

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN 6-FOSFOGLUKONAT
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇ
VE KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şevki ADEM

Y.Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

2006

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN 6-FOSFOGLUKONAT
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI
İLAÇ VE KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şevki ADEM

KİMYA ANABİLİMDALI

ERZURUM

2006

Her hakkı saklıdır

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler.....	2
1.2.Pentoz Fosfat Yolu.....	5
1.2.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri	5
1.2.2. Pentoz fosfat yolunun metebolik önemi.....	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar.....	19
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	20
3.2. Yöntemler	24
3.2.1. İnsan kanında 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması	24
3.2.1.1. Kan numunelerinin hazırlanması ve hemolizat hazırlanması.....	24
3.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	24
3.2.1.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve insan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması.....	27
3.2.1.4 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	27
3.3. Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	28
3.4. Protein Tayini.....	29
3.4.1. Kalitatif protein tayini.....	29
3.4.2. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	30

3.5. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç Etkilerinin Belirlenmesi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	44
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	44
4.2. Afinite Kromatografisi Sonuçları.....	45
4.3. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü.....	46
4.4. İnhibitör Etkisi Gösteren İlaçlar İçin I_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKÇA.....	65
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Y. Lisans Tezi

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇ VE KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Şevki ADEM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışmanı : Doç Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Bu çalışmada insan eritrositlerinden saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimini üzerinde bazı antibiyotiklerin etkisi araştırıldı. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimini eritrositlerden amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5' ADP-Spharose afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak %78,37 ve 6552 kat saflaştırıldı. Enzim aktiviteleri Beutler metoduna göre belirlendi. İn vitro şartlarda imipenem, vankomisin, amoksisilin, ornidazol, metronidazol, larnoksikam, sefuroksim ve klindamisin gibi ilaçlar enzimi inhibe etmiştir. İn vitro şartlarda rifamisin, sülfanil amid sülfasetil amida ve linkomisin, enzim aktivitesi üzerinde etkisizdir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçların I_{50} ve K_i değerleri tespit edilmiştir.

2006, 69 sayfa

Anahtar kelime: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, insan, eritrosit, ilaç, inhibisyon

ABSTRACT

MS Thesis

DETERMINATION OF THE EFFECT OF SOME ANTIBIOTICS AND SOME CHEMICALS ON HUMAN ERYTHROCYTE 6-PHOSPHOGLUKONATE DEHYDROGENASE ENZYME ACTIVITY

Şevki ADEM

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

The *in vitro* effect of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphoglukonate dehydrogenase was investigated in this study. Human erythrocyte 6-phosphoglukonate dehydrogenase was purified with ammonium sulfate precipitation and 2',5' ADP-Sepharose 4B affinity chromatography methods. Purification of enzyme was obtained with a yield %78,37 and 6552 fold. The enzyme activity was determined by Beutler's method. Some antibiotics such as imipenem, vancomycin, amoxicillin, ornidazol, metronidazol, lornoxicam, sefuroxime and klindamycin inhibited while, the enzyme activity in *in vitro* condition, rifamicin, sulphanylacetamide, sulphanylamide and linkomicin did not show any effect. The I_{50} and K_i values of the inhibiting antibiotics were determined.

2006, 69 pages

Keyword : 6-phosphogluconate dehydrogenase, human, erythrocyte, drug, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak yürüttüğün bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Deneysel çalışmalarım ve tez yazımı boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Yrd. Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR, Sayın Yrd. Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN ve diğer bölüm elemanlarına teşekkürü borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım boyunca beraber çalıştığım Sayın Murat ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Şevki ADEM

Haziran 2006

SİMGELER DİZİNİ

6PGD	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
6PGA	6-Fosfoglukonat
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Bovin serum albümin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ES	Enzim substrat kompleksi
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
MetHb	Methemoglobin
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
NSAİİ	Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar
RNA	Ribonükleik asit
PER	Amonyum per sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
V _{max}	Maksimum hız
I ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
nm	Nanometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları ve diğer sentez yolları ile ilişkisi	8
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	44
Şekil 4.2. İnsan eritrosit 6PGD enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği. Kolon 1x10 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 1 ml.....	45
Şekil 4.3. SDS-PAGE elektroforezi sonucu jel fotoğrafı.....	47
Şekil 4.4. İnsan 6PGD enzimi üzerine amoksisilin ilacının % aktivite-[I] grafiği	48
Şekil 4.5. İnsan 6PGD enzimi üzerine klindamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği	48
Şekil 4.6. İnsan 6PGD enzimi üzerine vankomisin ilacının % aktivite-[I] grafiği	49
Şekil 4.7. İnsan 6PGD enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I] grafiği	49
Şekil 4.8. İnsan 6PGD enzimi üzerine ornidazol ilacının % aktivite-[I] grafiği	50
Şekil 4.9. İnsan 6PGD enzimi üzerine imipenem ilacının % aktivite-[I] grafiği	50
Şekil 4.10. İnsan 6PGD enzimi üzerine larnoksikam ilacının % aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 4.11. İnsan 6PGD enzimi üzerine linkomisin ilacının % aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 4.12. İnsan 6PGD enzimi üzerine sülfasetamid ilacının % aktivite-[I] grafiği	52
Şekil 4.13. İnsan 6PGD enzimi üzerine sülfanilamid ilacının % aktivite-[I] grafiği	52
Şekil 4.14. İnsan 6PGD enzimi üzerine rifamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil 4.15. İnsan 6PGD enzimi üzerine metronidazol ilacının % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil. 4.16. 6PGD enzimi üzerine metronidazol ilacının etkisi.....	54
Şekil. 4.17. 6PGD enzimi üzerine amoksisilin ilacının etkisi.....	54
Şekil. 4.18. 6PGD enzimi üzerine tenoksikam ilacının etkisi.....	55
Şekil. 4.19. 6PGD enzimi üzerine larnoksikam ilacının etkisi.....	55
Şekil. 4.20. 6PGD enzimi üzerine klindamisin ilacının etkisi.....	56
Şekil. 4.21. 6PGD enzimi üzerine vankomisin ilacının etkisi	56
Şekil. 4.22. 6PGD enzimi üzerine imipenem ilacının etkisi	57
Şekil. 4.23. 6PGD enzimi üzerine ornidazol ilacının etkisi	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 6-PGD enziminin koenzim özgülüğü.....	13
Çizelge 2.2. Farklı türlere ait 6-PGD enziminin molekül kütleleri ve altbirim yapısı	14
Çizelge 2.3. Farklı türlere ait 6-PGD enziminin kinetik sabitleri	17
Çizelge 3.1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği.....	29
Çizelge 3.2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sülfanilamid ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.3. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için linkomisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.4. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için larnoksikam ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.5. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için vankomisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	33
Çizelge 3.6. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için amoksisilin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	33
Çizelge 3.7. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için klindomisin, ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	33
Çizelge 3.8. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefuroksim Na ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	34
Çizelge 3.9. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ornidazol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	34
Çizelge 3.10. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için imipenem ilacı ile yapılan	

çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	34
Çizelge 3.11. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için metronidazol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	35
Çizelge 3.12. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için rifamisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	35
Çizelge 3.13. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sülfasetilamid ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	35
Çizelge 3.14. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde ornidazol ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	36
Çizelge 3.15. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde vankomisin ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	37
Çizelge 3.16. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde metronidazol ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	38
Çizelge 3.17. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde klindamisin ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	39
Çizelge 3.18. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde amoksisilin ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	40
Çizelge 3.19. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde tenoksikam ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	41
Çizelge 3.20. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde larnoksikam ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	42

Çizelge 3.21. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde imipenem ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	43
Çizelge 4.1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları.....	46
Çizelge 4.2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için bulunan K_i ve I_{50} değerleri.....	58

1. GİRİŞ

Kan, içinde bulundurduğu maddeler ve hücrelerden dolayı viskozdur. Kanın rengi; oksijen taşıdığında kırmızı, karbondioksit taşıması halinde ise koyu kırmızıdır. Erişkin erkeklerde ortalama 5 litre, erişkin kadınlarda ise 4 litre kan bulunmaktadır. Kanın insan metabolizmasında taşıma, düzenleme, savunma, ve koruma görevleri vardır (Özden 1990).

Kanın %42-45'i trombosit, lökosit ve eritrosit gibi kan hücrelerinden meydana gelmiştir. Lökositler mikroorganizmaların vücuda yayılmalarının önlenmesi ve dokuların tamir edilmesinde görev alır. Trombositlerin, kapillerin endotel bütünlüğünün sağlanması ve damardan dışarıya kanın sızmasını önlemek gibi fonksiyonları vardır (Onat 1996). Malphigi 1665 yılında eritrositleri tanımladı ve 1673'te Leeuwenhock kanın kırmızı renginin eritrositlere bağlı olduğunu buldu. Şekillerinin disk biçiminde olduğu 1765'te saptanan eritrositlerde, demirin varlığını Menghini, hemoglobini ise Funke bulmuştur (Özer 1985). Eritrositlerin en önemli görevlerinin başında yapılarında bulunan hemoglobin ile dokulara oksijen taşımaktır.

Eritrositlerin hücre yapıları bir çok değişimden sonra oluşur. "Stem cell" temel hücresinden sonra bazı değişimlerle, nükleus dışında bütün organelleri bulunan retikülositler oluşur. Retikülositlerde glikoliz, pentoz fosfat yolu, trikarboksilik asit siklüsü, oksidatif fosforilasyon, hemoglobin, kolesterol, fosfolipid, triaçil gliserol ve pürin nükleotid sentezi enzimleri bulunur (Thomas and Devlin 1986).

Retikülositler kemik iliğinden kana salındıktan sonra, üç gün içinde mitokondri, golgi cisimciği, lizozom ve RNA'nın hücreden uzaklaştırılmasıyla olgun eritrositlere dönüşürler (Shohet *et al.* 1986). Eritrositlerin ortalama ömürleri 120 gün kadardır. Olgun hücre çekirdeksiz ve bikonkav yapıdadır. Membran kalınlığı 6 nm, insan eritrosit çapı 6.0-9.0 mikron arasındadır (Onat 1996).

İleri düzeyde özelleşmiş olan bu hücrelerin, sitoplazmasının %34'ü hemoglobindir. Eritrositlerde nükleik asit ve protein sentezi yapılamamaktadır (Onat 1996). Hücrenin membran yapısının korunması, fonksiyonlarının yerine getirebilmesi ve iç yapısının korunması için ihtiyaç duyulan enerji ve biyomoleküller; glukozdan, anaerobik glikoliz ve pentoz fosfat (aerobik) yolu olmak üzere iki metabolik yolla karşılanır. Reaksiyonlar sonucu oluşan NADPH; glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonda okside glutatyonu indirgenmiş şekline çevirerek glutatyonun diğer reaksiyonlarına bağlanmasında kullanılır (Gupte *et al.* 2002).

Glikoliz ve pentoz fosfat yolu enzimlerinin eksikliğinde, eritrositlerde; kation gradienti düzenlenememekte, enzimlerin ve hemoglobinin –SH grupları indirgenmiş halde tutulamamakta, bikonkav membran esnekliği kaybolduğundan, hücre bütünlüğü de ortadan kalkmaktadır. Oksidasyon, eritrosit membranı ile hemoglobinin yapısındaki hem ve globin kısımlarını etkileyerek bozulmalara yol açmaktadır. Hücredeki bu değişimler sonucu; membranda karmaşık disülfit bağları oluşmakta, denatüre hemoglobinin disülfit bağları ile bağlanması sonucu K^+ iyonlarının sızıntısı artmakta, membran esnekliği kaybolmakta, globin heinz cisimciği biçiminde çökmekte ve methemoglobin oluşmaktadır. Koruma ve destekleme fonksiyonlarını kaybeden eritrosit hücrelerinin sayıları azalmakta ve zamanla hücre ölmektedir (Onat 1996).

1.1. Enzimler

Canlı organizmalarda, kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir (Lehninger 2000). Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidirler. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Lehninger 2000).

Enzimlerin bazıları katalizleme fonksiyonlarını protein yapıları ile gerçekleştirirken, bazıları ise enzimlerin yapılarında bulunmayan ve kofaktör denen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör metal iyonu (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} vb.) olabileceği gibi koenzim denen

kompleks organik moleküller de (NAD^+ , FAD^+ , KoenzimA) olabilir. Bazı enzimler her ikisine de ihtiyaç duyarlar. Koenzimlerin çoğu vitaminlerden ve özellikle B grubu vitaminlerinden türetilmişlerdir. Koenzimler proteinin denatüre olması ile bozulmazlar ve defalarca kullanılabilirler. Kofaktörlü enzimlere holoenzim, enzimin protein kısmına ise apoenzim denir (Onat 1996).

Enzimlerin kinetik özellikleri hakkındaki bilgiler Michaelin-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini ifade eden $V_{\max}$ değerlerinden anlaşılır. Enzim aktivitesi “Enzim Ünitesi” ile ifade edilir. “Enzim Ünitesi”, 25°C 'de ve optimal şartlarda 1µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. “Spesifik aktivite” 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Biyokimya tarihindeki bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu enzimler oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2004). Enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanı ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun tanısı konulmakta ve hastalığın geleceği ile ilgili ipuçları edinilmektedir (Onat 1996). Günümüzde yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, bir çoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

İnhibisyon, inhibitör denen maddeler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesidir. Bu maddeler, çoğunlukla küçük molekül yapısına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemlidir. Bir çok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

İnhibisyon, dönüşümsüz yada dönüşümlü olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana gelir. Bu inhibisyonda V_{max} düşerken, K_M değişmez.

Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşmeleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışır. İnhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda K_M değeri artar. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda V_{max} düşerken K_M değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ES (enzim-sustrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_M azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen ve allosterik enzimler olarak adlandırılan enzimlerde de allosterik inhibisyon adı verilen inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyonda, inhibitörler enzimin aktif bölgesinden başka bir kısma bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimler, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Bu biyolojik katalizörler tek bir kimyasal reaksiyonu yada aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler (Lehninger 2000).

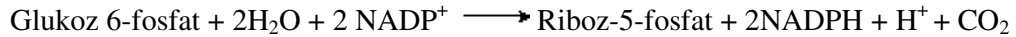
1.2. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu yada fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da bilinmektedir. İlk kez 1931 yılında Otto Warburg tarafından ortaya atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dinckens, Bernard Horecker ve Efrahim Rocher isimli biyokimyacılar tarafından aydınlatılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

1.2.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri

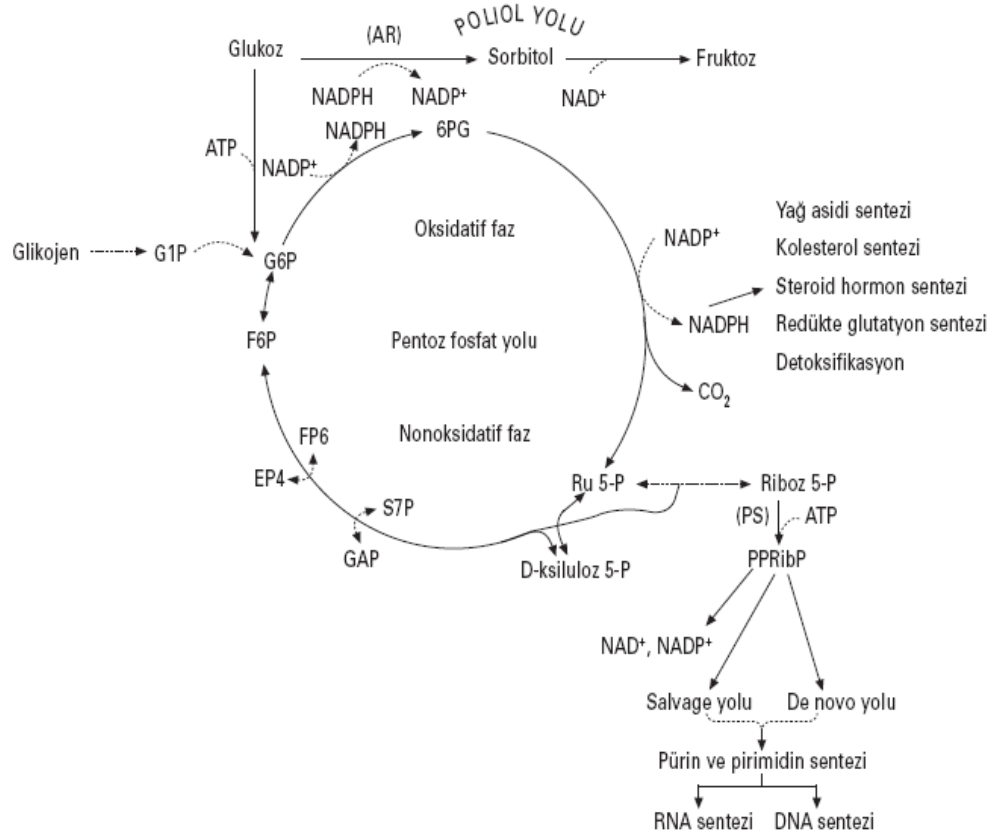
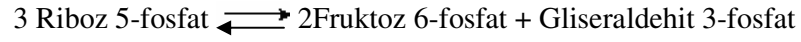
Pentoz fosfat yolu oksidatif ve oksidatif olmayan olmak üzere iki aşamadan oluşur. Sitozolda oluşan bu metabolik yolun amacı indirgeyici biyosentez olayları için NADPH ve birçok bileşiğin yapısında bulunan riboz-5-fosfat üretmektir. Bu yolda; üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerler oksidatif olmayan reaksiyonlar serisi ile birbirlerine dönüştürülür (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Oksidatif reaksiyonlar; 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimince, glukoz 6-fosfat'ın bir nolu karbonunun dehidrogenasyonu sonucu 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüştürülmesi ile başlar. İkinci olarak fosfoglukono-1,5-lakton, laktonaz enzimi tarafından 6-fosfoglukonat'a dönüştürülürken, burada oluşan ürün 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimince ribuloz 5-fosfat'a, oluşan bu molekül de fosfopentoz izomeraz enzimi tarafından riboz 5-fosfat'a dönüştürülür. Bu tepkimeler sonucunda D-riboz-5-fosfat ve CO₂ oluşur. NADPH birinci ve üçüncü reaksiyonlarda oluşur. Reaksiyonun net denklemi aşağıdaki şekildedir (Kutay 2002).



Oksidatif olmayan bölümde; ksiluloz 5-fosfat ve riboz 5-fosfattan transketolaz enzimi ile gliseraldehit 3-fosfat ve sedoheptuloz 7-fosfat oluşması ile başlar. Oluşan bu iki ürün transaldolaz enzimi ile eritroz 4-fosfata ve fruktoz 6-fosfata, bu bileşikler de transketolaz tarafından gliseraldehit 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfata dönüştürülmektedir.

Böylece pentoz fosfat yoluyla oluşan riboz 5-fosfat glikoliz yolu ara bileşiklerine dönüştürülmüş olur. Oksidatif olmayan bölümün net reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Şekil 1.1. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları ve diğer sentez yolları ile ilişkisi (Tandoğan 2004)

1.2.2. Pentoz fosfat yolunun metabolik önemi

Pentoz fosfat yolu; hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki işlevi vardır (Krebs and Eggleston 1978). Ayrıca, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat, bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbohidratlar bu yolda sentezlenmektedir (Wood 1986).

NADPH hücrede yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksitlerin indirgenmesinde rol alır (Wood 1986; Nelson and Cox 2000). Eritrositlerde pentoz fosfat yolu okside glutatyonun indirgenmesinde kullanılan NADPH'yı sağlar. Redükte glutatyon (GSH) ve GSH-bağımlı enzimler hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) korur (Siems *et al.* 2000). Fagositlerde oksijen tüketimi ve H₂O₂ oluşumu fazla olduğundan pentoz fosfat yolunun aktivitesi de fazladır (Borregaard *et al.* 1984). Ksenobiyotikler, glutatyon peroksidaz, sitokrom P-450 detoksifikasyon sistemleri ile NADPH kullanılarak zararsız hale getirilir (Hollenberg 1992). NADPH'nın damar düz kas hücrelerinde iyon kanallarının aktivitesini kontrol ettiği öne sürülmüştür. NADPH'nın azalması özellikle V-tipi potasyum (K⁺) kanallarının açılmasına ve vazodilatasyona neden olur (Gupte *et al.* 2002). Sorbitol yolunun önemli enzimlerinden aldoz redüktaz da NADPH kullanır (Grunewald 1993). DNA sentezi için ribonükleotidlerin (ribonükleotid redüktaz ile) deoksiribonükleotidlere dönüşmesini sağlar. NADPH suda çözünmeyen birçok bileşik için de gereklidir. Diğer ürün riboz-5-fosfat; ATP, FAD, NAD⁺, NADP⁺, DNA, RNA, CoA yapısına girer (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Eritrositlerde glukoz 6-fosfat dehidrogenazın kalıtsal eksikliği yada değişik varyantlarının bulunması, ileri seviyelerde anemiye yol açmaktadır. Tiamin eksikliğinde ortaya çıkan ve bellek kaybı ile kısmi paralizin birlikte görüldüğü Wernicke-Karsokoff sendromu; pentoz fosfat yolundaki transketolaz aktivitesindeki değişimlere de

bağlanmaktadır (Kutay 2002). Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin eksikliğinde anemi görülür (Ajmar 1979).

Pentoz fosfat yolu alyuvarlar ve beyin doku hücreleri gibi bazı hücrelerde, temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için başvuru olan glikolize alternatif bir oksidatif yoldur (Lukens 1993; Thomas and Gillham 1983). Bu yolda hücredeki glukozun %10'u kullanılmaktadır (Beutler 1991; Lu and Comphehl 1991).

Bu çalışmada 6PGD enzimine etkisi araştırılan ilaç ve özellikleri aşağıdaki gibidir.

1. Metronidazol: Nitroimidazol türevidir. Protozoal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Kemik ve eklem, merkezi sinir sistemleri, alt solunum yolu ve ciltte meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Metronidazol'un nitro grubu elektron alıcı olarak görev yaparak proteinlere ve DNA'ya bağlanan indirgenmiş sitotoksik bileşikler oluşturur ve hücre ölümüne neden olur (Kayaalp 2000).

2. Ornidazol: Metronidazol gibi nitroimidazol türevidir. Kimyasal yapılarının özelliği nedeniyle metronidazoldan daha lipofiliktirler ve karaciğerde enzimatik inaktivasyonları daha azdır. Bakteri ve diğer mikroorganizma hücrelerine pasif difüzyonla girerek duyarlı bakteri ve protozon hücre DNA' sına bağlanıp DNA sentezini inhibe ederek mikrobiyal hücre ölümüne sebep olur (Kayaalp 2000).

3. Tenoksikam: Oksikam grubundan bir tienotiazin türevi olan tenoksikam NSAİİ olan bir ajandır. Antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkisi yanında trombosit agregasyonunuda engellemektedir. Tenoksikam, araşidonik asit metabolizmasında siklooksigenaz enzimini inhibe ederek, prostaglandin oluşumunu engellediğinden antiinflamatuvar etkiye sahiptir (Kayaalp 2000).

4. Klindamisin: Linkomisin'in 7(R)-hidroksil grubunun 7(S)-kloro grubuyla sübstütüsyonu ile elde edilmiş yarı sentetik bir antibiyotiktir. Antibakteriyel etki spektrumları aynı olmakla birlikte klindamisin, *in vitro* aktivitesinin daha yüksek olması

ve daha az gastrointestinal yan etkilere neden olması gibi özellikler ile Linkomisininden farklıdır. Klindamisin bakteri ribozomunun 50 S alt birimine bağlanarak peptid bağlarının oluşmasını engelleyerek protein biyosentezini inhibe eder. Yüksek dozlarda kullanıldığında bakterisid etkisi olan, bakteriyostatik bir antibiyotiktir (Kayaalp 2000).

5. Linkomisin: Geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, kaynağı *Streptomyces Linclnensis* mantarıdır. Etkisi bakterisid ve bakteriyostatik olabilir. Linkomisin, gram-pozitif bakterilerin bir çoğu üzerinde etkilidir. Dokulara ve vücut sıvılarına nüfuz edebilmesi özelliği ile klindamisine benzer ve onun gibi BOS'a ancak az derecede girebilir. Eliminasyon hızı ve kalıbı özellikleri klindamisin'e benzer (Kayaalp 2000).

6. Amoksisilin: Ampisilin'in fenil yan zincirinin üzerine bir hidroksil grubu ilavesi ile türetimiştir. Geniş spektrumlu yarı sentetik antibiyotiktirlerdendir. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ettiğinden, bakterisid etki gösterir (Kayaalp 2000).

7. Rifamisin: Yarı sentetik antibiyotiktir. Suda aşırı çözünen kırmızı renkli bir maddedir. Rifamisine duyarlı bakterilerde; RNA polimeraz enzimini inhibe ederek, DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezini bozarak bakterisid etki gösterir. Nadiren kullanılan bir ilaçtır (Kayaalp 2000).

8. Vankomisin: *Streptomyces orientalis*'ten elde edilen, yaklaşık 3.300 dalton molekül ağırlıklığında kompleks bir glikopeptiddir. Suda çözünen stabil bir bileşiktir. Etkisini, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek gösterir. Ayrıca bakteri hücre membranı geçirgenliğini değiştirmekte ve RNA sentezini engellemektedir. Antibakteriyel spektrumu dardır. Esas olarak gram-pozitif kokusları ve *Clostridium*'ları üzerinde etkilidir (Kayaalp 2000).

9. İmipenem: Klinik kullanıma giren ilk karbapenem türevi bir antibiyotiktir. Tienamisin'in kimya dilinde N-forminidol türevidir. Penisilin bağlayan proteinlere yüksek afinitesi vardır. Kromozom ve plazmid-aracılı β -laktamazlara dayanıklılığı ileri

derecede olup, penisilinlere ve sefalosporinlere karşı da etkilidir. Mide-barsak kanalında absorbe olmazlar. Böbrekte proksimal tubulus hücrelerinde bulunan bir dipeptidaz türü olan dihidropeptidaz enzimi tarafından hemen inaktive edildiği için, bu enzimi spesifik olarak inhibe eden silastatin sodyum maddesi ile kombine müstahzar halinde üretilir (Kayaalp 2000).

10. Sefuroksim: İkinci kuşak bir sefalosporinlerdendir. Bu antibiyotik, solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. Sefuroksim, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe edererek, önemli hedef proteinlere bağlanır ve bu yolla bakterisid etki gösterir. Sefuroksim, β -laktamaz üretenler dahil birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakterisid etki gösterir (Kayaalp 2000).

11. Sülfanilamid: Esasen p-aminobenzen sülfanamid'dir. Sülfanamidlere duyarlı olan bakteri ve diğer mikroorganizmaların membranları folik asidi (dihidro folik asidi) geçiremediklerinden onu sentezlemeleri zorunludur. Dışardan aldıkları p-aminobenzoik asidi, pteridin ile birleştirerek dihidropteroik aside dönüştüren dihidropteroat sentetaz; sülfanamidler tarafından inhibe edilir. Dihidrofolikasidin ve ondan dihidrofolat redüktaz enzimi aracılığı ile oluşturulan tetrahidrofolik asidin sentezi azalır. Sonuçta pürin bazları ve timidin sentezini sağlayan enzimlerin kofaktörü olan tetrahidrofolat türevleri yapılamaz ve bakterilerde DNA ve RNA sentezi bozulur; metiyonin ve glisin sentezi de azalır. İnsan hücreleri folik asidi geçirebildiklerinden bu belirtilen öğelerin sentezi etkilenmez (Kayaalp 2000).

12. Sülfasetamid (sülfanilasetamid): Sülfanilamid'in sulfonamid ($\text{SO}_2\text{-NH}_2$) grubundaki azot atomundaki hidrojen atomlarından birinin yerine uygun radikal (CH_3 .) bağlanarak türetilmiştir. Suda, sulfadiazinde göre 90 kat fazla çözünür. Sulfonamidlerin etkisi, bakteriyostatiktir. Çok yüksek konsantrasyonlarda bakterisid etki gösterebilir. Sodyum tuzunun %30'luk solüsyonu veya %10'luk merhemi göze lokal olarak uygulanabilir (Kayaalp 2000).

13. Lornoksikam: Oksikam grubundan analjezik ve antipiretik etkili, non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) bir ajandır. Lornoksikamın etki mekanizması, siklooksigenaz-1 (COX-1) ve siklooksigenaz-2 (COX-2) izoenzimlerinin dengeli biçimde dönüşümlü olarak inhibe edilerek, inflamasyon mediyatörleri olan prostaglandinlerin sentezini inhibe etmesi ile açıklanmaktadır (Kayaalp 2000).

Birçok ilacın, enzimleri *in vivo* olarak aktive veya inhibe ettiği bilinmektedir. İlaçların 6PGD'yi inhibe etmesi durumunda eritrositlerin yapısı korunamayacak ve bu durumda birçok sağlık problemine neden olacaktır. Yapılan literatür çalışmasında bazı ilaçların 6PGD enzimi üzerine *in vivo* ve *in vitro* inhibisyon etkilerinin araştırıldığına rastlanmıştır. Çalışılan ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla 6PGD enzimi insan eritrositlerinden saflaştırılarak kullanılan bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri araştırılması düşünülmüştür. Enzimi inhibe eden ilaçların I_{50} ve K_i değerlerinin tespiti hedeflenmiştir.

KAYNAK ÖZETLERİ

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44; 6PGD) NADP^+ varlığında 6-fosfoglukonat bileşimini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimidir. Reaksiyon sonucu bir çok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve bir çok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzimin önemi NADP^{++} 'yi NADPH'a indirgemesinden kaynaklanmaktadır. Birçok mikroorganizmada glukoz ve glukonat katabolik enzimi olarak görev alır (Yoshida *et al.* 1997). Enzim glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentoz fosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemlidir (Del Mar *et al.* 1986).

Enzimin eksikliğinde hemolitik anemi, retikulosit sayısında eksiklik, sarılık ve episodemik hemolitik olaylar tespit edilmiştir. Enzimin eksikliği ile beraber piruvat kinaz aktivitesi artmakta ve GSH seviyesinde ise azalma gözlenmektedir. Bu durum da eritrositlerin ömürlerini kısaltmaktadır.

6PGD'nin doğal substratı 6-fosfoglukonat'tır. Enzimin NADP^{++} 'ya olan ilgisi genelde substratı olan 6-fosfoglukonat'tan daha fazladır (Topham and Dalziel 1986). Ayrıca NADPH spesifik 6PGD'nin insan eritrositi, kuzu karaciğeri, *Trypanosoma Brucei* ve *Candida utilis*' de substrat olarak 2-deoksi-6-fosfoglukonat ve 3-keto-6-fosfoglukonatı kullanabildiği çalışmalarda rapor edilmiştir (Hanau *et al.* 1992; Rippa *et al.* 1998).

Enzimin koenzim spesifikliği; spesifik olarak NAD^+ kullananlar, spesifik olarak NADP^+ kullananlar, spesifik olmayanlar olmak üzere üç farklı şekilde belirlenmiştir (Ohara *et al.* 1996). Koenzim kullanımı türe göre değişmekle beraber memeliler ve mayalar genelde NADP^+ spesifik, bakterilerde hem NADP^+ hem de NAD^+ spesifikliği belirlenmiştir.

Çizelge 2.1. 6-PGD enziminin koenzim özgüllüğü

Enzim kaynağı	NAD ⁺ spesifik	NADP ⁺ spesifik	Spesifik olmayan	Kaynak
<i>Gluconabacter subaksidans</i>			+	Wood 1982
Bradyrhizobium sp.	+			Sosa <i>et al.</i> 2001
<i>Pseudomonas flourosens</i>			+	Stournaras <i>et al.</i> 1983 ⁵
<i>Escherichia coli</i>		+		Yoon <i>et al.</i> 1989
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		+		Tsai and Chen 1998
<i>Haemophilus influenzae</i>		+		Yoon <i>et al.</i> 1989
Koyun karaciğeri		+		Toews <i>et al.</i> 1976
<i>Bacillus sığarotermofulus</i>		+		Veronese <i>et al.</i> 1976
<i>Lacto bacillus</i>	+			Menezes <i>et al.</i> 1989
<i>L. casei</i>		+		Menezes <i>et al.</i> 1989
Memeliler ve mayalar(genelde)		+		Wood 1982

Günümüzde en az 20 farklı kaynaktan elde edilen enzimin amino asit dizisi belirlenmiştir. Enzimlerin ortalama 400 civarında amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Hutchison *et al.* 1984). Örneğin; insan 6PGD enzimi 484 amino asitten oluşur. Enzimlerin amino asit dizilimi kaynağına göre değişmektedir.

Değişik kaynaklarda yapılan çalışmalarda 6PGD geninin yapısı aydınlatılmış, nükleotid sırası belirlenmiş ve genler klonlanmıştır. Örneğin insanda 1, domateste 4. 5. ve 12. kromozomlarda bulunan 3 geni vardır.

Yapılan X-ray kristalografik incelemelerde aktif bölgede proton alıcısı ve vericisi olarak rol oynayan bir çok amino asit rezidüsüne rastlanmıştır. Koyun karaciğerinde; enzimin aktif bölgesi, tirozin 196, glutamat 195 ve glutamat 222 substrat bağlanma yeri olarak düşünülen bir cepte bulunmaktadır. Enzimin substrata bağlanması aktif bölgesinde yer alan histidinin iyonizasyonu, koenzimin bağlanması ise tirozinin iyonizasyonu ile

sağlanır. Aktivite için histidin gerekliliği laboratuvar çalışmaları ile ispatlanmıştır (Topham and Dalziel 1986).

Yapılan X-ray çalışmalarında enzimin eşkenar dörtgen şeklinde kristalize olduğu gösterilmiştir. *Lactococcus lactis*' de aynı yapı gözlemlenirken; *trypanosoma brucei*'de kristalin üçgen şeklinde olduğu belirlenmiştir. Sığır enzimi kristalize elde edilmiş ve üç boyutlu yapısı incelenmiştir. Enzimin homodimer olduğu ve her alt birimin α - β - α - β bölgelerinden oluştuğu ve bu bölgelerin NADP⁺ bağladıkları gösterilmiştir (Adams *et al.* 1991).

6-fosfoglukanat dehidrogenazın molekül kütlesi kaynağına göre 80-152 kDa, altbirimlerinin molekül kütlesi ise 33-55 kDa arasında değişmektedir. Bazı canlılarda homodimer, bazılarında homotetramer bir yapıya sahiptir. İnsanda homodimer bir yapıya sahip enzimin alt biriminin molekül kütlesi 53 kDa olduğu deneysel verilerle gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve altbirim yapısı

Enzim kaynağı	Molekül kütlesi kDa	Alt birim molekül kütlesi ve yapısı kDa	Kaynak
Koyun karaciğeri	94	47, homodimer	Betts and Mayer 1975
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	120	52,5, homodimer	Bianchi and Bertrand 2001
<i>Leuconostoc lactis</i> SHO-54	140	32,8, tetramer	Ohara <i>et al.</i> 2004
İnsan	106	53, homodimer	Pearse and Rosemeyer 1975
Sıçan karaciğeri	102	52, homodimer	Proscal and Holten 1972
<i>Drosophila melanogaster</i>	105	53, homodimer	Williamson <i>et al.</i> 1980
<i>Schizosaccorharomyces Pombe</i>	152	38, homotetramer	Tsai and Chen 1998

Türüne göre değişmekle beraber enzimin optimum pH aralığı 5,5-9,6 aralığında değişmektedir. Enzim aktivitesinin pH 7,6-9,2 aralığında arttığı, 9,3'ten sonra ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Barenghi *et al.* 1987). Enzimin doğal halinin

optimum pH'sı; insan beyinde 8,6 (Weisz *et al.* 1985), sıçan eritrositlerinde 7,0 (Beydemir vd 2003) ve sıçan böbrek korteksinde 8,0 (Corpas *et al.* 1995) olarak belirlenmiştir.

Enzimin reaksiyon mekanizmasının ardışık/düzensiz olduğu tespit edilmiştir (Dallocchio *et al.* 1985). Bu mekanizmada enzime bağlanan substratlardan biri diğerinin bağlanmasını kolaylaştırır. Substratların bağlandığı üçlü ara kompleksten, ürünlerin bağlandığı üçlü kompleks oluşur ve ürünler sırayla ayrılırlar (Kutay 2002)

Enzimin saflaştırılmasında karşılaşılan problemler enzimin kararsızlığı ve stabilizasyonudur. Aktivite kaybının en aza indirilmesi için genelde çalışmalar +4 C°'de yapılmaktadır. Tampona 2-merkaptöetanol, EDTA, NADP⁺, fenilmetilsulfonilflorür ilavesiyle stabilizasyon sağlanmıştır (Toews *et al.* 1976; Carne 1982; Pearse and Rosemeyer 1974). Bakteriyel kaynaklı 6-PGD enzimler, hayvansal kaynaklı enzimlerden daha karardır (Menezes *et al.* 1989).

G6PD ve 6PGD beraber olarak 2' 5'-ADP Sepharose 4B afinite ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değıştirici kolonlar kullanılarak saflaştırılmışlardır. Enzimler iyon değışim kolonundan tuz gradienti oluşturularak elüe edilmişlerdir (Ulus *et al.* 1999).

Enzim; amonyum sülfat çöktürmesi, yüksek hızda santrifüj, DE-52 kolonu, SP-Sephadex, DEAE selüloz, CM-selüloz, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, hidroksiapatit ve NADP⁺-Sepharose, 2' 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi, NADP⁺-Agaroz vb. yöntemlerle saflaştırılmıştır (Hanua *et al.* 2004).

ATP'nin 6-PG'a karşı yarışmalı (Moritz *et al.* 2000), NADP⁺ karşı yarışmasız (Cottreau *et al.* 1975) inhibisyonu gözlenmesine karşın, *in vitro* şartlarda ATP enzimi inhibe etmesine rağmen *in vivo* şartlarda ATP'nin %80-90'ı Mg⁺² ile kompleks oluşturduğundan dolayı inhibisyonu zayıflar (Moritz *et al.* 2000). Fruktöz-1,6-

bisfosfatın ve eritroz 4-P'nin *leuconostoc lactis* 6PGD enzimini yarışmalı olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu türde 1'er mM ATP, ADP, AMP, NADP⁺, NADPH, asetilCoA, okzalasetat, glukoz-1-P, fosfoenolpruvat ve glukoz-6P'nin inhibisyon yaptığı gözlenmemiştir (Ohara *et al.* 2004).

Bazı metal iyonlarının potansiyel inhibitör olduğu belirtilmiş ve Roark and Brown (1996) tarafından Zn⁺², Cu⁺², Cd⁺² inhibisyonları tespit edilmiştir (Sawa *et al.* 1985). Asetat ve sodyum asetat inhibisyon etkisi göstermediği için diğer anyonların etkileri incelenirken sabit iyonik kuvvet oluşturmak da kullanılabilir (Proscal and Holten 1972). Ayrıca enzim düşük Mg⁺² konsantrasyonunda aktive, yüksek Mg⁺² konsantrasyonunda ise inhibisyona uğramaktadır (Veronese *et al.* 1974).

Enzimin ürün inhibisyonu çalışmalarında NADPH ve ribuloz-5-fosfatın etkisi araştırılmış ve NADPH'nın NADP⁺ bağlanmasını yarışmalı, 6-PG'nin bağlanmasını yarışmasız olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Kato *et al.* 1979). Ribuloz-5-fosfatın ise hem 6-PG hem de NADP⁺ bağlanmasını yarışmasız olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Fruktoz-1,6-bisfosfatın koyun karaciğerinde 6-PG'ye karşı yarışmalı, NADP⁺ye karşı yarışmasız inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Dyson and D'Orazio 1971). Bazı türlerde okzalasetat, glukoz-6P, okzalat, fruktoz-6-P, fruktoz-1-P, glukoz-1,6 bisfosfat, P_i, P_o (fosfanat), sitrat ve sülfatın inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Beitner and Nordenberg 1979). Sıçan eritrositlerinde 2.500 ± 0.866 mM, 0.052 ± 0.007 mM, ve 0.070 ± 0.007 mM konsantrasyonlarında ATP, NADPH ve NADH için inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. (Çiftçi vd 2002)

Buna ilaveten farklı kaynaklardan elde edilen 6PGD enziminin kinetik çalışmaları yapılmış ve bazı kinetik özellikleri tespit edilmiştir. Tespit edilen bazı kinetik özellikleri çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı türlere ait 6PGD enziminin kinetik sabitleri

Enzim kaynağı	K _M 6-PGA (mM)	K _M NADP ⁺ (mM)	K _M NAD ⁺ (mM)	K _i NADPH (μM)	Kaynak
Koyun karaciğeri	0,015	0,07			Dyson <i>et al</i> 1973
Sıçan karaciğeri	0,071	0,013		0,02	Corpas <i>et al</i> 1995
Tavşan meme bezi	0,054	0,0230			Betts and Mayer 1975
İnsan eritrositi	0,020	0,030		0,030	Pearse and Rosemeyer 1975
<i>Candida utilis</i>	0,054	0,020			Berdis and Cook 1993
Soya (izoenzim1)	0,098	0,0030			Hong and Copeland 1992
Soya (izoenzim 2)	0,109	0,0036			Hong and Copeland 1992
Sıçan böbrek korteksi	0,049	0,056		0,041	Corpas <i>et al.</i> 1995
<i>Pseudomonas oleaverans</i>	0,0152		0,055		Sokolov <i>et al</i> 1980
<i>Pseudomonas C.</i>	0,01	0,02	0,05		Ben and Goldberg 1980
Boğa adrenalin korteksi	0,035	0,018			Senkevich <i>et al</i> 1989
Domuz karaciğeri	0,0135	0,048			Toews <i>et al</i> 1976
<i>Candida biodinii</i>	0,011	0,013			Bianchi and Bertrand 2001
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0,02	0,025			Veronese <i>et al</i> 1976
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0,071	0,043			Kato et al 1979
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,024	0,015			Bridges and Palumbo 1975
İspanak yaprakları	0,04	0,006			Krepinsky <i>et al</i> 2001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,013	0,0008			Niehaus <i>et al</i> 1996

Eritrosit 6PGD'si üzerinde yapılan çalışmalarda metiergobazin maleat, piroksikam, tenoksikam, tiyokolşikozid, menadion sodyum bisülfid, fuluorourasil, sisplatin, ketoprofenin enzimi inhibe ettiği, adranalin, midazolam, fentanil, deksametazomna bisülfid, pentoksifilin de enzim üzerinde etkisiz olduğu belirtilmiştir (Özabacıgil 2005). Akyüz ve arkadaşları (2004) insan eritrositi üzerindeki çalışmalarında; amikasin, ampisilin, sefepim HCl, netilmisin, gentamisin sülfat, isepamisin, kloramfenikol, lavoflaksasin, ofloksasin, penisilin, seftazidim pentahidrat, siprofloksasin, sefotaksim

sodyum teikoplanin enzimi inhibe ettiği, sefazolin sodyumun aktive ettiği, seftriakson, meropenem, streptomisin slfatin etkisiz olduğu belirtilmiştir. Ayrıca vanadat'ın kuzu karaciğeri enzimini inaktive ettiği tespit edilmiştir. Çiftçi ve arkadaşları (2002) sıçan eritrositlerinde yaptıkları enzimin çalışmalarında amikacin, ampicilin ve netilmisin sülfat'ın enzimi inhibe ettiğini ve metamizol'nenzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Sıçan eritrositlerinde melatonin hormonunun enzimi inhibe ettiği ayrıca tespit edilmiştir (Gülçin ve Beydemir 2003).

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, β -nikotinamidadeninükleotidfosfat (Na tuzu) (NADP^+), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E. Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, β -merkapt etanol ve 2' 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan; çalışmada kullanılan ilaçlar ise piyasadan temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l.
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlmixer

Hassas terazi	: Gec Avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), Sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Mağnetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu	: Sanyo Madical Freezer

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve de iyonize sudur.

Eritrositlerin yıkanması için kullanılan çözelti

1. 0,16 M KCl : 11,92 g KCl (0,16 mol) alınarak su ile 1 L'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl/ 5mM 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 50 ml'ye tamamlandı.

2. 0.1 M MgCl₂: 0,475 g (5 mmol) alınıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacim 50 ml'ye tamamlandı.

3. 6 mM 6PGA: 0,091 g (0,3 mmol) 6PGA alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 2mM NADP⁺ Çözeltisi: 0,0765 g NADP⁺ (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 50 ml'ye tamamlandı.

Diyaliz ve Amonyum sülfat çöktürmesinin çözünmesi için kullanılan tampon:

1. (Amonyum sülfat çöktürmesi için) 50 mM KH_2PO_4 (pH= 7,5): 0,68 g KH_2PO_4 (5×10^{-3} mol) alınıp 80 ml suda çözöldü. pH'sı NaOH ile 7'ye ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. (Diyaliz için). 50 mM K-asetat/ 50 mM K-fosfat: 4,9 g K-asetat (5×10^{-2} mol) ,6,8 g K-fosfat (5×10^{-2} mol) karışımı 800 ml suda çözöndü. pH= 6'ya ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözelti:

1. 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH= 6 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml suda çözöldü. pH'sı 6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

2. 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH= 7,85 (Afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözöldü. pH= 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

3. 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl, pH= 7,85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 K-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 1L'ye tamamlandı.

4. 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA (pH= 7,85) + 80 mM KCl + 5 mM NADP^+ (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g K-fosfat, 0,121g EDTA, 0,298 KCl ve 0,1913 g NADP^+ karışımı 40 ml suda çözöldü. pH= 7,8'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 Na-asetat(50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözöldü, 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) 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl bir miktar suda çözöndükten 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 çözöldü.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH= 8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözöldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH= 6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözöldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid %0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid alınarak hacmi su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. %10'luk amonyum persölfat çözeltisi: 1 g amonyum persölfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS'nin hacmi su ile 10 ml'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözöldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH= 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (Jelde yürütölen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözölmesiyle hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.

11. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözöldü ve saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözöndü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti

1. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

İlaç ve kimyasal maddelerin stok çözeltileri:

1. Klindamisin: 600 mg klindamisinin 4 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (297 mM).
2. Sülfanilasetamid: 50 mg sülfanilasetamidin 5 ml steri saf l suda çözülmesiyle elde edildi (90 mM).
3. Sülfanilamid: 100 mg sülfanilamidin 5 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (22,22 mM).
4. Linkomisin: 600 mg Linkomisinin 2 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (736,2 mM).
5. Rifamisin: 250 mg Rifamisin sodyum'un 3 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (115,8 mM).
6. Amoksisilin: 1 g amoksisilinin 4 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (665,8 mM).
7. Vankomisin : 1 g vankomisinin 10 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (172,5 mM).
8. Sefuroksim sodyum: 750 mg sefuroksim sodyum'un 6 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (244,8mM).
9. İmipenem: 500 mg imipenemin 800 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (1,97 mM).
10. Ornidazol: 500 mg ornidazolün 3 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (758,8 mM).
11. Tenoksikam: 20 mg tenoksikamın 2 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (29,67 mM).
12. Lornoksikam: 8 mg lornoksikamın 2 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (10,76 mM).
13. Metronidazol: 500 mg metronidazol 100 ml steril saf suda çözülmesiyle elde edildi (29,2 mM).

3.2. Yöntemler

3.2.1. İnsan kanından 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

3.2.1.1. Kan numunelerinin alınması ve hemolizat hazırlanması

Deneyler için gerekli kan, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan merkezinde, taze olarak antikoagulanlı çözelti içeren kan torbalarına alındı. Alınan kan numuneleri ile hemen çalışılmaya başlandı.

Eritrositleri elde edilmesi için taze insan kanı 20'şer ml'lik 8 adet santrifüj tüpüne konuldu ve +4°C'de 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısımlarındaki lökosit ve plazma tabakası bir damlalık yardımı ile alındı. Kalan eritrosit tabakası 0,16 M KCl ile üç kez yıkandı. Her bir yıkama sonrası +4°C'de 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi ve süpernatantlar bir damlalıkla alındı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin beş katı buzlu suda hemoliz edildi.

Hemolizat içerisindeki eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 10.000xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Çalışmalara süpernatantla devam edildi ve çökelek atıldı. Hemolizat hazırlanmış oldu (Beutler 1971; Shreve and Levy 1977; Ninfali *et al.* 1990). Hemolizatda enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

3.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi %35-65 aralığında yapıldı (Akyüz 2004). Hemolizatın içinde bulunduğu beher buzlu su bulunan bir kabın içine konularak sıcaklığının 0 ile +4°C olması sağlandı. Çöktürme işleminde katı (NH₄)₂SO₄ kullanıldı. Amonyum sülfat hemolizata yavaş yavaş katıldı. Manyetik karıştırıcı ile iyice çözünmesi sağlandı. Her katılan miktarın çözünmesinden sonra yeni miktarlar katıldı. Hesaplanan miktar hemolizat içinde çözünmesinden sonra 20 dakika denge oluşması için beklenildi.

Önce %0-35 aralığında çöktürme işlemi yapıldı ve +4°C'de 5000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Çökelek bir miktar 50 mM pH= 7 fosfat tamponunda çözülerek aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite olmadığı görülünce çökelek atıldı. Süpernatant da yapılan aktivite ölçümleri olumlu sonuç vermesi ile (NH₄)₂SO₄ %35-65 aralığında çöktürme işlemi yapıldı. +4°C'de 5000xg'de 15 dakika santrifüj sonucu oluşan çökelek 50 mM pH= 7 fosfat tamponunda mümkün olan en az hacimde çözündürüldü. Süpernatantda yapılan aktivite ölçümlerinde aktivite gözlenmediği için süpernatant atıldı.

Katı amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri şu formüle göre hesaplandı.

$$g(NH_4)_2SO_4 : \frac{1,77.V.(S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V= Hemolizat hacmi

S₁= 1'in kesri şeklindeki mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂=1'in kesri şeklindeki istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen karışım diyaliz torbasında 2 saat süreyle, 2 kez değiştirilerek 50 mM K-asetat / 50mM K-fosfat (pH= 7) tamponuna karşı diyaliz edildi (Ninfali *et al.* 1990). Diyaliz işlemi +4°C'de mağnetik karıştırıcı kullanarak yapıldı. Diyalizden sonra aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

3.2.1.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve insan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra yıkama ve dengeleme tamponu (0,1 mM K-fosfat / 0,1 mM K-asetat, pH= 6) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompanın hızı 5 rpm'de yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkama yapıldı. (Ninfali *et al.* 1990). Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve

pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Belirlenen amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen numune, uygun tamponda çözülüp diyaliz edildikten sonra 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kanın kırmızı rengi tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Bunu takiben kolondan sırasıyla 25'er ml'lik 0,1 mM K-fosfat / 0,1 mM K-asetat, (pH= 6) ve 0,1 mM K-fosfat/0,1 mM K-asetat, (pH= 7,85) geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon yıkandıktan sonra 30ml 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA (pH= 7.85) + 80mM KCl + 5 mM NADP⁺ elüsyon tamponu ile elüe edildi. İnsan eritrosit 6PGD ile çalışırken literatürde kullanılan optimal şartlar uygulandı (Shreve and Levy 1977; Ninfali *et al.* 1990). Elüsyonlar 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alındı, her birinde aktivite değerleri okunarak insan eritrosit enzimi 6PGD için grafik oluşturuldu. Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı.

Afinite jelinin rejenerasyonu için 0,1 M Na-asetat/ 0,5 M NaCl (pH= 4,5) ve 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl (pH= 8,5) sırasıyla 30'ar ml halinde üç kez kolondan geçirildi. Kolon dengelendikten sonra, kolon materyallerini bakterilerden korumak için %0,02' lik 15 ml NaN₃ çözeltisi geçirildi.

3.2.1.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

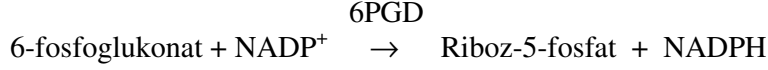
Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıpçılarla

tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla yapıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi .

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH= 8,8), 3,3 ml %30 akrilamid-% 0,8 bisakrilamid, 0,15 ml %10'luk SDS, 0,1 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %1,5'lik PER ve 2,35 ml saf su karıştırıldı.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 ml 1 M Tris-HCl (pH= 6,8), 0,3325 ml %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid, 0,025 ml %10'luk SDS, 0,025 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml % 1,5'lik PER ve 1,84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen PER döküldü.

3.3. Enzim Aktivitesinin Ölçümü



Reaksiyondada görüldüğü gibi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat varlığında; NADP⁺'yi NADPH, 6-fosfoglukonat'ı riboz-5-fosfat'a indirgemektedir. NADPH'in oluşumu 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır (Beutler 1971). NADPH'in 340 nm'de absorbans verdiği bilinmektedir. Enzim aktivitesi 340 nm'de NADPH'in spektrofotometrik olarak artışı ile tespit edildi. Aktivite ölçümleri aşağıdaki tabloya göre yapıldı. 0.,1.,2. ve 3. dakikalarda absorbans değerleri kaydedildi.

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

E $\ddot{U}$ /ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

Çizelge 3.1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

	Kontrol küveti	Numune küveti
Stok çözeltiler	Hacim (µl)	Hacim (µl)
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA 0,1 M MgCl ₂ (pH= 8)	200	200
2 mM NADP ⁺	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	40	40
10 dakika inkübasyon		
6PGA	-	100

Hemolizatta ve amonyum sülfat çökeleğinde aktivite ölçümü yapılırken 10 kat seyreltme yapıldı. Saf enzim aktivite çalışmalarında seyreltme yapılmadı.

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenil alanin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). İnsan eritrositlerinden elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu metoda göre belirlendi. Fakat 280 nm’deki enzim çözeltisindeki NADP⁺, proteinlerin absorbansını maskeleyeceğinden sonuç alınamadı.

3.4.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini

Hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$) formu

mevcuttur. Proteinin bağlanması ile kırmızı formun mavi forma dönüşür. Reaksiyon hızı yüksektir ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976). Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti çok azdır (1-100 µg arası).

Bu yöntem ile protein tayini edebilmek için standart bir grafik gereklidir. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki enzim numunelerinden 0,1 ml'lik tüplere konularak üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir numune için üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Standart grafikten yararlanılarak, elde edilen bu değerlere göre protein miktarları belirlendi.

3.5. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç Etkilerinin Belirlenmesi

İnsan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına farklı konsantrasyonlarda ilaç katılarak aktivite değerleri okundu. İlaçların inhibisyon etkileri mümkün olan en yüksek konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlenmiştir. İlaçların I_{50} değerleri 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda belirlendi. Aktivite ölçümlerinde kullanılan çözelti miktarları ile inhibitörlerin konsantrasyonları çizelgeler halinde verilmiştir.

Bu ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. K_i çalışmalarında kullanılan çözelti miktarları ile inhibitörlerin konsantrasyonları çizelgeler halinde verilmiştir.

Çizelge 3.2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sülfanilamid ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
580	200	100	20	100	1000	-	-
530	200	100	20	100	1000	50	1,111
480	200	100	20	100	1000	100	2,222
380	200	100	20	100	1000	200	4,444
180	200	100	20	100	1000	400	7,777
80	200	100	20	100	1000	500	11,11

Çizelge 3.3. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için linkomisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
580	200	100	20	100	1000	-	-
540	200	100	20	100	1000	40	0,4304
480	200	100	20	100	1000	100	1,076
380	200	100	20	100	1000	200	2,152
180	200	100	20	100	1000	400	4,304
-	200	100	20	100	1000	580	6,2408

Çizelge 3.4. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için larnoksikam ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
540	200	100	60	100	1000	-	-
535	200	100	60	100	1000	5	0,0538
530	200	100	60	100	1000	10	0,1076
525	200	100	60	100	1000	15	0,1614
520	200	100	60	100	1000	20	0,2152
515	200	100	60	100	1000	25	0,269

Çizelge 3.5. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için vankomisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
580	200	100	20	100	1000	-	-
480	200	100	20	100	1000	100	17,25
380	200	100	20	100	1000	200	34,5
280	200	100	20	100	1000	300	51,75
180	200	100	20	100	1000	400	69
80	200	100	20	100	1000	500	86,25

Çizelge 3.6. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için amoksisilin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
570	200	100	30	100	1000	-	-
470	200	100	30	100	1000	150	99,87
370	200	100	30	100	1000	200	133,16
270	200	100	30	100	1000	300	199,74
170	200	100	30	100	1000	400	266,32
70	200	100	30	100	1000	500	332,9

Çizelge 3.7. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için klindamisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
570	200	100	30	100	1000	-	-
370	200	100	30	100	1000	200	55,8
270	200	100	30	100	1000	300	83,7
17	200	100	30	100	1000	400	111,6
70	200	100	30	100	1000	500	139,5
-	200	100	30	100	1000	570	159,03

Çizelge 3.8. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefuroksim sodyum ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
560	200	100	40	100	1000	-	-
500	200	100	40	100	1000	60	14,688
480	200	100	40	100	1000	80	19,584
470	200	100	40	100	1000	90	22,032
460	200	100	40	100	1000	100	24,48
440	200	100	40	100	1000	120	29,376

Çizelge 3.9. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ornidazol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
560	200	100	40	100	1000	-	-
550	200	100	40	100	1000	10	7,588
540	200	100	40	100	1000	20	15,176
530	200	100	40	100	1000	30	22,764
520	200	100	40	100	1000	40	30,352
510	200	100	40	100	1000	50	37,94

Çizelge 3.10. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için imipenem ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (μl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (μl)	NADP ⁺ (2 mM) (μl)	Enzim hacmi (μl)	6PGA (6 mM) (μl)	Toplam hacim (μl)	İnhibitör hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
580	200	100	20	100	1000	-	-
480	200	100	20	100	1000	100	0,197
430	200	100	20	100	1000	150	0,2955
380	200	100	20	100	1000	200	0,394
330	200	100	20	100	1000	250	0,4925
280	200	100	20	100	1000	300	0,591

Çizelge 3.11. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için metronidazol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (µl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (µl)	NADP ⁺ (2 mM) (µl)	Enzim hacmi (µl)	6PGA (6 mM) (µl)	Toplam hacim (µl)	İnhibitör hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
570	200	100	30	100	1000	-	-
560	200	100	30	100	1000	10	0,0292
540	200	100	30	100	1000	30	0,0876
520	200	100	30	100	1000	50	0,146
595	200	100	30	100	1000	75	0,219
470	200	100	30	100	1000	100	0,292

Çizelge 3.12. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için rifamisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (µl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (µl)	NADP ⁺ (2 mM) (µl)	Enzim hacmi (µl)	6PGA (6 mM) (µl)	Toplam hacim (µl)	İnhibitör hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
540	200	100	60	100	1000	-	-
530	200	100	60	100	1000	10	8,2295
490	200	100	60	100	1000	50	41,1475
440	200	100	60	100	1000	100	82,295
390	200	100	60	100	1000	150	123,442
340	200	100	60	100	1000	200	164,59

Çizelge 3.13. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sülfasetilamid ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf Su (µl)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) MgCl ₂ (0,1 M) (µl)	NADP ⁺ (2 mM) (µl)	Enzim hacmi (µl)	6PGA (6 mM) (µl)	Toplam hacim (µl)	İnhibitör hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsant. (mM)
560	200	100	40	100	1000	-	-
460	200	100	40	100	1000	100	9
360	200	100	40	100	1000	200	18
260	200	100	40	100	1000	300	27
160	200	100	40	100	1000	400	36
-	200	100	40	100	1000	560	50.4

Çizelge 3.14. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde ornidazol ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
650	200	100	40	10	0,06	-	-	1000
640	200	100	40	20	0.12	-	-	1000
630	200	100	40	30	0.18	-	-	1000
600	200	100	40	60	0.36	-	-	1000
560	200	100	40	100	0.6	-	-	1000
630	200	100	40	10	0.06	20	7,558	1000
620	200	100	40	20	0.12	20	7,558	1000
610	200	100	40	30	0.18	20	7,558	1000
580	200	100	40	60	0.36	20	7,558	1000
540	200	100	40	100	0.6	20	7,558	1000
620	200	100	40	10	0.06	30	22,764	1000
610	200	100	40	20	0.12	30	22,764	1000
600	200	100	40	30	0.18	30	22,764	1000
570	200	100	40	60	0.36	30	22,764	1000
530	200	100	40	100	0.6	30	22,764	1000
610	200	100	40	10	0.06	40	30,352	1000
600	200	100	40	20	0.12	40	30,352	1000
590	200	100	40	30	0.18	40	30,352	1000
560	200	100	40	60	0.36	40	30,352	1000
520	200	100	40	100	0.6	40	30,352	1000

Çizelge 3.15. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi vankomisin üzerinde ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
650	200	100	40	10	0,06	-	-	1000
640	200	100	40	20	0.12	-	-	1000
630	200	100	40	30	0.18	-	-	1000
600	200	100	40	60	0.36	-	-	1000
560	200	100	40	100	0.6	-	-	1000
500	200	100	40	10	0.06	150	25,875	1000
490	200	100	40	20	0.12	150	25,875	1000
480	200	100	40	30	0.18	150	25,875	1000
450	200	100	40	60	0.36	150	25,875	1000
410	200	100	40	100	0.6	150	25,875	1000
370	200	100	40	10	0.06	280	48,3	1000
360	200	100	40	20	0.12	280	48,3	1000
350	200	100	40	30	0.18	280	48,3	1000
320	200	100	40	60	0.36	280	48,3	1000
280	200	100	40	100	0.6	280	48,3	1000
280	200	100	40	10	0.06	370	63,825	1000
270	200	100	40	20	0.12	370	63,825	1000
260	200	100	40	30	0.18	370	63,825	1000
230	200	100	40	60	0.36	370	63,825	1000
190	200	100	40	100	0.6	370	63,825	1000

Çizelge 3.16. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde metronidazol ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
660	200	100	30	10	0,06	-	-	1000
650	200	100	30	20	0.12	-	-	1000
640	200	100	30	30	0.18	-	-	1000
610	200	100	30	60	0.36	-	-	1000
570	200	100	30	100	0.6	-	-	1000
600	200	100	30	10	0.06	60	0,1752	1000
590	200	100	30	20	0.12	60	0,1752	1000
580	200	100	30	30	0.18	60	0,1752	1000
550	200	100	30	60	0.36	60	0,1752	1000
510	200	100	30	100	0.6	60	0,1752	1000
580	200	100	30	10	0.06	80	0,2336	1000
570	200	100	30	20	0.12	80	0,2336	1000
560	200	100	30	30	0.18	80	0,2336	1000
530	200	100	30	60	0.36	80	0,2336	1000
490	200	100	30	100	0.6	80	0,2336	1000
550	200	100	30	10	0.06	110	0,3212	1000
540	200	100	30	20	0.12	110	0,3212	1000
530	200	100	30	30	0.18	110	0,3212	1000
500	200	100	30	60	0.36	110	0,3212	1000
460	200	100	30	100	0.6	110	0,3212	1000

Çizelge 3.17. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde klindamisin ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
660	200	100	30	10	0,06	-	-	1000
650	200	100	30	20	0.12	-	-	1000
640	200	100	30	30	0.18	-	-	1000
610	200	100	30	60	0.36	-	-	1000
570	200	100	30	100	0.6	-	-	1000
410	200	100	30	10	0.06	250	69,75	1000
400	200	100	30	20	0.12	250	69,75	1000
390	200	100	30	30	0.18	250	69,75	1000
360	200	100	30	60	0.36	250	69,75	1000
320	200	100	30	100	0.6	250	69,75	1000
260	200	100	30	10	0.06	400	111,6	1000
250	200	100	30	20	0.12	400	111,6	1000
240	200	100	30	30	0.18	400	111,6	1000
210	200	100	30	60	0.36	400	111,6	1000
170	200	100	30	100	0.6	400	111,6	1000
160	200	100	30	10	0.06	500	139,5	1000
150	200	100	30	20	0.12	500	139,5	1000
140	200	100	30	30	0.18	500	139,5	1000
110	200	100	30	60	0.36	500	139,5	1000
70	200	100	30	100	0.6	500	139,5	1000

Çizelge 3.18. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde amoksisilin ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
660	200	100	30	10	0,06	-	-	1000
650	200	100	30	20	0.12	-	-	1000
640	200	100	30	30	0.18	-	-	1000
610	200	100	30	60	0.36	-	-	1000
570	200	100	30	100	0.6	-	-	1000
460	200	100	30	10	0.06	200	133,16	1000
450	200	100	30	20	0.12	200	133,16	1000
440	200	100	30	30	0.18	200	133,16	1000
410	200	100	30	60	0.36	200	133,16	1000
370	200	100	30	100	0.6	200	133,16	1000
360	200	100	30	10	0.06	300	199,74	1000
350	200	100	30	20	0.12	300	199,74	1000
340	200	100	30	30	0.18	300	199,74	1000
310	200	100	30	60	0.36	300	199,74	1000
270	200	100	30	100	0.6	300	199,74	1000
260	200	100	30	10	0.06	400	266,32	1000
250	200	100	30	20	0.12	400	266,32	1000
240	200	100	30	30	0.18	400	266,32	1000
210	200	100	30	60	0.36	400	266,32	1000
170	200	100	30	100	0.6	400	266,32	1000

Çizelge 3.19. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde tenoksikam ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
670	200	100	20	10	0,06	-	-	1000
660	200	100	20	20	0.12	-	-	1000
650	200	100	20	30	0.18	-	-	1000
620	200	100	20	60	0.36	-	-	1000
580	200	100	20	100	0.6	-	-	1000
630	200	100	20	10	0.06	40	0,1186	1000
620	200	100	20	20	0.12	40	0,186	1000
610	200	100	20	30	0.18	40	0,1186	1000
580	200	100	20	60	0.36	40	0,1186	1000
540	200	100	20	100	0.6	40	0,1186	1000
620	200	100	20	10	0.06	50	0,148	1000
610	200	100	20	20	0.12	50	0,148	1000
600	200	100	20	30	0.18	50	0,148	1000
570	200	100	20	60	0.36	50	0,148	1000
530	200	100	20	100	0.6	50	0,148	1000
610	200	100	20	10	0.06	60	0,178	1000
600	200	100	20	20	0.12	60	0,178	1000
590	200	100	20	30	0.18	60	0,178	1000
560	200	100	20	60	0.36	60	0,178	1000
520	200	100	20	100	0.6	60	0,178	1000

Çizelge 3.20. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde larnoksikam ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
670	200	100	20	10	0,06	-	-	1000
660	200	100	20	20	0.12	-	-	1000
650	200	100	20	30	0.18	-	-	1000
620	200	100	20	60	0.36	-	-	1000
580	200	100	20	100	0.6	-	-	1000
660	200	100	20	10	0.06	10	0,1076	1000
650	200	100	20	20	0.12	10	0,1076	1000
640	200	100	20	30	0.18	10	0,1076	1000
610	200	100	20	60	0.36	10	0,1076	1000
570	200	100	20	100	0.6	10	0,1076	1000
655	200	100	20	10	0.06	15	0,164	1000
645	200	100	20	20	0.12	15	0,164	1000
635	200	100	20	30	0.18	15	0,164	1000
605	200	100	20	60	0.36	15	0,164	1000
565	200	100	20	100	0.6	15	0,164	1000
650	200	100	20	10	0.06	20	0,215	1000
640	200	100	20	20	0.12	20	0,215	1000
630	200	100	20	30	0.18	20	0,215	1000
600	200	100	20	60	0.36	20	0,215	1000
560	200	100	20	100	0.6	20	0,215	1000

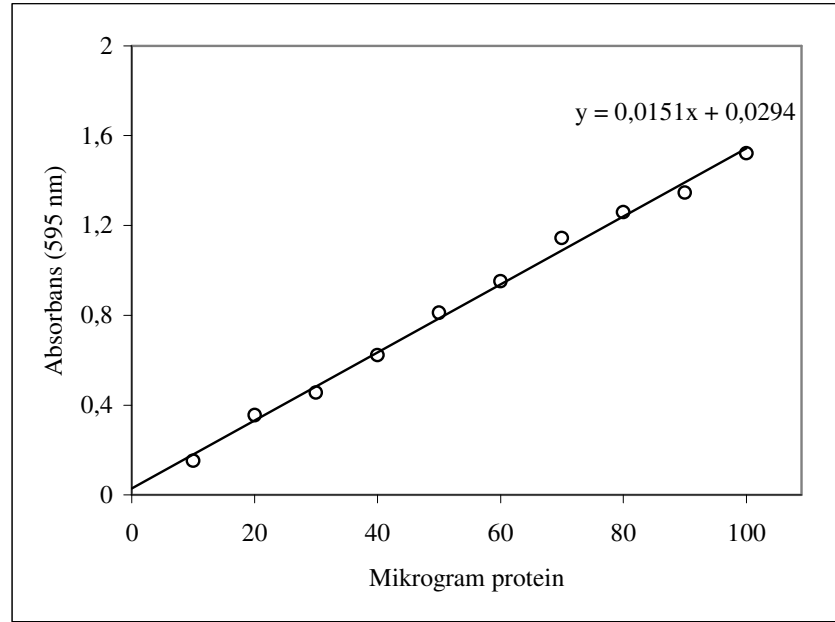
Çizelge 3.21. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde imipenem ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μ l)	Tris-HCl (1 M) EDTA pH= 8 (5 mM) $MgCl_2$ (0,1 M) (μ l)	NADP ⁺ (2 mM) (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	6PGA çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. 6PGA konsant. (mM)	İnh. çözeltisi hacmi (μ l)	Küv. inh. konsant. (mM)	Toplam hacim (μ l)
670	200	100	40	10	0,06	-	-	1000
660	200	100	40	20	0.12	-	-	1000
650	200	100	40	30	0.18	-	-	1000
620	200	100	40	60	0.36	-	-	1000
580	200	100	40	100	0.6	-	-	1000
570	200	100	40	10	0.06	100	0,179	1000
560	200	100	40	20	0.12	100	0,179	1000
550	200	100	40	30	0.18	100	0,179	1000
520	200	100	40	60	0.36	100	0,179	1000
480	200	100	40	100	0.6	100	0,179	1000
520	200	100	40	10	0.06	150	0,195	1000
510	200	100	40	20	0.12	150	0,195	1000
500	200	100	40	30	0.18	150	0,195	1000
470	200	100	40	60	0.36	150	0,195	1000
430	200	100	40	100	0.6	150	0,195	1000
470	200	100	40	10	0.06	200	0,394	1000
460	200	100	40	20	0.12	200	0,394	1000
450	200	100	40	30	0.18	200	0,394	1000
420	200	100	40	60	0.36	200	0,394	1000
380	200	100	40	100	0.6	200	0,394	1000

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

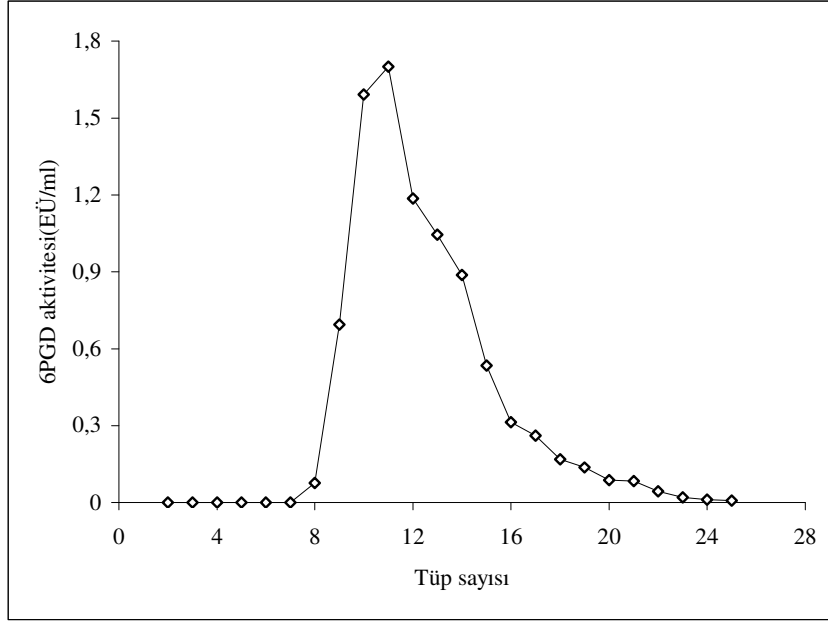
Enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbands değerleri şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Afinite Kromatografisi Sonuçları

İnsan eritrosit hemolizati hazırlandıktan sonra %35-65 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çökelek 50 mM KH_2PO_4 (pH= 07,5) tampon çözeltisinde çözüldükten sonra diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra numune afinite kolonuna tatbik edildi. Yıkama işleminden sonra 80 mM K-fosfat + 80 mM KCl + 5 mM NADP^+ + 10 mM EDTA (pH= 7,85) elüsyon tamponuyla enzim 1'er ml'lik tüplere alınarak aktivite tayini yapıldı. Eliüatlardaki aktivite değerleri şekil 4.2'de gösterildi. Çalışmalarda çok miktarda enzime ihtiyaç olduğundan bu işlem 5 kez yapıldı.



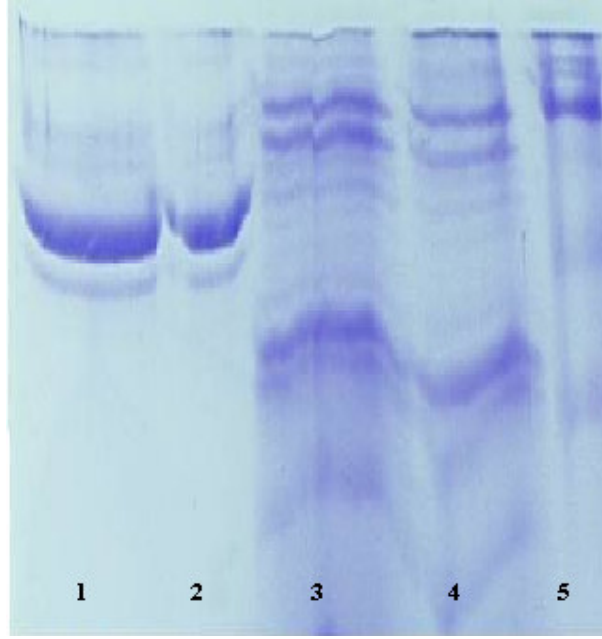
Şekil 4.2. İnsan eritrosit 6PGD enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği. Kolon 1x10 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20ml/saat ve fraksiyon hacmi 1 ml

Çizelge 4.1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	270	0,12	32,54	30,5	0,004	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 35-65) ve diyaliz	75	0,40	30,14	35,6	0,011	92,22	2,80
Afinite kromatografisi	15	1,70	25,5	0,07	25,75	78,37	6552

4.3. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

İnsan eritrositlerinden elde edilen 6PGD enzimi numunelerinin, hemolizat, amonyum sülfat çökeleği ve afinite elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 4.3'te gösterildi.



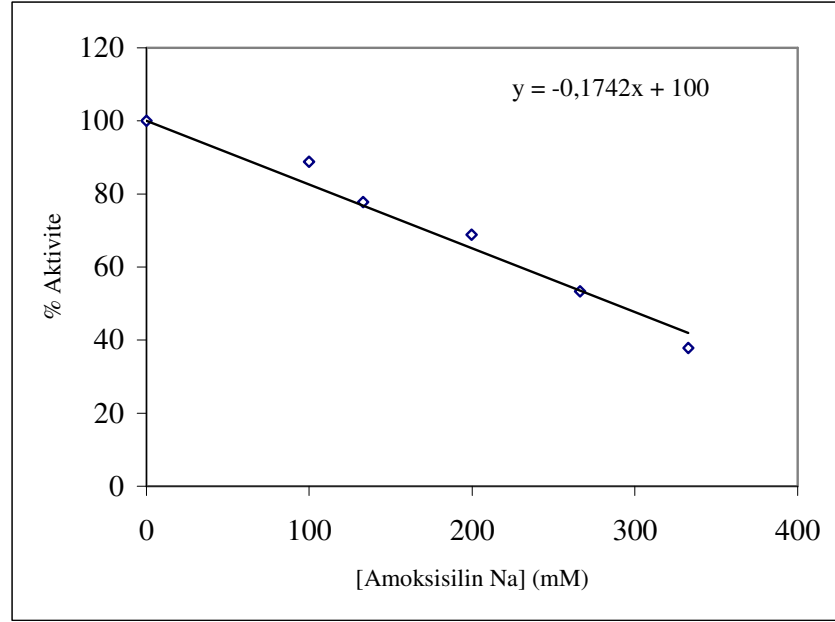
Şekil 4.3. SDS-PAGE elektroforezi sonucu jel fotoğrafı (1-2: saf 6PGD; 3: Amonyum sülfat çökeltisi; 4: Hemolizat; 5: Standtartlar (Karbonik anhidraz (bovin) 29 kDa, ovalbumin (tavuk) 45 kDa, albumin (bovin) 66 kDa, fosforilaz b (tavşan) 97,4 kDa, β -galaktozidaz (E. coli) 116 kDa ve miyoz (tavşan) 205 kDa kullanıldı).

4.4. İnhibitör Etkisi Gösteren İlaçlar İçin I_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar

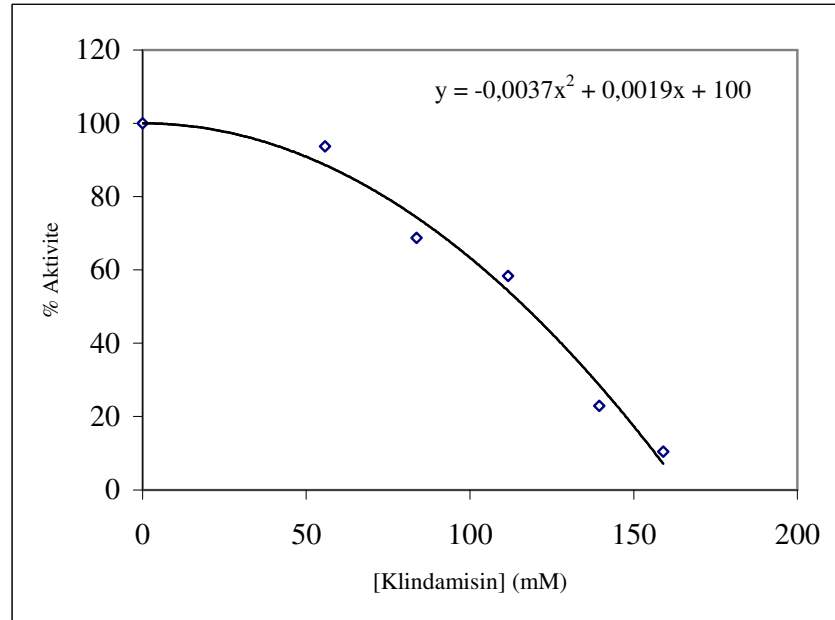
İnhibitör çalışmalarıyla ilgili bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi yüksek olan vankomisin, linkomisin, rifamisin, sülfanilamid, sülfanilasetilamid, sefuroksim, amoksisilin, imipenem, ornidazol, larnoksikam, sefuroksim, klindamisin ve metronidazol ilaçlarının % aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde I_{50} değerleri hesaplandı.

Bu ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında; ön deneme ile belirlenen beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan

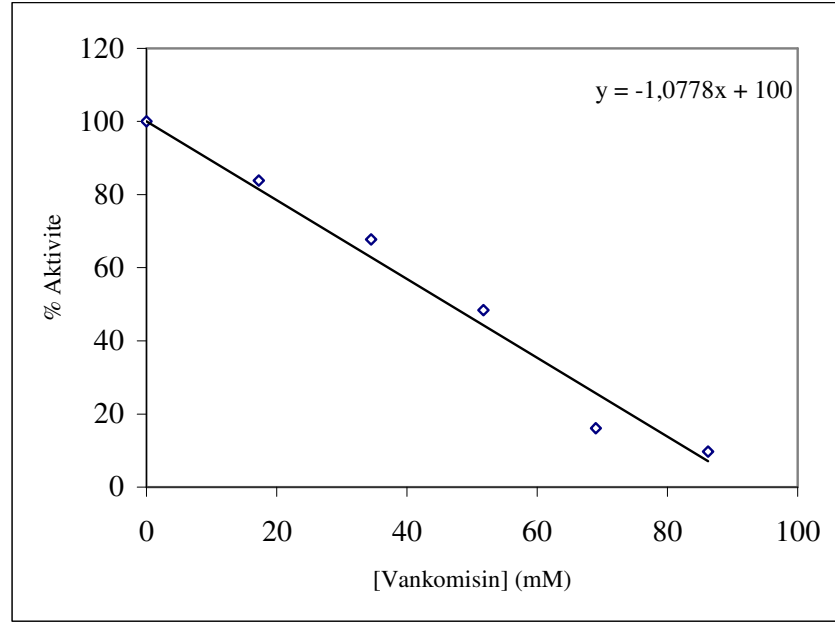
$K_M^I = K_m(1 + [I] / K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $V_{\max} = V_{\max}^I(1 + [I] / K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.



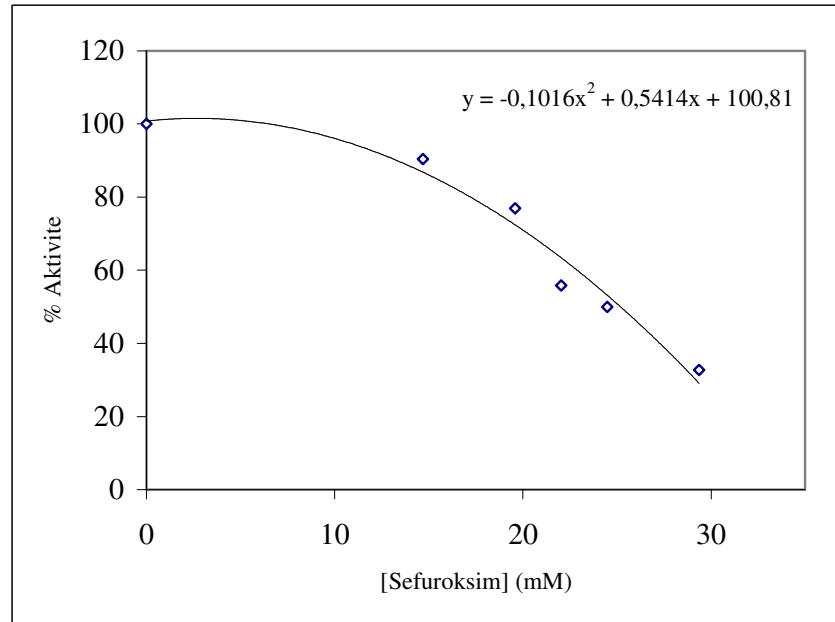
Şekil 4.4. İnsan 6PGD enzimi üzerine amoksisilin ilacının % aktivite-[I] grafiği



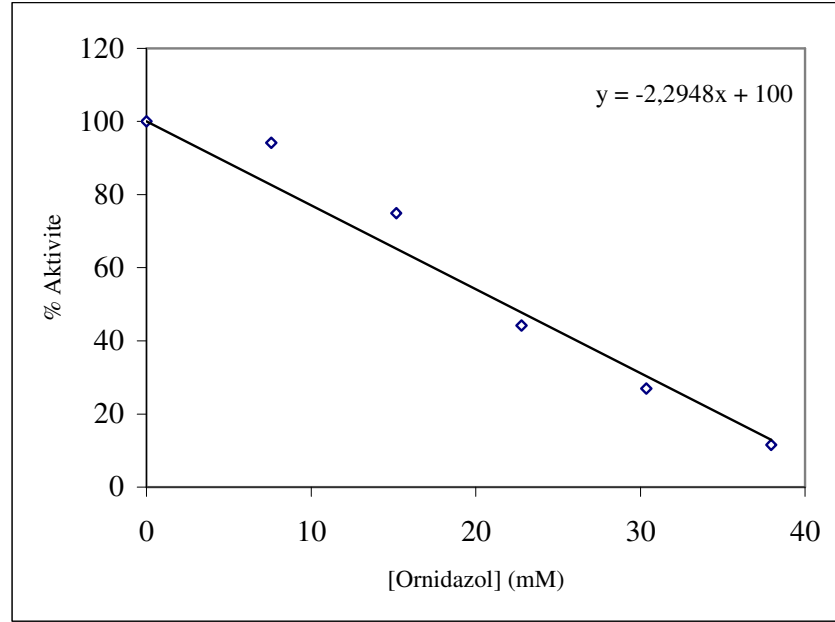
Şekil 4.5. İnsan 6PGD enzimi üzerine klindamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



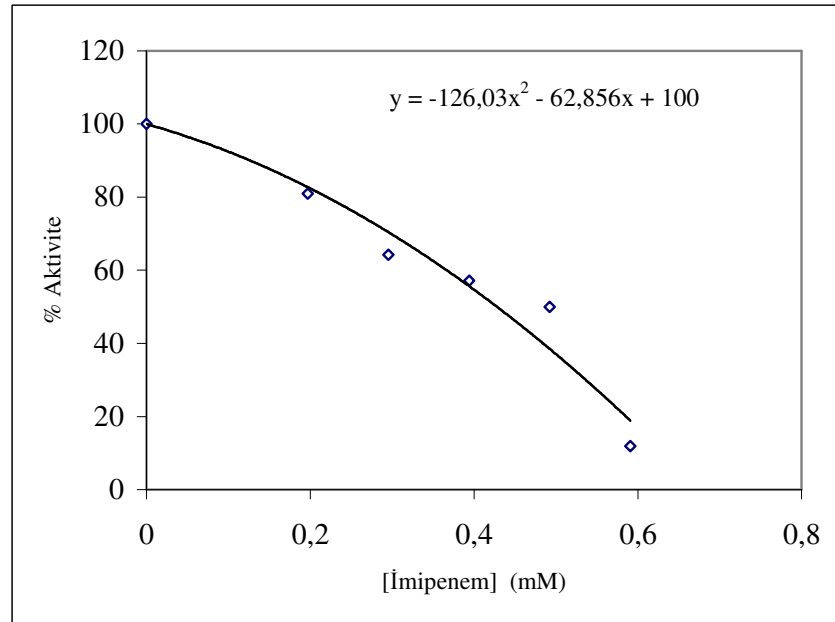
Şekil 4.6. İnsan 6PGD enzimi üzerine vankomisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



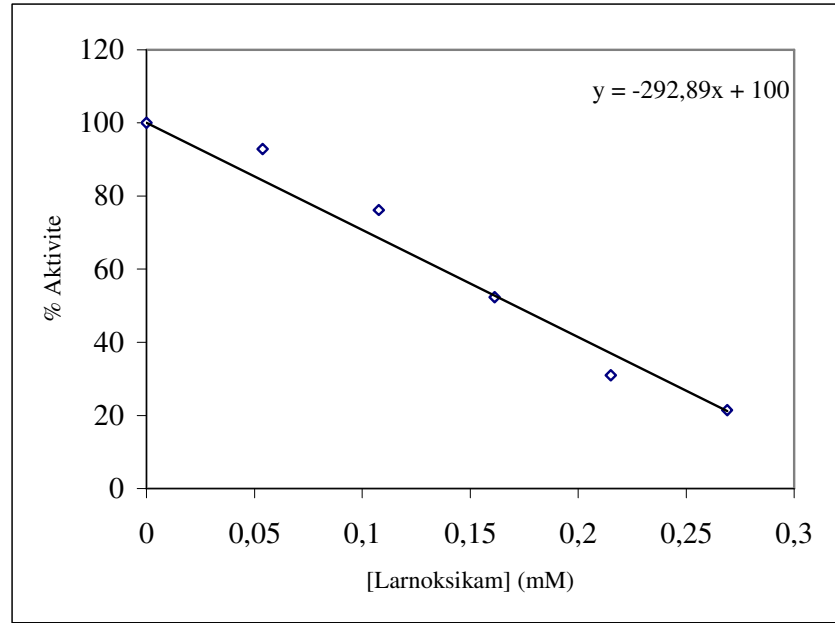
Şekil 4.7. İnsan 6PGD enzimi üzerine sefuroksim sodyum ilacının etkisi % aktivite-[I] grafiği



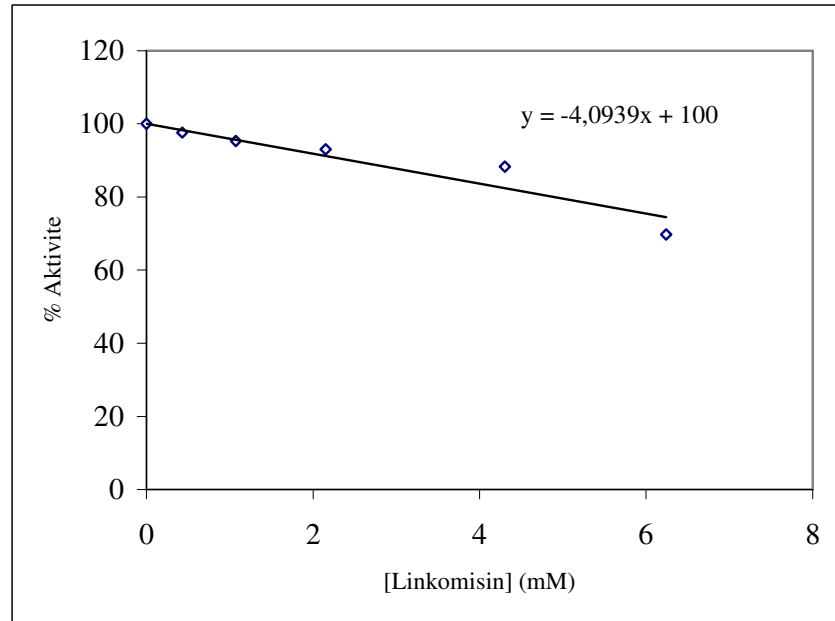
Şekil 4.8. İnsan 6PGD enzimi üzerine ornidazol ilacının etkisi % aktivite-[I] grafiği



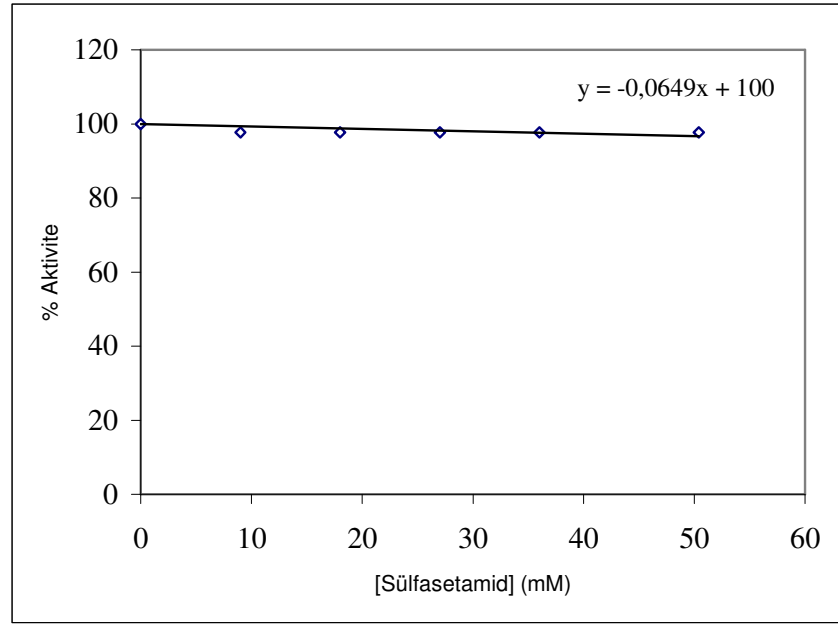
Şekil 4.9. İnsan 6PGD enzimi üzerine imipenem ilacının % aktivite-[I] grafiği



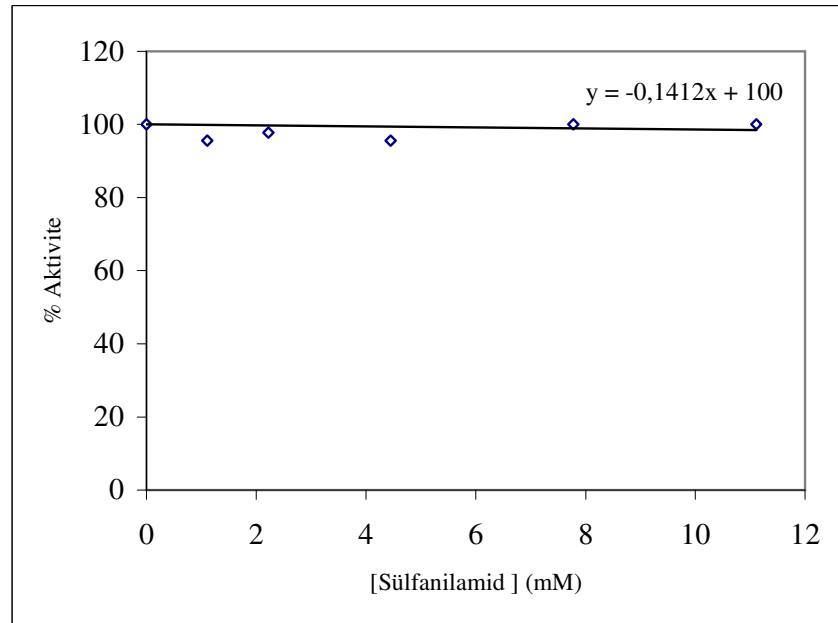
Şekil 4.10. İnsan 6PGD enzimi üzerine larnoksikam ilacının % aktivite-[I] grafiği



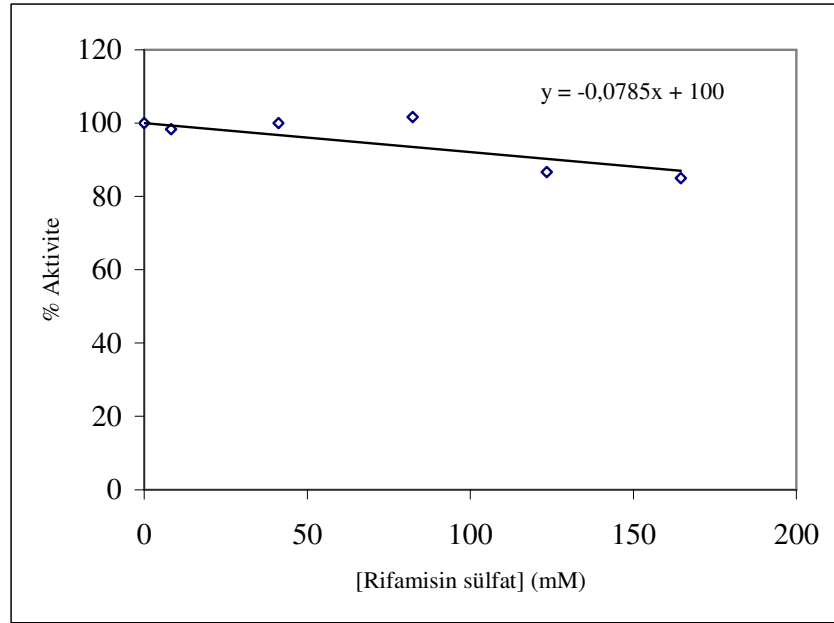
Şekil 4.11. İnsan 6PGD enzimi üzerine linkomisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



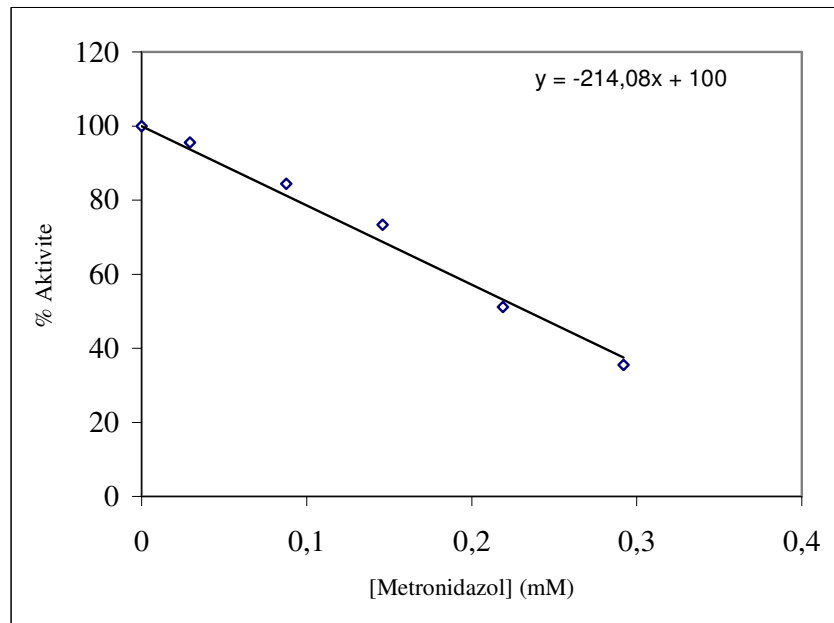
Şekil 4.12. İnsan 6PGD enzimi üzerine sülfasetamid ilacının % aktivite-[I] grafiği



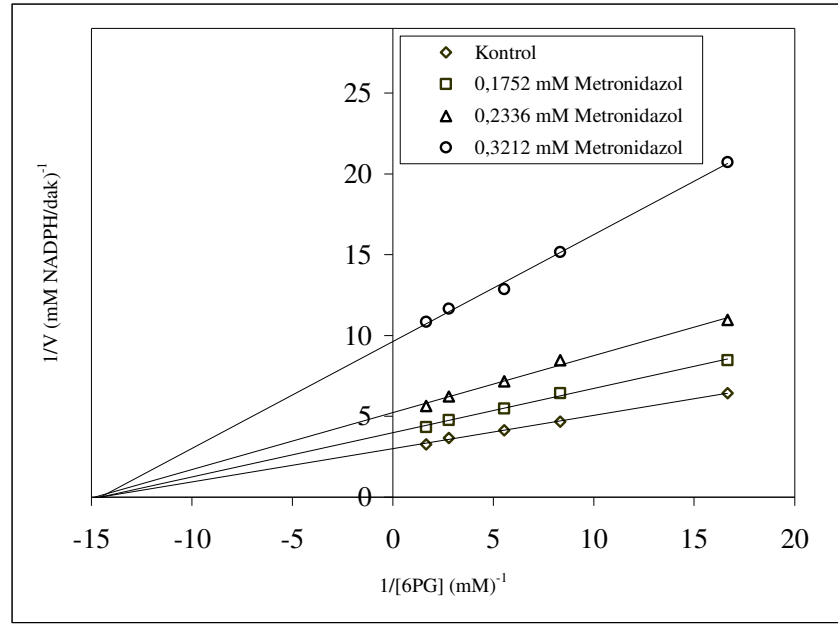
Şekil 4.13. İnsan 6PGD enzimi üzerine sülfanilamid ilacının % aktivite-[I] grafiği



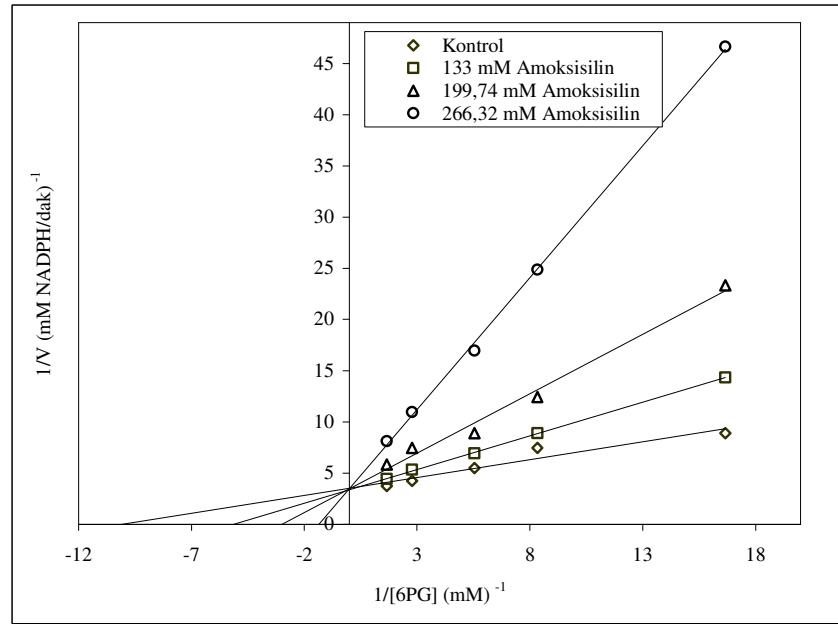
Şekil 4.14. İnsan 6PGD enzimi üzerine rifamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



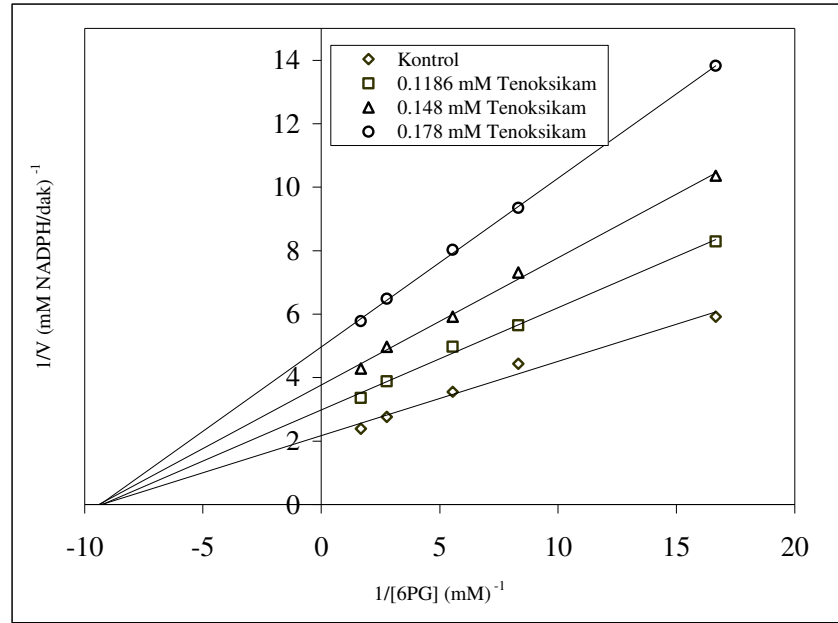
Şekil 4.15. İnsan 6PGD enzimi üzerine metronidazol ilacının % aktivite-[I] grafiği



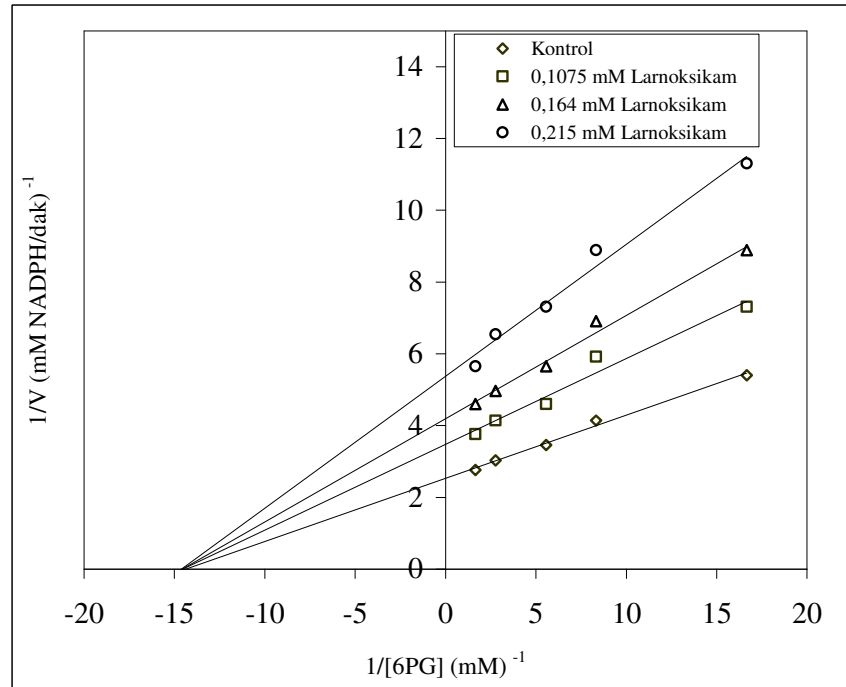
Şekil 4.16. 6PGD üzerine metronidazol ilacının ilacının



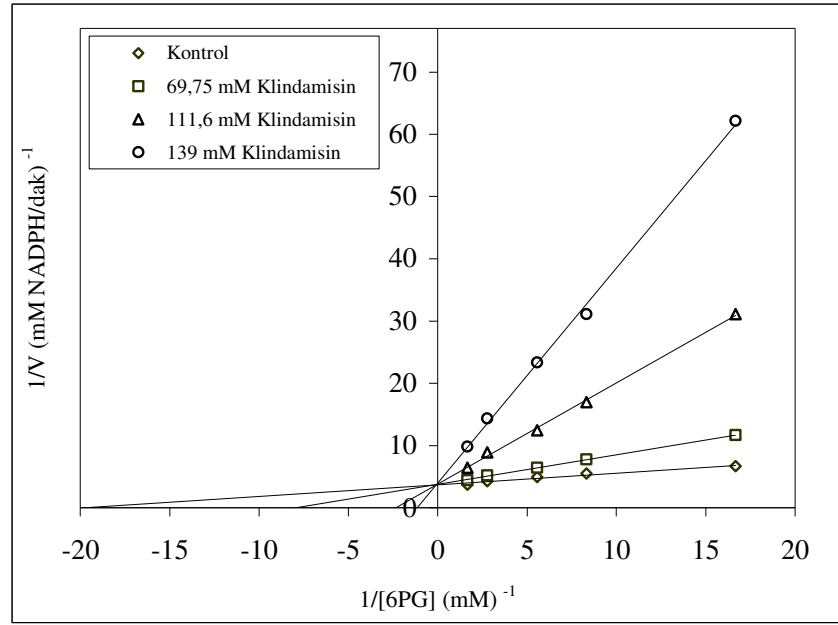
Şekil 4.17. İnsan 6PGD enzimi üzerine amoksisilin ilacının etkisi



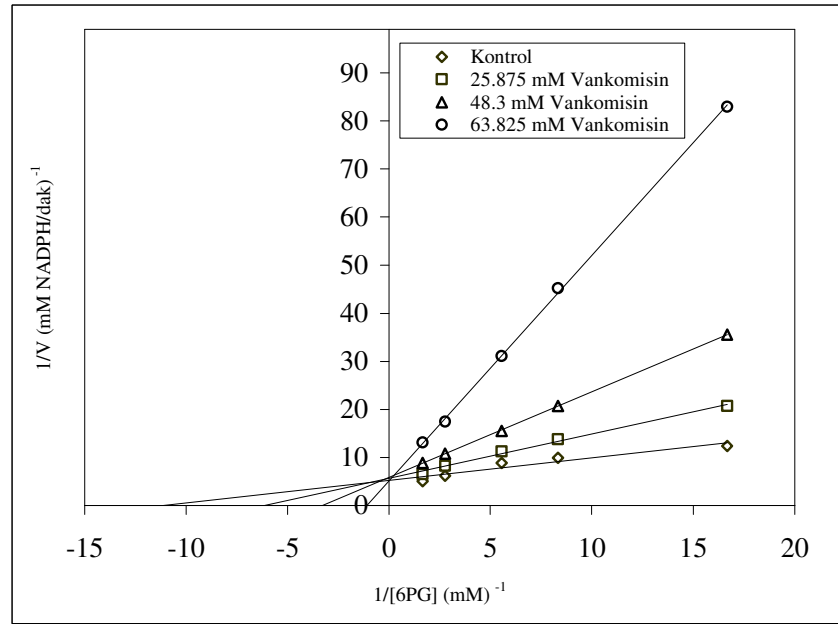
Şekil 4.18. 6PGD enzimi üzerine tenoksikam ilacının etkisi



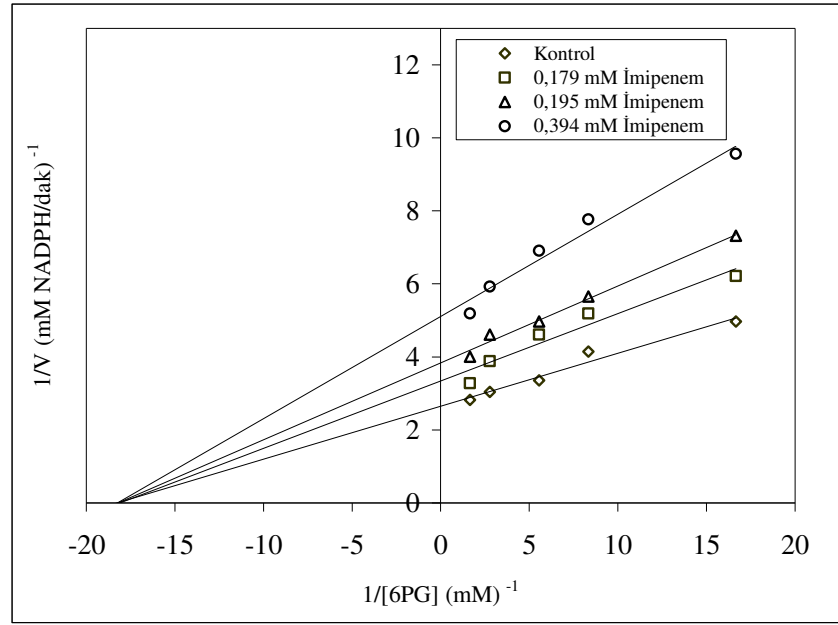
Şekil 4.19. 6PGD enzimi üzerine larnoksikam ilacının etkisi



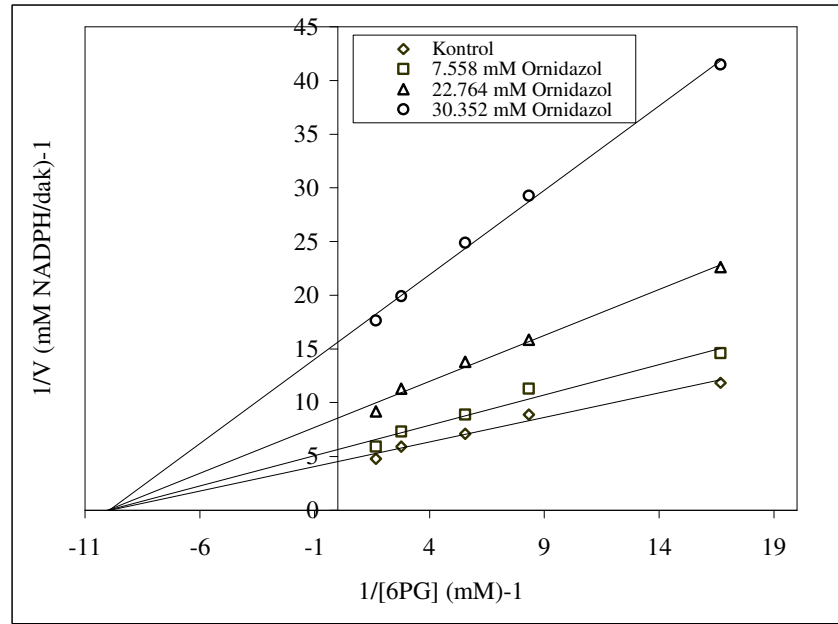
Şekil 4.20. 6PGD enzimi üzerine klindamisin ilacının etkisi



Şekil 4.21. 6PGD enzimi üzerine vankomisin ilacının etkisi



Şekil 4.22. 6PGD enzimi üzerine imipenem ilacının etkisi



Şekil 4.23. 6PGD enzimi üzerine ornidazol ilacının etkisi

Çizelge 4.2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için bulunan K_i ve I_{50} değerleri

İnhibitör	I_{50} (mM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon türü
Lornoksikam	0,170	0,1075 0,1640 0,2150	0,27 0,41 0,40	0,40±0,045	Yarışmasız
Metronidazol	0,233	0,1752 0,2336 0,3212	0,70 0,56 0,46	0,57±0,069	Yarışmasız
İmipenem	0,428	0,179 0,195 0,394	0,86 0,62 0,48	0,77±0,11	Yarışmasız
Ornidazol	21,79	7,558 22,764 30,352	37,44 47,47 42,28	42,40±2,89	Yarışmasız
Vankomisin	46,39	25,875 48,300 63,825	57,64 68,40 70,75	65,60±4,03	Yarışmalı
Klindamisin	117,43	69,75 111,60 139	116,49 126,47 147,73	130,22±9,21	Yarışmalı
Amoksisilin	287,35	133 199,74 266,32	271,45 283,80 307,47	287,58±10,56	Yarışmalı
Tenoksikam	-	0,1186 0,1480 0,1780	0,44 0,35 0,32	0,37±0,036	Yarışmasız
Sefuroksim sodyum	25,183	-	-	-	-

TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlı organizmalarda direkt veya indirekt antioksidan etki gösteren birçok enzimler bulunmaktadır. 6PGD bu enzimlerden biridir. (Reiter *et al.* 1984, Jakobasch *et al.* 1996). Enzim eritrositlerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Dallocchio *et al.* 1985). Enzim eksikliğinde glutatyon eksikliği meydana gelir. Dolayısıyla hücrede oluşan peroksitlerin ve Fe^{+3} 'ün indirgenememesinden dolayı, oluşan radikaller hücre zarındaki yağlara zarar verip hücrenin parçalanmasına neden olabilir (Soysal ve Bakan 1984).

Alzhemier hastalığında korteks tabakasında G6PD ve 6PGD'nin belirgin artışları belirlenmiştir. Pentoz fosfat yolu oksidatif basamaklarını katalizleyen bu enzimlerin yüksek aktivitesi oksidan aktivitesine cevap olarak oluşmaktadır (Palmer 1999). G6PD eksikliğinde olduğu gibi 6PGD eksikliğinde de hemolitik anemi oluşur (Caprari *et al.* 2001)

Enzim, glikolitik yola ve pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat arasındaki dengenin korunmasında önemli bir noktada bulunmaktadır (Del Mar *et al.* 1986). Enzim eksikliği 6-PG'nin birikmesine, bu da fosfoglukoz izomerazın ve glukoz metabolizmasının tamamen inhibisyonuna neden olmaktadır (Hanau *et al.* 1996) Bu durumda da hücrede toksik etki oluşmaktadır Enzim eksikliğinde retikulosit sayısında değişme, eritrosit piruvat kinaz aktivitesinde artma belirlenmiştir. Hücrede 6-PG'nin birikimi glikoliz metabolizmasını da olumsuz etkilediği hesaba katıldığında enzimin önemi ortaya çıkmaktadır. Bu önemli konumundan dolayı kemoterapilerde hedef enzim olarak seçilebileceği çeşitli çalışmalarda öne sürülmüştür (Barrett 1997).

G6PD varyantlarında olduğu gibi, eritrosit 6PGD varyantlarının da sıtmaya karşı direnç sağladığı belirtilmiştir (Bayoumi *et al.* 1986).

6PGD canlı yaşam için hayati öneme sahip NADPH ve riboz-5-P gibi moleküllerin sentezinde önemli bir basamakta durmaktadır (Barrett 1997). NADPH üretiminden sorumlu

enzimler hidroksi-metilglutaril-CoA redüktazın gen ekspresyonunu artırır. Bu nedenle kolesterol sentezi artmakta, bu da hiperkolesterolemiye neden olmaktadır. Hiperkolesterolemide kalp ve damar hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir (Szolkiewicz and Sucajtyś 2002).

Bu öneminden dolayı 6PGD enzimini birçok kaynaktan saflaştırılmış ve yapısı, inhibitörleri, amino asit dizilimi, reaksiyon mekanizması ve X-ray çalışmaları yapılmıştır. Enzimin gen yapısı aydınlatılmış ve enzimi şifreleyen gen tespit edilmiştir. Bu çalışmada insan eritrositlerinden 6PGD enzimini saflaştırılarak üzerinde bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri çalışıldı.

İnsan eritrositlerinden 6PGD enzimini saflaştırmak için önce hemolizat hazırlandı, literatür bilgilerine dayanılarak %35-65 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldıktan sonra numune 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edilerek saf enzim elde edildi. Çalışma sonucunda insan eritrosit 6PGD enzimini %78,37 verimle 6552 kat saflaştırma yapılabildi. Saflık kontrolü elektroforezle yapıldı.

Bütün saflaştırma işlemlerinde aktivite kaybını önlemek için sıcaklık 0 ile +4°C arasında tutuldu. Çalışmamızda ilaçların insan eritrosit 6PGD enzim aktivitesi üzerine olan etkileri denendiğinden enzim aktivitelerine insan vücut ısısı olan 37°C'de bakıldı.

Çok değerlikli elektrolitler olan proteinler iyonlara gibi hareket ederler. Protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, yüksek tuz konsantrasyonlarında, tuzdaki iyonlar tarafından çekilmesi ile proteinler çöker. Bu çökmede iyonik şiddet ve molekül kütleleri önemli ayırma unsurlarıdır. Bu nedenle değişik tuz konsantrasyonlarında farklı proteinler çökerler (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2004). (NH₄)₂SO₄ çöktürmesinde proteinlerin bu özelliklerinden yararlanılır. (NH₄)₂SO₄ yüksek iyonik şiddet oluşturması ve çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı tercih edildi. Afinitede; 2',5'-ADP Sepharose 4B'nin tercih edilme

nedeni, yapısında bulunan orto fosfatın 6PGD enziminin kuvvetli bir inhibitörü olmasıdır.

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerine bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkisi incelendi. Bu amaçla sülfanilasetamid, sülfanilamid, linkomisin, metronidazol, klindamisin, rifamisin, amoksisilin, vankomisin, sefuroksim, imipenem, ornidazol, larnoksikam ve tenoksikam ilaçları çalışıldı.

Sülfanilasetamid, metronidazol, sülfanilamid, linkomisin, klindamisin, amoksisilin, vankomisin ve ornidazol ilaçları bakterilerin hücre duvarı sentezinden sorumlu enzimleri inhibe ederek bakterisid etki gösterirler (Kayaalp 2000).

Sefuroksim sodyum ve imipenem ilaçları bakteri hücre membranı geçirgenliğini değiştirerek, DNA veya RNA sentezini önleyerek bakterisid etki gösterirler (Kayaalp 2000). Lornoksikam, ve tenoksikam ilaçları antienflamatuar, analjezik ve antipiretik etkiye sahip olan ilaçlardır (Kayaalp 2000).

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesi üzerine vankomisin, sefuroksim sodyum, imipenem, ornidazol, klindamisin, amoksisilin, metronidazol, larnoksikam ve tenoksikam ilaçlarının inhibisyon etkisi gösterdiği, sülfanilasetamid, sülfanilamid, rifamisin ve linkomisin ilaçlarının etkisiz olduğu belirlenmiştir. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik çiziminde en küçük kareler regresyon doğru denkleminde yararlanılmıştır. Yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M^I = K_M(1 + [I] / K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $V_{max} = V_{max}^I(1 + [I] / K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi. I_{50} değerleri aktivite-[I] grafiklerinden bulundu. Bu ilaçlardan amoksisilin, metronidazol, klidamisin, vankomisin, imipenem, ornidazol ve larnoksikam ilaçları için I_{50} ve K_i değerlerini belirlemek amacıyla grafikler çizildi. Tenoksikam için I_{50} çalışması daha önce yapıldığından, ön çalışma yapılarak K_i çalışmaları yapıldı (Özabacıgil 2005).

İlaç ve kimyasalların, enzim üzerinde inhibisyon etkileri I_{50} değeri olarak verilmektedir. I_{50} değeri küçük olan inhibitörlerin inhibisyon etkisi büyük, I_{50} değeri büyük olan inhibitörlerin inhibisyon etkisi ise küçüktür. Larnosikam, metronidazol, imipenem, ornidazol, sefuroksim sodyum, vankomisin, klindamisin ve amoksisilin inhibitörlerinin I_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sırayla; 0,170, 0,233, 0,428, 21,79, 25,183, 46,39, 117,43 ve 287,3 mM şeklindedir. Bu sıralamaya göre inhibisyon etkisi en yüksek olan larnoksikam, en düşük amoksisilin'dir. Beydemir ve arkadaşları (2003) vankomisin'in koyun lensinden saflaştırılan G6PD enzimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Vankomisin'in pentoz fosfat yolun kilit enzimlerinden G6PD ve 6PGD enzimlerini inhibe ettiği düşünüldüğünde pentoz fosfat yolunun verimi çok daha fazla düşecektir. Dolayısıyla metabolizma için gerekli NADPH ve riboz 5-fosfat sentezlenemeyecektir.

K_i sabitlerinin bulunmasında enzim kinetiği çalışan araştırmacılar tarafından kullanılan Lineveawer-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1968; Ciftci *et al.* 2000). K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime olan etkisi fazladır. Sonuçlara göre ilaçların 6PGD enzimi üzerinde inhibisyon etkileri büyükten küçüğe doğru; tenoksikam ($K_i = 0,36$ mM), larnosikam ($K_i = 0,40$ mM), metronidazol ($K_i = 0,57$ mM), imipenem ($K_i = 0,77$ mM), ornidazol ($K_i = 42,40$ mM), vankomisin ($K_i = 65,60$ mM), klindamisin ($K_i = 130,23$ mM), ve amoksisilin ($K_i = 287,53$ mM) şeklindedir. Ayrıca bu grafiklerle inhibitörlerin inhibisyon türü belirlendi. Bu sonuca göre amoksisilin, klindamisin, vankomisin inhibitörleri (ilaçları) yarışmalı inhibitörler olup enzim substratıyla aktif bölgeye yarış halindedir. Larnoksikam, imipenem, tenoksikam, metronidazol, ornidazol inhibitörleri (ilaçları) yarışmasız inhibitörler olup aktif bölge haricinde enzime bağlanarak inhibisyon etkisi gösterir.

İlaçların 6PGD enzimini inhibe etmesi durumunda NADPH üretiminde azalma oluşacak ve bu durumda eritrositler hemoliz olacaktır. Bu da ciddi sağlık problemleri ortaya çıkarabilir. 6PGD enzimi inhibisyonu durumunda, glikoliz yolu 6-PGA birikiminden dolayı fosfoglukoz izomeraz enzimi inhibe olacağından glikoliz yolu yavaşlayacağından dolayı hücre içinde ciddi problemler oluşabilir. Bundan dolayı 6PGD enzimi,

kemoterapilerde hedef enzim olabileceği düşünöldüğünde bu ilaçların inhibisyon etkilerinden yararlanılabilir.

Ayrıca 6GPD enzimini üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçların yetişkin ve sağlıklı bir insan kanında bir dozdaki konsantrasyonu hesaplanarak sebep olduğu %inhibisyon değeri, %aktivite-[ilaç] grafikleri yardımıyla hesaplanarak aşağıda verilmiştir.

İlaç adı	Kandaki konsantrasyonu (mM)	% inhibisyon
Lornoksikam	0,004	2
Metronidazol	0,058	13
İmipenem	0,315	23
Ornidazol	0,455	1
Vankomisin	0,345	0,4
Klindamisin	0,237	0
Amoksisilin	0,532	0,1
Sefuroksim	0,294	0

İnhibitörlerin kandaki konsantrasyonları hesaplanırken, inhibitörlerin kana tamamen karıştığı kabul edilmiştir. Bu sonuçlara göre; sağlıklı insanlarda metronidazol ve imipenem ilaçları kullanılırken çok dikkatli olunmalıdır.

Sonuç olarak, pentoz fosfat yolunda önemli bir rol oynayan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi insan eritrositlerinden tek kromotografik basamak kullanılarak %78,37 verimle 6552 kat saflaştırıldı. 13 ilacın enzim üzerindeki etkileri incelendi ve bunlardan 9'unun inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlendi. Bu ilaçların antibiyotik olanları uzman doktor kontrolünde ve etkileri sürekli takip edilerek verilmektedir. Yüksek inhibisyon etkisine sahip ve çok yoğun kullanılan larnoksikam ve tenoksikam içeren ilaçların ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Ümid ederiz ki kuvetli inhibisyon etkisi gösteren larnoksikam, imipenem, tenoksikam, metronidazol, ornidazol, vankomisin, linkomisin ve amoksisilin ilaçları kullanılırken biraz daha dikkatli olunur ve ilaçların zararlı etkileri göz ününe alınır.

KAYNAKLAR

- Adams MJ, Gover S, Leaback R, Phillips C, Somers DO'N. The Structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect B.* 1991; 47: 817-820
- Ajmar, F., Lamedica, D., Garre, C., Ravazzolo, R., (1979), Partial deficiency of red cell 6-phosphogluconate dehydrogenase: a family study, *Hum Genet*, 52(3), 347-51.
- Akyüz. M., 2004 Bazı antibiyotiklerin insan eritrositlerinden saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004.
- Barengi L, Ceriotti F, Ripamonti M, Luzzana M, Bonini P. Erythrotic 6-phosphogluconate dehydrogenase measured by a differential pH technique. *Clin Chem.* 1987; 33/4 579-582.
- Barrett. P., (1997), The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa, *Parasitol Today*, 13 (1), 11-16.
- Bayoumi, R.A, Bashir, A.H, Abdulhadi, H., (1986), Resistance to falciparum malaria among adults in Central Sudan, *Am J.Trop Med.Hyg*, 35 (1), 45-55.
- Bergamini CM, Signorini M, Hanau S, Rippa M. Inactivation and cleavage of liver 6-phosphogluconate dehydrogenase during irradiation in the presence of vanadate. *Archiv Biochem and Biophys.* 1995; 321(1): 1-5.
- Beitner, R., Nordenberg, J., (1979), Inhibition of 6-PGD by glucose 1,6-bisphosphate, *Biochim Biophys Acta*, 583, 266-269.
- Ben-Bassat, A., Goldberg I., (1980), Purification and properties of G-6-PD (NADP+/NAD+) and 6-PGD (NADP+/NAD+) from methanol-grown *Pseudomonas C.*, *Biochim Biophys Acta*, Jan 11, 611(1), 1-10.
- Berdis.J.A.,Cook.F., (1993), Overall kinetic mechanism of 6- PGD from *Candida utilis*, *Biochem*, 32, 2036-2040.
- Betts, S.A., Mayer, J.R. (1975), Purification and properties of 6-PGD from rabbit mammary gland, *Biochem J*, 151, 263-270.
- Beutler E: Red cell metabolism. Manual of biochemical methods. Academic pres,London 1971; 12: 68-70.
- Bentler E. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, The metabolic Basis of the Inherited Disases. Newyork: McGraw-Hill Book Company, 1983: 1629-1659.
- Beydemir Ş., Kulaçoğlu D.N., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö.İ.: The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase *in vitro*. *Eur. J. Ophthalmol.*, 2003, 13, 155–161.
- Beydemir Ş, Çiftci M, Yilmaz H. 2003: XVII. Ulusal Kimya Kongresi. İstanbul.
- Bianchi, D., Bertrand,O., (2001), Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum*. Purification and properties of 6-PGD, *Enzyme Microb Technol* 28, 754-759.
- Bridges B.R., Palumbo, M.P., (1975), Purification properties of an NADP-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis* *J Biol Chem*, 250(15), 6093-6100.
- Borregaard N, Schwartz JH, Tauber A. Proton secretion by stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1984; 74:455-9.
- Caprari P, Caforio MP, Cianciulli P, Maffi D, Pasquino MT, Tarzia A, Amadori S,

- Salvati A M. 6 -Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. *Ann Hematol.* 2001; 80: 41-44.
- Carne, A., (1982), Purification by dye-ligand chromatography of an NADP-dependent enzyme, 6-phosphogluconate dehydrogenase from lamb's liver, *Anal Biochem* 121, 227-229.
- Corpas FJ, Garca-Salguero L, Barroso JB, Aranda F, Lupitez JA. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. II. Isolation and partial purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Mol Cell Biochem.* 1995; 144 (2): 97-104.
- Cottreau D, Boivin P, Kahn A, Milani A, Marie J. Human granulocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification by elective elution with NADP immunological and kinetic properties. *Biochimie (Biochimie)* 1975; 57 (3): 325-35.
- Ciftci M, Beydemir Ş, Yilmaz H, Bakan E. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study. *Pol J Pharmacol.* 2002; 54: 275-280.
- Dalocchio F, Matteuzzi M, Bellini T. Half-site reactivity in 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochem J.* 1985; 227: 305-310.
- Del Mar M, Puerta M, Perlierra AG. Purification and properties of the enzyme 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver. *Comp Biochem Physiol.* 1986; 83 B (1): 215-220.
- Demir H, Ciftci M, Küfrevioğlu Ö.İ. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves and investigation of some kinetic properties. *Prep Biochem Biotechn.* 2003; 33 (1): 39-52.
- Dyson, J.E., D'Orazio, R., (1971), 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver, *Biochem Biophys Res Com*, 43(1), 183-188.
- Dyson, J.E., D'Orazio, R., Hanson, W., (1973), Sheep Liver 6- Phosphogluconate Dehydrogenase, *Arch Biochem Biophys*, 154, 623-635.
- Grunewald, R.W., Weber, I.I., Kinne-Saffran, E, (1993), Control of sorbitol metabolism in renal inner medulla of diabetic rats, *Biochim Biophys Acta*, 1225, 39-47.
- Gupte SA, Li K, Okada T, Sato K, Oka M. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:299-305.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., (2003), The Effects of melatonin on 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study, *Turk J Med Sci* 34 (2004) 295-299
- Hanau, S., Rippa, M., Dalocchio, F., (1992), NADPH activates a decarboxylation reaction catalysed by lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochim Biophys Acta*, 1122, 273-277.
- Hanau S, Rippa M, Bertei M, Dalocchio F, Barret MP. 6-phosphogluconate dehydrogenase from trypanosoma brucei kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur J Biochem.* 1996; 240: 592-599.
- Hutchison JS, Winberry L, Nakayama R, Holten D. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes. *Biochim et Biophys Acta* 1984; 781:30-38.
- Hollenberg PF. Mechanisms of cytochrome p-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J* 1992; 6:686-94.

- Hong, Z.Q., Les Copeland, (1992), Isoenzymes of 6-PGD from the host fraction of soybean nodules, *J Plant Physiol.*,39, 313-319.
- Jakobasch G, Rapoport SM. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Mol Asp Med.* 1996; 17: 143-170.
- Kato, N.,Sham, H., Wagner, F., (1979), Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. *Biochim Biophys Acta*, 566, 1-11.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı.
- Keha E, Küfrevioğlu Ö.İ. *Biyokimya, Aktif yayınevi, Erzurum* 2004
- Krebs HA, Eggleston LV. The regulation of the pentosephosphate cycle in rat liver. In: Weber G (ed). *Adv enzymeregul.* Oxford: Pergamon Press Ltd, 1978; 12:421-33.
- Krepinsky K, Plaumann M, Martin W, Schnarrenberger C. Purification and cloning of chloroplast 6-PGDH from spinach. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 2678-2686.
- Kutay F, Onat T. İnsan *Biyokimyasi*. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY eds. Ankara Palme Yayıncılık 2002:198, 243-245.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227,680.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 2nd edn..Worth Publishers Inc., Newyork, 2000; 558-560.
- Lu P, Comphell MK. *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders College Publishing,1991;293: 334.
- Lukens JN. *Clinical Hematology*. Philadelphia: Lea Febiger. 1993; 1: 1006-1022.
- Marbach A. Combined Phenotyping of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD; EC. 1.1.1.44). *Forens Sci int.* 1986; 32: 87-92.
- Menezes L, Kelkar SM, Kaklij GS. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*: Responses with different modulators. *Ind J of Biochem Biophys.* 1989; 26: 329-333.
- Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A. Biochemical mechanisms of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1978; 75:1979-1983.
- Moritz B, Striegel K, De Graaf, AA. Sahm H. Kinetic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-PGDH from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *Eur J Biochem.*2000; 267: 3442-3452.
- Niehaus WG, Richardson SB, Wolz RL. Slow-binding inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by zinc ion. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 333 (2): 333-337.
- Ninfali P, Orsenigo T, Barociani SR. Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Prep Biochem.* 1990; 20: 297-309.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. USA: Worth Publishers, 2000; 743-4.
- Ohara H, Uchida K, Yahata M, Kondo K. NAD⁺-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase in lactic acid bacteria. *Biosci Biotech Biochem.* 1996; 60 (4): 692-693.
- Ohara H., Russell, R., Uchida, K.,and Kondo H., 2004, Purification and characterization of nad-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from

- leuconostoc lactis sho-54. Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 98, No. 2, 126-128. 2004
- Onat T. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya İzmir, Saray medikal yayıncılık, 1996: 865-8797
- Özabacıgil, F., 2005; Bazı antibiyotiklerin insan eritrositlerinden saflaştırılan 6-fosfoglukonat dahidrojenaz enzim aktivitesi üzerindeki *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2005.
- Özden M. Anatomi ve fizyoloji ders kitabı. Ankara. Kadioğlu Matbaası 1990: 87-92.
- Özer, A., 1985. Pratik hematoloji: Klinik, laboratuvar ve tedavi., Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir.
- Pearse, B., Rosemeyer, M., (1974), Human 6-phosphogluconate dehydrogenase, Eur J Biochem, 42, 213-223.
- Palmer, A.M, (1999), The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease, J Neural Transm, 106, 317-328.
- Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Life Sci. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical. Pathophysiology. 1997; 60: 2255-2271.
- Roark S, Brown K. Effects of metal contamination from mine tailings on allozyme distributions of populations of Great plains fishs. Environ Toxicol Chem. 1996;15 (6): 921-927.
- Pearse, B.M., Rosemeyer, M.A., (1975), 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, Methods Enzymol, 41, 220-226.
- Proscal, D., Holten, D., (1972), Purification and properties of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Activity at normal *in vivo* concentration of coenzyme, Biochem, 11(7), 1310-1314.
- Sawa Y, Suzuki K, Ochiai H. Purification and Characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from phormidium sp. Agric Biol Chem. 1985; 49 (9): 2543-2549.
- Segel IH. Biochemical calculations. Newyork: Inc. 1968; 403.
- Shreve DS, Levy HR. On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochem Biophys Res Comm. 1977; 78: 1369-1375.
- Senkevich, S.B., Martynchik, D.I., Vinogradov, V., (1989), Kinetic characteristics of 6-phosphogluconate dehydrogenase from bull adrenal cortex, Ukr Biokhim Zh, Sep-Oct; 61(5): 92-5.273.
- Shohet SB, Beutler E. Glutathione metabolism of erythrocyte. Williams Hematology. The Erythrocyte. Part four. 1986.
- Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. Clin Nephrol 2000; 53(Suppl 1):9-17.
- Sosa-Saavedra F., Leon-Barrios M., Perez-Galdona R., (2001). Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in Bradyrhizobium sp lacking Entner-Doudoroff pathway. A role for NAD⁽⁺⁾-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating), Soil Biol Biochem, 33 (3), 339-343.
- Soysal T, Bakan E. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi, kinetik parametreleri ve klinik önemi. Doğa Bilim Dergisi 1984; 8(1): 150-153.
- Stournaras, C., Maurer, P., Kurz, G., (1983), 6-PGD from *Pseudomonas fluorescens* Properties and subunit structure, Eur J Biochem, Feb1, 130(2), 391-6.
- Sokolov, A.P., Luchin, S.V., Trotsenko, IuA., (1980), Purification and properties

- of G-6-PD and 6-PGD from *Pseudomonas oleaverans*, *Biokhim*, Aug, 45(8): 1371-8.
- Topham CM, Dalziel K. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochem J*. 1986; 234: 671-677.
- Thomas JH, Gillham B. Wills' Biochemical Basis of Medicine Wright. London: 1983; 297-302.
- Thomas M, Devlin Ph, D. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlasyon 2. baskı 1986.
- Toews, M.L., Kanji, M., Carper, W., (1976), 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, *J Biol Chem.*, 251 (22), 7127-7131.3.
- Tsai, C.S., Chen, Q., (1998), Purification and kinetic characterization of 6-PGD from *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochem Cell Biol*, 76(4), 637-644.
- Ulusu, N.N, Kus MS, Acan NL, Tezcan EF. (1999), A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. *Int J Biochem Cell Biol*. Jul;31(7):787-96.
- Tandoğan B. Kuzu böbrek korteksinden, glikoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2004.
- Veronese, M.F., Boccu, E., Fontana, A., (1974), Isolation and some properties of 6-PGD from *Bacillus stearothermophilus*, *Biochim Biophys Acta*, 334, 31-44.
- Veronese, F.M., Boccu, E., Fontana, A., (1976) Isolation and properties of 6-PGD from *E.coli*. Some comparisons with the thermophilic enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem*, Sep 7,15(18), 4026-33.
- Yoon H., Anderson C.D., Anderson BM., (1989), Kinetic studies of *Haemophilus influenzae* 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochim Biophys Acta*, Jan 19;994 (1):75-80.
- Yoshida Y, Nakano Y, Yamashita Y, ICoga T. The gnd gene encoding a novel 6-PGDH and its adjacent region of actinobacillus acclinomyces comitans chromosomal DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 230: 220-225.
- Weisz KS, Schofield PJ, Edwards MR. Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification and kinetic properties. *J of Neurochem*. 1985; 44 (2): 510-517.
- Williamson, J.H., Krochko, D., Geer, B., (1980), 6-PGD from *Drosophila melanogaster* I. Purification and properties of the A isozyme, *Biochem Genet*, Feb, 18 (1-2), 87-101.
- Wood, W., (1982), 6-phosphogluconate dehydrogenase from gluconobacter suboxydans, *Methods Enzymol*, 89, 291-295, Academic Press.
- Wood WA. Carbohydrate metabolism. *Methods in enzymology*. 1982; 89; 291.
- Wood T. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct* 1986; 4:235-40.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Ordu'nun Aybastı ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Aybastı'da tamamladı. Orta öğrenimini Fatsa'da bitirdi. 1996 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2000 yılında tamamladı. 2003 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Yüksek Lisans öğrenimini, Haziran 2006'da tamamladı.