

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLERİN GLUTATYON REDÜKTAZ  
(EC 1.8.1.7) ENZİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Eser ÇİFTÇİ  
DANIŞMAN: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

VAN-2019



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLERİN GLUTATYON REDÜKTAZ  
(EC 1.8.1.7) ENZİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Eser ÇİFTÇİ

VAN-2019



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU danışmanlığında, Eser ÇİFTÇİ tarafından sunulan "**Bazı Antioksidan Bileşiklerin Glutasyon Redüktaz (EC 1.8.1.7) Enzimine Etkisinin İncelenmesi**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 11/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zehra BAŞI

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.03/2019 tarih ve 2019/32-1...sayılı kararı ile onaylanmıştır.





## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

  
Eser ÇİFTÇİ





## ÖZET

### BAZI ANTIÖKSİDAN BİLEŞİKLERİN GLUTATYON REDÜKTAZ (EC 1.8.1.7) ENZİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÇİFTÇİ, ESER

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vedat Türkoğlu

Temmuz 2019, 96 sayfa

Glutatyon redüktaz (GR, EC 1.8.1.7) okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizleyen spesifik antioksidan bir enzimdir. GR enzimi, hücrel indirgenmiş GSH seviyesini koruyarak reaktif oksijen türlerine karşı hücre savunmasında merkezi bir rol oynar. Glutatyon redüktaz enzimi (GR, EC 1.8.1.7), insan eritrositinden afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta saflaştırıldı ve GR enziminin saflaştırma katsayısı 6224 kat ve spesifik aktivite 9.586 EU/mg protein olarak hesaplandı. SDS-PAGE ile GR enziminin molekül ağırlığı 53 kDa olarak belirlendi. İnsan eritrositinden saflaştırılan GR aktivitesi üzerine timokinon ve likopen bileşiklerinin etkisi araştırıldı. Her iki bileşik GR aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdi. Timokinon ve likopen için % Aktiviteye karşı İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizildi. Bu grafiğin denkleminde timokinon ve likopen için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 62.12  $\mu$ M ve 35.79  $\mu$ M olarak hesaplandı. Lineveawer-Burk grafiğinden İnhibisyon çeşidi ve  $K_i$  değerleri bulundu. Timokinon ve likopen için inhibisyon çeşidi yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi. Timokinon için  $K_i$  değeri 57.71  $\mu$ M ve likopen için  $K_i$  değeri 46.65  $\mu$ M olarak hesaplandı.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, Glutatyon redüktaz (GR), İnhibisyon, Likopen, Saflaştırma, Timokinon.



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME ANTIOXIDANT COMPOUNDS ON GLUTATHIONE REDUCTASE (EC 1.8.1.7) ENZYME

ÇİFTÇİ, Eser

M. Sc., Thesis Department of Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

July 2019, 96 pages

Glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7) is a specific antioxidant enzyme that catalyzes oxidized glutathione (GSSG) to reduced glutathione (GSH). GR enzyme maintains the cellular reduced GSH level and plays a central role in cell defense against reactive oxygen species. Glutathione reductase enzyme was purified from human erythrocyte by affinity chromatography in one step and the purification rate of GR was 6224 fold and specific activity was calculated as 9.586 EU/mg protein. The molecular weight of GR was determined to be 53 kDa by SDS-PAGE. The effect of thymoquinone and lycopene compounds on the GR activity purified from human erythrocytes was investigated. Both compounds showed inhibitory effect on GR activity. For thymoquinone and lycopene, % Activity vs. Inhibitor concentration was plotted.  $IC_{50}$  values for thymokinone and lycopene were calculated as 62.12  $\mu$ M and 35.79  $\mu$ M, respectively. Inhibition type and  $K_i$  values were determined from Lineweaver-Burk graph. The type of inhibition for thymoquinone and lycopene was found to be non-competitive inhibition.  $K_i$  value was calculated as 57.71  $\mu$ M for thymokinone and 46.65  $\mu$ M for lycopene.

**Keywords:** Antioxidant, Glutathione reductase (GR), Inhibition, Lycopene, Purification, Thymoquinone.



## ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Yüksek lisans çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda bilgi, deneyim ve özverisini esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Zehra BAŞI'ya teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana destek olan başta ailem olmak üzere herkese teşekkür ederim.

2019

Eser ÇİFTÇİ



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pentoz Fosfat Yolu.....	2
1.2. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.8.1.7.).....	4
1.3. Oksidatif Stres.....	6
1.4. Antioksidan Bileşikler ve Özellikleri .....	7
1.5. Timokinon.....	9
1.6. Likopen .....	11
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal .....	31
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	31
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....	31
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	32
3.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler .....	32
3.1.3.2. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler .....	33
3.1.3.3. Elektroforez için kullanılan çözeltiler .....	34
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Protein tayini.....	35
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini .....	35
3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	35
3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması .....	36

	<b>Sayfa</b>
3.2.3. İnsan eritrositindeki glutasyon redüktaz enziminin saflaştırılması.....	36
3.2.3.1. Kan numunelerinin alınması hemolizat eldesi .....	36
3.2.3.2. Eritrosit hemolizatının afinite kolonuna tatbiki ve enzim elüsyonu .....	37
3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü.....	37
3.2.5. İnsan eritrosit GR enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi .....	39
3.2.6. Enzim Aktivitesinin ölçümü .....	40
3.2.7. Timokinon ve likopen bileşiklerinin çözeltilerinin hazırlanması .....	42
3.2.8. İnsan eritrosit GR enzim aktivitesi üzerine timokinon ve likopen bileşiklerinin etkilerinin belirlenmesi.....	42
3.2.9. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine etkisi incelenen timokinon ve likopen bileşiklerinin $K_i$ değeri, inhibisyon türü ve $IC_{50}$ değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	43
4. BULGULAR .....	45
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	45
4.2. İnsan eritrositi GR Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları .....	45
4.2.1. İnsan eritrositi GR enzimi için saflaştırma sonuçları .....	46
4.3. İnsan eritrositi GR'nin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü.....	47
4.4. İnsan eritrositi GR'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar .....	48
4.5. İnsan eritrositi GR Aktivitesi Üzerine Timokinon ve Likopen Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları .....	49
4.6. İnsan eritrosit GR Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Timokinon ve Likopen Bileşiklerinin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları .....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	71



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1.SDS-PAGE elektroforez için ayırma jeli ve yığma jeli konsantrasyonları .	40
Çizelge 3.2. İnsan eritrosit GR enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	41
Çizelge 3.3. İnsan eritrosit GR enziminin timokinon ve likopen bileşiklerine ait aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	42
Çizelge 4.1. İnsan eritrositi GR'nin saflaştırma basamakları.....	47
Çizelge 4.2. İnsan eritrositindeki GR'nin timokinon konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri .....	49
Çizelge 4.3. İnsan eritrositindeki GR'nin likopen konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri .....	50
Çizelge 4.4. İnsan eritrositi GR için bulunan IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon türü.....	51



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Timokinon bileşiğinin molekül formülü .....	11
Şekil 1.2. Likopen bileşiğinin molekül formülü .....	13
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik .....	45
Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan insan eritrositi fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.....	47
Şekil 4.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan GR enziminin jel elektroforez fotoğrafı ve standart belirteç (markır)'in orijinal göstergesi .....	48
Şekil 4.4. İnsan eritrositi GR enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik .....	49
Şekil 4.5. İnsan eritrositindeki GR üzerine timokinon bileşiğinin etkisi .....	50
Şekil 4.6. İnsan eritrositindeki GR üzerine likopen bileşiğinin etkisi.....	51
Şekil 4.7. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine timokinon bileşiğinin etkisi .....	52
Şekil 4.8. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine likopen bileşiğinin etkisi .....	52



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>	Mikrogram/mililitre
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Mikrolitre
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Mikromolar
<b>cm Hg</b>	Santimetre civa
<b>mm Hg</b>	Milimetre civa
<b>Da</b>	Dalton
<b>dk</b>	Dakika
<b>EU</b>	Enzim ünitesi
<b>g</b>	Gram
<b>IC<sub>50</sub></b>	% 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
<b>kcal</b>	Kilokalori
<b>Kkat</b>	Turnover sayısı
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>K<sub>i</sub></b>	İnhibisyon sabiti
<b>K<sub>M</sub></b>	Michealis menten sabiti
<b>L</b>	Litre
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligram
<b>mg/mL</b>	Miligram/mililitre
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Mikromolar
<b>nM</b>	Nanomolar

**Simgeler****nm****°C****V<sub>max</sub>****Açıklama**

Nanometre

Santigrat derece

Maksimum hız

**Kısaltmalar****2-AAPA****2D-NMR****6PGD****ADP****ALP****ALT****APS****AST****ATM****ATP****Aβ-42****BSO****CAT****CDDP****CoA****CTX****DEAE****DETAPAC****DMBA****DMH****DMSO****DNA****EDTA****Açıklama**

Propiyonik asit

İki boyutlu-Nükleer manyetik rezonans

6- Fosfoglukonatdehidrogenaz

Adenozin difosfat

Alkalin fosfataz

Alanin aminotransferaz

Amonyum persülfat

Aspartat aminotransferaz

Aurotiomalat

Adenozin trifosfat

Amiloid-β protein

Butiyonin sülfoksimin

Katalaz

Sisplatin

Koenzim A

Siklofosfamide

Dietilaminoetil

Dietilenetriaminepenta-asetik asit

Dimetilbenz [α] antrasen

1,2-dimetilhidrazin

Dimetilsülfoksit

Deoksiribonükleik asit

Etilendiamintetraasetikasit

## Kısaltmalar

## Açıklama

<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotid
<b>Fe-NTA</b>	Ferrik nitrilotriasetat
<b>G6PD</b>	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
<b>GCL</b>	$\gamma$ -glutamilsistein ligaz
<b>GC-MS GC-MS</b>	Gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi
<b>GCS</b>	$\gamma$ -glutamilsistein sentetaz
<b>GGT</b>	$\gamma$ -glutamil transpeptidaz
<b>GP</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GS</b>	Glutasyon sentetaz
<b>GSH</b>	Redükte glutasyon
<b>GSSG</b>	Okside glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HDAC2</b>	Histon deasetilaz 2
<b>HepG2</b>	Hepatosellüler karsinoma hücreleri
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dipotasyum fosfat
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>LLC</b>	Akciğer kanseri hücreleri
<b>L-NAME</b>	N(omega)-nitro-L-arjinin metil esteri
<b>LN35</b>	Akciğer hücreleri
<b>LN35, MDA</b>	Kanser hücreleri
<b>LPO</b>	Lipidperoksidaz
<b>MDA - MB - 231</b>	Kanser hücreleri
<b>MDA - MB231 - 1833</b>	Kanser hücreleri
<b>MPO</b>	Miyeloperoksidaz
<b>N<sup>6</sup>-2'.5'-ADP- Sepharose</b>	Afinite kolonu
<b>NAC</b>	N-asetil-sistein
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NAD</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADH</b>	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid

**Kısaltmalar****Açıklama**

<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Sodyum azid
<b>NO</b>	Nitrik oksid
<b>O<sup>-2</sup></b>	Süperoksit
<b>OEC</b>	Oral epitel hücreleri
<b>PAH</b>	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
<b>PfGR</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> glutatyon redüktaz
<b>R<sub>f</sub></b>	Göreceli göç
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SiHa</b>	Servikal karsinoma hücreleri
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>STZ</b>	Streptozotosin
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography
<b>TQ</b>	Timokinon
<b>TRD</b>	Tiyol redoks durumu
<b>TRİS</b>	Trihidroksimetilaminometan
<b>TrxR</b>	Tioredoksin redüktaz
<b>UDP</b>	Üridin difosfat
<b>UGT</b>	Glukuronosiltransferazlar
<b>UMSCC-14C</b>	Skuamöz karsinom hücreleri



## 1. GİRİŞ

Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüştüren çok önemli bir enzimdir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolunda üretilir. NADPH indirgeyici bir ajandır ve GSSG gibi bu enzimin substratıdır. Reaksiyon ürünleri olarak GSH ve NADP<sup>+</sup> oluşur.

Bugüne kadar, dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanserin neden olduğu morbidite ve mortaliteyi azaltmada sadece ılımlı bir ilerleme kaydedilmiştir. Tarih boyunca, insan hastalıklarını tedavi etmek için doğal ürünler kullanılmış ve doğal kaynaklardan birçok önemli antikanser maddesi elde edilmiştir. Bu antikanser ajanlar, ilham verici yeni bileşikler olabilir ve doğrudan bitkilerden veya doğal bileşikler modifiye edilerek elde edilebilir. Her ne kadar birçok doğal kaynaklı ilaç keşfedilse de, yeni antikanser ajanlarının belirlenmesi halen gereklidir ve bu, modern antikanser tedavinin iyileştirilmesinde önemli bir yöntem olmaya devam etmektedir (Hail, 2005; Gordaliza, 2007; Hwang ve ark., 2015).

Pek çok kanser hücresi türü, sağlıklı benzerlerinden daha yüksek serbest radikal ve ROS seviyelerine sahiptir. Bununla birlikte, primer kanser dokularını kullanan birkaç çalışma, ROS-temizleyici enzimlerin ve antioksidan bileşiklerin seviyelerinin arttığını da göstermiştir. ROS-temizleyici enzimlerde bir artış, hücre içi oksidatif strese bilinen bir koruyucu tepkidir (Hail, 2005; Gordaliza, 2007; Hwang ve ark., 2015).

Reaktif oksijen türleri (ROS) aerobik hücreler tarafından fizyolojik olarak üretilir ve hücre yaralanması koşullarında üretimi artar. ROS'un fizyolojik seviyeleri kritik hücre içi sinyal yollarına aracılık eder ve hücre yaşamı için elzemdir. Bununla birlikte, aşırı ROS oluşumu hücre hasarı ve ölümüne neden olur. Oksidatif stres uzun zamandır kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır, bu da antioksidan tedavinin kanserden korunma sağlayabileceğini göstermektedir (Valko ve ark., 2007; Landriscina ve ark., 2009; Traverso ve ark., 2013).

Hücre içi redoks dengesinin korunmasında yer alan enzimatik sistemler arasında, sadece antioksidan savunma sistemlerinde değil, aynı zamanda birçok metabolik işlemlerde de yer alan GSH ana rolü oynamaktadır. Yüksek GSH seviyeleri çeşitli tümör türlerinde görülür ve bu neoplastik dokuları kemoterapiye daha dirençli hale

getirir. Ayrıca, bazı tümör hücrelerinde GSH içeriği tipik olarak  $\gamma$ -glutamilsistein ligaz (GCL) ve  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz (GGT) aktiviteleri gibi daha yüksek GSH ile ilgili enzimlerin daha yüksek seviyeleri ile bağlantılıdır. Bu nedenle, GSH sisteminin, kanser ilerlemesine ve kemo dirençliliğine karşı tıbbi müdahale için olası bir hedef olarak farmakologların dikkatini çekmektedir. Bu yüzden birçok çalışmada GSH'ın azalmasına neden olan GR inhibitörleri araştırılmıştır. GR inhibitörleri bu enzimi inhibe ederek GSH oluşumunu engeller ve oksidatif stres oluşturur. Bu durumda da GR enzimi inhibisyonu ile kanser hücrelerinin zayıfladığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak kanser hücrelerinin beslenip çoğalmasının önlediği belirlenmiştir (Calvert ve ark., 1998; Estrela ve ark., 2006; Traverso ve ark., 2013).

Bu çalışmada, glutatyon redüktaz enzimi insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Saflaştırılan GR enzimi aktivitesi üzerine antioksidan ve antikanser özelliği olan iki antioksidan karakterdeki bileşik, timokinon ve likopenin inhibisyon etkisi araştırıldı.

### **1.1. Pentoz Fosfat Yolu**

Pentoz fosfat yolu bir metabolik enerjinin, yani indirgeyici gücün üretildiği metabolik bir yoldur. Biyosentezde kullanılmak üzere yakıt molekülündeki hidrojen atomları ve elektronların bazılarının korunmaları gerekmektedir. NADPH, hücrelerde indirgeyici gücün hemen kullanılabilir şeklidir. Pentoz fosfat yolunda glukoz 6-fosfat, riboz 5-fosfata ve CO<sub>2</sub>'ye oksitlenirken NADPH üretilir. Bu beş karbonlu şeker ve onun türevleri, ATP, CoA, NAD<sup>+</sup>, FAD, RNA ve DNA gibi önemli biyomoleküllerin bileşenleridir (Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Pentoz fosfat yolu aynı zamanda üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan seri reaksiyonlarla birbirlerine dönüştürülmesini de katalizler. Bu reaksiyonların tamamı sitoplazmada meydana gelir. Bitkilerde pentoz fosfat yolunun bir bölümü, fotosentez olayı ile CO<sub>2</sub>'den glukozun sentezlenmesinde de rol alır. Pentoz fosfat yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilir. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens,

Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından belirlenmiştir (Gözükara, 2001; Keha ve Küfrevioğlu, 2012; Onat ve ark., 2006).

Hayvan hücrelerinde glukoz yıkımının diğer önemli bir yolu da pentoz fosfat metabolik yoludur. Bu yol glikolizisten çok erken bir devrede ayrılmaktadır. Glikolitik yolda glukoz, piruvata dönüştürülmektedir. Piruvatın büyük bir kısmı ise sitrik asit döngüsünde oksitlenmektedir. Glukozun glikolitik yolda yıkılmasındaki amaç enerji elde etmektir. Pentoz fosfat metabolik yolunun temel amacı redükleyici güce sahip olan  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  molekülleri üretmektir. Bu metabolik yolda üretilen  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  lar hücre için çok önemli olan moleküllerin biosentezinde kullanılmaktadır. Örneğin;  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  ve riboz-5-fosfat molekülleri yağ asidi sentezinde, redükte glutatyon sentezinde, kolesterol sentezinde, steroid hormon sentezinde ve enerji üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bu metabolik yolda üretilen D-riboz 5-fosfat ve D-deoksiriboz 5-fosfat nükleik asitlerin sentezinde kullanılmaktadır (Gözükara, 2001; Onat ve ark., 2006; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( $\text{NADPH}$ ) eritrositlerde glutatyon metabolizmasında rol oynamaktadır. Oksijen ve türevleri hemoglobini inaktif methemoglobine (hemoglobine) dönüştürmektedir. Ayrıca moleküler oksijen, membran lipidlerinden aktivitesi yüksek peroksidler oluşturmaktadır. Çok az miktarda glukozun kullanıldığı heksoz monofosfat yolunda üretilen  $\text{NADPH}$ , eritrositin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır (Gözükara, 2001; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Hemoglobin yapısının korunması, membranın deformasyon özelliğinin ve sürekliliğinin sağlanması için eritrositlerde oksidatif hasarlardan korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Normal koşullarda hücrede oluşan methemoglobinin (günde yaklaşık % 3 kadar) çoğu,  $\text{NAD}^+$ -bağımlı methemoglobin redüktaz ile katalizlenen tepkime sonucunda hemoglobine indirgenmektedir. Az miktarda methemoglobin ise glutatyon ( $\text{GSH}$ ) tarafından  $\text{NADP}^+$ -bağımlı glutatyon peroksidazın katalizlediği tepkimeye katılmaktadır. Diğer taraftan lipid peroksidasyonuna karşı selenyum içeren glutatyon peroksidaz, eritrositte oluşan peroksid gruplarını zararsız hidroksil gruplarına çevirmektedir. Tripeptid yapısındaki glutatyon methemoglobin ve peroksidlerin indirgenmesi sırasında disülfitle bağlı okside glutatyona ( $\text{GSSG}$ ) yükseltgenmektedir. Tekrar kullanılabilmesi için  $\text{GSSG}$ ,  $\text{NADPH}$ -bağımlı glutatyon redüktaz ile indirgenmekte ve  $\text{GSH}$  oluşturulmaktadır (Gözükara, 2001; Onat ve ark.,

2006; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

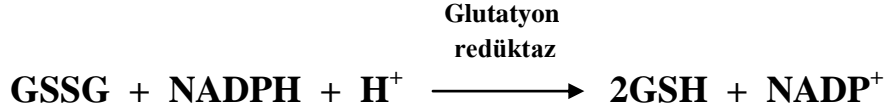
Pentoz fosfat yolunun aktivitesini uyaran oksidan ilaçlar NADPH üretiminin artmasına yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin yetersiz olması veya bulunmaması halinde yeniden GSH üretilmemekte ve hemoglobinin oksidatif strese okside olmaktadır. Okside hemoglobinin denatüre olarak Heinz cisimcikleri halinde çökerek membrana yapışmakta ve eritrositin parçalanmasına neden olmaktadır. Normal koşullarda anemi ile ilişkili olmayan bu yoldaki enzim yetmezlikleri (G6PD) oksidatif strese (ilaçlar, enfeksiyon) hemolitik anemiye yol açmaktadır (Gözükara, 2001; Onat ve ark., 2006).

## **1.2. Glutasyon Redüktaz Enzimi (GR, EC 1.8.1.7 )**

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.8.1.7), NADPH'ye bağlı oksidoredüktaz ailesine aittir ve hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunur. GR; kloroplast, sitozol ve mitokondride yer almasına rağmen, fotosentetik dokulardaki aktivitesinin % 80'inden fazlasının kloroplastik izoform olduğu bildirilmiştir. Glutasyon redüktaz, 2x52 kDa'luk bir homodimerik flavoproteindir ve oksidatif strese karşı hücre için kritik olan hücre içi bir indirgeme ortamının korunmasında önemli bir antioksidan enzimdir. Enzim, bu işlevi, glutasyon disülfidin (GSSG) glutasyona (GSH, L-L-glutamil-L-sisteinilglisine) indirgenmesini katalize ederek gerçekleştirir. GSSG, GSH'nin oksidatif stres koşulları sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROS) gibi oksidanlar tarafından oksidasyonu yoluyla üretilir. GSH, GSH'nin GSSG'ye eş zamanlı oksidasyonu ile oksidanların sonlandırılması yoluyla hücreleri oksidatif strese karşı korur. GSH, memeli hücrelerinde, milimolar aralığında tipik konsantrasyonlara sahip en bol proteinli olmayan tiol olup, hücrelerde bulunan başlıca glutasyon formudur. GSH sitoplazmada 30:1 ila 300:1 arasında değişen genel hücresel GSH/GSSG oranları ile sentezlenir (Mannervik ve ark., 1989; Jones, 2002; Zhao ve ark., 2009).

Yüksek GSH konsantrasyonları nedeniyle, GSH/GSSG, hücrenin ana redoks tamponu olarak kabul edilir ve GSH/GSSG oranı, hücresel redoks durumunun ana göstergesi olarak görülür. GSH/GSSG oranı oksidatif stres koşullarında azalır. Fizyolojik olarak yüksek GSH/GSSG oranı esas olarak iki biyokimyasal işlemle korunur: GSH biyosentezi ve GSSG'nin GSH'ye indirgenmesi. GSH'nin biyosentezi,

glutamik asit ve sisteinin bağlanması ve ardından ardışık  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz (GCS) ve glutatyon sentetaz (GS) etkisiyle glisin ilavesiyle başlar. Bu işlemde, GCS katalizli reaksiyon oranı sınırlama aşamasıdır. GSH biyosentezinin veya GSSG azalmasının inhibisyonunun GSH/GSSG oranını düşürmesi beklenir (Schirmer ve Krauth-Siegel 1989; Mannervik ve ark., 1989; Jones, 2002; Zhao ve ark., 2009).



Bir antioksidan enzim rolüne ek olarak GR, antikanser ve antimalarial ilaç gelişimi için bir hedef olarak tanımlanmıştır. Enzimin inhibisyonunun ayrıca çeşitli kimyasalların ve metallerin toksisitesi ile ilgili olduğu bulunmuştur. GR inhibisyonunun GSH tükenmesine ve GSSG birikimine neden olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, GR inhibisyonunun hücrel tiyol redoks sistemi üzerindeki etkisine dair sistematik bir çalışma belgelenmemiştir. GR inhibisyonunun, hücrel tiyol redoks durumu ve ilgili sistemler üzerindeki etkilerinin bilinmesi, antikanser ve antimalarial ilaç gelişimi için enzimi hedeflemekte ve enzimin toksikoloji içindeki rolünü anlamada değerli olacaktır (Biot ve ark., 2003; Bauer ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2009).

Glutatyon redüktaz okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizleyen spesifik antioksidan enzimdir. Glutatyon (GSH) çok fonksiyonlu tripeptid antioksidandır, okside glutatyonun (GSSG) indirgenmiş şeklidir; Hücrel GSH/GSSG oranı, glutatyon redüktaz tarafından düzenlenmiştir. Glutatyon metabolizması, sistemdeki tüm canlı hücrelerde kükürt metabolik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır; GSH ve GSSG toplamı 300:1 oran olarak hesaplanmıştır. GR ekspresyonu, glutatyon seviyesinin artması veya azalmasının, hücre içi yüzeylerde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Glutatyon redüktaz, hücre içi strese karşı hücre canlılığı ve stabilitesini arttırmanın yanı sıra GSH/GSSG homeostazi, mitokondri ve kloroplastın sitotoksitesisi için kritik bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir (Zhao ve ark., 2009; Ithayaraja, 2011).

### 1.3. Oksidatif Stres

Serbest radikal, bir atomik orbitalde eşlenmemiş bir elektron içererek bağımsız bir varlığa sahip olan herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir. Eşleştirilmemiş bir elektronun varlığı, çoğu radikal tarafından paylaşılan belirli ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Serbest radikaller bir elektronu diğer moleküllerden alır veya kabul edebilir, bu yüzden oksidan veya indirgeyici gibi davranırlar. Birçok hastalık durumunda en önemli oksijen içeren serbest radikaller, hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, oksijen singleti, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar, DNA, protein, karbohidrat ve lipidler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar vererek hücrelerin membranlarında bulunan yüksek oranda reaktif türlerdir. Serbest radikaller hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Serbest radikallerin hedefleri, vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipidler, nükleik asitler ve proteinler başlıca hedeflerdir (Cheeseman ve Slater, 1993; Young ve Woodside, 2001; Lobo ve ark., 2010).

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, insan vücudundaki normal temel metabolik süreçlerden ya da X-ışınları, ozon, sigara içilmesi, hava kirleticilerine ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış kaynaklardan elde edilir. Serbest radikal oluşumu, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak hücrelerde sürekli olarak meydana gelir. Serbest radikallerin kaynağı olarak işlev gören enzimatik tepkimeler, solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer almaktadır. Serbest radikaller, organik bileşiklerle oksijenin nonenzimatik reaksiyonlarında da oluşturulabilir (Bagchi ve Puri, 1998; Liu ve ark., 1999; Lobo ve ark., 2010).

Serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunmaları arasındaki kritik denge elverişsiz olduğunda ortaya çıkan durum oksidatif hasar olarak tanımlanır. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunmaları arasındaki dengesizliğin sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres; lipidler, proteinler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlere verilen hasarla ilişkilidir. Travma, enfeksiyon, ısı hasarı, hipertoksia, toksinler ve aşırı egzersiz ile zarar görmüş dokularda kısa süreli oksidatif stres, ortaya çıkabilir. Radyasyon ve kemoterapinin yan etkilerinin yanı sıra kanserin

başlaması ve ilerlemesi, ROS ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik ile ilişkilendirilmiştir. Reaktif oksijen türleri diabetes mellitus, yaşa bağlı göz hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların indüksiyonu ve komplikasyonlarında rol oynamaktadır. Damar tıkanıklığı, inflamatuvar durum, belirli kanserler ve yaşlanma süreci gibi birçok durumda oksidatif stresin etkili olduğu öne sürülmüştür. Oksidatif stresin tüm inflamatuvar hastalıklar, iskemik hastalıklar, hemokromatoz, immün yetmezlik sendromu, amfizem, organ transplantasyonu, gastrik ülserler, hipertansiyon, nörolojik bozukluk, alkolizm, sigara ile ilgili hastalıklar ve diğer birçok hastalığa önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir (Rao ve ark., 2006; Stefanis ve ark., 1997).

#### **1.4. Antioksidan Bileşikler ve Özellikleri**

Antioksidanlar, esas olarak serbest radikal süpürücü özelliği sayesinde hücresel zararı geciktirir veya inhibe eder. Bu düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve hayati moleküller zarar görmeden önce zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Glutasyon, übikinol ve ürik asit gibi bazı antioksidanlar vücuttaki normal metabolizma sırasında üretilir. Vücutta serbest radikalleri temizleyen birkaç enzim sistemi bulunmaktadır. Ancak temel mikro besin (vitaminler) antioksidanları olan E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve  $\beta$ -karoten gibi vitaminlerin diyetle dışarıdan alınmaları gerekir. Antioksidanlar radikal süpürücü, hidrojen verici, elektron verici, peroksit parçalayıcı, singlet oksijen giderici, enzim inhibitörü, sinerjist ve metal şelatlayıcı ajanlar olarak görev yapar. Hem enzimatik hem de nonenzimatik antioksidanlar reaktif oksijen türlerini detoksifiye etmek için hücre içi ve hücre dışı ortamda bulunurlar (Halliwell, 1995; Shi ve ark., 1999; Levine ve ark., 1991).

Glutasyon sistemi; glutasyon, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidazlar ve glutasyon S-transferazları içerir. Bu sistem hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eden dört selenyum-kofaktör içeren bir enzimdir (Matill, 1947; Meister, 1988).

Glutasyon, aerobik yaşamın çoğunda bulunan sistein içeren bir peptiddir. Glutasyonun sistein grubundaki tiyol grupları indirgeyici maddelerdir. Aynı zamanda glutasyon, tersinir olarak oksitlenebildiği ve indirgenebildiği için antioksidan özelliklere sahip olan bir bileşiktir. Hücrelerde glutasyon, indirgenmiş formda glutasyon redüktaz enzimi tarafından korunur ve diğer metabolitleri ve enzim sistemlerini indirger ve doğrudan oksidanlarla reaksiyona girer. Glutasyon yüksek konsantrasyonu ile hücrenin redoks durumunu koruyan en önemli hücresel antioksidanlardan biridir (Meister, 1988; Halliwell, 2007; Lobo ve ark., 2010).

Serbest radikal hasarı kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalık, katarakt ve kanser gibi birçok kronik hastalığın ilerlemesine neden olur. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya onları yok ederek serbest radikal kaynaklı doku hasarını önler (Halliwell, 2007; Lobo ve ark., 2010).

Antioksidan savunma sistemi, yabancı bileşik ve ağır metallerin (kurşun, civa, arsenik vb.) detoksifikasyonu, immun savunma sistemi, prostaglandin sentezi ve gama glutamil siklusu ile amino asitlerin plazma membranından taşınması gibi olaylarda glutasyon önemli rol oynamaktadır (David ve ark., 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Robert ve ark., 2004).

Hücrede reaktif oksijen türlerine karşı bazı antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Birçok hücrede bulunan ve bir tripeptid-tiol olan redükte glutasyon (GSH),  $H_2O_2$ 'i kimyasal olarak detoksifiye edebilmektedir. Bu reaksiyonu glutasyon peroksidaz düzenlemektedir. Ancak bu reaksiyonda okside olarak koruyucu özelliklerini kaybeden redükte glutasyonun (GSH) yerine konması gerekir. Hücrelerimiz, indirgeyici elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile tekrardan redükte glutasyonu sentezler. Böylece NADPH  $H_2O_2$ 'in indirgenmesinde indirekt elektron kaynağı olarak rol alır ve antioksidan savunmaya katkıda bulunur (Richard ve ark., 2007; David ve ark., 2005; Onat ve ark., 2006; Halliwell, 2007).



## 1.5. Timokinon

*Nigella sativa* tohumu İngilizcede siyah tohum, Arapçada 'Alhabba Al-sauda' ve Urduca ve Hintçe dillerinde 'Kalvanji' olarak bilinir ve dünyanın birçok yerinde özellikle orta doğu ve uzak doğu ülkelerinde çok sayıda hastalığın önlenmesi ve tedavisi için sıkça kullanılır. Bu bitki timokinon, p-simen,  $\alpha$ -pien ve monoterpenler gibi çeşitli aktif bileşenleri içerir ve bu bileşikler, antioksidan, analjezik, anti-inflamatuvar, anti-astimatik, antimikrobiyal, antihipertansif, antipiretik ve antinoplastik gibi pek çok farmakolojik özelliğe sahiptir (Randhawa ve Alghamdi, 2011; Imran ve ark., 2018).

Moleküler formülü  $C_{10}H_{12}O_2$  ve mol kütlesi  $164.20 \text{ g.mol}^{-1}$  olan timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon) tohumların en biyoaktif bileşenidir. Timokinon, enol, keto ve karışım formlarından oluşur. Keto formu, timokinonun farmakolojik etkilerinde rol oynayan ana formdur. Timokinon bileşiğinin ışığa duyarlılığı yüksektir ve kısa bir süre ışığa maruz kaldığında etkisini kaybeder. Ayrıca, sulu çözeltilerde, özellikle bir alkali bir pH'da kararsızdır. TQ'nun hidrofobik özelliği biyolojik olarak kullanılabilirliğini ve ilaç formülasyonunu sınırlar. İntravenöz, intraperitoneal ve oral subakut ve subkronik uygulama dahil, TQ uygulamasının farklı yolları vardır (Al-Ali ve ark., 2008; Randhawa ve Alghamdi, 2011; Imran ve ark., 2018).

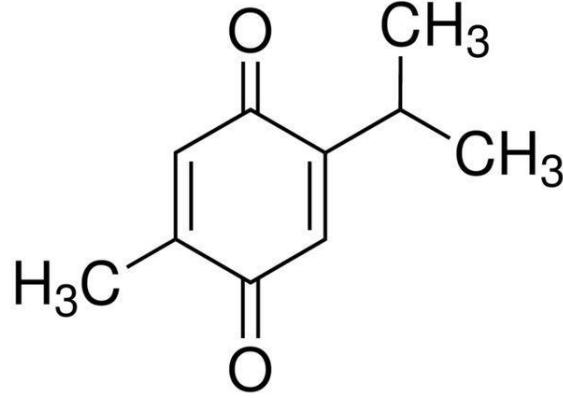
*Nigella sativa* 4-terpineol, p-cymene, thymoquinone, dihydroquinone, thymohydroquinone ve t-anethol gibi çeşitli biyoaktif bileşen türlerinin önemli bir kaynağıdır (Randhawa ve Alghamdi, 2011; Imran ve ark., 2018). Aynı zamanda karbonhidratlar, vitaminler, yağlar, proteinler, mineral elementler ve esansiyel aminoasitler dahil diğer bileşenlerden oluşur. Ayrıca, *Nigella sativa* tohumunun, nigellimin, nigellidin, saponin, nigellicin ve suda çözünür triterpenlerden oluştuğu bulunmuştur. Timokinon, oksidatif hasara bağlı serbest radikal ajanlara ve kardiyotoksisteyi indüklemek için kullanılan doksorubisine (kemoterapi ilacı) karşı ümit verici bir rol göstermiştir. Kanser gelişimi, eikosanoid üretimi ve oksidasyon başına membran lipidi üzerinde baskılayıcı aktivite gösterir. Aynı zamanda, timokinon farelerde hiperproliferatif (aşırı hücre bölünmesi) bir eylem olarak etkili kemo-koruyucu fitokimyasal olarak çalışır ve ferrik nitrilotriasetat (Fe-NTA) kaynaklı oksidatif stresi yok eder. Timokinon tedavisi, bağışıklık sisteminin zayıflamasını önler ve insanı hastalıklara karşı daha dayanıklı hale getirir. Aynı zamanda timokinon, toksik yan

etkileri önleyerek hücreleri oksidatif hasardan korur. Diğer belirgin sağlık perspektiflerinde, timokinon sırasıyla yumurtalık, kolon, gırtlak, meme, miyeloblastik lösemi, akciğer ve osteosarkom (habis bir kemik tümörü) gibi farklı kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etki gösterir. Timokinon, demir askorbat tarafından indüklenen hipokampal (beynin bir bölgesi) homojenatlarda, *in vitro* enzimatik olmayan lipit peroksidasyonunu önlemiştir. Benzer şekilde, timokinon tedavisi hipokampus bölümündeki serebral iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında, oksidasyon seviyesindeki lipid konsantrasyonlarını belirgin şekilde düşürmüştür (El-Mahdy ve ark., 2005; Al-Ali ve ark., 2008; Perazella ve Moeckel, 2010; Randhawa ve Alghamdi, 2011; Imran ve ark., 2018).

Başka bir çalışmada, timokinonun (9 mg / kg vücut ağırlığı) tatbik edilmesinin, aflatoksin B1'in neden olduğu karaciğer hasarını, örneğin AST, ALT ve ALP'nin serum konsantrasyonlarında azalma ve glutatyon konsantrasyonlarında arttırma gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla önlediği belirlenmiştir. Aynı şekilde, timokinon tedavileri beyin dokusunu radyasyona bağlı nitrosatif basınçtan korumuştur. Wistar ratları kullanılarak yapılan *in vivo* bir analiz ile 5 mg/kg vücut ağırlığı oranında oral verilen timokinon bileşiğinin belirgin olarak lipidperoksidaz (LPO), miyeloperoksidaz (MPO), nitrik oksit konsantrasyonlarında azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, timokinon bileşiği katalaz ve artrit (eklem iltihabı) üreten kolajen içindeki glutatyon konsantrasyonlarını arttırmıştır ve Fe (III) nitritotriasetik asit (Fe-NTA) kaynaklı oksidatif stresi baskılamıştır. Timokinon, glukoz kaynaklı süperoksit dismutaz aktivitesi kaybına ve parçalanma veya çapraz bağlanmaya karşı koruma sağlar. Ek olarak, timokinon ve 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile tedavi edilen Wistar ratların kırmızı kan hücrelerinde süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz sızıntısını önemli ölçüde engellenmiştir (Houghton, 1995; Khan ve Sultana, 2005; Bourgou ve ark., 2008; Imran ve ark., 2018; Ahlatci ve ark., 2014).

Aynı zamanda, timokinon hemoglobin konsantrasyonunu koruyarak, şeker konsantrasyonlarını normalleştirerek, alkalın fosfatazı düşürerek, kreatinin, üre, bilirubin, kolesterol, düşük yoğunluklu trigliseritler gibi böbrek parametrelerini koruyarak anti-kanser ilaçları olan siklofosfamide (CTX) karşı sitoprotektif bir ajan olarak bilinmektedir. Timokinonun, mitokondriyal membran potansiyel depolarizasyonunu güçlendirmek için hücre canlılığını artırarak amiloid-P (A $\beta$ -42)

tarafından üretilen nörotoksisiteyi azalttığı da bildirilmiştir (Houghton, 1995; Alenzi ve ark., 2010; Imran ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Timokinon bileşiğinin molekül formülü.

## 1.6. Likopen

Likopen, karotenoidler olarak bilinen geniş bitki pigmentleri ailesindeki bir pigmenttir. Karotenoidler sarı kabak renginden balkabağının turuncu rengine, kırmızı domates rengine kadar değişen renkler üretir. Karotenoidler ayrıca bazı bitkisel gıda aromalarına da katkıda bulunur. Bazı karotenoidler ayrıca provitamin A aktivitesine sahiptir ve güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Bugüne kadar 700'den fazla karotenoid tanımlanmıştır. İki ana karotenoid tipi vardır: hidrokarbon karotenoidleri ve ksantofiller. Likopen gibi hidrokarbon karotenoidleri tamamen hidrojen ve karbondan oluşur. Buna karşılık, lutein gibi ksantofiller karbon ve hidrojene ek olarak oksijen içerir.  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -karoten gibi bazı hidrokarbon karotenoidleri, A vitamini oluşturmak için enzimatik olarak parçalanabilir. Likopen, bir terminal beta iyonon halkasının bulunmamasından dolayı provitamin A aktivitesinden yoksundur. Karotenoidler tipik olarak 40 karbon içerir. Apokarotenoidler 40'tan az karbon içerir. Karbon sayısından bağımsız olarak, tüm karotenoidler bir izoprenoid omurgasına sahiptir (Cámara ve ark., 2013; Mozos ve ark., 2018).

$C_{40}H_{56}$  kimyasal formülüne sahip olan likopen, bitkilerde karotenoid sentezinin önemli bir ara maddesi olarak kabul edilir, ancak insan beslenmesinde likopen, uygun

enzimlerin bulunmamasından dolayı provitamin A öncüsü olarak rol oynamaz. Bitki likopen genellikle all-trans izomeri olarak bulunur. Biyolojik olarak yararlı hale gelebilmesi için all-trans izomerinin asidik koşullarda (örneğin, mide asidi) termal enerjiye maruz kalma neticesinde cis izomerine dönüşmesi gerekir. Likopen içeriği, meyvelerin olgunlaşmasının farklı aşamalarında artar. Karpuz özü ayrıca likopen ekstraksiyonu için de kullanılabilir ve domatesten daha yüksek konsantrasyonlarda bol miktarda bulunan cis-izomerik likopen bakımından zengin bir kaynaktır (Naz ve ark., 2014; Oberoi ve Soqi, 2017). İlginç şekilde ayrıca mantar bitkisi patojeni *Blakeslea trispora*, likopen üretmek için ticari bir kaynak olarak kabul edilmiştir. Likopen içeriği yüksek olan bazı yiyecekler fonksiyonel yiyecekler olarak sınıflandırılır. Domates suyu, salça, püresi, ketçap, sos veya çorba, ısıl işlem nedeniyle geliştirilmiş biyoyararlanımı olan likopen kaynaklarını temsil eder (Mantzouridou ve Tsimidou, 2008; Mozos ve ark., 2018).

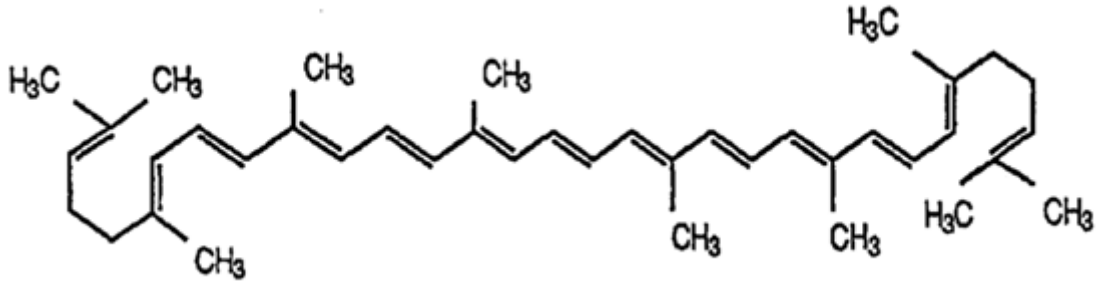
Likopen; antioksidan, anti-inflamatuar, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, antiplatelet etki, endotel fonksiyonunu iyileştirici (nitrik oksidal biyoyararlanım ve kan akışı), metabolik profil (kolesterol sentezini bozarak) ve kan basıncı kontrolü gibi çeşitli kardiyovasküler yararlarına sahiptir (Cámara ve ark., 2013; Mozos ve ark., 2018).

Likopen, karotenoidler grubunda etkili bir tekli oksijen söndürücü olarak kabul edilir. Alfa tokoferolden (10 kat daha güçlü) veya beta karotenden (iki kat daha güçlü) çok daha güçlü bir antioksidandır. Likopen ayrıca süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin üretimini düzenler. Likopen, okside edilmiş likopen ürünlerini ortaya çıkaran peroksinititi de temizleyebilir (Kong ve ark., 2010; Böhm, 2012; Pereira ve ark., 2017).

Oksidatif stres, nitrik oksit sentazın ayrışması ve endotel hücrelerinin oksidatif hasarı nedeniyle endotel disfonksiyonuna neden olur. Likopen oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerini azaltarak, nitrik oksidin (NO) biyoyararlanımını artırır, endotel bağımlı vazodilatasyonu iyileştirir ve protein, lipidler, DNA ve mitokondriyal hasarı azaltır (Cámara ve ark., 2013; Naz ve ark., 2014; Nakamura ve ark., 2017; Mozos ve ark., 2018).

Vücutta lipidleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyebilen serbest radikallerin veya diğer bileşiklerin oluşumu, kronik hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biridir. Likopenin kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon, ateroskleroz, cilt hasarı ve prostat,

meme, akciğer ve diğerleri gibi belirli kanser türlerine karşı koruyucu bir etkisi olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Bu nedenle diyetteki likopen varlığının çok değerli olduğu düşünülmektedir. Diyetteki likopen, vücuttaki likopen seviyesini artırabilir ve bir antioksidan görevi görür. Alternatif olarak, serum likopen seviyesindeki artış; hücreler arası iletişimi geliştirerek (hücre büyümesinden sorumlu), metabolizmayı düzenleyerek ve kronik hastalık riskini azaltarak gen fonksiyonlarını düzenleyebilir. Bu mekanizmalar birbiriyle ilişkili olabilir ve tedavi etkisi sağlamak için aynı anda hareket edebilir. Likopen farklı besin kaynaklarından (özellikle domates ürünlerinden) hızlı bir şekilde emilir ve antioksidan özelliklerini koruduğu bedensel dokulara dağıtılır. Bu emilim, gıda kaynağı, gıda işleme ve diyetteki diğer bileşenler gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. İnsan vücudu likopen gibi karotenoidleri sentezleyememektedir, bu nedenle yeterli seviyelere ulaşmak için uygun bir diyet alımı gereklidir (Cámara ve ark., 2013; Mozos ve ark., 2018).



Şekil 1.2. Likopen bileşiğinin molekül formülü.



## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Fototropik mor sülfür bakterisindeki (*Chromatium vinosum*) glutatyon redüktaz [NAD(P)H: glutatyon disülfid oksidoredüktaz, EC 1.6.4.2] enzimi belirgin bir homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile GR enziminin moleküler ağırlığı 52 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin GSSG yokluğunda NADH ile inkübe edilmesi, aktivitede önemli bir kayıpla sonuçlanmıştır. GR fosfat ve sülfat iyonu ile uyarılmıştır. Ancak klorür iyonu, ağır metaller ve sülfhidril reaktifleri tarafından inhibe edilmiştir. Veriler, adenilat nükleotid inhibitörlerinin, flavin adenin dinükleotid (FAD) için yarışmalı inhibitörleri olarak davrandıklarını göstermiştir. GSSG için  $K_M$  değeri  $7 \times 10^{-3}$  M ve NADH için  $K_M$  değeri  $6 \times 10^{-5}$  M olarak hesaplanmıştır (Chung ve Hurlbert, 1975).

Rat karaciğerinden glutatyon redüktaz (GR, NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7) enzimi % 20 verimle 5000 kattan daha fazla saflaştırılmıştır. Enzimin ve alt birimlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla 125.000 ve 60.000 Da olarak belirlenmiştir. Enzim molekülü NADPH, GSH veya ditioeritritol ile indirgenebilen 2 FAD molekülü içerir. Redükte flavin, GSSG ilavesiyle aniden yeniden oksitlenir (Carlberg ve Mannervik, 1975).

DBA/2J farelerinin karaciğerinden glutatyon redüktaz, amonyum sülfat fraksiyonu ve 8-(6-aminoheksil)-amino-2'-fosfo-adenosin difosforiboz ve N<sup>6</sup>-(6-aminoheksil)-adenosin 2', 5'-bisfosfat-Sepharose kolonları kullanılarak iki afinité kromatografisi adımı ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 158 U/mg olarak hesaplanmıştır. GR enziminin molekül ağırlığı 105 kDa olan bir dimer olarak belirlenmiştir. Fare ve insan enzimi amino asit bileşimi, arasında çok az benzerlik göstermiştir. Fare glutatyon redüktaza karşı antikolar, tavşanlarda büyütülmüş ve yüksek özgüllük sergilemiştir. Fare karaciğer glutatyon redüktazının katalitik özellikleri, çeşitli deneysel koşullar altında incelenmiştir. Diğer kaynaklardan gelen aynı enzimde olduğu gibi, kinetik veriler "dallanmış" bir mekanizma ile tutarlıdır. GR 80 °C'de GSSG ile ve daha az belirgin bir şekilde NADP<sup>+</sup> ve GSH ile termal inaktivasyona karşı stabilize edilmiştir, fakat NADPH veya FAD ile stabilize edilmemiştir. Fare glutatyon redüktazın NADPH veya NADH varlığında inkübasyonu, neredeyse tamamen etkisiz

hale getirmiştir. NADPH ile inaktivasyon zaman, pH ve konsantrasyona bağlı olmuştur. Okside glutatyon, enzimi GSSG veya diğer elektron alıcıları tarafından da tersine çevrilebilen inaktivasyona karşı korumuştur. Enzim, fazla NADPH'yi ortadan kaldırdıktan sonra bile inaktif durumda kalmıştır. Aktif olmayan enzim, aktif glutatyon redüktaz ile aynı molekül ağırlığını göstermiştir. Aktif olmayan enzimin spektral özellikleri de incelenmiştir. Glutatyon redüktazın NADPH tarafından otomatik olarak aktive edilmesinin ve GSSG ile reaktivasyonun *in vivo* önemli bir düzenleyici rol oynaması ileri sürülmektedir (López-Barea ve Lee, 1979).

Boggaram ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, domuz eritrositlerinden 2',5'-ADP Sepharose afinite kolonu, DEAE-selüloz iyon değişim kolonu, 2',5'-ADP Sepharose afinite kolonu ve Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kullanarak glutatyon redüktaz enzimini % 15 verim ile 105.238 kat saflaştırılmıştır (Boggaram ve ark., 1979).

Glutatyon redüktaz, izole edilmiş bezelye kloroplastlarından (*Pisum sativum* L.) kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırma katsayısı 1600, spesifik aktivitesi 26  $\mu\text{mol}$  NADPH oksitlenmiş (mg protein)<sup>-1</sup> dak<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Enzimin nativ molekül ağırlığı yaklaşık 156 kDa olarak bulunmuştur. Aynı zamanda enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 41 ve 42 kDa olan iki altbirimden oluştuğu belirlenmiştir. Okside glutatyon için  $K_m$  11  $\mu\text{M}$  ve NADPH için  $K_M$  1,7  $\mu\text{M}$ 'dir. GR sülfhidril modifiye edici reaktifler tarafından etkisiz hale getirilmiş ve oksitlenmiş glutatyon veya NADPH'nin varlığı inaktivasyon derecesini etkilemiştir. Kloroplast glutatyon redüktaz muhtemelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin askorbat bağlı redüksiyonu için dehidroaskorbatı azaltarak fotosentetik olarak türetilmiş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılmasında görev yapar. Bu reaksiyon dizisinin ara maddeleri olan dehidroaskorbat, askorbat, indirgenmiş glutatyon ve NADPH enzimik aktivite üzerinde hiçbir etki göstermemiştir (Kalt-Torres ve ark., 1984).

*Escherichia coli* suşu S33'ten glutatyon redüktaz, iki afinite kromatografi aşamasından oluşan basit ve hızlı bir prosedürle saflaştırılmıştır. % 40-80' lik bir amonyum sülfat fraksiyonundan sonra, enzim bir N<sup>6</sup>-2'.5'-ADP-Sepharose afinite kolonuna yüklenmiştir. Enzim, bir C<sup>8</sup>-ATPR-Sepharose kolonunda ikinci bir afinite kromatografisi aşamasından sonra homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. 182 g *Escherichia coli* hücrelerinden başlayarak, 2632 kat saflaştırmadan sonra toplam % 63 verimle 6.9 mg saf enzim elde edilmiştir. Saf enzim 361 U/mg spesifik bir aktivite göstermiştir. GR,



molekül ağırlığı 109 kDa olan bir dimer olarak belirlenmiştir. Optimum pH, indirgeyici maddeler olarak sırasıyla NADPH ve NADH için 7.5 ve 4.5 olarak bulunmuştur. NADPH, NADH ve GSSG için  $K_M$  değerleri sırasıyla 16, 377 ve 66  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Depolamadan sonra, GR 7.5 ile 9.5 arasında değişen pH değerlerinde kararlıdır, ayrıca FAD,  $\text{NADP}^+$ , dithiothreitol veya gliserol ile stabilize edilmiştir. Saf GR oldukça ısıya dayanıklı bulunmuş ve sadece 70 °C'de 10 dakika sonra önemli ölçüde denatüre edilmiştir. Ancak 20  $\mu\text{M}$  NADPH varlığında 0 °C'de bile belirgin bir aktivite kaybı gözlenmiştir (Mata ve ark., 1984).

Glutasyon redüktaz koyun beyninden % 40 verimle yaklaşık 1000 kat saflaştırılmıştır. Metot, amonyum sülfat fraksiyonlama, ısı denatürasyonu, 2',5' - ADP Sepharose 4B ve Sephadex G-200 kromatografi adımlarını içermektedir. GR enziminin spesifik aktivitesi 193 EU mg/protein olarak bulunmuştur. GR enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 116 kDa olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığı 64 kDa olan iki özdeş alt birim elde edilmiştir (Acan ve Tezcan, 1989).

Glutasyon redüktaz, koyun karaciğerinden saflaştırılmıştır. Saflaştırma; homojenat, amonyum sülfat fraksiyonasyonu, 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere dört adımda gerçekleştirilmiştir. GR 1477 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 47.27 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. Optimal pH, kararlı pH ve optimal sıcaklık sırasıyla 8.0, 5.5 ve 60 °C olarak bulunmuştur. NADPH ve GSSG substratları için  $K_M$  ve  $V_{\text{max}}$  değerleri sırasıyla 0.0258 ve 0.0239 mM ve 0.266 ve 0.255 EU/mL olarak hesaplanmıştır. Ek olarak,  $\text{NADP}^+$  ve GSH için sırasıyla Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak 4.367 ve 0.4055 mM  $K_i$  değerleri belirlenmiştir (Uluslu ve ark., 2005).

Glutasyon redüktaz, tavuk karaciğerinden saflaştırılmış ve enzimin bazı özellikleri araştırılmıştır. Saflaştırma prosedürü; homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, 2' 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere dört aşamadan oluşmuştur. GR % 38'lik bir verimle 1714 kat saflaştırılmıştır. Spesifik aktivite, 120 enzim ünit (EU)/mg protein olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan enzim, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) üzerinde tek bir bant göstermiştir. Enzimin moleküler ağırlığı, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile 100 kDa olarak bulunmuştur ve alt birim molekül

ağırlığı SDS-PAGE ile 43 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH, kararlı pH, optimum, iyonik şiddet ve optimum sıcaklık sırasıyla 7.0, 7.4, 0.75 M Tris-HCl, 50 °C olarak belirlenmiştir (Erat ve ark., 2005).

Glutasyon redüktaz, indirgen bir kofaktör olan NADPH'ı kullanarak oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) indirgenmesini katalize eder. Glutasyon redüktaz enzimi 2',5' ADP-Sepharose 4B ve DEAE-Sepharose Fast Flow kolonları kullanılarak sığır karaciğerinden saflaştırılmıştır. Enzim 5456 kat ve % 38.4 verimle saflaştırılmıştır. Optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve 7 olarak bulunmuştur. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisi 9.065 kcal/mol'dür. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak bulunmuştur. Sığır karaciğeri GR enziminin kinetik karakterizasyonu da araştırılmış,  $K_M$  değeri NADPH için  $0.063 \pm 0.008$  mM ve GSSG için  $K_M$  değeri  $0.154 \pm 0.015$  mM olarak belirlenmiştir (Ulus ve Tandoğan, 2007).

Glutasyon redüktaz (EC: 1.8.1.7; GR), gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden saflaştırılmış ve enzimin bazı özellikleri araştırılmıştır. Saflaştırma prosedürü; homojenat, amonyum sülfat fraksiyonasyonunun hazırlanması, 2', 5'-ADP Sepharose-4B üzerinde afinite kromatografisi ve Sephadex G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ile dört basamaktan oluşmaktadır. 27.45 U/mg protein spesifik aktivitesi olan GR enzimi, % 41 verimle 1654 kat saflaştırılmıştır. GR için optimum pH, kararlı pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik kuvvet, moleküler kütle, GSSG ve NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri de belirlenmiştir. Ayrıca, metal iyonlarının ( $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Al^{+3}$ ) glutasyon redüktaz üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir.  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Al^{+3}$ 'ün  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 0.0655, 0.082, 0.122, 0.509, 0.797 ve 0.804 mM ve  $Cd^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  için  $K_i$  sabitleri sırasıyla  $0.104 \pm 0.001$ ,  $0.117 \pm 0.001$  olarak hesaplanmıştır (Tekman ve ark., 2008).

Glutasyon redüktaz, sığır böbrek korteksinden % 85'lik bir nihai verimle 34806 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin bazı moleküler ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Ürün inhibisyon çalışmaları enzimin "dallanmış" mekanizmaya uyduğunu göstermiştir. NADPH için  $K_M$  değeri  $18 \pm 3$   $\mu$ M ve GSSG için  $K_M$  değeri  $65 \pm 5$   $\mu$ M olarak hesaplanmıştır (Tandoğan ve Ulus, 2010).

Glutasyon redüktaz (E.C.1.8.1.7), ototrofik bir ortamda ekstenel olarak büyütülen *Phaeodactylum tricornutum* hücrelerinden saflaştırılmıştır. Hücre ekstraktının

hazırlanması, % 20 doygunluğa amonyum sülfat eklenmesi ve ardından anyon değişimi ve afinite etkileşimi kromatografisi (Blue-A- ve 2', 5' - ADP-Sepharose) yöntemleri ile GR enzimi birkaç adımda saflaştırılmıştır. GR enziminin molekül ağırlığı nativ poliakrilamid jel elektroforezi ile 118 kDa olan bir dimer olarak belirlenmiştir. Enzim, pH 8.0 ve 32 °C'de optimum bir aktivite ve 190 U.mg<sup>-1</sup> değeri ile spesifik bir aktivite göstermiştir. NADPH ve okside glutatyon (GSSG) için K<sub>M</sub> değerleri sırasıyla 14 µM ve 60 µM olarak hesaplanmıştır (Arias ve ark., 2010).

Hindi karaciğerinden glutatyon redüktazı (GR) enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. GR enzimi % 10.75 verim ile 2476 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 606.67 EU mg protein<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. GR için optimum pH, kararlı pH, optimal sıcaklık, optimal iyonik güç, moleküler ağırlık, turnover sayısı ve k<sub>kat</sub>/K<sub>M</sub> ve K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri, NADPH ve glutatyon disülfür substratları için belirlenmiştir (Taşer ve Çiftçi, 2012).

Glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktaz (GR), hücreleri oksidanların zararlarına karşı koruyan GSH redoks döngüsünün parçalarıdır. GSH ve GR, *Setaria cervi* parazitlerinde önemli miktarlarda bulunurlar. GR glutatyon metabolizmasında merkezi bir role sahiptir ve bu nedenle kemoterapi için potansiyel bir hedeftir. Arora ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Setaria cervi* parazitlerinden GR enzimi saflaştırılmıştır ve parazit GR enziminin özellikleri memelilerdeki GR enzimi ile karşılaştırılmıştır. Saflaştırılan proteinin, SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 55 kDa olan bir dimer olduğu belirlenmiştir. Kinetik çalışmalar, *Setaria cervi* GR enziminin, memeli muadillerinden, filariasis (parazitsel bir hastalık) kemoterapisinde kullanılabilecek özelliklerinde belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Filaryal GR, potansiyel bir ilaç hedefi olarak önerilmektedir (Arora ve ark., 2013).

*Alkanna tinctoria* bitki kökü organik faz ekstraktlarının insan eritrositlerinde bulunan glutatyon redüktaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. *Alkanna tinctoria* bitki kökünün organik faz ekstraktı, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerini aktive ederken glutatyon redüktaz enzimini inhibe etmiştir. Bitki ekstraktları glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi üzerine yarışmasız inhibisyon etkisi göstermiştir ve inhibisyonun I<sub>50</sub> değeri 0,0249 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Çakar ve Türkoğlu, 2013).

Glutasyon redüktaz enzimi, Van Gölü balığının (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) karaciğerinden ve eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Karaciğer ve eritrosit GR enzimlerinin saflaştırılması sırasıyla 4552 ve 7619 kat olarak gerçekleştirilmiştir. Karaciğer ve eritrosit GR için optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet sırasıyla 40 ve 60 °C; 8.0, 8.0, 50 mM ve 50 mM olarak bulunmuştur. SDS-PAGE ile enzimlerin alt birimlerinin molekül ağırlıkları 55 kDa olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Van Gölü balığı karaciğer ve eritrosit GR enzim aktiviteleri üzerine amikasin, sefazolin, ivermektin ve kanamisin ilaçlarının etkileri araştırılmıştır. Yarışmasız inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için  $K_i$  sabitleri ve  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir.. Van Gölü Balığı karaciğer GR enzimi için  $IC_{50}$  değerleri sırayla  $1.63 \times 10^{-2}$ ,  $3.66 \times 10^{-2}$ ,  $5.04 \times 10^{-4}$ ,  $1.88 \times 10^{-2}$  M ve eritrosit GR enzimi için  $IC_{50}$  değerleri sırayla  $2 \times 10^{-2}$ ,  $3.04 \times 10^{-2}$ ,  $7.87 \times 10^{-4}$ ,  $3.18 \times 10^{-2}$  M olarak hesaplandı.  $K_i$  sabitleri de balık karaciğer GR enzimi için sırasıyla  $1.39 \times 10^{-2}$  M,  $1.84 \times 10^{-2}$  M,  $6.54 \times 10^{-4}$  M,  $1.12 \times 10^{-2}$  M; eritrosit GR enzimi için de sırasıyla  $2.32 \times 10^{-2}$  M,  $4.64 \times 10^{-2}$  M,  $1.19 \times 10^{-3}$  M,  $3.64 \times 10^{-2}$  M olarak bulunmuştur (Altun ve ark., 2015).

G6PD, 6PGD ve GR, 2',5' - ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak rat akciğerinden tek adımda ayrı ayrı saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimler, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) üzerinde tek bir bant göstermiştir. Enzimlerin moleküler ağırlıkları, Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi ile G6PD için 134 kDa, 6PGD için 107 kDa ve GR için 121 kDa olarak hesaplanmıştır ve SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 66, 52 ve 63 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH, stabil pH, optimum iyonik kuvvet, optimum sıcaklık, substratlar için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Enzimler, *in vitro* olarak levofloksasin, furosemid, seftazidim, sefuroksim ve gentamisin ile inhibe edilmiştir ve  $IC_{50}$  değerleri 0,07–30,13 mM arasında bulunmuştur. *In vivo* çalışmalar, akciğer GR enziminin furosemid tarafından inhibe edildiğini ve akciğer 6PGD'nin levofloksasin tarafından inhibe edildiğini göstermiştir (Adem ve Ciftci, 2016).

Glutasyon redüktaz (GR) ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) Van Gölü balıklarının solungaçlarından saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde, amonyum sülfat ile çöktürme ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisi kullanılmıştır. Enzim saflığının kontrolü ve moleküler ağırlığın belirlenmesi, SDS-PAGE ile yapılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği ile  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, bazı kalkon türevlerinin saflaştırılmış enzimler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İnhibisyon etkisi

gösteren kalkon türevleri için % Aktivite - [I] grafikleri çizilmiştir ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir (Kuzu ve ark., 2016).

Glutasyon Redüktaz enzimi, sığır karaciğerinden afinite kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Glutasyon redüktaz enziminin saflaştırma oranı ve spesifik aktivitesi sırasıyla 1832 kat ve 141 EU/mg.protein olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE yöntemiyle GR enziminin molekül ağırlığı 55 kDa olarak belirlenmiştir. *Arum elongatum* steven subsp. detruncatum (C.A. Mey. Ex Schott) Riedl (yılan yastığı) bitkisinin doğal yağ asitleri kolon kromatografisi yöntemi ile izole edilmiştir. TLC plakalarına göre, 7 madde (R1, R2, R3, R4, R5, R6, ve R7) elde edilmiş ve NMR analizlerinde R7 maddesi dışında diğer maddelerin yağ asidi karışımları olduğu saptanmıştır. Yağ asitlerinin analizi GC-MS ile belirlenmiştir. R7 maddesinin, 2D-NMR analiz sonuçlarına göre  $\beta$ -Sitosterol ve Kampesterol olduğu anlaşılmıştır. İzolasyonları yapılan maddelerin GR aktiviteleri araştırılmıştır. R1 maddesi, GR aktivitesi üzerine aktivatör etkisi göstermiştir. R4, GR aktivitesi üzerine yarışmasız inhibisyon gösterirken, R6, yarışmalı inhibisyon göstermiştir. % Aktiviteye karşı inhibitör konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Bu grafik denkleminde R4 ve R6 maddelerinin IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 0.193 mg/mL, 3.98  $\mu$ g/mL olarak bulunmuştur (Kıvanç ve Türkoğlu, 2019).

Glutasyon redüktaz enzimini inhibe etme yeteneklerini değerlendirmek için kimyasal olarak on dört flavonoid içeren bir yapı aktivite çalışması yapılmıştır. Aynı hidroksil konfigürasyonuna sahip farklı sınıflardaki flavonoidlerin I<sub>50</sub> değerlerini karşılaştırarak, GR enziminin inhibisyonu için aşağıdaki potansiyel sıra belirlenmiştir: antosiyanidin> dihidroflavonol = kalkon> flavonol> kateşin. Delphinidin klorür ve mirisetin tarafından yapılan enzim inhibisyonu, inhibisyon mekanizmasında oksijenin rol oynadığı bir N<sub>2</sub> atmosferinde kısmen önlenmiştir. Oksijen türlerinin enzim inhibisyonundaki rolünü belirlemek için GR; ya mannitol, dietilenetriaminepenta-asetik asit (DETAPAC), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ya da flavonoidler tarafından enzim inhibisyonu için deneylerden önce SOD ve CAT ile önceden inkübe edilmiştir. Delphinidin klorür ve mirisetin ile yapılan enzim inhibisyonu, SOD ilavesiyle baskılandı, bu da süperoksitin (O<sup>-2</sup>) dahil olduğunu ortaya koymuştur. Süperoksitin (O<sup>-2</sup>) GR inhibisyonundaki rolünü araştırmak için, flavonoid varlığında ve yokluğunda bir süperoksit üreten sistem kullanılmıştır. O<sup>-2</sup> üreten sistem, flavonoid

yokluğunda GR'yi inhibe edememiştir, ancak mirisetin ile inhibisyonu arttırmıştır. Aynı zamanda  $O^2$  üreten sistem sırayla GR enzimini inhibe eden reaktif bir ara ürün oluşturmak için doğrudan bazı flavonoidlerle reaksiyona girmiştir. Bu bulgular, flavonoidler tarafından GR enziminin inhibisyon mekanizmasının karmaşık olduğunu ve oksijene bağımlı ve oksijenden bağımsız bileşenlere sahip olabileceğini göstermektedir (Elliott ve ark., 1992).

*Plasmodium falciparum* glutasyon redüktaz (PfGR) tropikal sıtmaya karşı bir ilaç hedefi olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada *Escherichia coli* SG5'te (DE3) PfGR ifadesi ve bu protein için izolasyon prosedürleri rapor edilmiştir. Rekombinant PfGR, enzimik özelliklerinde gerçek enzimden farklı değildir, turnover sayısı  $9900 \text{ dak}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Dimerik flavoenzim redoks bağımlı absorpsiyon spektrumları sergiler; tekli triptofan kalıntısı (57.2 kDa alt birim başına) kuvvetli bir şekilde floresandır. PfGR, tedavi edici konsantrasyonlarda antimalarial ilaç metilen mavisi tarafından inhibe edilebilir; nonkompetitif inhibisyon için  $K_i$  değeri  $6.4 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Metilen mavisine karşı duyarlılık aynı zamanda yüksek iyonik kuvvette de gözlenir, böylece insan GR enzimine benzer şekilde kristalli enzim-ilaç komplekslerinin analizi öngörülebilir (Färber ve ark., 1998).

Fura-2 floresan görüntüleme metodu kullanılarak PC12 hücrelerinde hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonu ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) üzerine karmustin (1,3-bis (2-kloroetil) -1-nitrozoüre) bileşiğinin (kemoterapi ilacı) etkileri incelenmiştir. Karmustin ( $100\mu\text{M}$ ), yaklaşık 3 saat içinde gelişen kalsiyumda ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gecikmiş bir artışa neden olmuştur. Bu etki, butiyonin sülfoksimin (glutasyon sentez inhibitörü) ile ön işleme tabi tutulan hücrelerde arttırılmıştır ve bir antioksidan olan deferoksamin ( $50 \mu\text{M}$ ) ile tedavi edilen hücrelerde baskılanmıştır. Karmustin kaynaklı kalsiyumdaki ( $\text{Ca}^{2+}$ ) artış kesinlikle hücre dışı  $\text{Ca}^{2+}$  varlığına bağlı olduğu görülmüştür ve L tipi voltaj kapılı  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları dihidropiridin blokerleri tarafından inhibe edilebilir (nimodipin veya nitrendipin,  $10 \mu\text{M}$ ). Karmustin bileşiğinin L tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları ile hücre dışı  $\text{Ca}^{2+}$  akışını indüklediği ve GR inhibisyonundan kaynaklanan oksidatif stresin aracılık ettiği sonucuna varılmıştır (Doroshenko ve Doroshenko, 2004).

Glutasyon redüktaz antimikrobiyal kemoterapide kullanılan bazı ilaçlar tarafından inhibe olur. Demir ve ark. yaptığı bir çalışmada, tavuk karaciğerinden saflaştırılan GR aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri araştırılmıştır. Bu enzim

% 35 verim ile 1636 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivite 88.28 EU mg/protein olarak hesaplanmıştır. Enzimin saflığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edilmiştir. Ofloksasin, levofloksasin, sefazolin ve sefepim antibiyotiklerinin saf GR aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri belirlenmiştir. Bütün antibiyotikler GR aktivitesini inhibe etmiştir. Bu antibiyotikler için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla; ofloksasin için 0.159 mM ve 0.5840 ± 0.3121 mM, levofloksasin için 0.090 mM ve 0.3833 ± 0.2725 mM, sefazolin için 14.871 mM ve 34.5002 ± 4.2628 mM ve sefepim için 4.589 mM ve 4.9504 ± 3.8928 mM olarak bulunmuştur (Demir ve ark., 2006).

Tiyol redoks durumu (TRD), hücre içi oksidatif stresi yansıtan önemli bir parametredir ve çeşitli normal ve anormal biyokimyasal işlemlerle ilişkilidir. Hücre içi TRD'yi artırmak için kullanılacak ajanlar, TRD ile ilgili araştırmalarda önemli araçlar olabilir. Glutatyon redüktaz (GR), TRD'nin homeostazında kritik bir enzimdir. Enzim, yüksek bir GSH: GSSG oranını korumak için GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalize eder. Enzimin inhibisyonu TRD'yi arttırmak için kullanılabilir. Çeşitli GR inhibitörlerinin raporlarına rağmen, maya GR'ye karşı IC<sub>50</sub>=647 µM'ye sahip bir antikanser ilacı olan N, N-bis (2-kloroetil) -N-nitrosoüre, literatürde en yaygın kullanılan GR inhibitörü olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, spesifik olmayan etkileşimlerin neden olduğu toksisite ve ayrıca DNA sentezinin inhibisyonu, bir GR inhibitörü olarak N, N-bis (2-kloroetil) -N-nitrosoürenin kullanımını karmaşıktırır. 2 - asetilamino - 3 - [4 - (2 - a setilamino - 2 - karboksietil sülfanilthio karbonilamino) feniltio karbamoilsülfanil] propiyonik asit (2-AAPA) geri dönüşümsüz bir GR inhibitörü olarak belirlenmiştir. 2-AAPA, ticari olarak temin edilebilen reaktiflerden tek adımlı sentez yoluyla hazırlanmıştır. 2-AAPA'nın maya GR enzimine karşı K<sub>i</sub> ve k<sub>inact</sub> sırasıyla 56 µM ve 0.1 dakika<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. % 80'den fazla maya GR inhibisyonu üreten konsantrasyonda 2-AAPA; glutamilsistein sentetaz, glutatyon sentetaz, katalaz ve süperoksit dismutaza karşı inhibisyon göstermemiştir, ancak glutatyon S-transferaz ve glutatyon peroksidaza karşı minimal inhibisyon göstermiştir. CV-1 hücrelerinde, 2-AAPA (0.1 mM), 20 dakikada % 97 GR inhibisyonu, % 25 GSH azalması ve GSSG'de 5 kat bir artış üretmiştir (Seefeldt ve ark., 2009).

Glutatyon redüktazın (GR) inhibisyonunun, redükte glutatyonda (GSH) bir azalmaya neden olduğu ve okside glutatyonda (GSSG) bir artışa neden olduğu

gösterilmiştir. Hücre modeli olarak bir maymun böbrek hücre hattı ve bir GR inhibitörü olarak 2 – asetil amino – 3 – [4 – (2 – asetil amino – 2 – karboksi – etil sülfanilthio – karbonil amino) fenil tiokarbamoil sülfanil] propiyonik asit (2 – AAPA) kullanılarak, GR inhibisyonunun hücrel tiyol redoks durumu ve ilgili sistemler üzerindeki etkilerinin araştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada 2-AAPA inhibitörü GSH'ı azaltırken, GSSG'yi artırmıştır. Aynı zamanda, bu inhibitörün NADH/NAD<sup>+</sup> ve NADPH/NADP<sup>+</sup> oranlarını da arttırdığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, inhibisyon, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu veya antioksidan savunma enzim sistemlerinin [GR, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz] ekspresyonunu ve GSH biyosentezinde [ $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentez] yer alan enzimleri etkilememiştir (Zhao ve ark., 2009).

Reaktif oksijen türlerinde (ROS) indüklenen apoptozda (programlı hücre ölümü) glutatyon redüktazın (GR) hücrel rolleri, GR ile transfekte edilmiş HepG2 hücreleri kullanılarak incelenmiştir. GR'nin aşırı ifadesi, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH/GSSG) oranında belirgin bir artışa ve stabil transfektanlarda ROS seviyelerinde önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), apoptoz için en uygun koşul altında, hücrel canlılığı ve toplam GSH içeriğini önemli ölçüde azalttı ve sahte transfekte hücrelerde ROS seviyesi, apoptotik yüzdesi ve kaspaz-3 aktivitesini arttırmıştır. Sonuç olarak, GR oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynayabilir (Kim ve ark., 2010).

Plumbagin, ilk olarak bitkilerin *Plumbago* cinsinde tanımlanmış sekonder bir metabolittir. Anti-ateroskleroz, antikanser, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, kardiyotonik, immünoşüpresif ve nöroprotektif aktivitelere sahip olan bir naftokinon bileşiğidir. Bu çalışmada plumbagin bileşiğinin HepG2 hepatosellüler karsinoma hücreleri ve ayrıca LLC akciğer kanseri hücreleri, SiHa servikal karsinoma hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Plumbagin, HepG2 hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmıştır. Benzerlik grup yaklaşımı (SEA) - son teknoloji ürünü bir keminformatik teknik kullanılarak plumbaginın önceden bilinmeyen iki hücrel hedefi belirlenmiştir: tioredoksin redüktaz (TrxR) ve glutatyon redüktaz (GR). Bu daha sonra protein ve hücre bazlı analizler kullanılarak doğrulanmıştır. Plumbagin doğrudan TrxR ile azaldığını ve bu azalmanın TrxR inhibitörü sodyum aurotiomalat (ATM) tarafından inhibe edildiğini gözlemlenmiştir. Plumbagin ayrıca GR enziminin



aktivitesini de düşürmüştür. Plumbagin ve GR enzim inhibitörü olan sodyum arsenit, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini arttırmıştır ve bu artış, HepG2 hücrelerinde ROS süpürücü N-asetil-sistein (NAC) ile ön işleme tabi tutularak önemli ölçüde azaltılmıştır. Sonuç olarak, plumbagin, TrxR ve GR enzimleri ile doğrudan etkileşime girerek ve böylece hücre içi ROS seviyelerini artırarak antikanser etkisi göstermiştir (Hwang ve ark., 2015).

Dalmızrak ve ark. yaptığı bir çalışmada glutatyon redüktaz (GR) ve hiperisin arasındaki etkileşim incelenmiştir. İnhibisyon tipi, artan hiperisin konsantrasyonlarında ve ayrıca farklı glutatyon disülfid (GSSG) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) konsantrasyonlarında GR aktivitesindeki değişiklikler ölçülerek belirlenmiştir ve hiperisin bağlama pozunu, moleküler yerleştirme ile tahmin edilmiştir. Buna göre hiperisin, GR aktivitesi üzerine etkili bir inhibitör etkisi göstermiştir. Değişken substrat GSSG olduğunda, inhibisyon tipinin kompetitif olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, değişken substrat NADPH olduğunda, inhibisyon tipi lineer karışık tip yarışmalı görünmektedir. Hesaplamalı analizler, hiperisin bileşiğinin GR'nin büyük intermonomer boşluğuna bağlandığını ve enzimin aktif bölgesindeki redoks-aktif disülfür merkezinin normal konumlanmasına/çalışmasına engel olabileceğini göstermektedir. Genel olarak, fotodinamik tedavide reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla oksidatif stresin desteklenmesindeki rolünün yanı sıra, hiperisin de kanser hücrelerini GR enzimini inhibe ederek zayıflatabilir (Dalmızrak ve ark., 2018).

*Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağlarının antioksidan aktivitesi test edilmiştir. Bu bitkinin tohumlarından elde edilen timokinon, karvakrol, t-anethole ve 4-terpineol bileşiklerinin antioksidan aktivitelerini hızlı değerlendirme için iki TLC tarama yöntemi kullanılmıştır ve bu bileşiklerin önemli derecede radikal süpürücü özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Burits ve Bucar, 2000).

Khatab ve Nagi tarafından yapılan bir çalışmada, N(omega)-nitro-L-arjinin metil esteri (L-NAME) ile nitrik oksit sentezinin kronik inhibisyonu oluşmuş ratlarda *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağından elde edilen timokinon (TQ) bileşiğinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ratlar kontrol, L-NAME, TQ ve L-NAME + TQ tedavi gruplarına ayrılmıştır. 4 hafta L-NAME uygulanmasıyla ratlarda hipertansiyon oluşturulmuştur (50 mg/kg/gün p.o.). Ratlara 4 hafta boyunca sadece timokinon ve

timokinon, L-NAME uygulanmıştır. Ratların kesilmiş ve izole edilen serum ve böbrek dokularındaki kreatinin ve glutatyon seviyeleri tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırılan L-NAME gruplarının sistolik kan basıncında sürekli bir artış gözlenmiştir. TQ (0.5 ve 1 mg/kg/gün p.o.) ile eş zamanlı tedavi sonucunda doza bağlı L-NAME ile indüklenen kan basıncındaki artış azalmıştır. L-NAME verilen ratların böbrek dokularındaki glutatyon redüktaz seviyesinde azalma, serum kreatinin seviyesinde ise önemli ölçüde artış görülmüştür. TQ ile tedavi edilen ratlarda yükselen kreatinin seviyesi azalmış, GSH ise normal seviyeye ulaşmıştır. TQ, enzimatik ve enzimatik olmayan sistemlerde süperoksit radikalının *in vitro* üretimini inhibe etmiştir. Bu çalışmanın sonucunda L-NAME ile indüklenen hipertansiyona ve antioksidan akivitesi ile böbrek hasarına karşı TQ bileşiğinin koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir (Khattab ve Nagi, 2007).

Streptozotosin (STZ) kullanılarak deneysel bir diabetes mellitus oluşturulan modellerin kalp ve beyindeki oksidatif stres üzerine *Nigella sativa* yağının ve aktif bileşeni olan timokinonun (TQ) etkisi araştırılmıştır. Oksidatif stres; kardiyak ve beyin nitrik oksit, lipid peroksit seviyeleri, glutatyon (GSH) ve antioksidan enzim aktiviteleri, glutatyon-S-transferaz (GST) ve katalaz ölçülerek değerlendirilmiştir. Aynı zamanda Kardiyak metabolik hasar; üzerine *Nigella sativa* yağı veya TQ bileşiğinin etkisi incelenmiştir. Beyin monoamin seviyeleri de değerlendirilmiştir. STZ diyabeti kalp ve beyin NO ve malondialdehit konsantrasyonlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu değişiklikler, ratlara *Nigella sativa* yağı ve TQ ile ön muamelesiyle zayıflatılmıştır. STZ diyabeti GST, GSH ve katalazdaki belirgin bir azalma ile oksidatif stresi tetiklemiştir. Bu düşürülmüş seviyeler, *Nigella sativa* yağı veya TQ uygulamasıyla tedavi edilmiştir. Diyabet seyri sırasında, norepinefrin ve dopamin konsantrasyonlarında belirgin bir artış ve kontrol grubuna kıyasla serotonin konsantrasyonunda belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu bulgular *Nigella sativa* ya da TQ'nun oral yoldan verilmesiyle kısmen tersine çevrilmiştir. *Nigella sativa* ve TQ'nun antioksidan özelliklerinden dolayı beyin monoaminlerinde STZ-diyabetin neden olduğu değişiklikleri iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Hamdy ve Taha 2009).

Fitokimyasal bileşikler, kanser hastalarında sınırlı toksisiteye sahip yeni nesil antikanser ajanlar olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Nigella sativa* tohumlarının ana bileşeni olan timokinonun (TQ) daha uzun yaşama, *in vitro* kanser

hücrelerinin istilası ve *in vivo* olarak tümör büyümesi üzerindeki potansiyel etkisi araştırılmıştır. Toksik olmayan konsantrasyonlarda TQ bileşiğinin uygulanması ile LNM35, MDA - MB - 231 ve MDA - MB231-1833 kanser hücrelerinin istilacı potansiyelinin inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, TQ'nun, hücrel yaşayabilirliği inhibe etmek için DNA'ya zarar veren ajan sisplatin ile sinerjize olduğu belirlenmiştir. Timokinonun antikanser aktivitesi, LNM35 akciğer hücreleri ile aşılınmış olan atimik farelerde de araştırılmıştır. Timokinonun (10 mg / kg / i.p.) 18 gün boyunca verilmesi, LNM35 tümör büyümesini % 39 oranında inhibe etmiştir (P <0.05). Tümör büyümesi inhibisyonunun, aktive edilmiş kaspaz -3'te anlamlı bir artış ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, TQ tedavisinin HDAC2 proteinlerinin önemli bir inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Mevcut deneysel bulgular ışığında, timokinon ve analoglarının tek başına antikanser ajan olarak veya sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde klinik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Attoub ve ark., 2012).

Sisplatin (CDDP), çeşitli tümör tipleri için kullanılan güçlü antikanser ajanıdır. Timokinon (TQ), kemoterapiler için antikanser ve kemo modülatörü olarak büyük dikkat çeken doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Alaufi ve ark. yaptığı bir çalışmada, normal oral epitel hücrelerinin aksine, insan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerine karşı timokinon, CDDP ve bunların kombinasyonlarının potansiyel sitotoksitesini incelenmiştir. CDDP benzer şekilde hem kafa hem de boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerini (UMSCC-14C) ve normal oral epitel hücrelerini (OEC) öldürmüştür. Tek başına TQ, UMSCC-14C hücrelerine karşı önemli sitotoksitesite sağlarken, normal oral epitel hücrelerine (OEC) karşı daha zayıf bir öldürme etkisi göstermiştir. TQ ve CDDP'nin ekitoksik kombinasyonu, hem UMSCC-14C hem de OEC hücrelerine karşı sinerjik etkileşime katkı göstermiştir. Yalnızca TQ, 6 saat sonra olduğu gibi UMSCC14C hücrelerinde apoptotik hücre fraksiyonunu arttırmıştır. Öte yandan, TQ, OEC'de apoptozda sınırdaki bir artışa neden olmuş ve hatta sadece CDDP'nin indüklediği apoptozu azaltmıştır. Apoptoz indüksiyon sonuçları hem UMSCC-14C hem de OEC hücrelerinde p53, Bcl-2 ve Kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerle doğrulanmıştır (Alaufi ve ark., 2017).

Likopen insan kanında ve dokularında bulunan bir non-provitamin A karotenoiddir. İnsan için başlıca besin kaynağı olan likopen kaynakları domates ve

domates ürünleridir. Likopen açısından zengin bir diyetin bazı kanser türlerine koruyucu etkileri, epidemiyolojik çalışmalar temelinde gözlemlenmiştir. Likopenin koruyucu etkilerinin potansiyel olarak altında yatan birkaç biyokimyasal mekanizma vardır. Bunlar, tekli oksijenin söndürülmesi ve peroksil radikallerinin temizlenmesi, hücre-hücre iletişimi ve büyüme kontrolünün indüksiyonu gibi antioksidan aktiviteleri içerir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar bu varsayımı desteklemektedir. Diyet likopeni insan organizmasında emilir ve dağıtılır, ancak biyoyararlanımı, gıda işleme veya yağın pıhtılaşması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Likopenin biyolojik olarak aktif oksidasyon ürünleri insan plazmasında tanımlanmıştır (Sies ve Stahl, 1998).

Likopen, domateslerde, pembe greyfurtlarda ve diğer yiyeceklerde görülen kırmızıdan pembe renklere kadar sorumlu olan bir non-provitamin A karotenoid'dir. Diğer birçok doğal bileşenden farklı olarak, likopen, bitki dokusu matrisinde mevcut olduğunda işleme için genellikle stabildir. Son zamanlarda, likopen de potansiyel sağlık etkileri ile ilgili olarak çalışılmıştır. Son çalışmalar, likopen ve likopen içeren gıdaların tüketilmesinin kanser veya kardiyovasküler hastalık riskini etkileyebileceğini düşündürmektedir, bu hipotezi desteklemek için daha fazla klinik çalışma verisi gerekmektedir (Story ve ark., 2010).

Likopen, meyve ve sebzelerde yaygın olarak dağılmış bir karotenoiddir. Epidemiyolojik çalışmalar, likopen tüketiminin azalmış kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hayvan çalışmaları, likopen bileşiğinin memedeki dimetilbenz [ $\alpha$ ] antrasen (DMBA) kaynaklı karsinogeneze karşı koruyucu etki göstermiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar; (PAH), iki faz I enzimi, sitokrom P450 1A1 ve 1B1 ile metabolize edilebilen çevresel toksik maddelerdir. Bu reaksiyonların oluşturduğu ürünler DNA'ya saldıran kısımlardır. Bu genotoksik ara maddeler tarafından üretilen mutasyonun kanser başlangıcında önemli bir adım olduğuna inanılmaktadır. Üridin difosfat (UDP) - glukuronosiltransferazlar (UGT) gibi bazı faz II detoksifiye edici enzimler, bu genotoksik parçaların ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır. Bu çalışmada, memede PAH kaynaklı karsinogenezi önleyen likopenin mekanizması MCF-7 hücre kültürü modelinde araştırılmıştır. Likopenin CYP1 enzimleri üzerindeki inhibitör etkisi, etoksiresorufin-O-deilalaz deneyi kullanılarak rekombinant protein ve hücre kültüründe değerlendirilmiştir. CYP1A1 ve 1B1 ve UGT'nin messenger RNA ifadeleri, yarı kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu ile tahmin edilmiştir. Hücreler,

DMBA metabolitlerinden üretilen DNA lezyonuna karşı fito-bileşimin korunmasını ölçmek için DMBA ve likopen ile birlikte muamele edilmiştir. Likopen, rekombinant CYP1A1 ve CYP1B1'i inhibe etmiştir. MCF-7 hücrelerinde, likopen uygulaması, DMBA kaynaklı etoksiresorufin-O-deilaz aktivitesini % 20 oranında hafifçe azaltmıştır. Bu arada, mikrozomal UGT aktivitesinde dört kat bir artış gözlenmiştir. Bu çalışma, faz I enzim inhibisyonunun ve faz II enzim indüksiyonunun, PAH kaynaklı toksisiteye karşı belli başlı likopen kemoprotektif mekanizmaları olduğunu göstermiştir (Wang ve Leung, 2010).

Güçlü bir antioksidan olduğu öne sürülen likopen, oksidatif stres ile ilgili hastalıklarda koruyucu bir rol oynayabilir. Likopenin kolestaz patogenezindeki etkilerini anlamak için, likopenin oksidatif stres parametreleri ve karaciğer dokularında ve Wistar albino ratlarının lenfositlerinde deneysel biliyer (safra kesesi) obstrüksiyonun (engel) neden olduğu DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ratlar 3 gruba randomize edilmiştir. Sham (suni) grubuna suni bir işleme uygulanmıştır. BDL grubu safra kanalı ligasyonuna (BDL) tabi tutulmuştur ve BDL + L grubu BDL'ye tabi tutulmuştur ve 10 mg/kg vücut ağırlığı kadar likopen ile işlem görmüştür. 7 günlük tedaviden sonra karaciğer fonksiyonları, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı değerlendirilmiştir. Likopen tedavisi, BDL ratlarında karaciğer fonksiyon parametrelerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Ayrıca likopen, BDL ratlarında malondialdehit ve nitrik oksit seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon S transferaz aktivitelerini arttırmıştır. Likopen tedavisi ayrıca BDL ratlarının lenfositlerinde ve hepatositlerinde comet (tek hücreli jel elektroforezi) analizi ile değerlendirildiği üzere DNA hasarını azaltmıştır. Bu sonuçlar, likopenin akut kolestaz (tıkalı safra kanalları) üzerine koruyucu etkileri olabileceğini göstermektedir (Tokaç ve ark., 2015).

Likopen, bitkilerde oluşan bir antioksidan karotenoid bileşiğidir. Yapılan bir çalışmada, domates (*Solanum lycopersicum*), karpuz (*Citrullus lanatus* var. *Lanatus*), jak meyvesi (*Artocarpus heterophyllus*), muz (*Musa acuminata*), üzüm (*Vitis vinifera*), portakal (*Citrus reticulaa*) ve papaya (*Carica papaya*) taze meyvelerinde likopen içeriğini belirlenmiştir. Taze meyve örneklerindeki likopen heksan: etanol: aseton (2: 1: 1) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Domates, karpuz, jak meyvesi, muz, üzüm, portakal ve papayadaki likopen miktarları sırasıyla  $104.699 \pm 0.000$ ,  $144.27 \pm 0.001$ ,  $4.122 \pm$

0.000,  $31.189 \pm 0.001$ ,  $10.028 \pm 0.000$ ,  $13.1904 \pm 0.000$  ve  $45.342 \pm 0.000$  mg/kg olarak belirlenmiştir. En yüksek likopen miktarı karpuzda (*Citrullus lanatus* var. *Lanatus*) bulunurken, en düşük likopen miktarı jak meyvesinde (*Artocarpus heterophyllus*) gözlemlenmiştir (Suwanaruang, 2016).



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Çalışmamızda enzim saflaştırılmasında kullanılan insan eritrositi Van Kızılay Kan Merkezi'nden bir ünite kan alınıp işlenerek elde edilmiştir.

##### **3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler**

Çalışmalarımızda kullanılan timokinon, likopen, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), okside glutatyon (GSSG), redükte glutatyon (GSH), glisin, potasyum asetat, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, AppliChem GmbH'den; serum albumin, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), trihidroksimetilaminometan (TRIS), potasyum fosfat, potasyum klorür, izopropanol,  $\beta$ -merkapt etanol, magnezyum klorür, Sigma Chemical Comp.'den; sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum dihidrojenfosfat, etanol, asetik asit, Coomassie brillant blue G-250, E. Merck AG'den;  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form, NADPH),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form, NADP<sup>+</sup>) E. Fluka Chemical Corp.'dan; ve 2' 5' ADP-Sepharose 4B Amersham Biosciences'den temin edildi. Elektroforez markırı SM0671 fermentas Life Science Thermo Fisher Scientific'ten alındı.

##### **3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar**

Klinik santrifüj: Hettich EBA 3 S

Klinik santrifüj: Hettich Universal 320

Spektrofotometre: Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Elektroforez tankı: BIO RAD (dikey)

Güç kaynağı: Thermo scientific

Peristaltik pompa: Eyela Micro Tube Pump MP-3

Karıştırıcı (Vorteks) : Mixer VX 20

Hassas terazi: Shimadzu Uni Bloc

Kromatografi kolonu: Sigma 1×10 cm

Otomatik pipetler: Eppendorf, Volac R 880/A,880/D, 880/E

İnkübatör: G24 Enviromental İncubatur Shaker

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Grand Technical. Specification 6G- 20 to 100 °C

Soğutmalı santrifüj: Hettich Universal 320R

### 3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan bidistile su, saf ve deiyonize sudur.

#### 3.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 50 mM Tris-HCl / 1mM EDTA (pH= 8.0): 0.6057 g (5 mmol) Tris ve 0.0292 g (0.1 mmol) EDTA alınarak 90 mL destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8.0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 20 mM GSSG Çözeltisi: 65.66 mg okside glutatyon (0.1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Toplam hacim 5 mL'ye tamamlandı.

3. 2 mM NADPH Çözeltisi: 8.3 mg NADPH ( $9.9 \times 10^{-3}$  mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 5 mL'ye tamamlandı.



### 3.1.3.2. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 50 mM  $K_2HPO_4$  /1 mM EDTA, 1mM DTT pH= 7.3 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 8.71 g  $K_2HPO_4$  (50 mmol), 0.292 g EDTA (1 mmol) ve 0.156 g DTT (1 mmol) alınarak 950 ml suda çözüldü. pH'sı 7.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

2. 0.1 M K-asetat/0.1 M K-fosfat, pH= 7.85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan birinci tampon): 9.8 g Potasyum-asetat (0.1 mol) ve 17.42 g Potasyum-fosfat (0.1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH= 7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

3. 0.1 M K-fosfat/0.1 M KCl, pH= 7.85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan ikinci tampon): 17.42 g Potasyum-fosfat (0.1 mol) ve 7.45 g (0.1 mol) KCl karışımının hacmi su ile 800 mL'ye tamamlandı. pH'sı 7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

4. 50 mM K-fosfat/1 mM EDTA, 1mM GSH, 0.5 mM NADPH, pH= 7.3 (Afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0.435 g Potasyum-fosfat, 0.0146 g EDTA, 0.0153 GSH, 0.0208 g NADPH karışımı 45 mL suda çözüldü. pH= 7.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

5. 0.1 M Na-asetat/0.5 M NaCl (pH= 4.5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4.1 g Sodyum-asetat (50 mmol) ve 14.61 g NaCl (0.25 mol) alınıp bir miktar suda çözüldü, pH= 4.5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

6. 0.1 M Tris / 0.5 M NaCl (pH= 8.5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 6.05 g Tris (50 mmol) ve 14.61 g NaCl (0.25 mmol) bir miktar suda çözüldükten sonra pH= 8.5'e ayarlandı. Daha sonra hacim 500 mL'ye tamamlandı.

7. % 0.02'lik  $NaN_3$  çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg  $NaN_3$  alınarak 50 ml suda çözüldü.

### 3.1.3.3. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

- 1.) 1.5M Tris-HCl (pH= 8.8): 18.17 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mLbidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 2.) 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8): 6.057 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mLbidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 3.) %30 Akrilamid - %2.7 Bisakrilamid çözeltisi: 14.6 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid 40 mLbidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- 4.) %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak bidistile su ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- 5.) %10'luk SDS: 1 g SDS tartılarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- 6.) Yürütme tamponu: 3.028 g Tris ve14.410 g glisin tartılarak 950 mL bidistile suda çözüldü, %10'luk SDS'den 10 mL ilave edildi, pH= 8.3'e ayarlandı ve toplam hacim bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 7.) Numune tamponu: 1.5 M Tris-HCl (pH= 6.8)'den 2.5 mL, %10'luk SDS'den 4 mL, %100'lük gliserinden 2 mL ve  $\beta$ -merkaptoetanolden 1 mL alınarak hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- 8.) Jel boyama çözeltisi: 40 mL metanol, 7 mL asetik asit ve 0.025 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözümlenerek hacim bidistile su ile 100 mL'yetamamlandı
- 9.) I. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL bidistile su karıştırılarak elde edildi
- 10.) II. Jel yıkama çözeltisi: 5 mL metanol, 7 mL asetik asit ve 88 mL bidisitle su karıştırılarak elde edildi
- 11.) Su ile doyurulmuş n-bütanol: 10 mL n-bütanol ve 1 mL bidistile su karıştırıldı.
- 12.) % 0.1'lik brom timol mavisi çözeltisi: 0.01 g indikatör,1 mL bidistile su içerisinde çözüldü ve toplam hacim bidistile su ile10 mL'ye tamamlandı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Protein tayini

#### 3.2.1.1. Kalitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kalitativaif protein tayinleri yapıldı. Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1981). İnsan eritrositinden elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu yöntemle göre belirlendi. Fraksiyonlar kuvarts küvetlere alınarak absorbandsları köre karşı okundu. Kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

#### 3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu yöntem o-fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{\max}= 465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{\max}=595$  nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (ortalama 2 dk.). Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100  $\mu\text{g}$  arasındadır (Bradford, 1976).

Ölçüm şu şekilde gerçekleştirildi; 1 mL'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltilisinde tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{L}$  alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. 10 dk inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan

karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri standart grafik halinde verildi.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden (her bir fraksiyondan) ayrı ayrı 0.1 mL alındı. 5 ml Coomassie reaktifi ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak 10 dkakika inkübasyona bırakıldı. Yine kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılarak 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir fraksiyon için bulunan absorbans değerleri standart grafikten  $\mu\text{g}$ .protein değerine dönüştürüldü.

### **3.2.2 Afinite kolonunun hazırlanması**

10 mL'lik yatak hacmine sahip afinite kolonu için 2.5 gr kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak 400 mL destile su ile birkaç defa yıkandı. Olası katı maddeler uzaklaştırılarak jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu ile uzaklaştırıldıktan sonra dengeleme tamponu (50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  / 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH= 7.3) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel 1 x 10 cm'lik kolona yerleştirilerek paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile 3 gün boyunca dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile dengeleme tamponununun 280 nm'de absorbanslarının birbirine eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu saflaştırma yapmak için hazır hale getirilmiş oldu.

### **3.2.3. İnsan eritrositinden glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.3.1. Kan numunelerinin alınması ve hemolizat eldesi**

Bu amaçla Van Kızılay Kan Merkezi'nden bir ünite kan alındı ve antikoagulantlı tüplere konuldu. Kanlar alındıktan sonra +4 °C'de muhafaza edildi ve en çok iki gün içerisinde kullanıldı. Eşit miktarda numune bırakılan tüpler 20 dakika 1.500 rpm'de santrifüjlendi. Sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde alındı. Altta kalan eritrositler 0.154 M NaCl çözeltisi ile iki defa yıkanıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositler, hacimlerinin 1.5 katı destile buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizin tam gerçekleşmesi için 4°C'de yarım saat karıştırıldı. Hücre zarlarını uzaklaştırmak için hemolizat 8.500 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Tüplerin dibindeki

beyaz renkli hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatli bir şekilde alındı. Hücre zarlarından arındırılmış olan hemolizatın pH'sı katı sodyum fosfat ile dengeleme tamponunun pH'sı olan 7.3'e ayarlandı. Böylece eritrosit hemolizatı kolona uygulanabilecek hale getirildi.

### **3.2.3.2. Eritrosit hemolizatının afinite kolonuna tatbiki ve enzim elüsyonu**

İnsan eritrosit hemolizatı daha önceden hazırlanıp dengelenmiş olan 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kırmızı renk tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirilmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Ardından, kolondan yıkama-I 0,1 M K-fosfat / 0.1 M K-asetat tamponu (pH=7,85) 100 mL geçirilerek ilk yıkama yapıldı. Daha sonra kolona 100 mL yıkama-II tamponu (0.1 M K-fosfat / 0.1 M KCl, pH=7.85) kolondan geçirildi. Yıkama-II tamponu kolondan geçirilirken aynı zamanda spektrofotometre ile yıkamanın olup olmadığı kontrol edildi. Yıkama ise spektrofotometrik okumada absorbans değerinin 0.1 olmasıyla tamamlandı. Bu işlemle, kolonun yıkanması tamamlandı ve elüsyon tamponu (50 mM K-fosfat/1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.5 mM NADPH, pH=7.3) kolona verilerek elüe edildi (Boggaram ve ark., 1979; Carlberg ve Mannervik, 1981).

İnsan eritrosit hemolizatından saflaştırılan GR ile çalışılırken literatürde kullanılan optimum şartlar uygulandı. Elüsyonlar 3'er mL olacak şekilde tüplere alındı, her bir elüsyonun aktivite tayinleri yapıldı. Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elektroforez bantları elde edildi.

### **3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü**

GR enzimi saflaştırıldıktan sonra % 4-10 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Öncelikle elektroforez plakaları su ile ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaların her iki kenarında aralık oluşturucu çubuklar kullanılarak plakalar üst üste getirildi ve kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar

sabitleştirildikten sonra içerisinde sızdırmayı engelleyen sünger içeren jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.3 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Bu jelin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabakası dökülerek jelin pürüzsüz olması sağlandı (dökme işlemi yana eğilerek yapılır). Bir saat ayırma jelinin donması beklenip ayırma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra yağma jeli hazırlandı. Hazırlanan yağma jeli, ayırma jelinin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarını oluşturmak için tarak jelin içine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Tarak uçlarında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi (hava kabarcığı oluşur ise oksijen, polimerizasyonu inhibe edecek ve kuyucukların alt tarafındaki jel yüzeyinde bozukluğa neden olacaktır). Yağma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve jelin üst kısmının çok kurumaması engellendi. Yağma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak numune kuyuları belirlendi. Her bir kuyucuk saf su ile yıkandı, daha sonra kuyucuklar yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örneklerine numune tamponu eklendikten sonra üzerine takip boyası olarak % 0.1 bromtimol mavisi damlatıldı. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi ve bu karışım 65 °C'de su banyosunda 90 saniye bekletildi. Her bir kuyucuğa 20, 30, 40 ve 50 µL enzim örneği ilave edildi. Numuneler ince bir enjektör ile jeldeki kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 60 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelerek burada birikti. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütme işlemine devam edildi. Numune tamponuna katılan brom timol mavisi ile numune bantları takip edildi ve takip boyası aşağıya ulaştığında akım kesildi. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel boyama çözeltisine bırakıldı ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletilerek boyanması sağlandı. Jel boyandıktan sonra çözeltiden çıkarılarak I. yıkama çözeltisine bırakıldı. Daha sonra bantların daha iyi belirginleşmesi için jel II. yıkama çözeltisine bırakıldı. Jelin rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).

Ayırma jeli: 5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH= 8.8), 6.6 mL % 30 akrilamid- % 2.7 bisakrilamid, 0.2 mL % 10'luk SDS, 6.6 µL TEMED, 100 µL % 10'luk amonyum persülfat (APS) ve 8 mL bidistile su karıştırıldı.

Yığıma jeli: 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8), 1.33 mL % 30 akrilamid % 2.7 bisakrilamid, 0.1 mL % 10'luk SDS, 5 µL TEMED, 50 µL % 10'luk APS ve 6.1 mL bidistile su karıştırıldı. APS çözeltisi taze hazırlandı ve jel çözeltisi karıştırılırken hemen APS eklendi.

### **3.2.5. İnsan eritrosit GR enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlığının belirlenmesi**

İnsan eritrosit GR enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bu metod proteinleri ve enzimleri denatüre eder. Birden fazla alt birimleri bulunanları ayırır. Elektroforez resminde gözlenen bant toplam molekül ağırlığı değil, alt birimlerinin molekül ağırlığıdır. Bu amaçla elektroforez, bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Ancak molekül ağırlığını belirlemek için standart proteinlerin yürütülmesi gereklidir. Bu nedenle molekül ağırlıkları 10 kDa ile 170 kDa aralığında değişen standart proteinlerden oluşan kit (Fermentas, SM0671) kullanıldı. Jel hazırlanıp elektroforez tankına yerleştirildikten sonra kuyulardan birine 10 µL standartları ihtiva eden çözelti yüklendi. Diğer kuyulara ise enzim numuneleri tatbik edilerek yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel yıkandı ve fotoğrafı çekildi. Enzim ve standartların  $R_f$  değerleri  $R_f = \text{enzimin yürüme mesafesi} / \text{boyanın yürüme mesafesi}$  formülünden hesaplanarak  $R_f - \log M_A$  standart grafiği çizildi. Bu grafikten ve grafiğin denkleminde yararlanarak  $R_f$  değeri hesaplanan insan eritrosit glutatyon redüktaz enziminin molekül ağırlığı hesaplandı (Laemmli, 1970).

Çizelge 3.1.SDS-PAGE elektroforezi için ayırma jeli ve yığıma jeli konsantrasyonları

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
Tris-HCl (pH= 8.8)	5 mL	-
Tris-HCl (pH= 6.8)	-	2.5 mL
% 30 akrilamid - % 2.7 bisakrilamid	6.6 mL	1.33 mL
% 10'luk SDS	0.2 mL	0.1 mL
TEMED	6.6 µL	5 µL
% 10'luk APS	100 µL	50 µL
Bidistile su	8 mL	6.1 mL

### 3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçümü



Glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa dayanmaktadır. Birincisi; yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren NADPH 340 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NADPH'ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de takip edilmektedir (Bogaram ve ark., 1979; Carlberg ve Mannervik, 1981).

Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi FAD'li ve FAD'sız olmak üzere iki değişik ölçüm yapılmaktadır. Bazen biri bazen de her iki türlü ölçüm yapılarak karşılaştırma yapılmaktadır. Bu çalışmada FAD (Flavin Adenin Dinükleotid) kullanılmadan ölçüm yapıldı.



Çizelge 3.2. İnsan eritrosit GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kontrol Küveti	Numune Küveti
Stok Aktivite Çözeltileri	Hacim (µL)	Hacim (µL)
50 mM Tris-HCl,	50	50
1 mM EDTA		
20 mM GSSG	30	30
2 mM NADPH	50	50
Su	Değişken	Değişken
	3 dakika inkübasyon	
Enzim numunesi	-	30

Aktivite ölçüm küvetleri (Çizelge 3.2) gösterildiği gibi önce enzim numunesi katılmaksızın pipetlendi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra enzim numunesi küvete eklenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Başlangıçta ve 30 saniyede bir olmak üzere 3 dakika boyunca absorbans değerleri kaydedildi (Boggaram ve ark., 1979; Carlberg ve Mannervik, 1981).

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül (3.1) kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta OD}{6.22} \times \frac{V_c}{V_e} \times f \quad (3.1)$$

A: ml başına enzim ünitesi (EU/mL)

$\Delta OD$ : Bir dakikadaki absorbans değişimi

$V_c$ : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

$V_e$ : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

f: Seyreltme faktörü

6.22: 1mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

### 3.2.7. Timokinon ve Likopen Bileşiklerinin Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmamızda timokinon ve likopen bileşikleri kullanıldı.

Timokinon; 2 miligram timokinon bileşiği tartılarak alındı, 25 µL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Daha sonra saf su ile hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

Likopen; 5 miligram likopen bileşiği tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

### 3.2.8. Eritrosit GR enzim aktivitesi üzerine timokinon ve likopen bileşiklerinin etkilerinin belirlenmesi

İnsan eritrositinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerine timokinon ve likopen bileşiklerinin etkisini belirlemek için küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda timokinon ve likopen bileşiklerinin ilave edilmesiyle aktivite değerleri okundu. Aktivite çalışmaları süresince küvet içeriği gösterilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. İnsan Eritrosit GR enziminin timokinon ve likopen bileşiklerine ait aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kontrol Küveti	Numune Küveti
Stok Aktivite Çözeltileri	Hacim (µL)	Hacim (µL)
50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA	50	50
20 mM GSSG	30	30
2 mM NADPH	50	50
Su	Değişken	Değişken
Timokinon veya Likopen	Değişken	Değişken
	3 dakika inkübasyon	
Enzim numunesi	-	30

İnsan eritrositten saflaştırılan GR enzim aktivitesine olan etkilerini araştırılmasına yönelik olarak timokinon ve likopen bileşikleri çalışıldı. Bu bileşiklere ait sonuçlar gösterilmiştir (Çizelge 4.4).

### **3.2.9. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine etkisi incelenen timokinon ve likopen bileşiklerinin $K_i$ değeri, inhibisyon türü ve $IC_{50}$ değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Timokinon ve likopen bileşikleri değişik konsantrasyonlarda kuvvet içeriğine eklenerek GR aktiviteleri ölçüldü. Bu aktivitelerden % Aktivite – [İnhibitör] değeri ile grafikler çizildi. Elde edilen grafik denklemlerinden  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı.

Timokinon ve likopen bileşiklerinin inhibisyon türünü belirlemek için insan eritrositinden saflaştırılan GR aktivitesini yarıya düşüren timokinon veya likopen konsantrasyonu ile bu değer in altında ve üstünde 3 sabit timokinon veya likopen konsantrasyonlarında uygun 5 substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerden inhibisyon türü ve  $K_i$  değerleri belirlendi. Sonuçlar çizelge 4.4’de verildi.

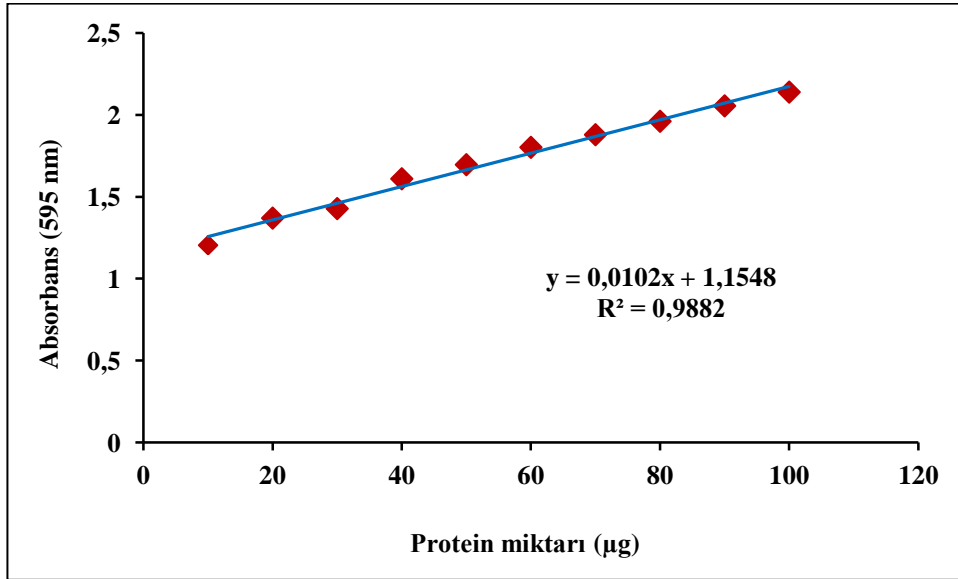


## 4. BULGULAR

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Yöntemle tayin yapabilmek için önceden standart bir grafik hazırlandı. Bu grafik bilgisayar ortamında Microsoft Excel 2010 programı kullanılarak çizildi. 10-100 µg protein/mL konsantrasyon aralığındaki protein çözeltileri ile bu çözeltilerin 595 nm'deki absorbanları arasında çizilen bu standart grafik çizildi. Bu standart grafik yardımıyla hem homojenat hem de saf enzim çözeltilerindeki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik çiziminde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorban değerleri şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

### 4.2. İnsan eritrositi GR Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Yapılan çalışmada insan eritrositi afinite kromatografisi ile saflaştırılan GR enzim numuneleri için elde edilen sonuçlar şekil 4.2'de verilmiştir.

#### 4.2.1. İnsan eritrositi glutatyon redüktaz enzimi için saflaştırma sonuçları

Eritrosit hemolizati için mL'deki enzim ünitesi 0.230 EU/mL, mL'deki protein miktarı da 149.256 mg protein/mL olarak bulundu.

Eritrosit hemolizati homojenatı için spesifik aktivite aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{0.230}{149.256} = 0.00154 \quad (4.1)$$

İnsan eritrositinden saflaştırılan enzim çözeltisinin Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca enzimin aktivitesi belirlenerek enzim ünitesi EU/mL cinsinden hesaplandı. Glutatyon redüktaz enziminin enzim ünitesi hem hemolizatta hem de saflaştırma sonucunda elde edilen elüsyonlarda belirlendi. İnsan eritrositinden saflaştırılan enzim çözeltisi için mL'deki enzim ünitesi 1.233 EU/mL, mL'deki protein miktarı da 0,12863 mg/mL olarak hesaplandı.

Saflaştırılan insan eritrositi glutatyon redüktaz enziminin için spesifik aktivite aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{1.233}{0.12863} = 9.5856 \quad (4.2)$$

Saflaştırma oranı ise;

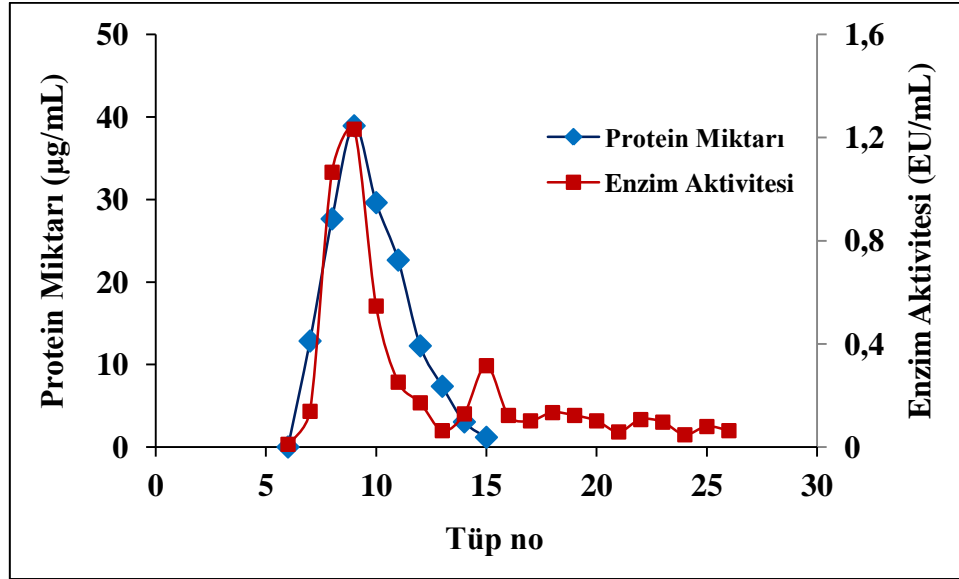
$$\frac{\text{Spesifik Aktivite1}}{\text{Spesifik Aktivite2}} = \frac{9.5856}{0.00154} = 6224.416 \quad (4.3)$$

olarak hesaplandı.

Bu değere göre eritrosit hemolizatının doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucunda enzim hemolizattan 6224.416 kat saflaştırıldı.

Saflaştırılan fraksiyonlardaki protein miktarı 595 nm'de verilen standart eğrinin regrasyon denkleminden her bir fraksiyon için µg/mL protein miktarları belirlendi. Grafikten de anlaşılacağı üzere yaklaşık 7-15 nolu fraksiyonların hem yüksek protein

miktarı ve hem de yüksek enzim aktivitesi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2).



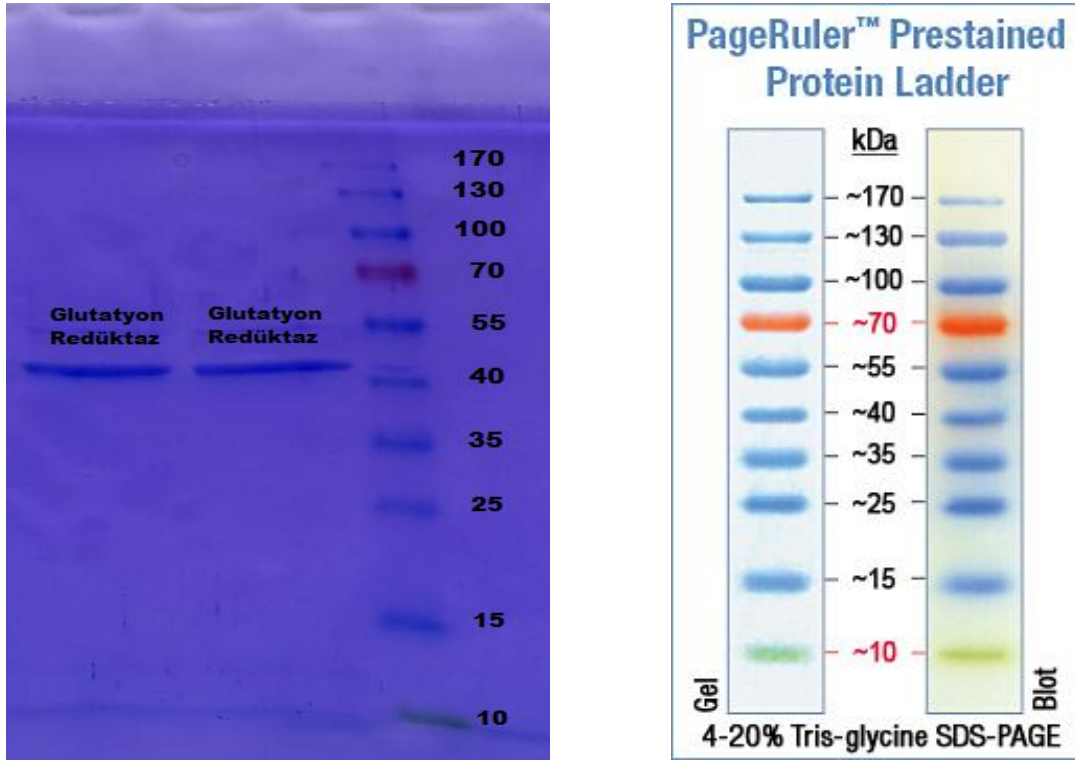
Şekil 4.2. Afinité kolonundan alınan insan eritrositi fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.

Çizelge 4.1. İnsan eritrositi GR'nin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite(EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
İnsan eritrositi	0.230	40	149.256	5970.24	9.2	0,00154	100	1.0
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow Kromatografisi	1.233	20	0.12863	2.5726	26.6	9.5856	50	6224.416

### 4.3. İnsan eritrositi GR'nin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

İnsan eritrositinden afinité kromatografisi ile saflaştırılan enzimin (GR) saflığını kontrol etmek ve moleköl ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla % 4-10 kesikli dikey SDS-PAGE elektroforez sistemi uygulanarak birkaç kuyucuğa saf enzim, en uçtaki iki kuyucuğada protein markırı doldurularak proteinler yürütüldü. Elektroforez jeli üzerinde elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 4.3'te gösterilmektedir.

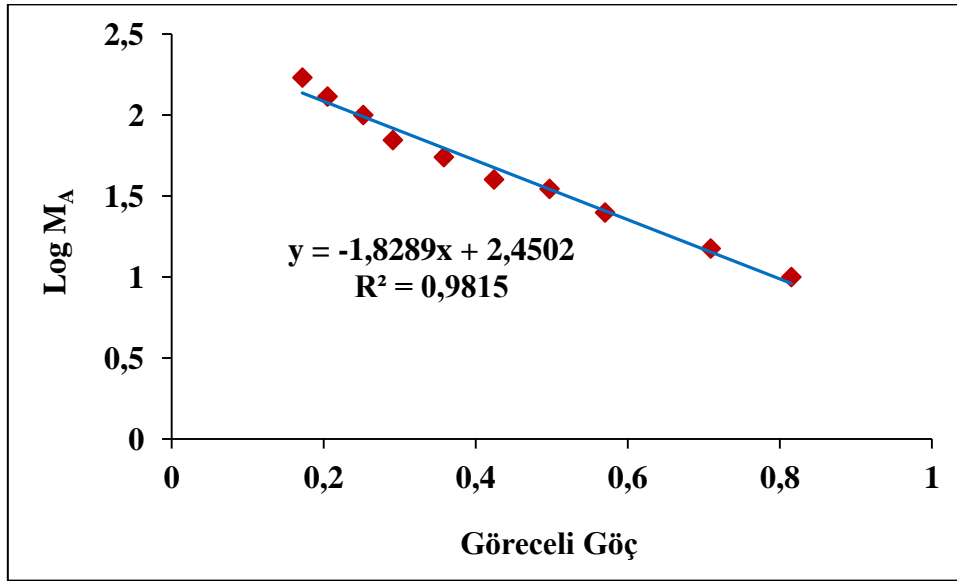


Şekil 4.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan GR enziminin jel elektroforez fotoğrafı ve standart belirteç (markır)'in orijinal göstergesi.

#### 4.4. İnsan eritrositi GR'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar

İnsan eritrositi GR'nin alt birimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzim numuneleri SDS-PAGE'de yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafları çekildi. Yürütülen standartların ve enzimlerin  $R_f$  değerleri ölçülüp hesaplanarak Göreceli Göç ( $R_f$ ) –  $\log M_A$  standart grafiği çizildi. İnsan eritrositi glutasyon redüktaz enziminin molekül ağırlığı çizilen grafik denkleminde 53 kDa olarak hesaplandı.





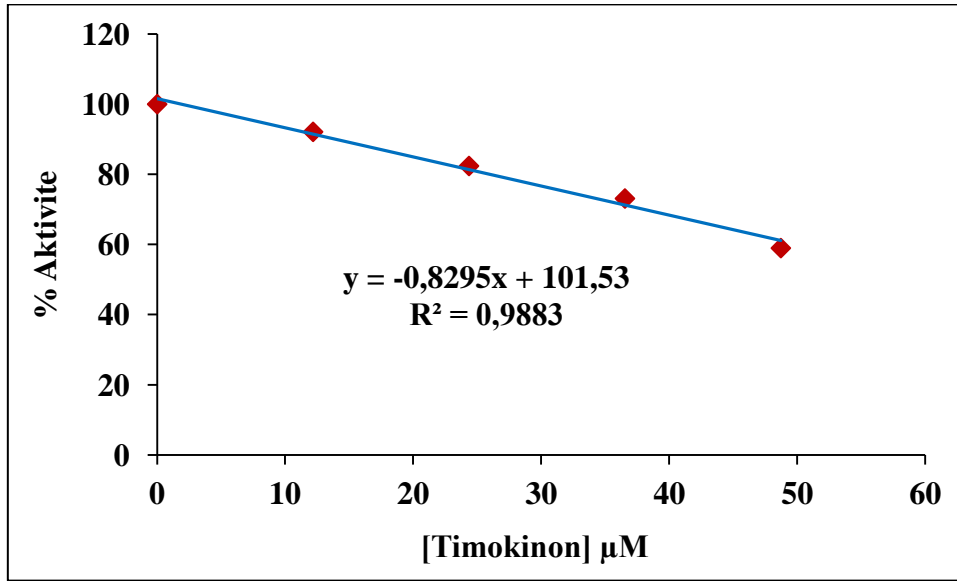
Şekil 4.4. İnsan eritrositi GR enziminin SDS-PAGE ile altbirimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

#### 4.5. İnsan eritrositi GR Aktivitesi Üzerine Timokinon ve Likopen Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan GR aktivitesi üzerine timokinon ve likopen bileşikleri çalışıldı. Bu bileşiklerden elde edilen sonuçlar çizelge 4.2-4.3 ile şekil 4.5-4.6'te gösterildi.

Çizelge 4.2. İnsan eritrositindeki GR'nin timokinon konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri

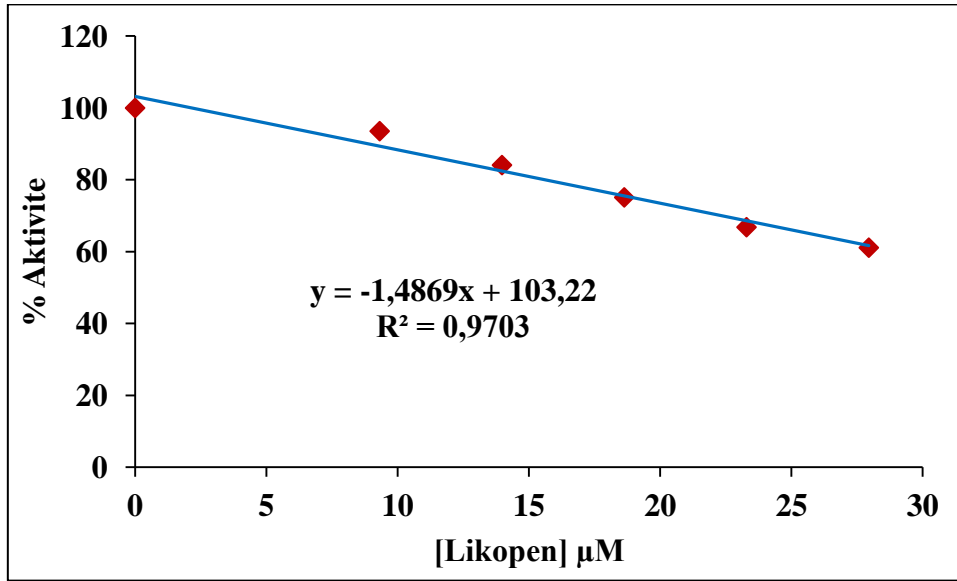
<b>I (µM)</b>	0	12.18	24.36	36.54	48.72
<b>EU</b>	0.279	0.230	0.241	0.204	0.165
<b>%Akt.</b>	100	92.115	82.38	73.118	58.98



Şekil 4.5. İnsan eritrositindeki GR üzerine timokinin bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.3. İnsan eritrositindeki GR'nin likopen konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri

<b>I (μM)</b>	0	9.315	13.973	18.630	23.288	27.945
<b>EU</b>	0.193	0.181	0.162	0.145	0.129	0.118
<b>%Akt.</b>	100	93.56	84.12	75.13	66.84	61.14



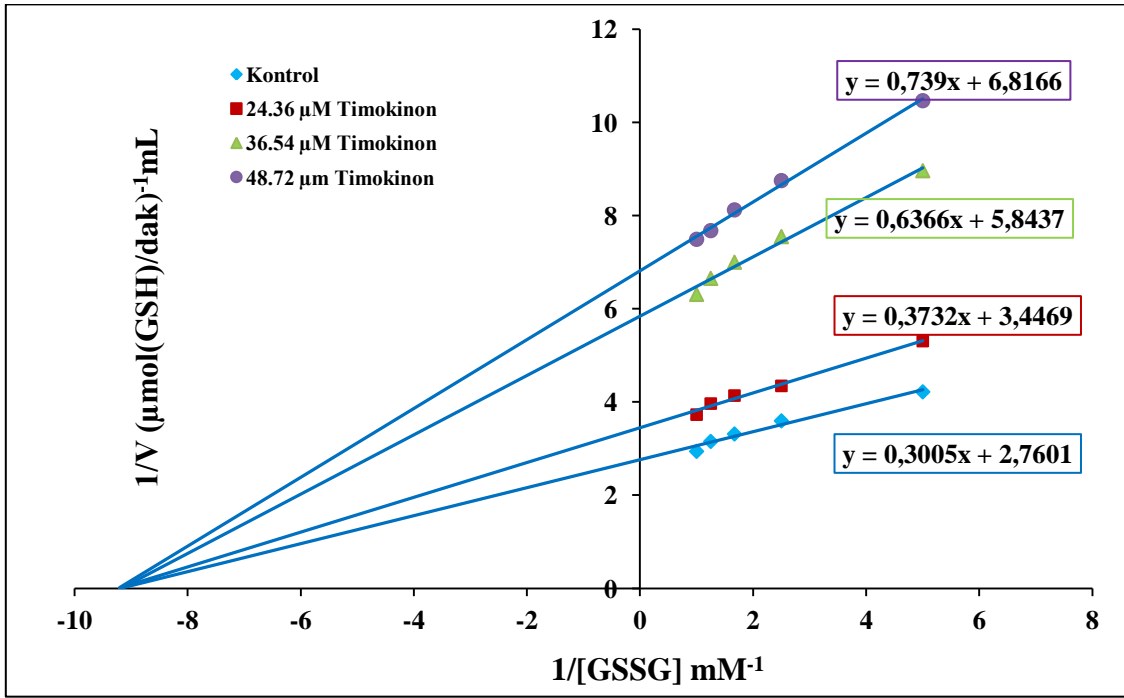
Şekil 4.6. İnsan eritrositindeki GR üzerine likopen bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.4. İnsan eritrositi GR için bulunan  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{K}_i$  değerleri ve inhibisyon türü

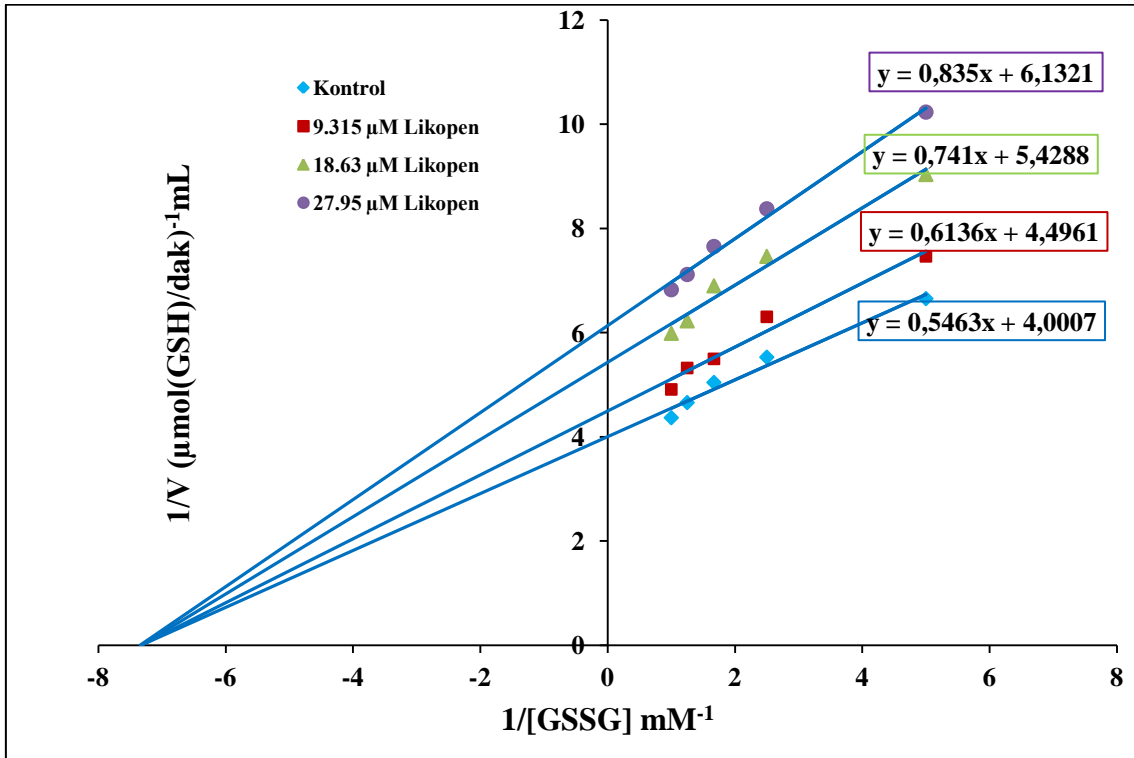
İnhibitör	$\text{IC}_{50}$	$\text{K}_i$	İnhibisyon türü
Timokinon	62.12 $\mu\text{M}$	57.71 $\mu\text{M}$	Yarışmasız
Likopen	35.79 $\mu\text{M}$	46.65 $\mu\text{M}$	Yarışmasız

#### 4.6. İnsan Eritrositi GR Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Timokinon ve Likopen Bileşiklerinin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren timokinon ve likopen bileşiklerinin inhibisyon türünü belirlemek için bölüm 3.2.9'de anlatıldığı gibi aynı bileşiğin 3 uygun inhibitör konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. x ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren timokinon ve likopen bileşiklerinin inhibisyon türü yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi.



Şekil 4.7. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine timokinin bileşiğinin etkisi.



Şekil 4.8. İnsan eritrositi GR aktivitesi üzerine likopen bileşiğinin etkisi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.8.1.7) okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizleyen spesifik bir antioksidan enzimdir. Glutasyon (GSH) çok fonksiyonlu tripeptid antioksidandır, okside glutasyonun (GSSG) indirgenmiş şeklidir. Hücresel GSH/GSSG oranı, glutasyon redüktaz tarafından düzenlenmiştir. Glutasyon metabolizması, sistemdeki tüm canlı hücrelerde kükürdün metabolik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır; GSH ve GSSG toplamı 300: 1 oran olarak hesaplanmıştır. GR ekspresyonu, glutasyon seviyesinin artması veya azalmasının, hücre içi yüzeylerde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Glutasyon redüktaz, hücre içi strese karşı hücre canlılığı ve stabilitesini artırmanın yanı sıra GSH / GSSG homeostazı, mitokondri ve kloroplastın sitotoksitesisi için kritik bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir (Zhao ve ark., 2009; Ithayaraja, 2011).

Glutasyon, zararlı kimyasal türlerin detoksifikasyonunda yer alan hücre boyunca düşük formda sitoplazma, kloroplast ve mitokondride bulunur. Modern kavramlara göre, çeşitli organ ve hastalıklarda çoğu patolojinin gelişimine, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretilmesi ve antioksidan sistemin tükenmesi eşlik etmektedir. GR aktivitesinin eksikliği, ilaca bağlı hemolitik anemi, hipoplastik anemi, trombositopeni, oligophreni, homozigot hemoglobin C hastalığı, Gaucher hastalığı ve alfa talasemi gibi birçok klinik komplikasyonla ilişkilendirilmiştir (Banu ve Kazım, 2008; Agarkov, 2009; Ithayaraja, 2011).

Çalışmamızda GR insan eritrositinden afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saflaştırılan GR enziminin saflaştırma katsayısı 6224 kat ve spesifik aktivitesi 9.586 EU/mg protein olarak hesaplandı. Glutasyon redüktaz koyun beyninden % 40 verimle yaklaşık 1000 kat saflaştırılmıştır. (Acan ve Tezcan, 1989). Başka bir çalışmada, GR, gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden, dört basamakta % 41 verimle 1654 kat saflaştırılmıştır (Tekman ve ark., 2008). Hindi karaciğerinden GR enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. GR enzimi % 10.75 verim ile 2476 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 606.67 EU mg protein<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. (Taşer ve Çiftçi, 2012). Yaptığımız

çalışmada yüksek bir saflaştırma katsayısı ile tek basamakta insan eritrositinden GR başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır.

Afinite kromatografisi, bir molekülün veya bir molekül grubunun, iki molekül arasındaki oldukça spesifik biyolojik etkileşime dayanan karmaşık karışımlardan seçici bir şekilde saflaştırılması esasına dayanan bir yöntemdir. Etkileşim tipik olarak geri dönüşümlüdür ve saflaştırma işleminde hedeflenen protein veya enzim, karmaşık bir karışımın parçası olarak mobil bir fazdayken bir yüzeye hareketsiz hale getirilmiş moleküllerden biri olan bir ligand kullanılarak bifazik bir etkileşimle elde edilir. Yakalama aşamasını genellikle yıkama ve elüsyon takip eder, bu da yüksek oranda saflaştırılmış proteinin geri kazanılmasını sağlar. Yüksek düzeyde seçiciliğe sahip olan bu yöntemle tek adımda birkaç yüz ile birkaç bin kat saflaştırma yapılabilir. Bu yüzden saflaştırma işlemlerinde genellikle afinite kromatografisi yöntemi tercih edilir. (Urh ve ark., 2009).

Çalışmamızda 2',5'-ADP Sepharose 4B kolon dolgu maddesi kullanılarak afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırma yapıldı. López-Barea ve Lee tarafından yapılan bir çalışmada, DBA/2J farelerinin karaciğerinden glutatyon redüktaz, amonyum sülfat fraksiyonu ve 8-(6-aminoheksil)-amino-2'-fosfo-adenosin difosforiboz ve N<sup>6</sup>-(6-aminoheksil)-adenosin 2', 5'-bisfosfat-Sepharose kolonları kullanılarak iki afinite kromatografisi adımı ile saflaştırılmıştır. (López-Barea ve Lee, 1979). Başka bir çalışmada, domuz eritrositlerinden 2',5'-ADP Sepharose afinite kolonu, DEAE-selüloz iyon değişim kolonu, 2',5'-ADP Sepharose afinite kolonu ve Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kullanarak glutatyon redüktaz enzimini dört basamakta saflaştırılmıştır (Boggaram ve ark., 1979). Glutatyon redüktaz, koyun karaciğerinden homojenat, amonyum sülfat fraksinyasyon, 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere dört adımda saflaştırma yapılmıştır. (Ulus ve ark., 2005). Ototrofik bir ortamda büyütülen *Phaeodactylum tricornutum* hücrelerinden GR saflaştırılmıştır. Hücre ekstraktının hazırlanması, % 20 doygunluğa amonyum sülfat eklenmesi ve ardından anyon değişimi ve afinite etkileşimi kromatografisi (Blue-A- ve 2', 5' - ADP-Sepharose) yöntemleri ile GR enzimi birkaç adımda saflaştırılmıştır (Arias ve ark., 2010). Benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişimi kromatografisi, jel filtrasyon

kromatografisi gibi ek yöntemlere gerek kalmadan afinite yöntemi ile tek basamakta GR enzimi saflaştırıldı.

Bu çalışmada insan eritrositinden saflaştırılan GR enziminin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlendi ve jelin üzerinde 53 kDa olan tek bir bant gözlemlendi. Ancak bu enzimin bir homodimer olduğu ve gerçek molekül ağırlığının 100 kDa'nun biraz üzerinde olduğu (2x53 kDa) düşüncesindeyiz. Bunu anlamk için jel filtrasyon kromatografisi ya da nativ elektroforez yapılması gerekirdi. Bu işlemler çalışmanın bir yüksek lisans tez çalışması olması ve zamanın yetersizliği nedeniyle yapılamamıştır. Bulunan molekül ağırlığı SDS-PAGE elektroforezi ile yapılan ve enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığıdır. Homodimer yapıdaki protein yada enzimler aynı yerde elektroforez bandı verdiklerinden tek bir leke olarak görünürler. Enzimin gerçek molekül ağırlığı tabi elektroforez ve jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenebilir. Bunlar da oldukça zahmetli ve zaman alan işlemlerdir. SDS-PAGE jel elektroforezi ile bulunan ve 53 kDa olan GR enziminin monomerinin molekül ağırlığı çok sayıda literatürle de benzerlik göstermiştir. Başka bir çalışmada, *Chromatium vinosum* bakterisindeki glutatyon redüktaz belirgin bir homojenliğe kadar saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 52 kDa olarak belirlenmiştir (Chung ve Hurlbert, 1975). DBA/2J farelerinin karaciğerinden saflaştırılan glutatyon redüktazın molekül ağırlığı 105 kDa olan bir dimer olarak belirlenmiştir (López-Barea ve Lee, 1979). Glutatyon redüktaz, sığır karaciğerinden saflaştırılmıştır. Enzim 5456 kat ve % 38.4 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak bulunmuştur (Uluslu ve Tandoğan, 2007). Arias ve ark. yaptığı bir çalışmada, GR *Phaeodactylum tricorutum* hücrelerinden saflaştırılmıştır. GR enziminin molekül ağırlığı nativ poliakrilamid jel elektroforezi ile 118 kDa olan bir dimer olarak belirlenmiştir. (Arias ve ark., 2010). Glutatyon redüktaz enzimi hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunur. Aynı zamanda GR, hücrelerin kloroplast, sitozol ve mitokondri kısımlarında yer alır. Glutatyon redüktaz, 2 x 52 kDa'luk bir homodimerik flavoproteindir ve oksidatif strese karşı hücre için kritik olan hücre içi bir indirgeme ortamının korunmasında önemli bir antioksidan enzimdir (Zhao ve ark., 2009). Bu yüzden GR enziminin molekül ağırlığı farklı kaynaklarda değişmektedir.

Oksidatif stres uzun zamandır kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır, bu da antioksidan tedavinin kanserden korunma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, birçok primer tümörün antioksidan enzimleri çok yüksek seviyelerde aşırı eksprese etmesi ve kanser hücrelerinin ilaç dozlarına karşı direncine yol açması nedeniyle tatmin edici olmayan sonuçlar vermiştir (Calvert ve ark., 1998; Hussain ve ark., 2003; Cabello ve ark., 2007). Yüksek GSH seviyeleri çeşitli tümör türlerinde görülür ve bu neoplastik dokuları kemoterapiye daha dirençli hale getirir. Bu nedenle glutatyon (GSH) sistemi, kanserin ilerlemesini önlemede ve kemodirence karşı tıbbi müdahale için en önemli hedeflerden biridir. Bu yüzden kanser tedavisi araştırmalarında, GSH biyosentezinin inhibisyonu ile GSH bileşimini azaltma amaçlanmaktadır. GR inhibisyonu, GSH tükenmesine ve GSSG birikimine sebep olur. Bu yüzden, son zamanlarda yapılan birçok çalışmada antioksidan bir enzim olan GR enziminin inhibisyonu, antikanser ve antimalarial ilaç gelişimi için önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu enzimin çeşitli kimyasallar, metaller ve doğal antioksidan bileşiklerle inhibisyona uğradığı gözlemlenmiştir (Calvert ve ark., 1998; Estrela ve ark., 2006; Traverso ve ark., 2013). Örneğin; *Plasmodium falciparum* glutatyon redüktaz (PfGR) enzimi tropikal sıtmaya karşı bir ilaç hedefi olarak ortaya çıkmıştır. PfGR enzimi, tedavi edici konsantrasyonlarda antimalarial ilaç metilen mavisi ile inhibe edilmiştir ve nonkompetitif inhibisyon için  $K_i$  değeri  $6,4 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Färber ve ark., 1998).

Fura-2 floresan görüntüleme metodu kullanılarak PC12 hücrelerinde hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonu ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) üzerine karmustin (1,3-bis (2-kloroetil) -1-nitrozoüre) bileşiğinin (kemoterapi ilacı) etkileri incelenmiştir. Karmustin ( $100\mu\text{M}$ ), yaklaşık 3 saat içinde gelişen kalsiyumda ( $\text{Ca}^{+2}$ ) gecikmiş bir artışa neden olmuştur. Bu etki, butiyonin sülfoksimin (glutatyon sentez inhibitörü) ile ön işleme tabi tutulan hücrelerde arttırılmıştır. Karmustin bileşiğinin L tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları ile hücre dışı  $\text{Ca}^{2+}$  akışını indüklediği ve GR inhibisyonundan kaynaklanan oksidatif stresin aracılık ettiği sonucuna varılmıştır (Doroshenko ve Doroshenko, 2004).

Demir ve ark. yaptığı bir çalışmada, tavuk karaciğerinden saflaştırılan GR aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri araştırılmıştır. Ofloksasin, levofloksasin, sefazolin ve sefepim antibiyotiklerinin saf GR aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri



belirlenmiştir. Bütün antibiyotikler GR aktivitesini inhibe etmiştir. Bu antibiyotikler için IC<sub>50</sub> ve Ki değerleri sırasıyla; ofloksasin için 0.159 mM ve  $0.5840 \pm 0.3121$  mM, levofloksasin için 0.090 mM ve  $0.3833 \pm 0.2725$  mM, sefazolin için 14.871 mM ve  $34.5002 \pm 4.2628$  mM ve sefepim için 4.589 mM ve  $4.9504 \pm 3.8928$  mM olarak bulunmuştur (Demir ve ark., 2006).

Tiyol redoks durumu (TRD), hücre içi oksidatif stresi yansıtan önemli bir parametredir ve çeşitli normal ve anormal biyokimyasal işlemlerle ilişkilidir. Glutatyon redüktaz (GR), TRD'nin homeostazında kritik bir enzimdir. Enzimin inhibisyonu TRD'yi arttırmak için kullanılabilir. Çeşitli GR inhibitörlerinin raporlarına rağmen, maya GR'ye karşı IC<sub>50</sub>=647 µM'ye sahip bir antikanser ilacı olan N, N-bis (2-kloroetil) - N-nitrosoüre, literatürde en yaygın kullanılan GR inhibitörü olmaya devam etmektedir. 2 - asetilamino - 3 - [4 - (2 - a setilamino - 2 - karboksietil sülfanilthio karbonilamino) feniltio karbamoilsülfanil] propiyonik asit (2-AAPA) geri dönüşümsüz bir GR inhibitörü olarak belirlenmiştir. CV-1 hücrelerinde, 2-AAPA (0.1 mM), 20 dakikada % 97 GR inhibisyonu, % 25 GSH azalması ve GSSG'de 5 kat bir artış üretmiştir (Seefeldt ve ark., 2009).

Hwang ve ark. yaptığı bir çalışmada, plumbagin bileşiminin HepG2 hepatosellüler karsinoma hücreleri ve ayrıca LLC akciğer kanseri hücreleri, SiHa servikal karsinoma hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Plumbagin, HepG2 hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmıştır. Plumbagin ayrıca GR'nin aktivitesini de düşürmüştür. Plumbagin ve GR inhibitörü olan sodyum arsenit, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini arttırmıştır ve bu artış, HepG2 hücrelerinde ROS süpürücü N-asetil-sistein (NAC) ile ön işleme tabi tutularak önemli ölçüde azaltılmıştır. Sonuç olarak, plumbagin, TrxR ve GR ile doğrudan etkileşime girerek ve böylece hücre içi ROS seviyelerini artırarak antikanser etkisi göstermiştir (Hwang ve ark., 2015).

Dalmızrak ve ark. yaptığı bir çalışmada glutatyon redüktaz (GR) ve hiperisin arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Buna göre, hiperisin, GR aktivitesi üzerine etkili bir inhibitör etkisi göstermiştir. Değişken substrat GSSG olduğunda, inhibisyon tipinin kompetitif olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, değişken substrat NADPH olduğunda, inhibisyon tipi lineer karışık tip yarışmalı görünmektedir. Genel olarak,

fotodinamik tedavide reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla oksidatif stresin desteklenmesindeki rolünün yanı sıra, hiperisin de kanser hücrelerini GR'yi inhibe ederek zayıflatabilir (Dalmızzrak ve ark., 2018).

Reaktif oksijen türleri (ROS) aerobik hücreler tarafından fizyolojik olarak üretilir ve hücre yaralanması koşullarında üretimi artar. ROS'un fizyolojik seviyeleri kritik hücre içi sinyal yollarına aracılık eder ve hücre yaşamı için gereklidir. Bu türler hem toksik hem de yararlı bileşikler olarak ikili bir rol oynamaktadır. Düşük veya orta seviyelerde, ROS hücre tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterir. Yüksek konsantrasyonlardaki ROS, tüm hücre yapılarına hasar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stresi oluşturur. Bununla birlikte, aşırı ROS oluşumu hücre hasarı ve ölümüne neden olur (Halliwell, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

Bu çalışmada antioksidan özellikleri olan timokinon ve likopen bileşiklerinin GR aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı ve önemli ölçüde inhibisyon etkisi gözlemlendi. Aynı zamanda yapılan birçok çalışmada timokinon ve likopen bileşiklerinin antioksidan, antikanser, antihipertansif ve antitümör özellikleri incelenmiştir. Khattab ve Nagi tarafından yapılan bir çalışmada, N(omega)-nitro-L-arjinin metil esteri (L-NAME) ile nitrik oksit sentezinin kronik inhibisyonu oluşmuş ratlarda *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağından elde edilen timokinon (TQ) bileşiğinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda L-NAME ile indüklenen hipertansiyona ve antioksidan aktivitesi ile böbrek hasarına karşı TQ bileşiğinin koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir (Khattab ve Nagi, 2007).

Fitokimyasal bileşikler, kanser hastalarında sınırlı toksisiteye sahip yeni nesil antikanser ajanlar olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Nigella sativa* tohumlarının ana bileşeni olan timokinonun (TQ) daha uzun yaşama, *in vitro* kanser hücrelerinin istilası ve *in vivo* olarak tümör büyümesi üzerindeki potansiyel etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda, TQ tedavisinin HDAC2 proteinlerinin önemli bir inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Mevcut deneysel bulgular ışığında, timokinon ve analoglarının tek başına antikanser ajan olarak veya sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde klinik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Attoub ve ark., 2012).

Sisplatin (CDDP), çeşitli tümör tipleri için kullanılan güçlü antikanser ajanıdır. Timokinon (TQ), kemoterapiler için antikanser ve kemo modülatörü olarak büyük dikkat çeken doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Alaufi ve ark. yaptığı bir çalışmada, normal oral epitel hücrelerinin aksine, insan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerine karşı timokinon, CDDP ve bunların kombinasyonlarının potansiyel sitotoksitesini incelenmiştir. CDDP benzer şekilde hem kafa hem de boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerini (UMSCC-14C) ve normal oral epitel hücrelerini (OEC) öldürmüştür (Alaui ve ark., 2017).

Likopen, meyve ve sebzelerde yaygın olarak dağılmış bir karotenoiddir. Epidemiyolojik çalışmalar, likopen tüketiminin azalmış kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Klinik hayvan çalışmaları, likopen bileşiğinin memedeki dimetilbenz [α] antrasen (DMBA) kaynaklı karsinogeneze karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Wang ve Leung, 2010).

Çalışmamızda GR insan eritrositinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı ve saflaştırma işleminde ek bir yonteme gerek kalmadan sadece afinite kromatografisi yöntemiyle tek basamakta başarılı bir saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırma katsayısı 6224 ve spesifik aktivite 9.586 EU/mg protein olarak belirlendi.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, GR enziminin inhibisyonu ile kanser hücrelerinin zayıfladığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da Saf GR enzimi aktivitesi üzerine antoksidan bileşikler olan timokinon ve likopen bileşiklerinin inhibisyon etkisi incelendi. Timokinon ve likopen sırasıyla 62.12 µM ve 35.79 µM IC<sub>50</sub> değerleri ile önemli ölçüde inhibisyon etkisi gösterdi. Bu sonuçlar GR aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren timokinon ve likopen bileşiklerinin kanser tedavisinde antikanser ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Radyoterapi, kanser tedavisi için en önemli terapilerden biridir. Radyoterapi, DNA kırılmalarına ve diğer hücrel bileşenlere zarar veren serbest radikallerin üretilmesiyle kanser hücresi büyümesinin inhibisyonunu sağlar. Radyoterapinin klinik kullanımı ile ilişkili ana konulardan biri radyoterapi direncinin gelişmesidir (Belka, 2006; Fitzgerald ve ark., 2008).

Tümör hücrelerinin radyasyon direnci geliştirdiği mekanizmalar karmaşıktır ve katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP) ve glutatyon redüktaz

(GR) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonu (fonksiyonel protein üretimi) nedeniyle olabilir (Belka, 2006; Fitzgerald ve ark., 2008).

Radyoterapi direncini azaltmak için farmakolojik olarak birkaç temel yaklaşım başarıyla uygulanmıştır. Tiyoller radyoterapiye karşı kanser direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Tiyollerin neden olduğu kanser direnci mekanizması, tiyollerin serbest radikalleri sonlandırma kabiliyetine bağlanmaktadır. Glutasyon (GSH), memeli hücrelerinde en yaygın non-protein tiyoldür. GSH, serbest radikalleri, glutasyon disülfid (GSSG) 'ye oksitlenerek sonlandırır. GSH'nin serbest radikallerin sonlandırılmasındaki önemi nedeniyle, GSH tükenmesinin radyasyona ve diğer kemoterapötik tedavilere karşı kanser duyarlılığı üzerindeki etkileri hakkında çok sayıda rapor belgelenmiştir. En kapsamlı çalışılan GSH tükenme ajanı, GSH biyosentezinde hız belirleyici enzim olan  $\gamma$ - glutamil sistein sentetazın bir inhibitörü olan butiyonin sülfoksimindir (BSO). BSO'nun GSH'yi etkili bir şekilde tükettiği ve radyasyona ve diğer kemoterapötik maddelere karşı kanseri duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Meister, 1991; Fojo ve Bates, 2003)

GSH metabolizması ile ilgili diğer bir enzim glutasyon redüktazdır (GR, EC 1.8.1.7). GR, hücre içi ortamın azalmasını sağlamak için GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalize eder. Bu enzimin inhibisyonunun, bir tiyol oksidatif stres durumu yaratan GSSG birikimine yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, GSSG artışında ortaya çıkan tiyol oksidatif stresin radyasyona karşı kanser duyarlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Son zamanlarda, Coleman ve arkadaşları; 2-deoksi-D-glikozun, glukoz metabolizmasını bloke ederek ve pankreas kanserini radyasyona karşı duyarlı hale getirerek GSSG seviyelerini arttırdığını göstermiştir (Kassahun ve ark., 1994; Cereser ve ark., 2001; Coleman ve ark., 2008).

GSH/GSSG oranı ile yansıtılan tiyol redoks tamponu, hücrenin esas redoks tamponudur. Hücre içi indirgeme ortamının temeli olan GSH/GSSG'nin yüksek oranı, öncelikle GSSG'nin GSH'ye indirgenmesiyle GR tarafından korunur. GR'nin inhibisyonu, hücre içi tiyol oksidatif stresi arttıran GSSG birikimine yol açar. Sonuç olarak, hücrelerin oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı daha duyarlı olmaları muhtemeldir. Tutarlı olarak, GR aktivitesinde bir artışın radyoterapi direncine bağlı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, GR'nin inhibisyonu yoluyla hücrel tiyol oksidatif

stresindeki bir artışın, kanser hücrelerini radyasyonun maruz kaldığı oksidatif stres hasarına daha duyarlı hale getirmesini beklemek makul olacaktır. (Cereser ve ark., 2001; Aon ve ark., 2007; Coleman ve ark., 2008).

Bu çalışmada timokinon ve likopen bileşiklerinin GR enzimini inhibe etmesiyle GSH oluşumu engellenmiş ve GSSG birikmesi meydana gelmiştir. Sonuç olarak bu bileşiklerin de kanser tedavisinde GR inhibisyonu ile oksidatif stres oluşturarak kanser hücrelerinin gelişmesini engelleyeceği ve diğer antioksidanlar gibi tedavi sürecine katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. Elbette bu çalışmamız ile ilgili iddialı ifadeler kullanamayız. Ancak bu *in vitro* çalışmamız daha ileri tıbbi, farmakolojik ve *in vivo* araştırmaları destekleyecek niteliktedir.





## KAYNAKLAR

- Acan, N. L., Tezcan, E. F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Lett.* **250(1)**: 72-4.
- Adem, S., Ciftci, M., 2016. Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and inhibition effects of some antibiotics. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **31(6)**: 1342-8.
- Agarkov, A. A., Popova, T. N., and Semenikhina, A. V., 2009. Catalytic properties of glutathione reductase from liver at norm and toxic hepatitis, biochemistry (Moscow) supplement series B: *Biomed. Chem*, **3 (2)**: 172–176.
- Ahlatci, A., Kuzhan, A., Taysi, S., Demirtas, O. C., Alkis, H. E., Tarakcioglu, M., 2014. Radiation-modifying abilities of *Nigella sativa* and thymoquinone on radiation-induced nitrosative stress in the brain tissue. *Phytomedicine*, **21**: 740–744.
- Al-Ali, A., Alkhawajah, A., Randhawa, M. A., Shaikh, N. A., 2008. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J. Ayub. Med. Coll*, **20 (2)**: 25–27.
- Alaufi, O. M., Noorwali, A., Zahran, F., Al-Abd, A. M., Al-Attas, S., 2017. Cytotoxicity of thymoquinone alone or in combination with cisplatin (CDDP) against oral squamous cell carcinoma *in vitro*. *Scientific Reports*, **7**: 13131.
- Alenzi, F. Q., El-Bolkiny, Y., Salem, M. L., 2010. Protective effects of *Nigella sativa* oil and thymoquinone against toxicity induced by the anti-cancer drug cyclophosphamide. *Br. J. Biomed. Sci*, **67**: 20–28.
- Altun, M., Türkoğlu, V., Çelik, İ., 2015. The effect of some antibiotics on glutathione reductase enzyme purified from liver and erythrocyte of Lake Van pearl mullet. *Pharm. Biol*, **53 (11)**: 1647-52.
- Aon, M. A., Cortassa, S., Maack, C., O'Rourke, B., 2007. Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J Biol Chem*, **282**: 21889–21900.
- Arias, D. G., Marquez, V. E., Beccaria, A. J., Guerrero, S. A., Iglesias, A. A., 2010. Purification and characterization of a glutathione reductase from *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, **161(1)**: 91-101.
- Arora, K., Ahmad, R., Srivastava, A.K., 2013. Purification and characterization of glutathione reductase (E.C. 1.8.1.7) from bovine filarial worms *Setaria cervi*. *J. Parasit Dis*, **37 (1)**: 94-104.
- Attoub, S., Sperandio, O., Raza, H., Arafat, K., Al-Salam, S., Al Sultan, M. A., Al Safi, M., Takahashi, T., Adem, A., 2013. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion *in vitro* and tumor growth *in vivo*. *Fundam Clin Pharmacol*, **27(5)**: 557-69.
- Bagchi, K., Puri, S. 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr*, **4**: 350–60.
- Banu, K and Kazim, Ş., 2008. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Clin. Rheumatol*. **27**: 141–145.

- Bauer, H., Fritz-Wolf, K., Winzer, A., Kühner, S., Little, S., Yardley, V., Vezin, H., Palfey, B., Schirmer, R. H., Davioud-Charvet, E., 2006. A fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2'-(3'-methyl)-1',4'-naphthoquinolyl]hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. Crystal structure of the alkylated human enzyme(Article). *Journal of the American Chemical Society*, **128**: 10784-10794.
- Belka, C., 2006. The fate of irradiated tumor cells. *Oncology*, **25**: 969–971.
- Biot, C., Dessolin, J., Grellier, P., Davioud-Charvet., 2003. Double-drug development against antioxidant enzymes from Plasmodium falciparum. *Redox Report*, **8**, 280-283.
- Boggaram, V., Brobjer, K. L., Mannervik, B., 1979. Purification 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.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B., 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots, Comptes. *Rendus-Biologies*, **331**: 48–55.
- Böhm, V., 2012. Lycopene and heart health. *Mol. Nutr. Food Res*, **56**, 296–303.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sentive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-54.
- Burits, M., Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14**: 323-328.
- Cabello, C. M., Bair, W. B., Wondrak, G. T., 2007. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **8(12)**: 1022–1037.
- Calvert, P., Yao, K. S., Hamilton, T. C., O'Dwyer, P. J., 1998. Clinical studies of reversal of drug resistance basedon glutathione. *Chemico-Biological Interactions*, **111-112**: 213–224.
- Cámara, M., Sánchez-Mata, M. C., Fernández-Ruiz, V., Cámara, R., M., Manzoor, S., Caceres. J. O., 2013. Chapter 11 - Lycopene: A Review of Chemical and Biological Activity Related to Beneficial Health Effects. *Studies in Natural Products Chemistry*, **40**: 383-426.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose-4B. *Analytical Biochemistry*, **116**:531-536.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol Chem*, **250 (14)**: 5475-80.
- Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., Revo, I. A., 2001. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, **163**: 153–162.
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F., 1993. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*, **49**: 481–93
- Chung, Y. C., Hurlbert, R. E., 1975. Purification and properties of the glutathione reductase of Chromatium vinosum. *J Bacteriol*, **123(1)**: 203-11.
- Coleman, M. C., Asbury, C. R., Daniels, D., Du, J., Aykin-Burns, N., Smith, B. J., Li, L., Spitz, D. R., Cullen, J. J., 2008. 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity,



- oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med*, **44**: 322–331.
- Çakar, M., 2013. *Alkanna tinctoria (Hava-Cıva otu) Bitki Kökü Organik Faz Ekstraktının Glutasyon Redüktaz 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz ve Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimleri Üzerine İn Vitro Etkisinin Araştırılması* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tuşba, Van.
- Dalmizrak, O., Teralı, K., Abdullah, R. K., Ozer, N., 2018. Mechanistic and structural insights into the in vitro inhibitory action of hypericin on glutathione reductase purified from baker's yeast. *J Biochem Mol Toxicol*, **32(5)**: e22051.
- David, L., Nelson, Michael, M., Cox., 2005. *Lehninger Biyokimyanın ilkeleri* (Çeviri editörü: Prof. Dr. Nedret Kılınç). Palme Yayıncılık. Ankara .
- Demir, H., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2006. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase obtained from chicken liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **30** :513 – 519.
- Doroshenko, N., Doroshenko, P., 2004. The glutathione reductase inhibitor carmustine induces an influx of Ca<sup>2+</sup> in PC12 cells. *Eur J Pharmacol*, **16;497(1)**: 17-24.  
Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. *Arch Biochem Biophys*, **485**: 56-62.
- Elliott, A. J., Scheiber, S. A., Thomas, C., Pardini, R. S., 1992. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol*, **20;44(8)** :1603-8.
- El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., Wani, A. A., 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL- 60 cells. *Int. J. Cancer*, **117**: 409–417.
- Erat, M., Demir, H., Sakiroğlu, H., 2005. Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **125**: 127–138.
- Estrela, J. M., Ortega, A., Obrador, E., 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **43(2)**:143–181.
- Färber, P. M., Arscott, L. D., William, C. H., Jr, Becker, K., Schirmer, R. H., 1998. Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett*, **6;422(3)**: 311-4.
- Fitzgerald, T. J., Wang, T., Goel, H. L., Huang, J., Stein, G., Lian, J., Davis, R. J., Doxsey, S., Balaji, K. C., Aronowitz, J., Languino, L. R., 2008. Prostate carcinoma and radiation therapy: therapeutic treatment resistance and strategies for targeted therapeutic intervention. *Expert Rev Anticancer Ther*, **8**: 967–974.
- Fojo, T., Bates, S., 2003. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene*, **22**: 7512–7523.
- Gordaliza, M., 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol*, **9**: 767–776.
- Gözükara, E.M., 2001. *Biyokimya*, Nobel tıp kitapçevleri, İstanbul, 685
- Hail Jr., N., 2005. Mitochondria: a novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis*, **10**: 687–705.
- Halliwell, B., 1995. How to characterize an antioxidant- An. update. *Biochem Soc. Symp*, **61**: 73–101.

- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans*, **35**: 1147-1150.
- Hamdy, N. M., Taha, R., 2009. Effects of *Nigella sativa* oil and thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacology*, **84**: 127-134.
- Houghton, P. J., Zarka, R., De las Heras, B., Hout, J. R. S., 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*, **61**: 33-36.
- Hussain, S. P., Hofseth, L. J., Haris, C. C., 2003. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **3(4)**: 276-285.
- Hwang, G. H., Ryu, J. M., Jeon, Y. J., Choi, J., Han, H. J., Lee, Y. M., Lee, S., Bae, J. S., Jung, J. W., Chang, W., Kim, L. K., Jee, J. G., Lee, M. Y., 2015. The role of thioredoxin reductase and glutathione reductase in plumbagin-induced, reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cell lines. *Eur J Pharmacol*, **765**: 384-93.
- Imran, M., Rauf, A., Khan, I. A., Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Fatmawati, S., Abu-Izneid, T., Imran, A., Rahman, K. U., Gondal, T. A., 2018. Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomed Pharmacother*. **106**: 390-402.
- Ithayaraja, M., 2011. Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **9**:104-115.
- Jones, D. P., 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymo*, **348**: 93-112.
- Kalt-Torres, W., Burke, J. J., Anderson, J. M., 1984. Chloroplast glutathione reductase: Purification and properties. *Physologia Plantarum*, **61**: 271-278.
- Kassahun, K., Jochheim, C. M., Baillie, T. A., 1994. Effect of carbamate thioester derivatives of methyl- and 2-chloroethyl isocyanate on glutathione levels and glutathione reductase activity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **48**: 587-594.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya*. 9. baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum. 643.
- Khan, N., Sultana, S., 2005. Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyperproliferative response by *Nigella sativa*. *Eur J Cancer Prev.*, **14**:159-68.
- Khattab, M. M., Nagi, M. N., 2007. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, **21** (5): 410-414.
- Kıvanç, M. R., Türkoglu, V., 2019. Investigation of the effects of natural compounds isolated from *Arum ruficollis* var. *ruficollis* on glutathione reductase enzyme purified from bovine liver. *Biomed Chromatogr*, **24**:e4560.
- Kim, S. J., Jung, H. J., Hyun, D. H., Park, E. H., Kim, Y. M., Lim, C. J., 2010. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie*, **92(8)**: 927-32.
- Kong, K. W., Khoo, H. E., Prasad, K. N., Ismail, A., Tan, C. P., Rajab, N. F., 2010. Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, **15**: 959-987.
- Kuzu, M., Aslan, A., Ahmed, I., Comakli, V., Demirdag, R., Uzun, N., 2016. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase

- enzymes from the gill tissue of Lake Van fish and analyzing the effects of some chalcone derivatives on enzyme activities. *Fish Physiol Biochem*, **42(2)**: 483-91.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Landriscina, M., Maddalena, F., Laudiero, G., Esposito, F., 2009. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, **11(11)**: 2701–2716.
- Levine, M., Ramsey, S. C., Daruwara, R., 1991. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. *JAMA*, **281**: 1415–23.
- Liu, T., Stern, A., Roberts, L. J., 1999. The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci*, **6**: 226–35.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and N., 2010. Chandra Pharmacogn Rev. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Chandra Pharmacogn Rev*, **4(8)**: 118–126.
- López-Barea, J., Lee, C. Y., 1979. Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation. *Eur J Biochem*, **1;98(2)**: 487-99.
- Mantzouridou, F., Tsimidou, M. Z., 2008. Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends Food Sci. Technol*, **19**: 363–371.
- Mata, A. M., Pinto, M. C., López-Barea, J., 1984. Purification by affinity chromatography of glutathione reductase (EC 1.6.4.2) from *Escherichia coli* and characterization of such enzyme. *Z Naturforsch C*, **39**: 908-15.
- Matill, H. A., 1947. Antioxidants. *Annu Rev Biochem*, **16**: 177–92.
- Meister, A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol Chem*, **263**: 17205–8.
- Meister, A., 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther*, **51**: 155–194.
- Mozos, I., Stoian, D., Caraba, A., Malainer, C., Horbańczuk, J. O., Atanasov, A. G., 2018. Lycopene and Vascular Health. *Front Pharmacol*, **23;9**: 521.
- Nakamura, A., Itaki, C., Saito, A., Yonezawa, T., Aizawa, K., Hirai, A., et al. 2017. Possible benefits of tomato juice consumption: a pilot study on irradiation human lymphocytes from healthy donors. *Nutr. J*, **16**: 27
- Naz, A., Butt, M. S., Sultan, M. T., Qayyum, M. M., and Niaz, R. S., 2014. Watermelon lycopene and allied health claims. *EXCLI J*, **13**, 650–660.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, USA. 743.
- Oberoi, D. P. S., and Sogi, D. S., 2017. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. *Food Chem*, **232**: 6–321.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmén, E., 2006. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara. 813.
- Perazella, M. A., Moeckel, G. W., 2010. Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy. *Semin Nephrol*, **30(6)**: 570-81.
- Pereira, B. L. B., Reis, P. P., Severino, F. E., Felix, T. F., Braz, M. G., Nogueira, F. R., et al. 2017. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) or lycopene supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction through different mechanistic pathways. *J. Nutr. Biochem*, **46**: 117–124.

- Pham-Huy, L. A1., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedicalsience*, **4(2)**: 89-96.
- Randhawa, M. A., Alghamdi, M. S., 2011. Anticancer activity of *Nigella sativa* (Black seed). *Am. J. Chin. Med*, **39 (6)**: 1075–1091.
- Rao, A. L., Bharani, M., Pallavi, V., 2006. Role of antioxidants and free radicals in health and disease. *Adv Pharmacol Toxicol*, **7**: 29–38.
- Richard, A., Harvey, Pamela, C., 2007. Champe: *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden Biyokimya* 3. baskı (Çeviri editörü: Doç. Dr. Engin Ulukaya). Nobel Tıp Kitabevi.
- Robert, K., Murray, Daryl, K., Granner, Peter, A., Mayes, Victor, V., Rodwell., 2004. **Harper biyokimya**, (Çeviri editörü: Nurten Dikmen, Tuncay Özgünen9. Nobel Tıp Kitabevi Ankara.
- Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L., 1989. *Glutathione, Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*. Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O., editors. Vol. III. Wiley; New York: 1989. p. 553-596.
- Seefeldt, T., Zhao, Y., Chen, W., Raza, A. S., Carlson, L., Herman, J., Stoeber, A., Hanson, S., Foll, R., Guan, X., 2009. Characterization of a novel dithiocarbamate glutathione reductase inhibitor and its use as a tool to modulate intracellular glutathione. *J Biol Chem*, **284(5)**: 2729-37.
- Shi, H. L., Noguchi, N., Niki, N., 1999. Comparative study on dynamics of antioxidative action of  $\alpha$ -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol and  $\alpha$ -tocopherol, against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, **27**: 334–46.
- Sies, H., Stahl, W., 1998. Antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. Lycopene. *Proc. Soc. Exp. Biol Med*, **218 (2)**: 121-4.
- Stefanis, L., Burke, R. E., Greene, L. A., 1997. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol*, **10**: 299–305.
- Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., Harris, G. K., 2010. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu Rev Food Sci Technol*, **1**: 189-210.
- Suwanaruang, T., 2016. Analyzing Lycopene Content in Fruits. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, **11**: 46-48
- Tandogan, B., Ulusu, N. N., 2010. Purification and kinetics of bovine kidney cortex glutathione reductase. *Protein & Peptide Letters*, **17**: 667-674.
- Taşer, P., Çiftci, M., 2012. Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, **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 Part C: Toxicology & Pharmacology*, **148**: 117-121
- Tokaç, M., Aydın, S., Taner, G., Özkardeş, A. B., Yavuz Taşlipinar M., Doğan, M., Dündar, H. Z., Kiliç, M., Başaran, A. A., Başaran, A. N., 2015. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene in acute cholestasis. *Turk J Med Sci*, **45(4)**: 857-64.
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., 2013. Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**: 1-10.


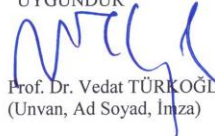

- Ulusu, G., Erat, M., Çiftci, M., Şakiroğlu, M., Bakan, E., 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turk J. Vet. Anim. Sci*, **29**: 1109-1117.
- Ulusu, N. N., Tandoğan, B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem*, **303(1-2)**: 45-51.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39(1)**: 44–84.
- Wang, H., Leung, L. K., 2010. The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition*, **26**: 1181-7.
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., 2009. Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol.*, **463**: 417-438.
- Young, I. S., Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin Pathol*, **54**: 176–86.
- Zhao, Y., Seefeldt, T., Chen, W., Wang, X., Matthees, D., Hu, Y., Guan, X., 2009. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. *Arch Biochem Biophys*, **485(1)**: 56-62.



## ÖZ GEÇMİŞ

1981 yılında Van'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da tamamladı. 2000 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nü kazandı ve 2005 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2007 yılında askerlik görevini tamamladı. 2013 yılında Van 1. İdare Mahkemesi'nde zabıt katibi olarak göreve başladı. 2015 yılında Anadolu Üniversitesi Adalet bölümünü bitirdi. 2016 yılı güz döneminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2017 yılında Anadolu Üniversitesi Uluslararası İlişkiler bölümünü bitirdi.



T.C VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 04/07/2019	
Tez Başlığı / Konusu:	
<b>“Bazı Antioksidan Bileşiklerin Glutasyon Redüktaz (EC 1.8.1.7) Enzimine Etkisinin İncelenmesi”</b>	
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 96 sayfalık kısmına ilişkin, 04/07/2019 tarihinde şahsım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 (Beş) dir.	
Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kabul ve onay sayfası hariç,</li> <li>- Teşekkür hariç,</li> <li>- İçindekiler hariç,</li> <li>- Simge ve kısaltmalar hariç,</li> <li>- Gereç ve yöntemler hariç,</li> <li>- Kaynakça hariç,</li> <li>- Alıntılar hariç,</li> <li>- Tezden çıkan yayınlar hariç,</li> <li>- 7 kelimedan daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)</li> </ul>	
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.	
Gereğini bilgilerinize arz ederim.	 04/07/2019 Tarih ve İmza
Adı Soyadı: Eser ÇİFCİ Öğrenci No: 169102036 Anabilim Dalı: Kimya Programı: Biyokimya Statüsü: Y. Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>	
<b>DANIŞMAN ONAYI</b> UYGUNDUR  Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLU (Unvan, Ad Soyad, İmza)	<b>ENSTİTÜ ONAYI</b> UYGUNDUR  Doç. Dr. Serhat KARAC Enstitü Müdür Yard. (Unvan, Ad Soyad, İmza)