



Bazı Antibiyotiklerin Koyun Dalak Glutasyon S-Transferaz Enzimi Üzerine *In Vitro* Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the *In Vitro* Effects of Some Antibiotics on Sheep Spleen Glutathione S-Transferase Enzyme

Ömer Faruk ÇİFTÇİ¹, Songül ÜNÜVAR², Yusuf TEMEL³

ÖZ

Glutasyon S-transferazlar (GST) hücre içi detoksifikasyon mekanizmasında görev alan multigen ailesine sahip izoenzimlerdir. GST'ler, faz II sistemi ile endojen ve eksojen kaynaklı kimyasalların toksik etkisini azaltır. GST izoenzimleri tarafından katalize edilen reaksiyonlarda, indirgenmiş glutasyonun (GSH) tiyol grubu sayesinde çeşitli elektrofillerle konjugasyon oluşturur. GST izoenzimleri hücrede sitozol ya da mikrozomlarda bulunabilir.

Bu çalışmada koyun dalak dokusundan sitozolik glutasyon S-transferaz enzimi, homojenat hazırlanması ve glutasyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. İkinci aşamada saflaştırılan GST enzimi üzerine sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, sefaperazon sodyum, ampisillin, gentamisin, klindamisin ve tylosin antibiyotiklerin *in vitro* etkileri incelendi ve inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Antibiyotiklerden sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin, enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken ampisillinin aktivasyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Tylosinin ise 0,545-5,45 mM aralığında enzim üzerinde herhangi etkiye sahip olmadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, Enzim, Glutasyon S-transferaz, İnhibisyon

ABSTRACT

The multigene family of glutathione S-transferases (GST) isoenzymes participates in the intracellular detoxification process. With the phase II system, GSTs lessen the harmful effects of endogenous and external substances. Due to the thiol group of reduced glutathione, it conjugates with different electrophiles in processes catalyzed by GST isoenzymes (GSH). The cytoplasm or microsomes of the cell contain GST isoenzymes.

In this study, the cytosolic glutathione S-transferase enzyme was purified from sheep spleen tissue utilizing homogenate preparation and glutathione agarose affinity chromatography. The second phase involved examining the *in vitro* effects of ampicillin, gentamicin, clindamycin, cefazolin sodium, and tylosin antibiotics on the purified GST enzyme and calculating IC₅₀ values for those that showed inhibitory impact. Among these antibiotics, cefaperazone sodium, cefazolin sodium, cefuroxime sodium, gentamicin, and clindamycin shown an inhibitory influence on enzyme activity, but ampicillin displayed an activating effect. It was determined that tylosin did not affect the enzyme in the concentration range of 0.545-5.45 mM.

Keywords: Antibiotic, Enzyme, Glutathione S-transferase, Inhibition.

Bu çalışmada canlı hayvan dokuları kullanılmadığından etik kurul izin belgesi gerekli değildir.

¹ Araştırmacı, Ömer Faruk ÇİFTÇİ, İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, djciftcim@hotmail.com, ORCID No: 0000-0002-4214-4382

² Doç.Dr., Songül ÜNÜVAR, İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, songul.unuvar@inonu.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-8454-490X

³ Doç. Dr. Yusuf TEMEL, Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri MYO, ytemel@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-8148-3718

İletişim/Corresponding Author:

Yusuf TEMEL

Geliş Tarihi/Received : 11.04.2023

E-posta/E-mail:

ytemel@bingol.edu.tr

Kabul Tarihi/Accepted: 22.06.2023

Yayın Tarihi/Published: 28.06.2023

GİRİŞ

Glutasyon transferazlar (glutasyon S-transferazlar veya GST'ler) çok işlevli enzimlerdir. Bir dizi katalitik ve katalitik olmayan süreçte yer alan, faz II hücresel detoksifikasyon sistemi enzimleri olarak kabul edilmektedir [1–4]. Çok çeşitli polar olmayan eksojen (kimyasal kanserojenler, çevresel kirlenmeler ve hatta antitümör ajanlar) ve endojen bileşiklere glutasyonun (GSH) nükleofilik bağlanma reaksiyonunu katalize ederler, bu bileşikler suda çözünür ürünler haline getirirler ve böylece eliminasyonlarını kolaylaştırırlar [1, 5–7].

GSH tripeptidi, hücre içi ana antioksidan metabolizmasını oluşturur. Hücre farklılaşması, hücrelerin çoğalması ve apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreçte önemli bir rol oynar [8]. GSH homeostazındaki bozukluklar başta kanser olmak üzere yaşlanma ile ilgili hastalıklar, kistik fibrozis, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar, immünolojik, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklar dahil pek çok hastalığın etiyolojisinde ya da ilerlemesinde rol oynar [9, 10].

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilmiş ilaçlardır. Etki mekanizmaları bakımından, bakterilerin DNA, RNA, hücre duvarı veya protein

sentezini inhibe ederek hücre ölümüne neden olmalarına (bakterisidal ilaçlar), sadece hücre büyümesini engellemelerine (bakteriyostatik ilaçlar) ve etkiledikleri hücresel bileşen veya sisteme göre sınıflandırılabilirler [11]. Antibiyotikler, geçen yüzyılda bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmış ve zaman içinde yaşam beklentisinin artmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte son yıllarda yapılan araştırmalar antibiyotik kullanımının, bağırsak mikrobiyomundaki bakteri türlerinin bileşimini etkileyerek mikrobiyal ekosistem çeşitliliğinde değişikliklere neden olabildiğini [12], metabolizmada hayati reaksiyonları katalizleyen enzimlerin inhibisyonuna neden olduğunu [13–15], gastrointestinal toksisite, alerjik reaksiyonlar ve çeşitli doku ve organlarda toksisiteye neden olduğunu göstermektedir [12, 16].

Bu çalışmanın amacı hücre içi antioksidan mekanizmada çok önemli görevler üstlenen GST enzimini koyun dalak dokusundan saflaştırarak, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, sefaperazon sodyum, ampicillin, gentamisin, klindamisin ve tylosin antibiyotiklerinin GST enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkilerini incelemektir.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

GSH agaroz, GSH, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich'ten (Taufkirchen, Almanya) satın alındı.

Homojenatın Hazırlanması

Koyun dalak dokusu Bingöl Et ve Balık kurumundan soğuk zincir kurallarına göre temin edildi. Laboratuvara getirilen dokular küçük parçalara bölündü. Bu parçalardan 5 gram doku alınarak havanda sıvı azot ile toz haline getirildi ve 10 mL, 50 mM Tris-HCl (pH:7,5) tamponunda süspansiyon edildi. Süspansiyon daha sonra 13.000 rpm'de bir saat boyunca santrifüj edilerek doku ve hücre

parçacıklarının çökmesi sağlandı. Çökelti atılarak üstte kalan süpernatant damlalıklı dikkatli bir şekilde alınarak kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza altına alındı. Bütün bu işlemler 4 °C'de gerçekleştirildi [4, 5, 17].

GST Enziminin Saflaştırılması

Enzim, GSH-agaroz afinite kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Başlangıçta kolon 10 mM fosfat tamponu, pH 7,4, 150 mM NaCl ile dengelendi ve homojenat kolona yüklendi ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Bu adımların ardından, GST enzimi, 10 mM GSH içeren 50 mM Tris-HCl tamponu pH 9,0 ile elüe edildi [18].

GST Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Enzim aktivitesi Habig ve arkadaşlarının kullandığı metoda göre yapıldı [19].

In vitro Kinetik Çalışmalar

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin küvet içi etkileyici konsantrasyonları ön denemelerle belirlenerek söz konusu konsantrasyon aralıklarında enzim aktiviteleri hesaplandı. IC₅₀ grafiği hazırlamak amacıyla inhibitörsüz ortamda ölçülen enzim aktivite değeri %100 kabul edildi. İnhibitör etkisi gösteren antibiyotikler için IC₅₀ değerlerini belirlemek amacıyla beş farklı konsantrasyon belirlenerek kinetik çalışmalar yapıldı.

Bu konsantrasyon değerleri; sefazolin sodyum için 1,04, 2,08, 5,20, 10,40 ve 15,60 mM; sefuroksim sodyum için 1,12, 2,24, 5,60, 11,2 ve 16,8 mM; sefaperazon sodyum için 0,745, 1,49, 3,725, 7,45 ve 11,175 mM;

ampisillin için 0,375, 0,75, 1,50, 3 ve 6 mM; gentamisin için 7,3, 14,6, 36,5, 73, 109,5 ve 146 mM; klindamisin için 2,94, 7,35, 14,7, 22,05 ve 29,4 mM; tylosin için ise 0,45- 5,45 mM olarak belirlendi.

Elde edilen bu değerler ile % aktivite-inhibitör konsantrasyonu grafiği oluşturuldu. Bu grafiğin denkleminde yararlanarak inhibitöre ait IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Teşekkür

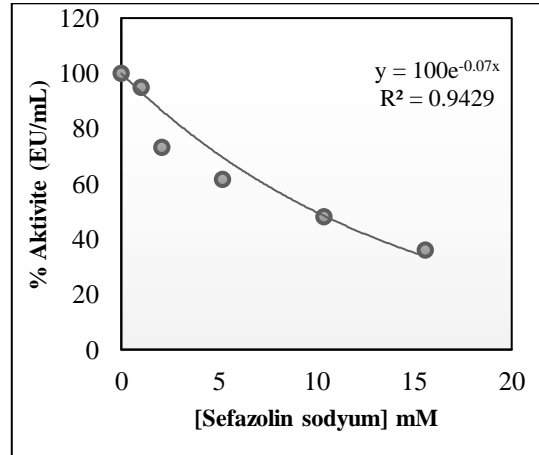
Bu çalışmada herhangi bir projeden maddi destek alınmamıştır.

Araştırmanın Etik Yönü

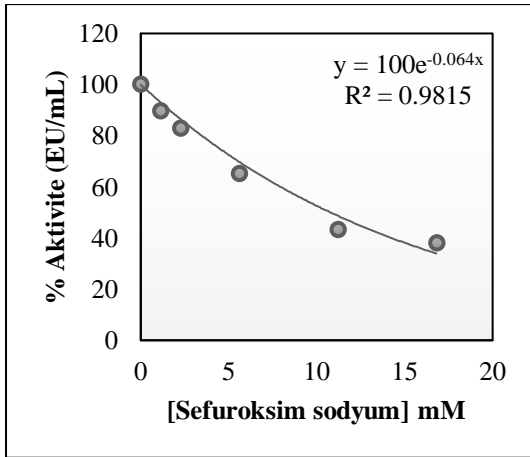
Çalışma kapsamında canlı hayvan kullanılmadığından etik kurul izni gerekli değildir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

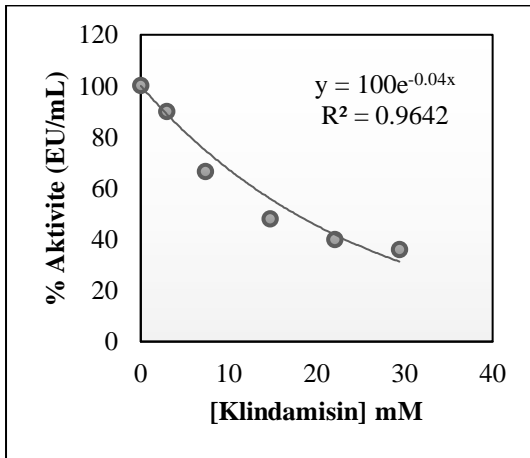
Bu çalışmada koyun dalak dokularından GST enzimi homojenatın hazırlanması ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin antibiyotikleri için %Aktivite - [I] grafikleri çizilerek Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4 ve Tablo 1 gösterildi. Söz konusu grafiklerden sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin antibiyotikleri için IC₅₀ değerleri sırası ile 8,15 mM, 9,90 mM, 10,83 mM, 17,32 mM ve 99,02 mM olarak hesaplandı.



Şekil 1. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin GST enzim aktivitesi üzerindeki etki grafiği.

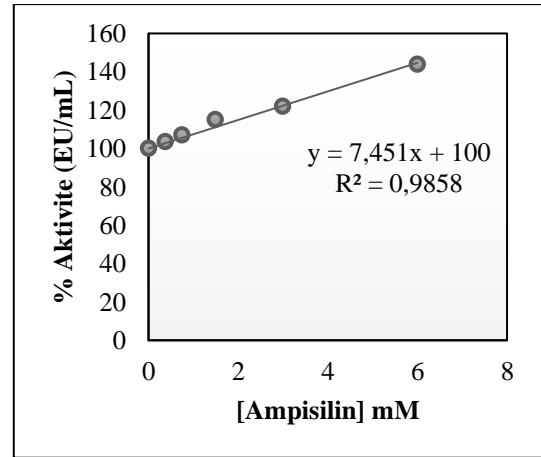


Şekil 2. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin GST enzim aktivitesi üzerindeki etki grafiği.



Şekil 3. Klindamisin antibiyotiğinin GST enzim aktivitesi üzerindeki etki grafiği.

Enzimi aktive eden ampisillin için çizilen % Aktivite - [Ampisillin] grafiği ise Şekil 4'de gösterildi. Tylosinin antibiyotiği 0,545-5,45 mM aralığında enzim üzerinde herhangi etkiye sahip olmadığından herhangi bir grafik çizilmedi.



Şekil 4. Ampisillin antibiyotiğinin GST enzim aktivitesi üzerindeki etki grafiği.

Tablo 1. Antibiyotiklerin GST enzim aktiviteleri üzerine etkileri

Antibiyotik	Etki	IC ₅₀ (mM)
Sefaperazon sodyum	inhibisyon	8,15
Sefazolin sodyum	inhibisyon	9,90
Sefuroksim sodyum	İnhibisyon	10,83
Klindamisin	inhibisyon	17,32
Gentamisin	inhibisyon	99,02
Ampisillin	aktivasyon	-
Tylosin	etkisiz	-

GST izoenzimleri indirgenmiş glutatyonun (GSH) tiyol grubunun başka bir substratın elektrofilik bölgesine bağlanma reaksiyonunu katalize eder. GST'ler birçok bileşiğin detoksifikasyonunu sağlayan çok fonksiyonlu enzimlerdir. Detoksifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan yeni bileşik daha az toksiktir ve vücuttan kolayca atılır [20]. Detoksifikasyon reaksiyonları sonucu yükseltgenen glutatyonun rejenerasyonu pentoz fosfat yolu oksidatif reaksiyonları sonucu üretilen NADPH'ı kullanan glutatyon redüktaz enzimi tarafından gerçekleştirilir [21, 22].

GST enzimi ile ilgili daha önce farklı çalışmalar yapılmış ve enzime ait çok sayıda inhibitör ve aktivatör tespit edilmiştir. Özellikle ilaçlarla yapılan kinetik çalışmalar

dikkat çekmektedir. Örneğin Balcı ve arkadaşları bazı pestisitlerin yaban mersini GST enzimi üzerine etkilerini incelemiş ve bu pestisitlerin enzimi önemli derecede inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir [20]. Yine Ahmed ve arkadaşları da bıldırcın kalbinden saflaştırılan GST enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerini incelemiş ve bu metal iyonlarından Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Ag^{+} iyonlarının enzimi inhibe ettiklerini bulmuşlardır [23]. Temel ve arkadaşları da bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST üzerine bazı önemli organik bileşiklerin etkilerini araştırmış ve bu organik bileşiklerin GST enzimini inhibe ettiklerini ortaya koymuşlardır [4]. Temel ve Taysi tarafından yapılan bir araştırmada civa (II) klorürün sıçan eritrosit GST enzimini *in vivo* olarak inhibe ettiği ve borik asidin bu inhibisyon derecesini azalttığı rapor edilmiştir [3]. Temel ve Taysi tarafından yapılan başka bir çalışmada GST enzimi bıldırcın karaciğerinden glutatyon-agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılarak karakterize edilmiş ve Ag^{+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , ve Al^{3+} gibi metal iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir [3]. Yapılan başka bir çalışmada ise Türkan ve arkadaşları tarafından albino cinsi sıçanlarda karaciğer, kalp kası ve böbrek GST enzimleri üzerine sefuroksim ve sefaperazon sodyum antibiyotiklerinin *in vivo* etkileri incelenmiş ve bu antibiyotiklerin söz konusu enzim aktivitesini ilaç uygulamasından özellikle yedi saat sonra düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır [15]. Çomaklı ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada GST enzimi alabalık eritrositlerinden saflaştırılmış ve gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum, ampicillin, ornidazol ve metranidazol antibiyotiklerinin enzim üzerindeki *in vitro* etkilerine bakılmıştır. Çalışmada gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum antibiyotiklerinin enzimi inhibe ettikleri tespit edilmiş ve IC_{50} değerleri

sırası ile 0,568, 7,637 ve 1,104 mM olarak hesaplanmıştır. Ampisilin, ornidazol ve metranidazol antibiyotiklerinin enzim üzerinde herhangi bir etki göstermedikleri bulunmuştur [24]. Ayna ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise gentamisin ve klindamisin antibiyotiklerinin sıçan eritrosit dokusundan saflaştırılan GST enzimini sırasıyla 1.69 ve 6.9 mM IC_{50} ve 1,70 ve 2,36 mM K_i değerleriyle inhibe ettiğini belirlemişlerdir [25].

Bu çalışmada sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin antibiyotikleri için IC_{50} değerleri sırası ile 8,15 mM, 9,90 mM, 10,83 mM, 17,32 mM ve 99,02 mM olarak hesaplandı. Bu IC_{50} değerlerine göre enzim üzerinde en etkin inhibitör sefaperazon sodyum olurken diğer antibiyotiklerin etkinlik sırası sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin olarak tespit edildi. Ampisilin antibiyotığının ise GST enzimini aktive ettiği tespit edildi. Ampisilin aktivasyon etkisini kimyasal yapısında yer alan nükleofilik/bazik karakterli $-NH_2$ grubunun GSH'daki tiyoalkol grubunda ($-SH$) bulunan asidik hidrojeni uzaklaştırarak kükürt'ün nükleofilik aktivitesini artırdığı ve bu şekilde GSH'ı aktive ederek okside moleküllere bağlanmasını kolaylaştırma mekanizmasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bu çalışma sonuçları literatürde farklı dokulardan saflaştırılan GST enzim aktiviteleri üzerine araştırılan antibiyotiklerin sonuçları ile paralellik arz etmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu çalışmada, koyun dalak dokusundan sitozolik GST izoenzimi afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin, gentamisin, ampisilin antibiyotiklerinin *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları, sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin antibiyotiklerinin enzimatik aktiviteyi sırası ile 8,15 mM, 9,90 mM, 10,83 mM, 17,32 mM ve 99,02 mM IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiğini ortaya koydu. Ampisilin

antibiyotığının ise enzim üzerine aktivatör olarak etki ettiğini gösterdi.

Sefaperazon sodyum, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, klindamisin ve gentamisin antibiyotiklerinin gerek insan ve gerekse hayvan tedavilerinde kullanılması durumunda bu çalışmada elde edilen IC₅₀ değerlerinin dikkate alınarak dozajlarının iyi ayarlanması gerektiği değerlendirilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları insan ve veteriner hekimlikte GST enzimi üzerine yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Aksoy, M., Ozaslan, M. S., & Kufrevioğlu, O. I. (2016). Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 546–550. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1046063>
2. Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., Radic, T., & Simic, T. (2018). Glutathione transferases: Potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123785>
3. Temel, Y., & Taysi, M. Ş. (2018). The Effect of Mercury Chloride and Boric Acid on Rat Erythrocyte Enzymes. *Biological Trace Element Research*, 177–182. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1601-x>
4. Temel, Y., Koçyigit, U. M., Taysi, M. S., Gökalp, F., Gürdere, M. B., Budak, Y., ... Çiftci, M. (2018). Purification of glutathione S-transferase enzyme from quail liver tissue and inhibition effects of (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-((E)-3-(aryl)acryloyl)phenyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-methanoisindole-1,3(2H)-dione derivatives on the enzyme activity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/jbt.22034>
5. Taysi, M. Ş., & Temel, Y. (2021). Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver and the Impact of Some Metal Ions on Enzyme Activity. *BioNanoScience*, 11(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00811-4>
6. Aybek, H., Temel, Y., Ahmed, B. M., Ağca, C. A., & Çiftci, M. (2020). Deciphering of The Effect of Chemotherapeutic Agents on Human Glutathione S-Transferase Enzyme and MCF-7 Cell Line. *Protein & Peptide Letters*, 27(9), 888–894. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200413101017>
7. Özasan, M. S., Demir, Y., Aslan, H. E., Beydemir, Ş., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2018). Evaluation of chalcones as inhibitors of glutathione S-transferase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(5), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.22047>
8. Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3), 191–214. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>
9. Singh, R. R., & Reindl, K. M. (2021). Glutathione S-Transferases in Cancer.
10. Lebda, M., & Taha, N. (2012). Purification and Characterization of Glutathione-S-Transferase from Rat's Liver: Effect of Carbon Tetrachloride and Camel's Milk. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000133>
11. Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
12. Martins Lopes, M. S., Machado, L. M., Ismael Amaral Silva, P. A., Tome Uchiyama, A. A., Yen, C. T., Ricardo, E. D., ... Peixoto, R. D. (2020). Antibiotics, cancer risk and oncologic treatment efficacy: a practical review of the literature. *Ecancermedicalscience*, 14, 1106.
13. Temel, Y., Ayna, A., Hamdi Shafeeq, I., & Çiftci, M. (2020). In vitro effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 219–223. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1481083>
14. Ayna, A., Khosnaw, L., Temel, Y., & Çiftci, M. (2021). Antibiotics as Inhibitor of Glutathione S-transferase: Biological Evaluation and Molecular Structure Studies. *Current Drug Metabolism*, 22(4), 308–314. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210118102700>
15. Türkan, F., Huyut, Z., Taslimi, P., Huyut, M. T., & Gülçin, İ. (2020). Investigation of the effects of cephalosporin antibiotics on glutathione S-transferase activity in different

- tissues of rats in vivo conditions in order to drug development research. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(4), 423–428. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497644>
16. Larsson, D. G. J. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 108–112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>
 17. Karaman, M., Temel, Y., & Bayindir, S. (2020). Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128700. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128700>
 18. Yüksel, F., & Temel, Y. (2022). Glutasyon S-transferaz: Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2352–2363. <https://doi.org/10.21597/jist.1150868>
 19. JAKOBY, H. P. (1974). the First the First. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(november), 11.
 20. Balcı, N., Türkan, F., Şakiroğlu, H., Aygün, A., & Şen, F. (2019). Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01422>
 21. Temel, Y., & Kocuyigit, U. M. (2017). Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity, (March). <https://doi.org/10.1002/jbt.21927>
 22. Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y., & Çiftci, M. (2017). Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Purification and Characterization of Glutathion Reductase Enzyme From Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Er, 7(3), 143–150.
 23. Mirza Ahmed, B., Temel, Y., Çiftci, M. (2019). Purification and characterization glutathione S-transferase enzyme from quail (*Coturnix, coturnix japonica*) heart and investigation the effect of some metal ions on enzyme activity, *Cumhuriyet Science Journal*, 40, 802–812.
 24. Çomaklı, Veysel, Mehmet, Çiftçi, Ömer İrfan, K. (2011). Purification of Glutathione S-Transferase Enzyme from Rainbow Trout Erythrocytes and Examination of the Effects of Certain Antibiotics on Enzyme Activity Gökkuşluğu Alabalık Eritrositlerinden Glutasyon. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39(4), 413–419.
 25. Bayindir, S., Temel, Y., Ayna, A., & Ciftci, M. (2018). The synthesis of N-benzoylindoles as inhibitors of rat erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(9), 1–9. <https://doi.org/10.1002/jbt.22193>