



Bazı metal iyonlarının tavuk böbreğinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine in vitro etkilerinin araştırılması

Yusuf Karagözoğlu¹, Mehmet Çiftçi*¹

Özet

Glutatyon redüktaz enzimi tavuk böbreğinden saflaştırıldı ve bazı metal iyonlarının bu enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri araştırıldı. Saflaştırma prosedürü üç basamaktan oluştu; homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve affinite kromatografisi. Bu üç basamak sonucunda 8,595 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip enzim ~ % 57 verimle 369 kat saflaştırıldı. Enzimin saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapıldı ve bazı metal iyonlarının (Ni^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} and Al^{+3}) glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Metal iyonları için K_i ve IC_{50} değerleri Lineweaver-Burk ve % vs [I] aktivite grafikleriyle belirlendi. Ni^{+2} , Hg^{+2} ve Ag^{+} yarışmasız inhibisyon gösterirken, Zn^{+2} ve Pb^{+2} yarı yarışmalı inhibisyon gösterdi. Diğer metal iyonlarının aksine Al^{+3} enzim üzerinde aktivatör etkisi gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon redüktaz; tavuk böbreği; metal iyonları; inhibisyon

Investigation of in vitro effects of some metal ions on purified glutathione reductase from chicken kidney

Abstract

Glutathione reductase (GR) was purified from chicken kidney and in vitro effects of some metal ions on glutathione reductase were investigated. The purification procedure was composed of three steps: homogenate preparation, ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography. After three consecutive steps, the enzyme, having a specific activity of 8.595 EU/mg proteins, was purified approximately 367-fold with a yield of 57 %. SDS-PAGE was carried out to control the purity of the enzyme and inhibitory effects of metal ions (Ni^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} and Al^{+3}) on glutathione reductase were investigated. K_i constants and IC_{50} values for metal ions were determined by Lineweaver – Burk graphs and plotting activity % vs. [I]. While Ni^{+2} , Hg^{+2} and Ag^{+} showed noncompetitive inhibition, Zn^{+2} and Pb^{+2} displayed uncompetitive inhibition. In contrast, Al^{+3} exhibited activatory effect on the enzyme.

Keywords: Glutathione reductase; chicken kidney; metal ions; inhibition

1. Giriş

Glutatyon redüktaz [Glutatyon; NADP+ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7: GR] flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim glutatyon disülfidi (GSSG) indirgenmiş glutatyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin; GSH)'a NADPH yada NADH'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak indirgenmesini katalizler [1,2]. Hücrede GR ve GSH eksikliği oksidatif hasara yol açarak alzheimer, parkinson, karaciğer ve akciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, HIV, AIDS, kanser, ateroskleroz, felç, şizofreni, epilepsi ve diyabet gibi birçok hastalığa neden olabilir [3,4].

Glutatyon redüktaz enzimi, insan eritrositleri, dana karaciğeri, buzağı karaciğeri, sığır böbrek korteksi, sığır eritrositleri, sığır karaciğeri, hindi karaciğeri, koyun beyni,

domuz eritrositleri, sıçan böbreği, sıçan karaciğeri ve tavuk karaciğeri [5-19] gibi memeli kaynaklardan; *Escherichia coli*, değişik türde parazit, çeşitli bakteri, alg ve maya [20-26] gibi birçok mikroorganizmadan ve buğday, mısır, bezelye [27-31] gibi birçok bitkisel kaynaktan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Metal iyonları, kimyasal tepkimelerde serbest radikal oluşumuna neden olurlar. Reaktif oksijen ve nitrojen bileşiklerinin oluşması hücrede artmış oksidatif strese, DNA baz kırıklarına, artmış lipid peroksidasyonu ve birçok hastalığa neden olur [32]. Metal iyonlarından cıva (Hg), kadmiyum (Cd^{+2}) ve nikel (Ni^{+2}) zararlı etkilerini GSH konsantrasyonunu azaltıp proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak gösterirler. Arsenik (As) doğrudan tiyol gruplarına bağlanmaktadır. Sonuç olarak, metal iyonları toksik ve karsinojenik etkilerini reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini oluşturarak gösterirler [33].

¹ Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 12000, Bingöl, Türkiye

*Sorumlu yazar E-posta: mciftci@bingol.edu.tr

Alerjik özelliği bulunan Ni^{+2} 'in akciğer kanserine neden olduğu bildirilmiştir [34,35]. Redoks aktif bir metal olan Ni^{+2} peroksidasyona karşı koruyucu hücresele antioksidan savunma mekanizmalarına zarar verir [36,37]. Ni^{+2} hücrede reaktif oksijen bileşikleri (ROS) üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırarak redoks dengeyi bozar ve bunun sonucunda hücresele proteinlere zarar verir [38-41]. Yaşam için önemli bir eser element olan Zn^{+2} 'nin birçok hücresele proteini özellikle aktif merkezinde sistein bulunan enzimleri etkilediği bilinmektedir [42-44]. Hücrede çinko derişiminin artmasıyla birlikte özellikle GR önemli derecede etkilenir. Zn^{+2} toksik derişimlerde bulunduğunda GR inhibisyonuna bağılı olarak GSH derişiminde bir azalma GSSG' de ise bir artış meydana gelir [45,46]. Zn^{+2} astrositlerde GR' yi inaktive ederek GSSG: GSH oranının artmasına ve hücre içi ROS üretimine neden olur [47].

Bu çalışmada, tavuk böbrek dokusundan GR enzimi ilk defa saflaştırıldı ve Ni^{+2} ve Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} , Al^{+3} , metal iyonlarının saflaştırılan enzim aktivitesi üzerindeki in vitro etkileri araştırıldı.

2. Materyal ve metod

2.1. Kimyasal materyali

NADPH ve GSSG Sigmadan, 2',5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia Firmasından alındı. Diğer kimyasallar ise Sigma veya Merck'ten analitik saflıkta alındı.

2.2. Homojenatın hazırlanması

Canlı tavuk kesildikten sonra alınan tavuk böbrek dokuları daha sonra kullanılmak üzere $-80^{\circ}C$ 'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Kullanılacak olan dokular küçük parçalara ayrıldıktan sonra 50 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) homojenat tamponunda homojenize edildi. Homojenize çözelti ultraturax homojenizatörle parçalanarak elde edilen süspansiyon $+4^{\circ}C$ 'de 13.500 rpm devirde 1 saat boyunca santrifüj edildi ve alttaki çökelti atılarak homojenat elde edildi.

2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Çöktürme işlemleri sonucunda tavuk yürek GR enzim aktivitesinin tamamının % 20-80 aralığında çöktüğü belirlendi. Saflaştırma esnasında bu aralıkta çöktürmenin yapılabilmesi için numuneler santrifüj tüplerine konularak $+4^{\circ}C$ 'de 13000 rpm devirde 15 dakika süreyle santrifüj yapıldı. Süpernatantlar atıldıktan sonra çökelekler çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM KH_2PO_4 , pH=7,5) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri süresince ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numuneler diyaliz torbasına yerleştirilerek yarım saat süreyle diyaliz tamponuna (50 mM K_2HPO_4 / KCH_3COO , pH=7) karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemleri, $+4^{\circ}C$ 'de gerçekleştirildi.

2.4. Enzim aktivitesinin ölçümü

Enzim aktivitesi spektrofotometrede $25^{\circ}C$ 'de Carlberg and Mannervik'in tanımladığı gibi 1 ml'lik küvetlerle yapıldı [17]. Bu metod GSSG varlığında NADPH'ın yükseltgenmesinden dolayı azalan NADPH'ın 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır.

2.5. Protein tayini

Protein miktarı spektrofotometrik olarak 595 nm de Bradford metoduna göre yapıldı. Ölçümde bovin serum albümin proteini standart olarak kullanıldı [48].

2.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5' ADP Sepharose 4B jeli tartıldı. 400 ml destile su ile birkaç defa yıkandı. Şişmiş jelin havası alındıktan sonra %25 dengeleme tamponu (0,1 M K-asetat / 0,1 M K-fosfat pH=6) ve %75 jel olacak şekilde 1x10 cm'lik kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı – yine aynı tamponu içeren-kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponuyla (0,1 M K-asetat / 0,1 M K-fosfat pH=6) yıkandı. Dengeleme ve yıkamada akış hızı 50 ml/saat olarak uygulandı [30]. Numune kolona yüklendikten sonra sırasıyla 25 ml 0,1 M K-asetat / 0,1 M K-fosfat pH=6, 25 ml 0,1 M K-asetat / 0,1 M K-fosfat pH=7,85 ve 25 ml 0,1 M KCl / 0,1 M K-Fosfat pH=7,85 çözümleriyle yıkandı. Daha sonra 25 ml 80 mM K-fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM $NADP^{+}$ + 10 mM EDTA pH=7,85 çözeltisi kolona uygulanarak enzim elüe edildi. Ayrıca homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktivite ayrı ayrı belirlenerek saflaştırma tablosu hazırlandı. Saflaştırılan enzim çözeltisi 50 mM K-asetat / 50 mM K-fosfat, pH=6 çözeltisiyle diyaliz edildi [49,50].

2.7. SDS - Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzimin saflığının kontrolü için %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) poliakrilamid jel elektroforezi Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak tek bant elde edildi [51].

2.8. Molekül kütlesinin belirlenmesi

Şekil 2'deki SDS-PAGE fotoğrafından yararlanılarak her bir standart protein ve enzim için Log MA - Rf grafiği çizilerek enzimin mol kütlesi hesaplandı. Standart olarak molekül *E. coli* β -galaktozidaz (120 kDa), sığır serum albumin (85 kDa), tavuk yumurtası ovalbumin (50 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidraz (35 kDa), inek sütü β -laktoglobulin (25 kDa) proteinleri kullanıldı.

2.9. İn vitro inhibisyon çalışmaları

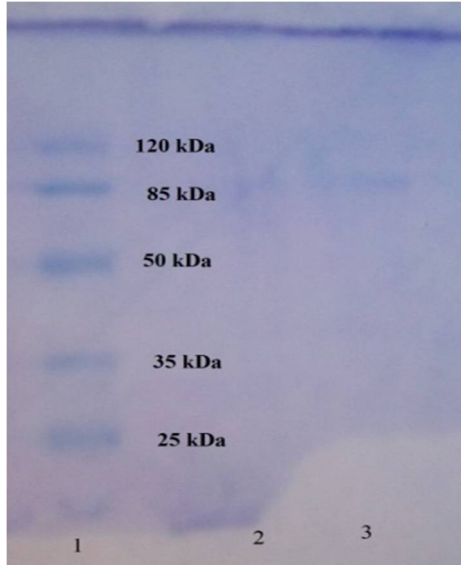
Bu çalışmada, GR enzimi üzerine Ni^{+2} ve Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} , Al^{+3} , iyonlarının etkileri araştırıldı. Her bir metal için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için 0,8 mM substrat ve beş farklı metal iyonu konsantrasyonlarında elde edilen değerler ile % aktivite-[I] grafikleri (Şekil 3, 4 ve 5) çizilerek aktivite değerleri kullanıldı. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesi amacıyla üç sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun beş farklı substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 6, 7 ve 8) çizilerek K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlendi.

3. Bulgular

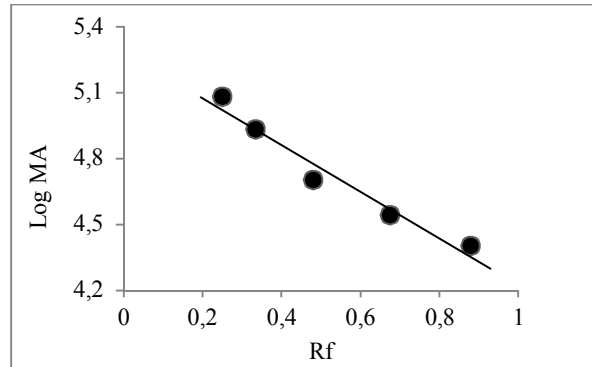
Glutatyon redüktaz enzimi 2',5'-ADP-sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak tavuk böbreğinden saflaştırıldı ve saflaştırma sonuçları Tablo 1'de gösterildi. Enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapılarak elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 1'de gösterildi. Enzimin mol kütlesinin hesaplanması için log MA - Rf grafiği çizilerek Şekil 2'de gösterildi. Enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için elde edilen IC_{50} değerleri, ortalama K_i sabitleri ve inhibisyon türleri Tablo 2'de verildi.

Tablo 1. Tavuk böbrek dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırma basamakları

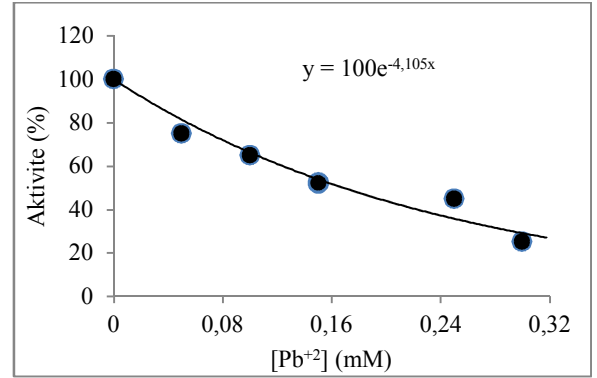
Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	15	0,509	21,77	7,635	326,55	0,0233	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 20-80) ve diyaliz	5	0,973	13,81	4,865	69,05	0,0704	63,719	3,021
2',5'- ADP sepharose 4B	6	0,722	0,084	4,332	0,504	8,595	56,738	368,884



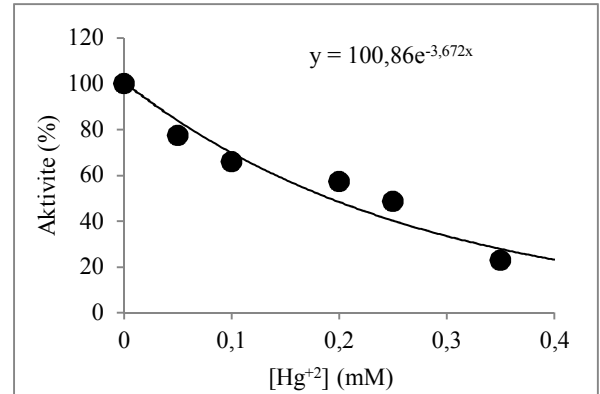
Şekil 1. Afinite kolonundan elüe edilen tavuk böbrek GR enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü; 1. kuyu: Standart proteinler, 2. ve 3. kuyu: afinite kolonundan elüe edilen saf GR enzimi



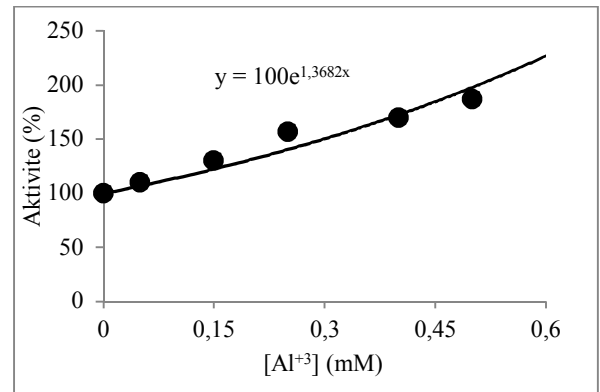
Şekil 2. Tavuk böbreğinden saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE sonucu molekül kütlelerini bulmak için çizilen log MA - Rf değeri grafiği. Standart proteinler: *E. coli* β-galaktosidaz (120 kDa), sığır serum albumin (85 kDa), tavuk yumurtası ovalbumin (50 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidraz (35 kDa), inek sütü β-laktoglobulin (25 kDa).



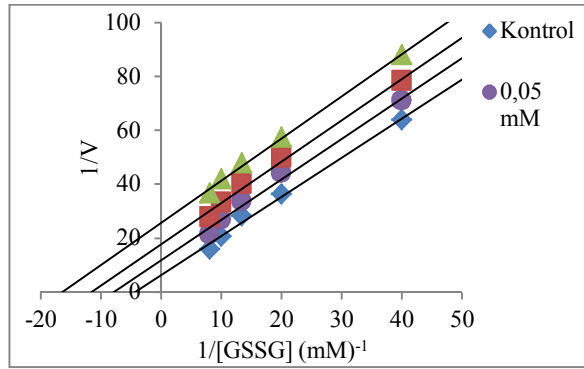
Şekil 3. Tavuk böbrek GR enzimi için 5 farklı $[Pb^{+2}]$ konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- $[Pb^{+2}]$ grafiği



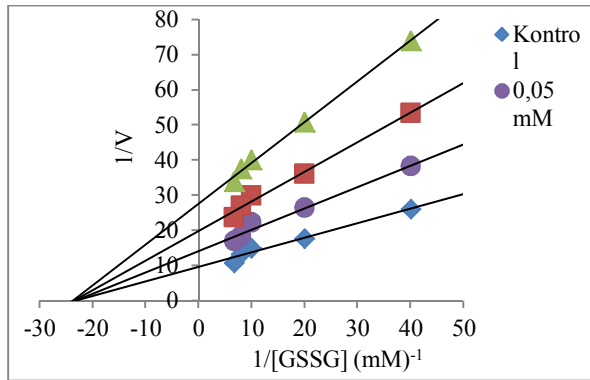
Şekil 4. Tavuk böbrek GR enzimi için 5 farklı $[Hg^{+2}]$ konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- $[Hg^{+2}]$ grafiği



Şekil 5. Tavuk böbrek GR enzimi için 5 farklı $[Al^{+3}]$ konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite- $[Al^{+3}]$ grafiği



Şekil 6. Tavuk böbrek GR enzimi için 3 sabit $[Pb^{+2}]$ için 5 farklı substrat (GSSG) konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 7. Tavuk böbrek GR enzimi için 3 sabit $[Hg^{+2}]$ için 5 farklı substrat (GSSG) konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

Tablo 2. Tavuk böbrek GR için % Aktivite-[I] ve Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

Metaller	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon tipi
Ni^{+2}	0,337	0,558±0,222	Yarışmasız
Zn^{+2}	0,191	0,100±0,026	Yarı yarışmalı
Pb^{+2}	0,168	0,077±0,015	Yarı yarışmalı
Hg^{+2}	0,187	0,101±0,007	Yarışmasız
Ag^{+}	0,289	0,416±0,110	Yarışmasız

4. Tartışma ve sonuç

Antioksidan bir enzim olan glutatyon redüktaz, çoğu organizmanın hücrel redoks metabolizmasında GSSG'nin indirgenmesinin sağlayarak hayati bir rol oynar. GSH redoks dengesinde, peroksitlerin, 2-oksoaldehitlerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır [52-57]. Antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan

GR hücrede serbest radikallerin lipid, protein ve DNA üzerinde oluşturduğu zararlı etkilerden korur [3].

Bu öneminden dolayı glutatyon redüktaz enzimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmış, birçok kaynaktan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir [5-31]. Bizim yaptığımız bu çalışmada tavuk böbrek dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelendi.

Tablo 1'den görüldüğü gibi spesifik aktivitesi 8,595 EÜ/ml olan tavuk böbrek GR enzimi, ~ % 57 verimle 369 kat saflaştırıldı. Elde edilen bu veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırıldığında yeterli verim ve saflaştırma katsayısına ulaşılmış olduğu söylenebilir [5-19]. Şekil 1'de görüldüğü gibi 2 ve 3 numaralı kuyucuklarda enzim için SDS-PAGE'de tek bant elde edilmiştir. Bu tek banttandır enzimin tam olarak saflaştırıldığı görülmektedir. Şekil 1'deki standartlardan faydalanılarak çizilen şekil 2'den enzimin mol kütlesi ~ 92 kDa olarak bulundu. Bulunan bu değer literatürdeki değerlerle karşılaştırıldığında çoğu GR enzimlerinden farklı olduğu görülmektedir. Dolayısıyla tavuk böbrek GR enzimi, diğer kaynak dokulardan saflaştırılmış GR enzimleri ile izoenzim olabilir veya alt birimlerinin sayısı farklı olabilir [58-64].

Bu çalışmada ayrıca GR enzimi aktivitesi üzerine Pb^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Ni^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırıldı. Tablo 2'den görüldüğü gibi bu iyonların IC_{50} değerlerinin ve K_i sabitlerinin küçükten büyüğe doğru sıralanışı Pb^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Ni^{+2} şeklindedir. Dolayısıyla enzimi en güçlü şekilde inhibe eden Pb^{+2} iyonudur. Pb^{+2} den sonra sırasıyla Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Ni^{+2} iyonları gelmektedir. Özellikle Pb^{+2} ve Hg^{+2} 'nin enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği IC_{50} değerleri ve K_i sabitlerinin küçük olmasından çıkarılabilir. Buna ilaveten bu metal iyonları için inhibisyon tipleri de belirlendi. Pb^{+2} ve Hg^{+2} enzimi yarı yarışmalı inhibe ederken, Hg^{+2} , Ag^{+} ve Ni^{+2} iyonlarının ise yarışmasız olarak enzimi etkilediği söylenebilir. Literatür araştırmalarında söz konusu metal iyonlarıyla ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda benzer sonuçların elde edildiği tarafımızdan tespit edildi [63,65-67].

Teşekkür

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri birimi tarafından BAP-718-184-2014' nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Müler F., Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes; Williams C.H., Ed.; CRC Pres: Boca Raton, Florida, 121-211, 1992.
- [2] Gül M., Kutay F.Z., Temocin S., Hanninen O., Cellular and clinical implications of glutathione. Indian J. Exp.Biol., 38, 625-634, 2000.
- [3] Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N.D., Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. Journal of Nutrition, 134, 489-492, 2004.
- [4] Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H., The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother. 57(3-4), 145-55, 2003.
- [5] Worhingyon D. J., Rosemeyer M. A., Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. E. J.Biochem., 15, 60(2), 459-66, 1976.
- [6] Erat M., Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2,5 -ADP Sepharose 4B affinity column material

- in single chromatographic step. *Protein Expr Purif.*, 34, 257–260, 2004..
- [7] Erat M., Çiftçi M., Effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 537, 59–63, 2006.
- [8] Şentürk M., Gülçin İ., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö.İ., Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(11), 2036–2039, 2008.
- [9] Akkemik E., Şentürk M., Özgeriş F.B., Taşer P., Çiftçi M., In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turk J Med Sci*, 41 (2), 235-241, 2011.
- [10] Le Trang N., Bhargava K.K., Cerami A., Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Anal. Biochem.*, 133, 94–99, 1983.
- [11] Ereser B.T., Sığır Böbrek Korteksinden Glutatyon Redüktazın Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Saptanması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- [12] Erat M., Şakiroğlu H., Çiftçi M., Effects of some antibiotics on glutathione reductase from bovine erythrocytes. *Vet. Med. - Czech*, 48 (11), 305–312, 2003.
- [13] Ulusu N.N., Tandoğan B., Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 303, 45–51, 2007.
- [14] Taşer P., Çiftçi M., Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36(5), 546-553, 2012.
- [15] Açı N.L., Tezcan E.F., Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties, *FEBS Lett*, 250 (1), 72-74, 1989.
- [16] Boggaram V., Brobjer K.L., Mannervik B., Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340, 1979.
- [17] Can B., Glutatyon Redüktaz Enziminin Sığır Böbreğinden Saflaştırılması, Substrat ve İnhibitör Kinetiğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- [18] Carlberg C., Mannervik B., Glutathione reductase assays. Academic Press, Orlando, FL. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495, 1985.
- [19] Adem Ş., Çiftçi M., Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expression and Purification*, 81, 1–4, 2012.
- [20] Erat M., Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of some kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 53-69, 2005.
- [21] Asnis R.E., A glutathione reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 213(1), 77-85, 1955.
- [22] McCallum M.J., Barrett J., Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia* expanse. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27,393-401, 1995.
- [23] Yadav S.S., Srikanth E., Singh N., Rathaur S., Identification of GR and TrxR systems in *Setaria cervi*: Purification and characterization of glutathione reductase. *Parasitology International*, 62, 193–198, 2013.
- [24] Patel M.P., Marcinkeviciene, J., Blanchard J.S., *Enterococcus faecalis* glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 155-163, 1998.
- [25] Libreros-Minotta C.A., Pardo J.P., Mendoza-Hernandez G., Rendon J.L., Purification and characterization of glutathione reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 247–253, 1992.
- [26] Jiang F., Hellmans U., Stroga E., Bergman B., Mannervik B., Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the *Cyanobacterium anabaena* PCC 7120. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (39), 22882-22889, 1995.
- [27] Arias D.G., Marquez V.E., Beccaria A.J., Guerrero S.E., Iglesias A.A., Purification and characterization of a glutathione reductase from *phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 161, 91–101, 2010.
- [28] Arscott L.D., Veine D.M., Williams C.H., Jr. Mixed disulfide with glutathione as an intermediate in the reaction catalyzed by glutathione reductase from yeast and as a major form of the enzyme in the cell. *Biochemistry*. 39(16), 4711-21, 2000.
- [29] Lamotte F., Vianey-Liuau N., Duviol M.P., Korehel K., Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4978-4983, 2000.
- [30] Mahan J.R., Burke J.J., Purification and characterization of glutathione reductase from corn mesophyll chloroplast. *Physiol. Plant.*, 71, 352-358, 1987.
- [31] Mullineaux P., Enard C., Hellens R, Creissen G., Characterization of glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 200, 186-194, 1996.
- [32] Molavi B., Mehta J.L., Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Cardiol.*, 19(5), 488-93, 2004.
- [33] Valko M., Morris H., Cronin M.T., Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12(10), 1161-208.
- [34] Garner, L.A., 2004. Contact dermatitis to metals. *Dermatol. Ther.*, 17, 321–327, 2005.
- [35] Costa M., Davidson T.L., Chen H., Ke Q., Zhang P., Yan Y., Huang C., Kluz T., Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat. Res.*, 592, 79-88, 2005.
- [36] Athar M., Hasan S.K., Srivastava R.C., Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation:

- implications for nickel carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 1276–1281, 1987.
- [37] Misra M., Rodriguez R.E., Kasprzak K.S., Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology.*, 64, 1–17, 1990.
- [38] Shainkin-Kestenbaum R., Caruso C., Berlyne G.M., Effect of nickel on oxygen free radical metabolism. Inhibition of superoxide dismutase and enhancement of hydroxydopamine autoxidation. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 28, 213-21, 1991.
- [39] Kalliri E., Grzycka P.K., Hausinger R.P., Kinetic and spectroscopic investigation of CoII, NiII, and N-oxalylglycine inhibition of the FeII/alpha-ketoglutarate dioxygenase, *TauD*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 191-7, 2005.
- [40] Romero C.S., Olmo R., Teijon C., Blanco M.D., Teijon J.M., Romero A., Structural and functional implications of the hexokinase-nickel interaction. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 2395-402, 2005.
- [41] Mahmoudi A., Nazari K., Mohammadian N., Moosavi-Movahedi A.A., Effect of Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Cu²⁺ on horseradish peroxidase: activation, inhibition, and denaturation studies *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 104, 81-94, 2003.
- [42] Wu W., Graves L.M., Jaspers I., Devlin R.B., Reed W., Samet J.M., Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Physiol.*, 277, 924-31, 1999.
- [43] Haase H., Maret W., Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell Res.*, 291, 289–298, 2003.
- [44] Perry D.K., Smyth M.J., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Duriez P., Poirier G.G., Hannun Y.A., Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 18530-3, 1997
- [45] Walther U.I., Wilhelm B., Walther S.C., Muckter H., Forth W., Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines. *In Vitro Mol Toxicol.*, 13(2), 145-52, 2000.
- [46] Mize C.E., Langdon R.G., Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, 237, 1589-95, 1962.
- [47] Bishop G.M., Dringen R., Robinson S.R., Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 42, 1222-30, 2007.
- [48] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248, 1976.
- [49] Ninfali P., Orsenigo T., Barociani L., Rapa S., Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative Biochemistry*, 20, 297-309, 1990.
- [50] Morelli A., Benatti U., Gaetani G.F., De Flora A., Biochemical mechanisms of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci.*, 75, 4-9, 1978.
- [51] Laemmli DK, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage. *T Nature*, 227, 680-683, 1970.
- [52] Karplus PA, Krauth-Siegel RL, Schirmer RH, and Schulz GE., Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-l-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-l-nitrosourea. *Eur J Biochem.*, 171, 193-198, 1988
- [53] Nordhoff A., Bücherler U.S., Werner D. And Schirmer R.H., Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446--Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry*, 32, 4060-4066, 1993.
- [54] Boehme C.C., Arscott L.D., Becker K., Schirmer R.H. and Williams C.H., Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum* Comparison with the human enzyme. *J. Biol. Chem.*, 275, 37317-37323, 2000.
- [55] Irler A., Bechthold E., Davioud-Charvet E., Hofman V., Reau R., Gromer S., Schirmer R.H., and Becker K., In *Flavins and Flavoproteins* (Chapman, S., Perham, R., and Scrutton, N., eds), Agency for Scientific Publications, Berlin, pp., 803-815, 2002.
- [56] Savvides S.N., Scheiwein M., Böhme C.C., Arteil G.E., Karplus P.A., Becker K. and Schirmer, R.H., Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 277, 2779-2784, (2002).
- [57] Becker K., Herold-Mende C., Park J.J., Lowe G., and Schirmer, R.H., Human Thioredoxin Reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2''Terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy *J. Med. Chem.*, 44, 2784-2792, 2001.
- [58] Becker K., Rahlfs S., Nickel C. and Schirmer R.H., Glutathione-function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.*, 384, 551-566, 2003.
- [59] López-Barea J., Lee C., Mouse-Liver Glutathione Reductase Purification, Kinetics, and Regulation. *Eur. J. Biochem.*, 98, 487-499, 1979.
- [60] Erat M., Demir H. and Şakiroğlu H., Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125, 127- 138, 2005.
- [61] Tekman B., Glutatyon Redüktaz Enziminin Gökkuşluğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu ve Bazı Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2007.
- [62] Taşer, P. Glutatyon Redüktaz Enziminin Hindi Karaciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2010.
- [63] Tekman B., Özdemir H., Şentürk M., Çiftci M., 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*, 148, 117-121, 2008.

- [64] Adem S., Sıçan Kalp ve Akciğer Dokularından Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz ve Glutatyon Redüktaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kotinin ve Bazı İlaçların Bu Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum, 2011.
- [65] Coban T.A., Senturk M., Ciftci M., Kufrevioglu O.I., Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Prot. Peptide Letters*, 14, 1027–1030, 2007.
- [66] Tandogan B, Ulusu NN., Comparative in vitro effects of some metal ions on bovine kidney cortex glutathione reductase. *Prep Biochem Biotechnol.*, Oct; 40(4): 405-11, 2010.
- [67] Ekinci D., and Şentürk, M., Assesment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28 (1), 11-15, 2013.