizol, ketojezik ve klindamisin'dir (Şekil 4.12-4.24). İlaçların enzim üzerinde inhibisyon etkileri IC_{50} (mM) değeri olarak belirlenmektedir. Bu değerler eğim denkleminde hesaplanarak gösterildi. Buna göre inhibisyon etkisi gösteren 5 tane ilacın enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı prekort-liyo (1,27 mM), ampisilin (3,22 mM), streptomisin sülfat (7,95 mM), sefoperazon sodyum (16,97 mM) ve gentamisin (17,20 mM)'dir. Çalıştığımız ilaçlar içerisinde düşük konsantrasyonda enzim aktivitesini yarıya düşüren dolayısıyla inhibisyon etkisi en büyük olan ilaç prekort-liyo'dur. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçları ön denemelerle belirlenen en uygun 5 substratta önce inhibitörsüz ortamda daha sonra da 3 farklı sabit ilaç konsantrasyonunda aktivitelerine bakılıp K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Buna göre; K_i sabitleri ampisilin için $1,057 \pm 0,110$, gentamisin için $20,770 \pm 8,169$, streptomisin sülfat için $3,386 \pm 1,305$, sefoperazon sodyum için $4,910 \pm 0,960$ ve prekort-liyo için $0,466 \pm 0,387$ 'dir. İnhibisyon türleri ise; ampisilin ve gentamisin yarışmasız, streptomisin sülfat, sefoperazon sodyum ve prekort-liyo yarışmalı olarak tespit edilmiştir.

Yaptığımız litartür araştırmalarında GR enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin incelendiği tespit edildi. Bu çalışmalardan biri, insan eritrosit GR enzimi üzerine yapılmıştır. Enzim üzerine kullanılan antibiyotikler; sefotaksim sodyum, meropenem,

streptomisin sülfat, penisilin G, teikoplanin, gentamisin sülfat, ampisilin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, ofloksasin, sefepim, metronidazol, sefodizim disodyum ve tiamfenikol'dur. Bu ilaçlardan streptomisin sülfat, gentamisin, ampisilin ve sefazolin sodyum ilaçları çalışmamızdaki ilaçların aynısıdır. Çalışmada tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin, streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve ampisilin ilaçlarının insan eritrosit GR enzimini aktive ettiği belirlenip enzimi aktivitesini inhibe eden antibiyotiklerin ise metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum olduğu tespit edilmiştir. Bu ilaçlardan K_i sabitleri ve IC_{50} değerleri belirlenenler sefotaksim ve sefodizimin'dir. Sefodizim için IC_{50} 1,682 mM ve K_i $0,7446 \pm 0,2216$ Mm, sefotaksim için IC_{50} 12,179 mM ve K_i $6,5123 \pm 4,1139$ mM, olarak belirlenmiştir (Erat 2002, Erat vd. 2005).

İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan GR enzimi üzerine yapılan başka bir inhibisyon çalışmasında enzim üzerine bazı analjezik ve anestetik ilaçlarla yapılmıştır. Bu ilaçlar diklofenak sodyum, ketoprofen, lornoxicam, tenoxicam, etomidate, morphine ve propofol ilaçları olup çalıştığımız ilaçlardan bazıları antiinflamatuvar ilaç gruplarından olduğundan bu çalışmaya benzerlik göstermektedir. Çalışma neticesinde propofol yarışmasız inhibisyon gösterirken diğerlerinin yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (Şentürk vd. 2009).

Adem (2011)'de yaptığı çalışmasında sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin furosemid, gentamisin, seftazidim, digoksin, dopamin, furosemidin, adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl, levofloksasin, sefazolin ve kotin ilaçlarını GR enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemiştir. Bu ilaçlardan sefazolin, seftazidim, sefuroksim furosemid, gentamisin, levofloksasin, metilprednisol, teikoplanin sıçan akciğer dokusu GR enzimini inhibe etmiştir. Digoksin, dopamin, furosemidin ise sıçan kalp dokusu GR enzimini inhibe etmiştir. Ayrıca adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının ise her iki dokudan da saflaştırılan GR enzimi üzerine inhibisyonu gözlenmemiştir.

Ayrıca GSH molekülü üzerinde yapılan çalışmaların çoğunluğu, eksojen toksinlere direk maruz kaldığından dolayı karaciğer dokusu olmuştur. Karaciğer hücreleri olan hepatositlerde GR enzimini dolayısıyla GSH biyosentezini inhibe etmek için butiyonin,

sulfoksimin, asetaminofen ve bromobenzen gibi çeşitli kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bunlara maruz kalan hepatositlerde GSH tükenmekte ve karaciğer hasarları ortaya çıkmaktadır (Atamer vd. 2000). Karaciğer GR enzimi üzerinde yapılan farklı bir çalışmada tavuk karaciğeri kullanılmıştır. Enzim üzerine ofloksasin, levofloksasin, sefsazolin, sefepim ilaçlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Ofloksasin, levofloksasin ve sefazolin'in yarışmasız, sefepim'in ise yarı yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Demir vd. 2006). Koyun karaciğer GR enzimi üzerine ise gentamisin sülfat, tiyamfenikol, oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin ilaçlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Oflaksasin, levoflaksasin, sefepim ve sefazolin antibiyotiklerinin enzimi yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Erat ve Çiftci 2003).

Sonuç olarak;

GR enzimi, pentoz fosfat yolu ve malik enzim basamağında elde edilen NADPH varlığında GSSG'nin indirgenmesini katalizleyerek GSH molekülünün oluşmasını sağlar. Böylece antioksidan metabolizması için kilit enzim görevini görür. Bu çalışmada GR enzimi koyun dalak dokusundan %20-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile yaklaşık olarak %40,61 verimle 1564,8 kat saflaştırıldı. Saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı.

Koyun dalak GR enziminin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları;

- Optimum pH : 8,0 (KH_2PO_4 tamponu)
- Optimum iyonik şiddet : 100 mM (KH_2PO_4 tamponu)
- Stabil pH : 7,0 (KH_2PO_4 tamponu)
- Optimum sıcaklık : 40°C
- Alt birim molekül kütlesi : 91 kDa
- NADPH için ; K_M sabiti : 0,0061 Mm, $V_{\max}$ değeri 0,259 EÜ/mL

- GSSG için ise, K_M sabiti : 0,351 Mm, V_{max} değeri 0,604 EÜ/mL

IC_{50} (mM) değerleri;

- Prekort-liyo :1,27 mM, Ampisilin : 3,22 mM, Streptomisin sülfat : 7,95 mM, Sefoperazon sodyum : 16,97 mM , Gentamisin :17,20 Mm

K_i sabitleri;

- Ampisilin : $1,057 \pm 0,110$, Gentamisin : $20,770 \pm 8,169$, Streptomisin sülfat : $3,386 \pm 1,305$, Sefoperazon sodyum : $4,910 \pm 0,960$ ve precort-liyo : $0,466 \pm 0,387$

İnhibisyon türleri;

- Ampisilin ve gentamisin yarışmasız, streptomisin sülfat, sefoperazon sodyum ve precort-liyo yarışmalı olarak tespit edildi.

Sonuç olarak şunlar önerilebilir;

Yapılan literatür taramalarında enzimlerin ilaç ve kimyasal maddelerden etkilendikleri görülmektedir. Kullanılan ilaçların birçoğu metabolizmada önemli görevleri olan düzenleyici enzimler üzerine etki etmektedir. Bu enzimlerin aktivitesinde meydana gelebilecek bir inhibisyon hücre metabolizmasındaki her hangi bir sorunun giderilmesinde yada hücrede patojen bir mikroorganizmanın yol açtığı durumun düzeltilmesinde rol oynayabilir. Bu açıdan bakıldığında hedefi GR enzimi olan tedaviler için bulduğumuz sonuçlar yol gösterici olabilir. Ayrıca yaptığımız çalışmada inhibisyon etkisi gösteren ilaçların konsantrasyonlarını düşürdüğümüz zaman enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin de azaldığı, konsantrasyonu artırdığımızda ise inhibisyon etkinin arttığı görülmektedir. Bundan dolayı GR tedavilerinde ampisilin, gentamisin, streptomisin sülfat, sefoperazon sodyum ve precort-liyo kullanım dozlarının kontrollü olması gerekmektedir. Özellikle yarışmasız inhibisyona yol açan ampisilin ve gentamisin kullanımında daha dikkatli davranılması fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Acan L, Tezcan EF (1989). Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. FEBS Lett 250(1): 72-74

Açan L (1990) Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s.100

Adem Ş (2011) Sıçan kalp ve akciğer dokularından glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz enzimlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu, kotinin ve bazı ilaçların enzimlerin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Iqbal M (2012) Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. Environmental and Experimental Botany, 75: 307-324

Asnis RE (1955) A glutathione reductase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 213(1): 77-85

Atamer Y, Koçyiğit Y, Atamer A, Mete N, Canoruç N (2000) Significance of Lipid Peroxides, glutathione and antiperoxidative enzymes in ethanol and acetaminophen toxicity in the rat 11(1): 54-60

Beydemir Ş, Çiftçi M, Özmen İ, Büyükkuroğlu ME, Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ (2000) Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. Pharmacol.Res. 42: 187-191

Bilir G (2017) Soya itkisinden (glycine max l.) glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin inhibisyon kinetiğinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Fen bilimleri enstitüsü, Tarımsal biyoteknoloji ana bilim dalı, Ondokuz mayıs üniversitesi, sayfa no; 49

Boggaram V, Brobjer KL, 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 MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72(1 2): 248-254

Brodelius P, Larsson PO, Mosbach K (1974) The synthesis of three AMPanalogues: N6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N6-(6- aminoheyl)-adenosine 2',5'-

bisphosphate and N6-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Eür. J. Biochem.* 47: 81-89

Budak H, Gonul N, Ceylan H, Kocpinar EF (2014) Impact of long term Fe³⁺ toxicity on expression of glutathione system in rat liver. *Environmental toxicology and pharmacology* 37: 365–370

Carlberg I, Mannervik B (1981) Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4B. *Anal. Biochem.* 116:531–536

Ciftci M, Kufrevioglu OI, Gundogdu M, Ozmen I (2000) Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research* 41(1): 109-113

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

Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry* 262(20): 9895-9901

Demir H, Erat M, Şakiroğlu H (2006) In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase obtained from chicken liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 30: 513-519

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

Ekinci D, Şentürk M (2013) Assesment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28(1): 11-15

Erat M (2002) İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, s.112-117

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

Erat M, Ciftci M (2006) Effect of Melatonin on Enzyme Activities of Glutathione Reductase from Human Erythrocytes In Vitro and from Rat Erythrocytes In Vivo. *Eur.J. Phlogy* 537: 59–63

Erat M, Sakiroglu H, Ciftci M (2003) Effects of some Antibiotics on Glutathione Reductase from Bovine Erythrocytes. *Vet. Med. Czech* 48(11): 305–312

Erat M, Ciftci M, Gumustekin K, Gul M (2007) Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology* 554: 92–97

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

Garcia AC, Martinez GE, Llobell A, Barcena JA, Lopez BJ (1993) Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int J Biochem* 25: 61–68

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone J M, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28(11): 1091-1101

Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Tuteja N (2013) Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930

Grellier P, Sarlauskas J, Anusevicius Z, Marozienne A, Houee-Levin, C, Schrevel J, Cenas N (2001) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 393: 199-206

Güller P (2015) Gentamisin, amoksisilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin fare karaciğer ve böbrek glutatyon redüktaz enziminin aktivite, protein ve gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Kimya anabilim dalı, Biyokimya Bilim dalı, s. 81

Halliwell B, Gutteridge J (2011) *Free radicals in biology and medicine*. NY: Oxford University Press 968-1999

Hasanuzzaman M, Hossain MA, Silva JAT, Fujita M (2012) Crop stress and its management: Perspectives and strategies. Springer 261-315

Hasanuzzaman M, Hossain MA, Fujita M (2010) Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *Am J Plant Physiol*, 5(6): 295-324

[https://tr.wikipedia.org/wiki/Amoksisilin#/media/Dosya:Amoxicillin-2D-\(erişim tarihi: 23.11.2021\)](https://tr.wikipedia.org/wiki/Amoksisilin#/media/Dosya:Amoxicillin-2D-(erişim_tarihi:23.11.2021))

<https://stringfixer.com/tr/Tylosin> (erişim tarihi: 23.11.2021)

https://tr.wikipedia.org/wiki/Ampisilin#/media/Dosya:Ampicillin_Structural_Formulae_V.1.svg (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://tr.taylrrenee.com/zdorove/113347-streptomicina-sulfat-instrukciya-poprimeneniyu-analogi-i-otzyvy.html> (erişim tarihi: 23.11.2021)

https://tr.tnjchem.com/gentamicin-sulfate-cas-1405-41-0_p310.html (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://www.chemwhat.info.tr/sefuroksim-sodyum-kas-56238-63-2/> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://www.chemwhat.info.tr/sefazolin-usp-safs%C4%B1zl%C4%B1k-e-cas-25953-19-95/> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/substance/cefoperazonesodiumsalt6676562893203> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://www.istockphoto.com/tr/vekt%C3%B6r/lincosamides-structures-of-lincomycin-clindamycin-antibiotic-gm474710692-65024001> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://neurologystatus.ru/tr/klindamicin-opisanie-klindamicin---instrukciya-poprimeneni-yu-forma-vypuska.html> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://tr.wikipedia.org/wiki/Metamizol> (erişim tarihi: 23.11.2021)

<https://tr.wikipedia.org/wiki/Ketoprofen> (erişim tarihi: 23.11.2021)

https://tr.bossgoo.com/member_tianfu-chem/fine-chemical/methylprednisolone-cas-83-43-2-57187180.html (erişim tarihi: 23.11.2021)

Kamerbeek NM, van Zwieten R, Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, Schirmer RH (2007) Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*, 109(8): 3560-3566

Kavutçu M (1995) Koyun dalağında adenozin deamilaz enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin araştırılması. Doktora tezi, Ankara üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya anabilim dalı, s.89

Kayaalp SO (2002) Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı. Kitabın muhtelif bölümleri

Keha E, Küfrevioğlu Öİ (2010) Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, s. 653

Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA (1999) Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 82: 171-184

Laemmli DK (1970) Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature, London*, s. 227-680

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

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2007) Principles of Biochemistry 3th ed Worth Publishers Inc, New York, s. 558-560

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

Levy HR (1979) Glucose-6-phosphate dehydrogenase *Adv.Enzymol*, 48: 97-192

Lopez BJ, Lee CY (1979) Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation. *Eur J Biochem* 98: 487–499

Madamanchi NR, Anderson JV, Alscher RG, Cramer CL, Hess JL (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiol* 100: 138–145

Mannervik B, Jacobsson K, Boggaram V (1976) Purification of glutathione reductase from erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5' - ADP-Sepharose 4-B. *FEBS Letters* 66: 221-224

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

Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220(4596): 472-477

Meldrum NU, Tarr HL (1935) The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. *Biochem. J.* 29: 108-15

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

Mieyal JJ, Starke DW, Gravina A, Dothey C (1991) Thioltransferase in Human Red Blood Cells. Purification and properties. *Biochemistry* 30: 6088-97

Montero S, Arriaga D, Busto F, Soler J (1990) A study of the kinetic mechanism followed by glutathione reductase from mycelium of *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch Biochem Biophys* 278: 52-9

Montgomery R, Conway TW, Spector AA, Chappell D (1996) *Biochemistry A Case-oriented Approach*, Sixth edition. Mosby-Year Book

Müller F, Williams CH(1992) *Chemistry and Biochemisry of Flavoenzymes*; Florida, 1992: 121-211

Özer A (1985) *Pratik hemoloji: Klinik, labaratuvar ve tedavi.*;Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir

Radzicka A, Wolfenden R (1995). A proficient enzyme. *Science* 267(5194): 90

Ray A, Chatterjee S, Mukherjee S, Bhattacharya S (2014) Arsenic trioxide induced indirect and direct inhibition of glutathione reductase leads to apoptosis in rat hepatocytes, *Biometals* 1-13

Reagan SS, Nihal M, Ahmad N (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* 22: 659-661

Serrano A, Rivas J, Losada M (1984) Purification and properties of glutathione reductase from the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain 7119. *J Bacteriol* 158:17–324

Scott E, Duncan IW, Eksrand V (1963) Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *J Biol Chem* 238:3928–3933

Siems WG, Sommerburg O, Grune T (2000) Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* 53(1): 9-17

Smith LL (1987) Cholesterol autoxidation. *Chem. Phys. Lipids* 44: 87-125

Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL (1972) The Susceptibility to Autoxidation of Human Red Cell Lipids in Health and Disease. *Brit J Haematol* 23: 713-24

Şentürk M, Kufrevioglu Öİ, Çiftci M (2009) Effects of Some Analgesic Anaesthetic Drugs on Human Erythrocyte Glutathione Reductase: An In Vitro Study. *J. Enz. Inh. Med.Chem* 24(2): 420–424

Tandoğan EB (2010) Sığır böbrek korteksinden glutatyon redüktazın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü, biyokimya ana bilim dalı, uzmanlığı tezi, s.2

Temel Y, Bozkuş T, Karagözoğlu Y, Çiftci M (2017) Glutatyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildırcın (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enstİtü Dergisi* 7(3): 143-150

Taser P (2010) Glutatyon redüktaz enziminin hindi karaciğerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, s. 14

Taser P ve Ciftci M (2012) Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary ve Animal Science* 36(5): 546-553

Tekman B, Ozdemir H, Senturk M, Ciftci M (2008) Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148: 117–121

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57(3): 145-155

Tunc T, Koc Y, Acik L, Karacan MS, Karacan N (2015) DNA cleavage, antimicrobial studies and a DFT-based QSAR study of new antimony(III) complexes as glutathione reductase inhibitor. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136: 1418-1427

Ullah S, Hasan Z, Dhama K (2015) Toxic Effects of Endosulfan on Behaviour, Protein Contents and Antioxidant Enzyme System in Gills, Brain, Liver and Muscle Tissues of Rohu, *Labeo rohita*. *International Journal of Pharmacology* 12(1), 1-10

Ulusu G, Erat M, Ciftci M, Sakiroglu H, Bakan E (2005) Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29(5): 1109-1117

Ulusu NN, Tandogan B (2007) Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* 303: 45-51

Wise RR, Naylor AW (1987) Chilling-enhanced photooxidation evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant physiology* 83(2): 278-282

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition* 134(3): 489-492

Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (2010) Moleküler Biyoloji. Nobel Yayın Dağıtım 613: 249- 295