



**KEÇİ (*Capra aegagrus hircus*) BÖBREĞİNDEN
ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ
ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU İLE BAZI İLAÇ VE
METALLERİN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mahinur KIRICI

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2015

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KEÇİ (*Capra aegagrus hircus*) BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ
VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU İLE BAZI İLAÇ VE
METALLERİN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mahinur KIRICI

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**KEÇİ (*Capra aegagrus hircus*) BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE
SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU İLE BAZI İLAÇ VE METALLERİN ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Mahinur KIRICI tarafından hazırlanan bu çalışma, 18/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5./0.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. S.Buğrahan CEYHUN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan SÖYÜT

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **14.01/2016** tarih ve **03./24** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 2211-BİDEB Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2211-BİDEB

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

KEÇİ (*Capra aegagrus hircus*) BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU İLE BAZI İLAÇ VE METALLERİN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mahinur KIRICI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Hiperglisemi durumunda aktif olabilen polioll yolağı enzimleri Aldoz redüktaz (AR) (Alditol: NADP⁺ 1- oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.21) ve Sorbitol dehidrogenaz (SDH) (L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) keçi (*Capra aegagrus hircus*) böbreğinden saflaştırıldı, karakterize edildi, bazı ilaç ve metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. AR enziminin saflaştırması; homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değışim kromatografisi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirildi. SDH enziminin saflaştırma işlemi ise homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değışim kromatografisi ve CM-Selüloz C-50 iyon değışim kromatografisi olmak üzere 4 basamakta gerçekleştirildi. AR enzimi 2,73 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile %0,14 verimle, yaklaşık 35 kat saflaştırıldı. SDH enzimi ise 19,6 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile %0,05 verimle, yaklaşık 124,05 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflık kontrollerini yapmak ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Her iki enzimin optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH'ları belirlendi. AR ve SDH enzimlerinin alt birimlerinin mol kütleleri ise SDS-PAGE ile sırasıyla 47 kDa ve 48,11 kDa olarak bulundu. Ayrıca iki enziminde substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Daha sonra keçi (*Capra aegagrus hircus*) böbrek AR enzimi ve SDH enzimi aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metallerin inhibisyon etkileri incelendi. İnhibisyon gösteren ilaç ve metaller için Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi.

2014, 174 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aldoz redüktaz, sorbitol dehidrogenaz, keçi böbreği, ilaç, metal, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF ALDOSE REDUCTASE AND SORBITOL DEHYDROGENASE ENZYMES FROM GOAT (*Capra aegagrus hircus*) KIDNEY AND INVESTIGATION OF SOME DRUGS' AND METALS EFFECTS ON ENZYMES ACTIVITY

Mahinur KIRICI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied sciences
Department of Chemistry
Branch of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

In case of the polyol pathway hyperglycemia can be active enzymes; Aldose reductase (Alditol: NADP^+ 1- oxidoreductase, E.C. 1.1.1.21) and sorbitol dehydrogenase (L- iditol: NAD^+ oxidoreductase, EC. 1.1.1.14). The both enzyme were purified from goat (*Capra aegagrus hircus*) kidney, characterized and effects of some drugs and metals on these enzymes activities were investigated. The purification of AR consists of five steps; They were preparation of homogenate, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration chromatography and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. The four steps of purification of SDH are preparation of homogenate, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and CM-Cellulose C-50 ion exchange chromatography. AR enzyme was obtained having a specific activity of 2.73 EU/mg proteins with a yield of 0.14% and approximately 35 fold. SDH enzyme was obtained having a specific activity of 19.6 EU/mg proteins with a yield of 0.05% and approximately 124.05 fold. SDS-PAGE was carried out to check the purity of both enzymes and to determine molecular weight of subunits. Optimal pH, optimal ionic strength, optimal temperature and stable pH were determined for both enzymes. The molecular weight of subunits determined by SDS-PAGE were calculated as; 47 kDa and 48,11 kDa respectively. Besides, K_M and V_{max} values for each substrates of two enzymes were calculated. Then the effects of some antibiotics and metas on goat (*Capra aegagrus hircus*) kidney AR and SDH activities were examined. For drugs and metals that exhibit inhibitory effect, K_i constants were calculated and inhibition types were determined by using Lineweaver-Burk curves.

2014, 174 pages

Keywords: Aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, goat kidney, drug, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e sonsuz şükran duygularımı sunarım.

Ayrıca yardım ve destekleri için Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVIÖĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Namık KILINÇ'a, Arş. Gör. Dr. Zuhâl ALİM'a ve Sayın Yeliz DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndaki bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, maddi manevi desteğinin yanı sıra göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı sevgili eşim Sayın Arş. Gör. Dr. Muammer KIRICI'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Sayın Elif AM'a ve babam Sayın Mustafa AM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tübitak 2211-BİDEB Yurt İçi Doktora Burs Programına teşekkür ederim.

Mahinur KIRICI

Aralık, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1. Diabetes mellitusun sınıflandırılması.....	4
1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu	9
1.3. Aldoö Redüktaz Enzimi.....	12
1.4. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi	19
1.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar	24
1.5.1. Sefüroksim.....	24
1.5.2. Sefazolin	25
1.5.3. Gentamisin.....	26
1.5.4. Amikasin	26
1.5.5. Seftriakson.....	27
1.5.6. Ampisilin	28
1.5.7. Linkomisin.....	28
1.5.8. Vankomisin	29
1.5.9. Siprofloksasin.....	30
1.5.10. Meropenem.....	31
1.5.11. Sefoperazon	32
1.5.12. Rifamisin	32
2. KAYNAK ÖZETLERİ	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	47

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	48
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	49
3.2. Yöntem	55
3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü	55
3.2.2. Protein tayini	56
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini	56
3.2.2.b. Kantitatif protein tayini	56
3.2.3. Keçi böbrek AR enziminin saflaştırılması	57
3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması	57
3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	57
3.2.3.c. Diyaliz	58
3.2.3.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	59
3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi.....	59
3.2.3.f. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve Keçi böbrek AR enziminin saflaştırılması.....	60
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile AR enzim saflığının kontrolü.....	61
3.2.5. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları.....	62
3.2.5.a. AR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	62
3.2.5.b AR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	62
3.2.5.c. AR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	62
3.2.5.d. AR enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	63
3.2.5.e. DL-Gliseraldehit substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	63
3.2.6. Keçi böbrek AR enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metallerin etkilerinin belirlenmesi	63
3.2.6.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	64
3.2.7. Keçi böbrek SDH enziminin aktivitesinin ölçümü.....	64
3.2.8. Protein tayini	65

3.2.8.a. Kalitatif protein tayini	65
3.2.8.b. Kantitatif protein tayini	65
3.2.9. Keçi böbrek SDH enziminin saflaştırılması	66
3.2.9.a. Homojenat hazırlanması	66
3.2.9.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	67
3.2.9.c. Diyaliz	68
3.2.9.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	68
3.2.9.e. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi.....	69
3.2.9.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi	69
3.2.10. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile SDH enzim saflığının kontrolü.....	70
3.2.11. SDH enzimi için karakterizasyon çalışmaları	71
3.2.11.a. SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar	71
3.2.11.b. SDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	72
3.2.11.c. SDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar ...	72
3.2.11.d. SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	72
3.2.11.e. Sorbitol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	73
3.2.12. Keçi böbrek SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi	73
3.2.12.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	73
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	75
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	75
4.2. Keçi Böbreğinden Aldoz Redüktaz Enziminin saflaştırılması.....	75
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	75
4.2.2. Diyaliz	76
4.2.3. DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	76
4.2.4. DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	77
4.2.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları	78
4.2.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları.....	78

4.2.7. Keçi böbreğinden aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	80
4.2.8. Keçi böbrek aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütlesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	81
4.3. Keçi Böbreğinden SDH Enziminin Saflaştırılması	81
4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	81
4.3.2. Diyaliz	82
4.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçları	82
4.3.4. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	83
4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları	84
4.3.6. Keçi böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	85
4.3.7. Keçi böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütlesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	86
4.4. Keçi böbreği Aldo Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	86
4.4.1. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	86
4.4.2. Keçi böbrek aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	88
4.4.3. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	89
4.4.4. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	90
4.4.5. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	91
4.5. Keçi Böbrek SDH Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	91
4.5.1. Keçi böbrek SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	91
4.5.2. Keçi böbrek SDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	93

4.5.3. Keçi böbreği SDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	94
4.5.4. Keçi böbreği SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	95
4.5.5. Keçi böbrek SDH enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	96
4.6. Keçi Böbrek Aldoiz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	96
4.7. Keçi Böbrek SDH Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	119
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	137
KAYNAKLAR	157
ÖZGEÇMİŞ	175

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

3DG	3-Deoksiglukoz
ADA	American Diabetes Association
AGE	İleri Glikasyon Ürünleri
AKR1B10	Aldehit redüktaz
ALR1	Aldehit redüktaz
AR	Aldoz redüktaz
ARİ	Aldoz redüktaz inhibitörü
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Bovine serum albumin
DAG	Diaçilgliserol
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
ECM	Ekstrasellüler matriks
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
F3P	Fruktoz-3-fosfat
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
HNE	Hekzanitroetan
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)

IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
NAD^+	Nikotinamidadenin dinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamidadenin dinükleotit (indirgenmiş form)
$NADP^+$	Nikotinamidadenin dinükleotitfosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotitfosfat (indirgenmiş form)
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nox	NADH-oksidaz
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
PKC	Protein kinaz C
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
S	Substrat
SDH	Sorbitol dehidrogenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
TMG	Tetrametilen glutarik asit
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V_{max}	Maksimum hız
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Poliöl (sorbitol) yolu.....	10
Şekil 1.2. Hiperglisemi poliöl yolağının aktivasyonunu arttırmaktadır.....	11
Şekil 1.3. Poliöl yolağı.....	12
Şekil 1.4. Poliöl yolağında substrat olarak galaktoz.....	13
Şekil 1.5. Aldoöz redüktaz enziminin yapısı.....	14
Şekil 1.6. Aldoöz redüktaz enziminin aktif bölgesi.....	15
Şekil 1.7. Poliöl yolağının diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi.....	17
Şekil 1.8. Sorbitol dehidrogenaz enziminin aktif bölgesindeki çinko iyonunun koordinasyonu.....	20
Şekil 1.9. (A) Sıçan Sorbital dehidrogenaz enziminin kuarterner yapısı, (B) Enzimin dimer yapısı.....	21
Şekil 1.10. Sefuroksim'in moleköl yapısı.....	25
Şekil 1.11. Sefazolin'in moleköl yapısı.....	25
Şekil 1.12. Gentamisin'in moleköl yapısı.....	26
Şekil 1.13. Amikasin'in moleköl yapısı.....	27
Şekil 1.14. Seftriakson'un moleköl yapısı.....	27
Şekil 1.15. Ampisilin'in moleköl yapısı.....	28
Şekil 1.16. Linkomisin'in moleköl yapısı.....	29
Şekil 1.17. Vankomisin'in moleköl yapısı.....	30
Şekil 1.18. Siprofloksasin'in moleköl yapısı.....	31
Şekil 1.19. Meropenem'in moleköl yapısı.....	31
Şekil 1.20. Sefoperazon Sodyum'un moleköl yapısı.....	32
Şekil 1.21. Rifamisin'in moleköl yapısı.....	33
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	75
Şekil 4.2. Keçi böbrek AR enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	76
Şekil 4.3. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	77
Şekil 4.4. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	77

Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	78
Şekil 4.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren grafik	79
Şekil 4.7. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	80
Şekil 4.8. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA-R _f grafiği	81
Şekil 4.9. Keçi böbrek SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	82
Şekil 4.10. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	83
Şekil 4.11. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	83
Şekil 4.12. Keçi böbreği Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	84
Şekil 4.13. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	85
Şekil 4.14. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA-R _f grafiği	86
Şekil 4.15. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği.....	87
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=6,8) tampon çözeltileri kullanılarak Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	89
Şekil 4.17. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği	90
Şekil 4.18. Değişik pH'lardaki Na-fosfat tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbrek AR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	90
Şekil 4.19. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	91
Şekil 4.20. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği.....	92

Şekil 4.21. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	94
Şekil 4.22. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	95
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	95
Şekil 4.24. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin için 5 farklı sorbitol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	96
Şekil 4.25. Sefuroksim Sodyum'un keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	98
Şekil 4.26. Seftriakson'un Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.27. Amikasin Sülfat'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	100
Şekil 4.28. Sefazolin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi....	101
Şekil 4.29. Gentamisin sülfat'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	102
Şekil 4.30. Vankomisin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	103
Şekil 4.31. Ampisilin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi...	104
Şekil 4.32. Siprofloksasin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	105
Şekil 4.33. Meropenem'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.34. Sefoperazon sodyum'un keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	107
Şekil 4.35. CoCl ₂ .H ₂ O'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	108
Şekil 4.36. FeSO ₄ 'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	109
Şekil 4.37. MgCl ₂ 'ün keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	110

Şekil 4.38. $Zn(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	111
Şekil 4.39. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefuroksim'in Lineweaver-Burk grafiği	111
Şekil 4.40. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Seftriakson Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 4.41. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Amikasin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 4.42. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği	113
Şekil 4.43. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Gentamisin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği	113
Şekil 4.44. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Vankomisin'in Lineweaver-Burk grafiği	114
Şekil 4.45. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği ...	114
Şekil 4.46. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Siproflaksasin'in Lineweaver-Burk grafiği	115
Şekil 4.47. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Meropenem'in Lineweaver-Burk grafiği	115
Şekil 4.48. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefoperazon Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	116
Şekil 4.49. Keçi böbrek AR enzimi üzerine $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği	116
Şekil 4.50. Keçi böbrek AR enzimi üzerine $FeSO_4$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği.....	117
Şekil 4.51. Keçi böbrek AR enzimi üzerine $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 6H_2O$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği	117
Şekil 4.52. Sefuroksim Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	119
Şekil 4.53. Seftriakson sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	120
Şekil 4.54. Amikasin Sülfat'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	121

Şekil 4.55. Sefazolin'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	122
Şekil 4.56. Siprofloksasin'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	123
Şekil 4.57. Meropenem'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	124
Şekil 4.58. Sefoperazon Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	125
Şekil 4.59. Rifamisin Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	126
Şekil 4.60. $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	127
Şekil 4.61. FeSO_4 'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	128
Şekil 4.62. MgCl_2 'ün keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	129
Şekil 4.63. $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	130
Şekil 4.64. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefuroksim Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	131
Şekil 4.65. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Seftriakson Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	131
Şekil 4.66. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Amikasin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği	132
Şekil 4.67. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği	132
Şekil 4.68. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Siproflaksasin'in Lineweaver-Burk grafiği	133
Şekil 4.69. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Meropenem'in Lineweaver-Burk grafiği	133
Şekil 4.70. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefoperazon Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	134

Şekil 4.71. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Rifamisin Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği	134
Şekil 4.72. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nun Lineweaver-Burk grafği	135
Şekil 4.73. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği	135
Şekil 5.1. Aldoz redüktaz inhibitörlerinden bazılarının moleköl yapıları.	144



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2. Sıçan dokularındaki Sorbitol dehidrogenaz miktarı	23
Çizelge 2.1. Aldoz redüktaz enziminin inhibitörlerinin sınıflandırılması	41
Çizelge 2.2. SDH enziminin saflaştırıldığı memeli dokuları	44
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar	47
Çizelge 4.1. Keçi böbreği aldoz redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları	79
Çizelge 4.2. Keçi böbreği SDH enziminin saflaştırma sonuçları	84
Çizelge 4.3. 800 mM Na-fosfat tamponu kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	87
Çizelge 4.4. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=6,8) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	88
Çizelge 4.5. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları	89
Çizelge 4.6. 40 mM Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	92
Çizelge 4.7. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum iyonik şiddeti için Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	93
Çizelge 4.8. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları	94
Çizelge 4.9. Keçi böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi	97
Çizelge 4.10. Keçi böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Seftriakson sodyum'un etkisi	98
Çizelge 4.11. Keçi böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi	99

Çizelge 4.12. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin'in etkisi	100
Çizelge 4.13. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Gentamisin sülfat'ın etkisi	101
Çizelge 4.14. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Vankomisin'in etkisi	102
Çizelge 4.15. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ampisilin'in etkisi	103
Çizelge 4.16. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi	104
Çizelge 4.17. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Meropenem'in etkisi	105
Çizelge 4.18. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefoperazon Sodyum'un etkisi	106
Çizelge 4.19. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'nun etkisi	107
Çizelge 4.20. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine FeSO_4 'ın etkisi ...	108
Çizelge 4.21. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine MgCl_2 'ün etkisi ..	109
Çizelge 4.22. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın etkisi	110
Çizelge 4.23. Keçi böbrek AR enzimi için bulunan IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri	118
Çizelge 4.24. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi	119
Çizelge 4.25. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Seftriakson'un etkisi	120
Çizelge 4.26. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi	121
Çizelge 4.27. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin sodyum'un etkisi	122
Çizelge 4.28. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi	123

Çizelge 4.29. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Meropenem'in etkisi.....	124
Çizelge 4.30. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefoperazon Sodyum'un etkisi.....	125
Çizelge 4.31. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Rifamisin Sodyum'un etkisi	126
Çizelge 4.32. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine CoCl ₂ .H ₂ O'nun etkisi	127
Çizelge 4.33. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine FeSO ₄ 'ın etkisi	128
Çizelge 4.34. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine MgCl ₂ 'ün etkisi	129
Çizelge 4.35. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O'ın etkisi	130
Çizelge 4.36. Keçi böbrek SDH enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri, K _i sabitleri ve inhibisyon türleri	136
Çizelge 5.1. Sıçan lensi AR ve ALR1 enzimleri için çeşitli substratlar ve K _M değerleri	139
Çizelge 5.2. Keçi böbreğinden AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	154
Çizelge 5.3. Keçi böbreğinden SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	154
Çizelge 5.4. Keçi böbrek AR enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri K _i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	155
Çizelge 5.5. Keçi böbrek SDH enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri K _i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	156

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

M.S. 2. yüzyılda Diabetes adı ilk kez Aretheaus tarafından Kapadokya'da kullanılmıştır. Yunancadan gelen Diabetes Mellitus, akıp giden anlamındaki dia+betes ve bal gibi tatlı anlamındaki Mellitus kelimelerinden türemiştir. Aretheaus, Diabetes adını çok fazla idrar yapan ve aşırı kilo kaybına uğrayan bireyleri sifonlu fiçiya benzettiği için kullanmış ve bu hastalara klinik tanı koymuştur. M.S. 5-6. yüzyıllarda Susruta ve diğer Hintli hekimler hasta kişilerin idrarlarının tatlı olduğunu ve bundan dolayı sineklerin, karıncaların ve diğer haşeratların idrara üşüştüğünü belirtmişler ve bu hastalığın iki tipinin olduğunu saptamışlardır. Bunlardan birinde, hastalar zayıf, genç ve genç yaşta öldükleri, diğerinde ise hastaların yaşlı ve şişman oldukları belirtilmiştir. Hastalığın M.S. 5-6. yüzyıllarındaki sınıflandırılmasının günümüzdeki Tip 1 ve Tip 2 diyabet sınıflandırılmasına benzemektedir (Başkal 2005).

Yaşadığımız yüzyılda, diabetes mellitus ve onun gibi benzer risk faktörlerini taşıyan bulaşıcı olmayan, kronik hastalıklar önemli bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin tümünde yaşam biçimindeki hızlı değişimle beraber özellikle tip 2 diyabetli hasta oranları hızla artmaktadır (Zimmet *et al.* 2001).

2009 yılının sonu itibarıyla bütün dünyadaki diyabetli hasta nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılına ulaştığımızda dünya diyabet nüfusunun 438 milyona ulaşması öngörülmektedir (IDF 2009). Bu artışın başlıca sebepleri nüfus artışı, yaşlanma ile kentleşmenin getirdiği yaşam biçimindeki değişim sonucu fiziksel inaktivitedeki ve obezitedeki artıştır (Sekikawa *et al.* 1997).

Diabetes mellitus çoğu ülkede ölüme sebep olan hastalıklar içerisinde beşinci sırada yer almaktadır (Wild *et al.* 2004; IDF 2006).

Diabetes mellitus, genellikle çevresel etkenlerin ve kalıtsal birleşimi ile oluşan metabolik bir bozukluk olup, glukozun hücre içine alınmasında rol alan insülinin sekresyonunda, etki mekanizmasında yada her ikisinde birden ortaya çıkan eksiklik sonucu karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarında görülmekte olan bozukluklar olarak tanımlanmaktadır. Bununla beraber DM, kronik hiperglisemi ile karakterize, çeşitli etiyolojik nedenlerle oluşan metabolik bir hastalıktır. Bu kronik hastalığın tüm organ ve sistemleri etkileyen, akut ve kronik komplikasyonları vardır. Bu komplikasyonlardan açlık hipoglisemisi veya postprandial hiperglisemi sorumludur. Kronik hiperglisemi, özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları gibi çeşitli organlarda uzun dönemde hasarlanma, fonksiyon bozukluğu ve yetmezlik ile ilişkilidir (Arslan *et al.* 2003; Diabetes Care 2003; Anonymous 2003).

Vücuttaki kan glukozunun regülasyonu çok sayıda kimyasal madde ve hormonun karmaşık etkileşmesi ile sağlanır (Rother 2007). Hücreler, enerjilerinin büyük bir kısmını glukozdan sağlar. Glukozun hücrelere girişi farklı yollarla olmaktadır. Hücrelerde granül halinde depo edilen insülin hormonu glukozun hücrelere girişinde en önemli etmendir. Glukoz oranının kanda yükselmesi ile kanda belirli oranda olan insülin hormonu artarak glukozun hücre içine girişini sağlar. Sağlıklı insanlarda kan glukozu uzun süre yüksek kalabilir, ancak 140 mg/dL üstüne çıkmaz (Anonymous 2003).

Diyabetes mellitusun akut ve kronik komplikasyonları aşağıda sınıflandırılmıştır (Arslan *et al.* 2003).

A) Akut (metabolik) komplikasyonlar:

- Diyabetik ketoasidoz
- Hiperosmolar non-ketotik koma
- Laktik asidoz koması
- Hipoglisemi koması

B) Kronik (dejeneratif) komplikasyonlar:

1) Makrovasküler komplikasyonlar:

- Kardiyovasküler hastalıklar
- Serebrovasküler hastalıklar
- Periferik damar hastalığı

2) Mikrovasküler komplikasyonlar:

- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati
- Diyabetik nöropati (Arslan *et al.* 2003).

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan defans sistemlerine sahiptir (Memişoğulları 2005).

“Amerikan Diyabet Birliği” (American Diabetes Association, ADA) ve “Dünya Sağlık Örgütü” (World Health Organization, WHO) tarafından aşırı susama (polidipsi), aşırı idrara çıkma (poliüri), aşırı yeme (polifaji), glukozüri, ketonüri, açıklanamayan kilo kaybı ve kan-glukoz değerini diyabetin başlıca belirtileri olarak vurgulanmıştır (Anonymous 1999). Buna göre tokluk kan şekeri seviyesinin 200 mg/dl ve üzerinde olması, ya da en az sekiz saatlik açlıktan sonra plazma glukoz oranının 126 mg/dl ve üzerinde olması, diyabet tanısı için yeterli görülmüştür (Engelgau 2004; Anonymous 2004a; Clee and Attie 2007). Bunun yanında, açlık kan glukoz oranı 100 mg/dl altındaysa veya şeker yüklemesinden sonraki 2. saatte ölçülen kan glukoz oranı 140 mg/dl altında bulunan bireylerin normal kan glukoz oranlarına sahip oldukları belirtilmiştir (Anonymous 2003).

Diyabet hastalarının tedavisinde gerek oral antidiyabetiklerin düzenli kullanımı gerekse insülin kullanımı, hastaların yaşam sürelerini arttırmış olup bunun yanı sıra diyabet hastalarının ömür sürelerinin artmasına bağlı olarak oluşan kronik komplikasyonlar diyabetin çok önemli mortalite ve morbilite sebepleri arasındadır (Ertekin 2006).

1.1.1. Diabetes mellitusun sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) raporuna göre, diyabetin etiyolojik sınıflandırılması aşağıdaki çizelgede yer almaktadır (Çizelge 2.2) (Anonymous 2005).

Çizelge 1.1. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması (Anonymous 2005)

I. Tip-1 diabetes mellitus	
1. İmmun nedenli	
2. İdiyopatik	
II. Tip-2 diabetes mellitus	
1. Periferik insülin direnci ön planda	
2. İnsülin sekresyon yetmezliği ön planda	
III. Gestasyonel diabetes mellitus	
IV. Diğer spesifik tipler	3. Glukogonoma ve diğerleri
A. β -hücre fonksiyonunun genetik defektleri	E. İlaç ve kimyasal sebepler
1. Kromozom 20, HNF- 4 α (MODY1)	1. Vakor
2. Kromozom 7, glukokinaz (MODY2)	2. Pentamidin
3. Kromozom 12, HNF- 1 α (MODY3) ve diğerleri	3. Nikotik asit ve diğerleri
B. İnsülin fonksiyonunda genetik defektler	F. Enfeksiyonlar
1. Tip A insülin direnci	1. Konjenital rubella
2. Leprechaunism	2. Sitomegalovirus enfeksiyonu ve diğerleri
3. Rabson- Mendenhall sendromu ve diğerleri	G. Otoimmün diyabetin nadir formları
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları	1. Anti- insülin reseptör antikoları
1. Pankreatitler	2. Stiff- man sendromu ve diğerleri
2. Travmal pankreatektomi	H. Diğer genetik hastalıklar
3. Neoplazitler ve diğerleri	1. Down sendromu
D. Endokrinopatiler	2. Klinifelter sendromu ve diğerleri
1. Akromegali	

1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği tarafından ve 1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından tarafından bilimsel araştırmalara dayanarak diyabetin patofizyolojik özellikler zemininde Tip 1, Tip 2, diğer gestasyonel diyabet ve spesifik tipler olmak üzere 4 sınıfa ayrıldığı yayınlanmıştır (Diabetes Care 1997; WHO 1999).

Diyabet vakalarının büyük çoğunluğu iki geniş etiyopatogenetik kategoriye ayrılır (1). Tip 1 diyabetin dahil olduğu birinci kategoride, mutlak insülin eksikliği ile sonuçlanan pankreas beta-hücrelerinin otoimmün aracılı yıkımı iken, tip 2 diyabetin dahil olduğu, çok daha yaygın olan diğer kategoride ise insülin direnci ve insülinin kompanseuar sekreteruar yanıtındaki yetersizliğin bir kombinasyonudur (Zimmet *et al.* 2001; Anonymous 2012).

Tip 1 diyabet mutlak insülin eksikliğine yol ačan pankreas beta hücre yıkımı ile karakterize olup, insülin vücutta olmadığı için yaşamı sürdürmek ve ketozisten korunmak için dışarıdan insülin desteğine ihtiyaç duyar. Bu nedenle diyabetin bu formu için insüline bağımlı diyabet tabiri kullanılmıştır. Her yaşta ortaya çıkabilmekle birlikte sıklıkla 30 yař altında görülür. Tip 1 diyabetli hastalarda insülin eksikliği günlük enjeksiyonlarla telafi edilmektedir. Tip 1 diyabet, bu hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerde genellikle enfeksiyon, stres veya travma gibi bir olay sonrasında tetiklenmektedir. Diyabetli tüm bireylerin %5-10'unu oluşturmaktadır. Etyolojisi tam bilinmemekle birlikte genetik (%10) ve çevresel faktörlerin ortak etkisi ile gelişmektedir. Hastalık genellikle küçük yař grupları ve gençlerde daha sık ortaya çıkması nedeniyle insüline bağımlı diyabet (IDDM) veya gençlik diyabet “Juvenil diyabet” olarak da tarif edilmiştir. Tip 1 DM de uzun dönemde görülen mikrovasküler komplikasyonları nefropati, retinopati ve nöropati oluşturmaktadır (Atkinson and Maclaren 1994; Yılmaz 2006; Anonymous, 2006; Diabetes Care 2007; Sperling 2008).

Tip 1 DM da tanı sırasında hastalar sürekli açlık hissi, kilo kaybı, ağız kuruluğu, çok su içme, sık idrara çıkma, bulanık görme, halsizlik ve yorgunluk gibi şikayetlerden yakınmaktadırlar. Hastalardaki bu yakınmalar genellikle teşhisin son birkaç gün ya da birkaç haftası içinde ortaya çıkmaktadır. Diyabetin bu tipi son yıllara kadar yalnızca

çocuklarda görülmekte iken günümüzde ise yetişkin yaşlarda da görülmeye başlamıştır. Bu tip diyabet olgularının yarısı 15 yaşın üzerinde ortaya çıkmaktadır. Erişkinlerde (genellikle 25 yaşından sonra) görülen tip 1 diyabet formu “LADA” (latent autoimmune diabetes in adult) olarak adlandırılmaktadır (Anonim 2011).

Tip 2 DM hücreler üzerindeki etki bozukluğu (insülin direnci) ve insülin sekresyon bozukluğu (insülin yetmezliği) ile karakterize bir hastalıktır. Patogenezinde insülin salınımının azalması, karaciğerde glukoz yapımının artması, insüline karşı direnç oluşması ve yağ metabolizmasının bozulması rol oynar. Tip 2 DM diyabetli bireylerin %90’ını oluşturmaktadır. Daha önceden insüline bağımlı olmayan diyabet ya da erişkin diyabeti olarak isimlendirilirken, çocuklarda epidemik obezite ve inaktivite artışı göstermesinden dolayı tip 2 diabetes mellitus olarak değiştirilmiştir ve bu hastalık çok erken yaşlarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Tip 2 diyabetli hastalarda tedaviye başlangıç olarak insülin direncini kıran oral anti-diyabetik ilaçlarla başlanır, istenen sonuca ulaşılamazsa insülin tedavisi uygulanır (Reaven *et al.* 1976; Olefsky *et al.* 1982; Anonymous 2006).

Bu tip diyabet çoğunlukla obezite ve fiziksel inaktiviteye bağlı olarak görülmektedir. Hastalığa genetik olarak yatkın olan insanlarda yaşam tarzı ile tetiklenen insülin direnci ve zamanla azalan insülin sekresyonu görülmektedir (IDF 2003).

Tip 2 DM hastalarda tanı tip 1 diyabetli hastalara benzemekle birlikte daha hafif gerçekleşmektedir. Bundan dolayı hastalık gerçek başlangıçtan yıllar sonra (ortalama 5 yıl sonra) fark edilir, bazen oluşan komplikasyonları sebebiyle tanı konabilir. Genellikle tip 2 diyabet 40 yaşından sonra ortaya çıkar ve yaşlanmayla beraber görülme sıklığı artar. Son yıllarda çocukluk çağında obezitenin artmasıyla beraber çocuk ve adolesan çağda da tip 2 diyabet görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde 15 yaş altında görülen diyabet vakalarının yarısına yakınının tip 2 diyabetli hastalar olduğu bildirilmektedir (Anonim 2011).

Hastalığın erken dönemlerinde, kompanzasyon mekanizmasının devreye girmesi ile pankreas β hücrelerinden insülin salınımı artar. Bu evrede glukoz toleransı normale yakındır. Hastalığın sonraki dönemlerinde ise insüline karşı direnç gelişir ve pankreas hücreleri yetersiz kalır. Nihai olarak, insülin salınımı azalırken karaciğerde glukoz yapımı artmaya devam eder. Sonuçta açlık kan şekeri artar ve aşikar diyabet meydana gelir (Anonymous 2006).

Diyabetik Nöropati

Nöropati somatik ve otonom sinirleri etkileyen, diyabetik hastalarda çok sık rastlanan diyabetin kronik komplikasyonlarından birisi olup sadece DM zemininde gelişen bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Ertekin 2006; Ropper and Brown 2006). Marchal De Calvi 1864 yılında diyabet sonucu periferik nöropatinin oluşabileceğini belirtmiştir (Thomas and Tomlinson 1993). Diyabetik nöropati otonomik ve somatik sinirlerde görülmektedir. Diyabetik nöropati omurilik ve merkezi sinir sistemini de etkilemektedir (Wessels 2006; Roubicek *et al.* 2009). Sinir kan akımını azaltan hiperglisemi endonöral hipoksi oluşturmakta ve oksidatif stresle sinir hücreleri ve membranlarında yıkıma sebep olmaktadır (Anonymous 1988; Ropper and Brown 2006). Diyabetlilerin %50-70'inde diyabetik nöropati gelişir. En sık görülen belirtiler ayaklarda (ve bazen ellerde) uyuşma, yanma, karıncalanma, ağrı ve güçsüzlüktür (WHO 1999).

Amerikan Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışması'nda, nöropati oluşumunun, diyabetin süresi, yaş, cinsiyet ve boy uzunluğu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (ileri komplikasyonları olan bireyler hariç) (DCCT 1988). Nöropati gelişimi 15-59 yaş arası DM'li hastaların %10'unda görülmektedir (Chase 1989; Güler *et al.* 1997). Bu hastalığın ileri evrelerinde duyu yitimi, el ve ayaklarda titremeler ve artan ağrılar gözlenmektedir (Boulton 1997; Boulton *et al.* 2005).

Yasuda ve arkadaşları diyabetik nöropatinin patogenezinde, aldoz redüktaz enzimi aktivitesinin hiperglisemiye bağlı artışı, protein glikasyonu ve oksidatif stres olduğunu belirtmişlerdir (Yasuda *et al.* 2003).

Diyabetik Nefropati

Glomerular filtrasyonun azalmasıyla beraber gelişen proteinüri (mikroalbuminüri) ile karakterize bir komplikasyondur (Mogensen *et al.* 1983). Hastalık küçük kan damarlarının hasarı nedeniyle oluşur. Tip 1 diyabet hastalarında proteinürisi olanların olmayanlara göre 40 kat, tip 2 diyabet hastalarında ise 4 kat artan bir ölüm riskine sahip olduğu belirlenmiştir (Borch-Johnsen *et al.* 1985). Tip 1 diyabetlilerde diyabetik nefropati görülme oranı %30-40 iken, tip 2 diyabetlilerde bu oran %5 olarak tespit edilmiştir (Little *et al.* 2002; Güner 2005). Diyabetli hastalarda ölüm oranının %10'undan diyabete bağlı böbrek yetmezliği sorumludur (Humphrey *et al.* 1989; Forsblom *et al.* 1998). DNP'li hastaların %50-60'ını tip 2 diabetes mellituslu hastalarda diyabet tanısı konduğu anda bulunmaktadır. Diyabetik nefropati tip 1 diyabetik hastaların yaklaşık %30-40'ında tanıdan ortalama 20 yıl sonra ortaya çıkmaktadır. Çoğu ülkede son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) yol açan en önemli neden diyabetik nefropatidir ve diyaliz uygulanan hastaların büyük bir bölümünü diyabetliler oluşturmaktadır (Mogensen 1998; Parving 2001; Ramuzzi *et al.* 2002). ABD'de son dönem böbrek yetmezliğinin hastalarının %40'ını diyabetli hastalar oluştururken Türkiye'de ise böbrek yetmezliği nedenleri arasında %25'lik oranla ilk sırayı tutmaktadır (Powers 2005).

Mikroalbuminüri olgusu; Diyabet süresi, yaş, glisemi oranı, diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin bulunması (Hipertansiyon, sigara, hiperlipidemi ve erkek cinsiyet), etnik köken, böbrek hastalıkları, genetik hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalığın varlığıyla alakalı olarak artar.

Diyabetik Retinopati

Diyabetin en sık karşılaşılan kronik mikrovasküler komplikasyonlarından biri olan diyabetik retinopati tüm dünyada görme kaybının önde gelen sebeplerindendir. Diyabet körlüğe neden olan ilk üç hastalık içinde yer almaktadır. Diyabetin bu komplikasyonu retinada meydana gelen geniş spektrumlu lezyonlar ile karakterize bir komplikasyondur

ve retinadaki küçük damarların uzun süreli hiperglisemiye bağlı hasarı sonucu gelişir (Fong *et al.* 2003). Tip 1 diyabetiklerde diyabet süresi 20 yılı aşkın olan hastaların neredeyse hepsinde, tip 2 diyabetiklerde ise hastaların %77'sinde retinopati gelişir (Klein *et al.* 1984). Hastalık süresi 15 yıla ulaşan diyabetlilerin %2'sinde körlük ve %10'unda ciddi görme kaybı olduğu bildirilmiştir (WHO 1999). Dünya Sağlık Örgütüne göre diyabetik retinopati dünyadaki 37 milyon körlük vakasının %4,8'inden sorumludur (Resnikoff *et al.* 2004).

Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal Konseyi Sağlık Bakanları Deklarasyonu 2009

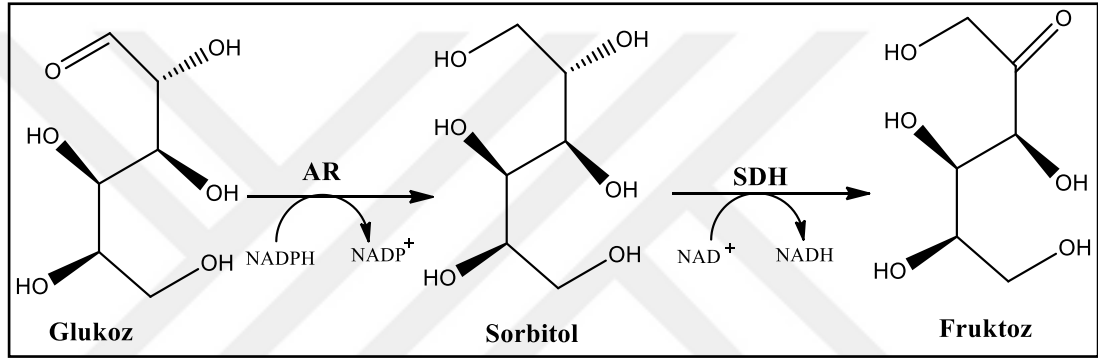
Bu deklarasyonda aşağıdaki unsurlara dikkat çekilmektedir:

- Halen dünyada ikiyüzseksenbeş milyon diyabetli insan yaşamaktadır.
- IDF 2009 sonu itibarı ile yılda dört milyona yakın kişinin diyabet nedeniyle kaybedildiğini bildirmiştir.
- Ölümünün %80'i gelişmekte olan ülkelerde gerçekleşmektedir.
- Ölenlerin yarısı 70 yaşın altındadır.
- Diyabete bağlı nedenlerle kaybedilen kişilerin %55'i kadındır.
- DSÖ ve IDF önümüzdeki çeyrek yüzyıl içinde dünya genelinde diyabetli nüfusun ikiye katlanacağını öngörmektedirler.
- Sağlıklı beslenme, düzenli fiziksel aktivite, normal kiloya ulaşılması, kilonun korunması ve sigara kullanımından uzak durulması ile diyabet önlenebilir veya ortaya çıkması geciktirilebilir (WHO 2006; Anonim 2011).

1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu

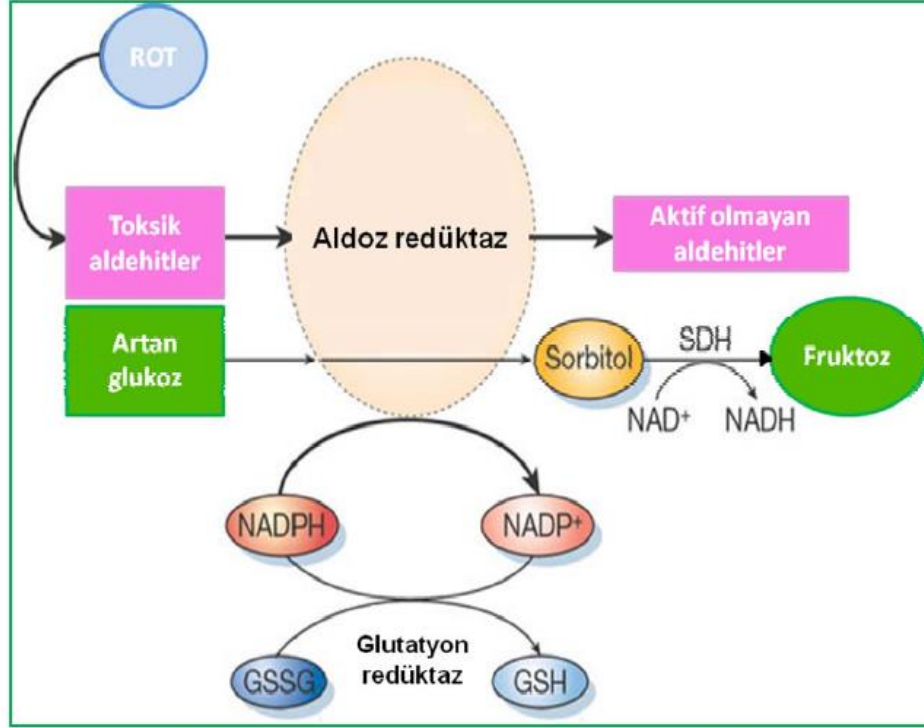
Poliöl yolağı, bu yolağın hız-sınırlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinden oluşmaktadır (Gleissner *et al.* 2007). Glukoz transportu için insülininden bağımsız lens, kan damarı, sinir, böbrek gibi dokularda hiperglisemi intraselüler glukoz artışına sebep olur. Artan intraselüler glukoz, aldoz redüktaz enzimi

ve kofaktörü NADPH aracılığı ile indirgenerek sorbitole dönüştürülür. Bir poliol olan sorbitol ise poliol yolağının ikinci enzimi sorbitol dehidrogenaz ile NAD^+ kofaktörü yardımıyla yükseltgenerek fruktoza dönüştürülür (bu dokularda SDH düşük konsantrasyonda bulunur). Sonuç olarak insülininden bağımsız ve glukoz artışı olan dokularda sorbitol hücre membranından kolay geçemediğinden dolayı dokularda birikime sebep olur ve bunu izleyen fruktozun dönüşümü yavaştır (Martin *et al.* 1968; Greene *et al.* 1987; Murray and Mayes 1993).



Şekil 1.1. Poliol (sorbitol) yolu (Alım and Beydemir 2012)

Poliol yolağı enzimi olan AR enzimi aracılığıyla glukozun redüksiyonu, diyabete bağlı komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Kao *et al.* 1999; Srivastava *et al.* 2005). Bu yolda hız-sınırlayıcı enzim olan AR, normalde toksik yapıdaki aldehitleri, inaktif alkollere indirgemektedir (Şekil 2.8) (Brownlee 2005). Normoglisemik durumlarda, hücresel glukoz glikoliz yolunda metabolize olur ve Krebs çemberi ile hücreler için enerji ve yapı taşlarına dönüştürülür (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Normoglisemik durumlarda poliol yolağında glukozun %3 metabolize olurken, hiperglisemi durumunda, glukozun %30'u metabolize olur ve glukozun %30'unun bu yolda metabolize olması DM istenmeyen zararlı etkilerin oluşmasına sebep olmaktadır (Gonzalez *et al.* 1984).



Şekil 1.2. Hiperglisemi poliöl yolağının aktivasyonunu arttırmaktadır (Brownlee 2005)

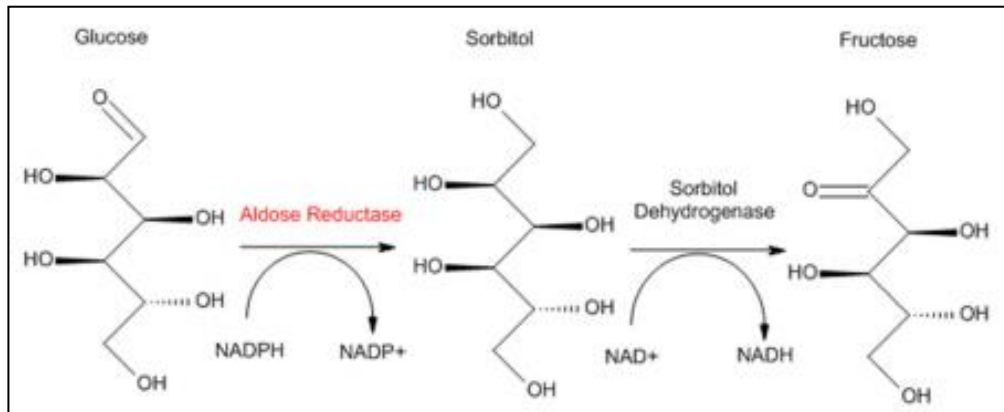
Hiperglisemide, sorbitolün fruktoza oksidasyonu sırasında oluşan NADH hücre içi NADH/NAD⁺ oranını değiştirmekte ve diyabetik dokularda yalancı hipoksi oluşmasına sebep olmaktadır (Dunlop 2000). Oluşan yalancı hipoksi hücre içi çeşitli sinyal yollarını etkileyerek değişikliklere neden olmakta ve komplikasyonların gelişmesini sağlamaktadır. Poliöl yolağı sonucu oluşan früktoz, glukozdan daha reaktiftir ve ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunu glukozdan daha etkili bir şekilde gerçekleştirmektedir (Khalifah *et al.* 1999). Enzimatik olmayan glikasyon yolağı sonucu oluşan ürünler proteinlere zarar vererek hücre fonksiyonlarının kaybına ve AGEs oluşumuna neden olmaktadır (Szwergold *et al.* 2002).

Glukozun sorbitole dönüşüm reaksiyonunu katalizleyen AR enzimi, ilk kez 1956 yılında Hers tarafından, seminal kesede sperm hücreleri için enerji kaynağı olan fruktozun, glukozdan oluşumunu sağlayan enzim olarak belirlendi (Hers 1956). Daha sonra poliöl yolunda oluşan sorbitol diyabetik sıçan lensinde bulundu (Van Heyningen 1959). AR ın patojenik etkisi ve poliöl yolu ile ilişkisi Kinoshita tarafından 1965 yılında ilk kez lenste

belirlendi ve bu çalışmalar sorbitol birikimi, katarakt oluşumu ve osmotik stres hipotezinin temelini oluşturdu (Kinoshita 1965). AR tarafından aşırı miktarda üretilen sorbitol hücre membranından geçemez ve hücre içerisinde birikir. Hücre membranını geçemeyen sorbitol osmotik stresin artmasına ve diyabetik katarakt komplikasyonuna sebep olur (Kinoshita 1974).

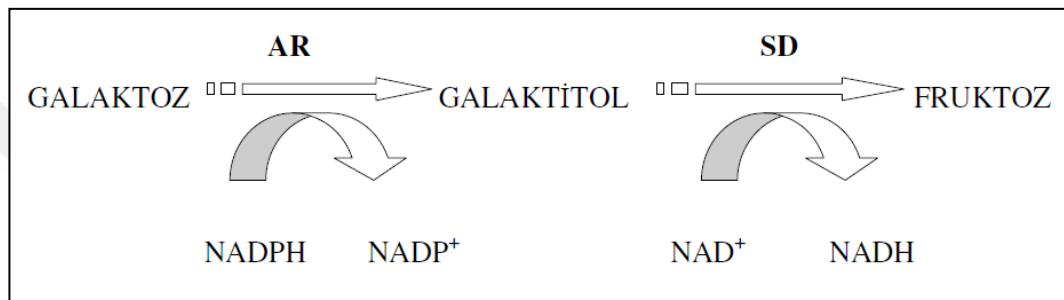
1.3. Aldoz Redüktaz Enzimi

Sistemik adı alditol olan aldoz redüktaz (AR) enzimi aldoketo-redüktaz (AKR) süper ailesinin bir üyesidir. Aldoketo-redüktaz süper ailesi, 15 aile ve toplam olarak 151 protein yapılı enzim içermektedir. Bu enzimler, substratları olan ketonlar ve alkanları, alkol ürünlerine indirgemektedirler (Jez *et al.* 1997; Jez and Penning 2001). Aldoz redüktaz enziminin kod numarası Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından E.C.1.1.1.21 olarak belirlenmiştir. Aldoz redüktaz (alditol: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.21, ALR2) enzimi Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktörüne bağlı olarak alifatik ve aromatik yapıdaki aldehitleri, streoidleri, monosakkaritleri, polisiklik aromatik hidrokarbonları ve isoflavonoidleri katalize etmektedir (Kumar and Reddy 2007). İlk defa Hers tarafından koyun plasentası ve seminal kesede belirlenen aldoz redüktaz, polioliol yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup, NADPH kofaktörü aracılığı ile glukozun polihidroksilalkol olan sorbitole dönüşüm reaksiyonunu katalizlemektedir (Hers 1956) (Şekil 1.1).



Şekil 1.3. Polioliol yolağı (Petraş *et al.* 2004)

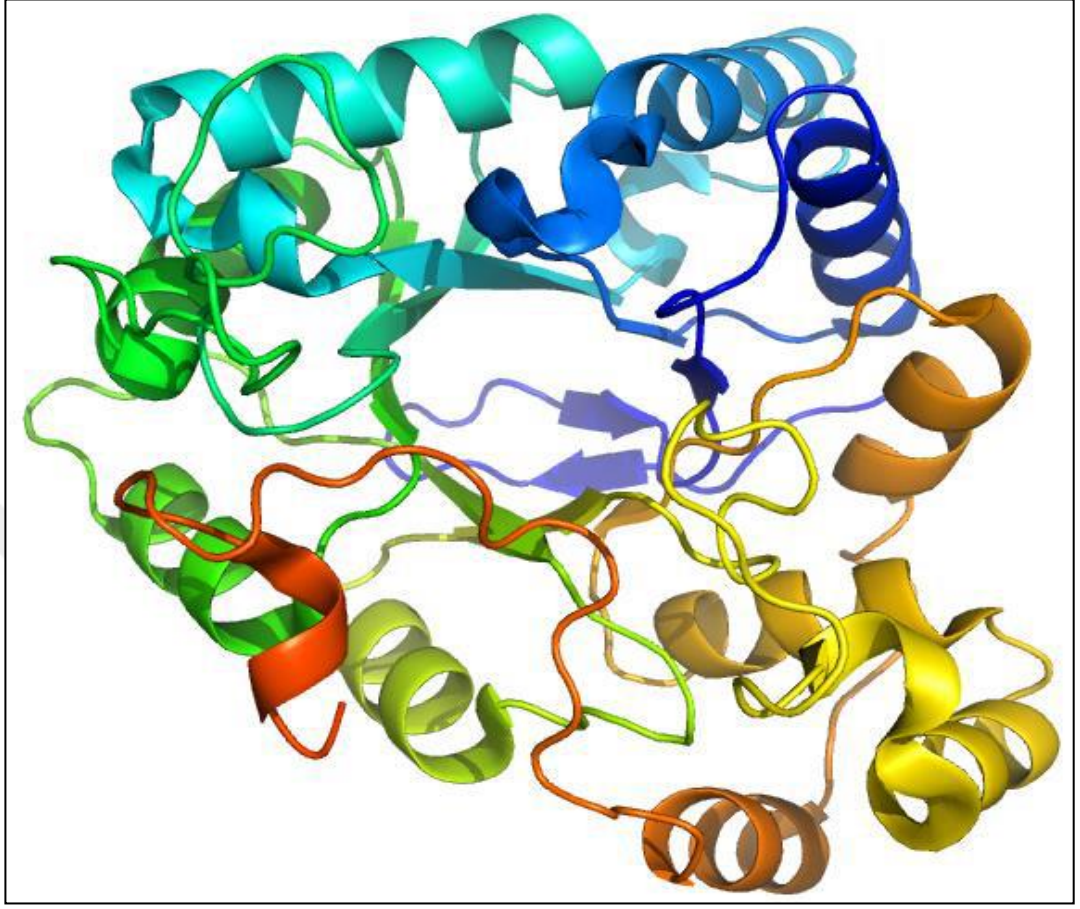
Substrat olarak alifatik ve aromatik aldehitleri kullanan aldoz redüktaz enzimi hücre içi temel substrat olarak glukoz ve galaktozu kullanır (Vander Jagt *et al.* 1995). Substrat olarak glukoz kullanıldığında sorbitol oluşurken galaktoz kullandığında ise galaktitol oluşur (Sekil 1.2). Fakat oluşan galaktitol, sorbitol dehidrogenaz enzimi için iyi bir substrat olmadığı için (Kinoshita *et al.* 1963) hiperglisemi durumunda galaktitol, sorbitolden daha hızlı birikir (Jedziniak *et al.* 1973).



Sekil 1.4. Poliöl yolağında substrat olarak galaktoz (Kinoshita *et al.* 1963; Gabbay *et al.* 1966).

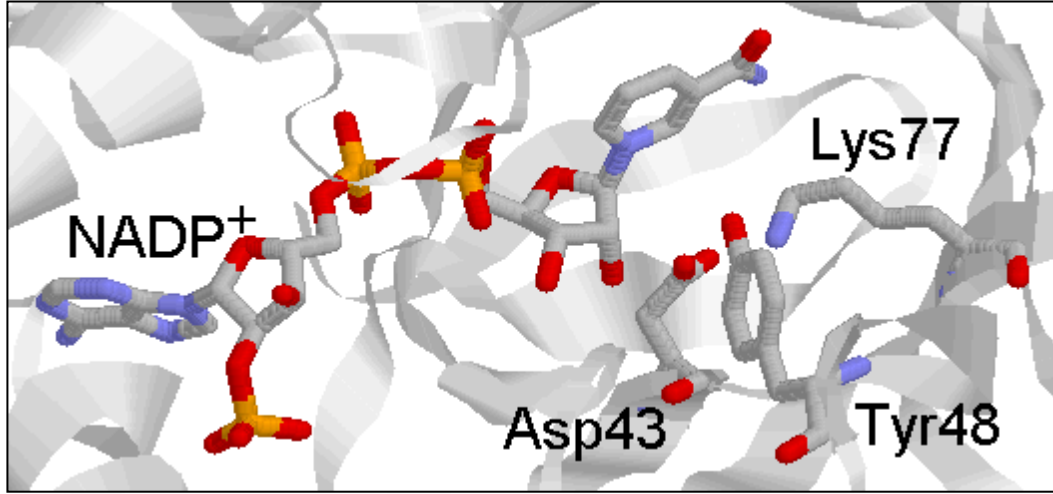
Memeli overlarında galaktoz ve galaktoz metabolitlerinin birikimi hasara sebep olmaktadır (Liu *et al.* 2000). Galaktitol, overlarda ozmotik dengesizliğe ve GSH depolarının tükenmesine sebep olur ve sonuç olarak hasar oluşur. Hiperglisemide poliöl yolağının artan aktivasyonu ile artan galaktitol üretimi bu hasarın oluşumuna katkı sağlar. Yapılan çalışmalarda, aldoz redüktaz inhibitörleri, galaktoza bağımlı toksiteyi önlediği belirtilmiştir (Meyer *et al.* 1992; Bery 1995).

Monomerik bir protein olan insan aldoz redüktaz enzimi AKR1B1 geni tarafından kodlanıp 7q35 kromozomu üzerinde yer alır. Enzimin kütlesi 36 kDa olup, 315 amino asitten oluşur. X-Ray kristallografisi çalışmaları sonucu aldoz redüktaz enziminin üç boyutlu bir yapısının olduğunu gösterilmiş ve enzimin üç boyutlu yapısı Şekil 1.3’de verilmiştir. Sitolik bir enzim olan aldoz redüktaz (ALR2) lens, retina, böbrek, böbrek üstü bezi ve çeşitli üreme organlarında çok miktarda dağılmış olarak bulunmaktadır (Srivastava *et al.* 2007).



Şekil 1.5. Aldoz redüktaz enziminin yapısı (Zhang *et al.* 2013)

Tüm aldo-keto redüktaz süper ailesi gibi aldoz redüktaz enzimi de α/β fiçi modelinde olup enzimin aktif bölgesi fiçi yapının karboksil terminalinde yer almakta ve H1- α -heliks, H2- α -heliks, ilmek A, B ve C yapıları da bu modele eşlik etmektedir (Wilson *et al.* 1992; Jez *et al.* 1997). Enzimin α/β fiçi yapısının karboksi-terminal ucunda yer alan aktif bölgesi 60Å genişliğinde ve 15Å derinliğindedir ve hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Bohren *et al.* 1992; Kim *et al.* 2006). Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesi Şekil 1.7’de görülmektedir.



Şekil 1.6. Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesi (Gabbay 2004).

Enzimin aktif bölgesi yüksek derecede hidrofobik olup, aromatik kalıntılar (Trp20, Tyr48, Trp79, Trp111, Phe121, Phe122 ve Trp219), apolar kalıntılar (Val47, Pro218, Leu300 ve Leu301) ve polar kalıntılardan (Gln49, Cys298 ve His110) oluşmaktadır (El-kabbani *et al.* 2004). Enzimin aktif bölgesinde yer alan Cys298'nin katalitik aktiviteyi kontrol ettiği yapılan bazı çalışmalar ile belirlenmiştir (Petrash *et al.* 1992). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktörü enzimin aktif bölgesine menteşe gibi bağlanır (Walsh 1979). Kofaktör yapısındaki nikotinamid halkası fiçinin iç kısmında, Nikotinamid halkasındaki amid grubu da Gln184, Asn163 ve Ser162 kalıntıları ile hidrojen bağı yaparken pirofosfat bölümü ise fiçinin kenarında yer almaktadır (Rondeau *et al.* 1992; El-kabbani *et al.* 1998). Kofaktörün enzim üzerindeki kararlılığını, NADPH kofaktörünün adenozin halkasının 2'-fosfatı ile enzimin aktif bölgesinde bulunan Lys263 ve Arg269 kalıntıları arasında kurulan tuz köprüleri tarafından arttırılmaktadır. Fosfat gurubu tarafından kurulan bu tuz köprüleri, enzimin NADH yerine NADPH'ı tercih etme sebebini de ortaya koymaktadır (El-kabbani *et al.* 1998).

Normal koşullar altında, glikolitik yolda glukoz molekülü, glukoz için yüksek afiniteye sahip olan heksokinaz enzimi tarafından fosforillenerek glukoz 6-fosfata (G6-P) metabolize edilmektedir. Bu koşullarda AR enziminin glukoz için afinitesi çok düşük

olduğundan, fosforilize olmamış glukozun yaklaşık %3'ü poliyol yolağına katılarak sorbitole ve fruktoza metabolize olmaktadır. Oluşan sorbitol böbreklerde osmotik regülasyonu, fruktoz ise seminal vezikülerde sperm hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamaktadır (Yabe-Nishimura 1998; Balasubramanyam *et al.* 2002; Kumar and Reddy 2007).

Hers tarafından 1956 yılında, sperm hücreleri için enerji kaynağı olan fruktozun seminal kesede poliol yolu ile glukozdan dönüşümü gösterilmiştir (Hers 1956). Glisemik olmayan durumda aldoz redüktaz enziminin poliol yolundaki rolü tam olarak bilinmemesine karşın, fare testisinde yüksek miktarda aldoz redüktaz mRNA'sı tespit edilmiş olup testis metabolizmasında enerji kaynağı üretiminde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Gui *et al.* 1995).

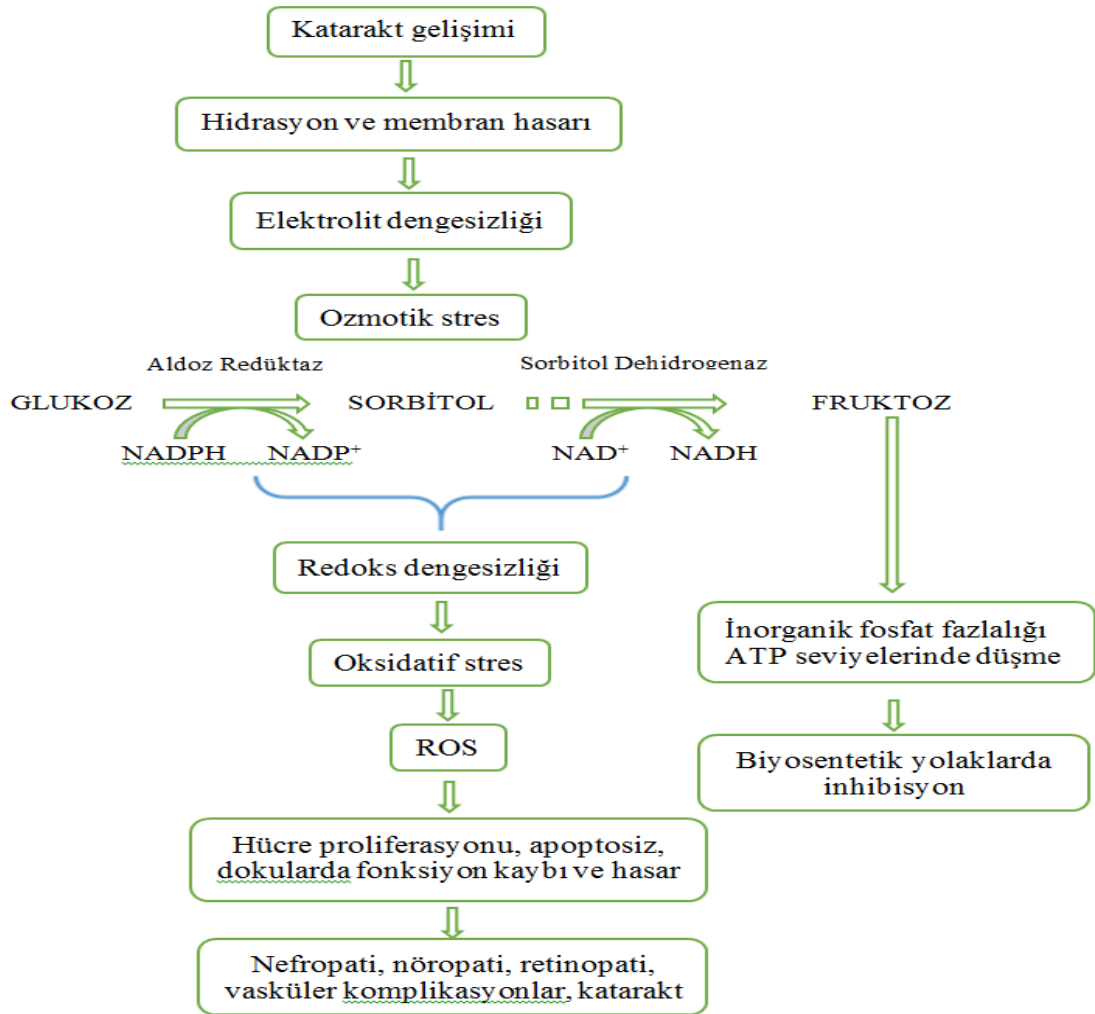
Aldoz redüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla glukozun, sorbitole ve sonra da sorbitol dehidrogenaz enzimi aracılığı ile fruktoza hızlı dönüşmesiyle GSH düzeylerinin düşmesine, oksijen radikalleri ($O^{2\cdot}$) oluşumunun artmasına, (Kashiwagi *et al.* 1994) lipit aldehit ve reaktif karbonil oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan da AR, reaktif karbonilleri ve lipit aldehitlerini detoksifiye ederek oksidatif stresi azaltmaktadır (Dunlop 2000).

Normalde aldoz redüktaz enziminin işlevi toksik aldehidleri inaktif alkollere indirgemektir. Hücrelerde glukoz konsantrasyonu yükseldiğinde yani hiperglisemi durumunda aldoz redüktaz enzimi glukozun sorbitole dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Daha sonra sorbitol, SDH enziminin katalizlediği reaksiyonla fruktoza yükseltgenir. Glukozun sorbitole indirgenmesi reaksiyonunda Aldoz redüktaz enzimi NADPH tüketir. NADPH tüketiminin artmasıyla glutatyon redüktaz enziminin aktivitesini azalmakta ve bunun sonucu olarak poliyol yolunun intraselüler oksidatif strese karşı duyarlılığı artmaktadır (Petrash 2004; Brownlee 2005).

Poliol yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz enziminin konsantrasyonu böbrek medullası, retina ve siyatik sinirler gibi dokularda daha

yüksektir. Uzun süre devam eden yüksek hiperglisemi durumunda, böbrek medullası, retina ve siyatik sinirler gibi dokuların mikrovasküler damarları etkilenerek bu dokuların fonksiyonel ve yapısal özelliklerinde farklılaşmalar meydana gelmekte (Riihimaa 2002) ve bunun sonucunda diyabetik nefropati, diyabetik retinopati, katarakt ve diyabetik nöropati oluşumu gerçekleşmektedir (Tanimoto *et al.* 1998).

Bir çok diyabetik komplikasyon, aldoz redüktaz enziminin aktivite artışı ile ilgilidir. (Sekil 1.4). Hiperglisemi sebebiyle polioll yolağının artan aktivitesiyle bazı dokularda önemli oranlarda sorbitol ve fruktoz birikimi oluşmaktadır (Lou and Kinoshita 1967; Soulis-Liparota *et al.* 1995).



Şekil 1.7. Polioll yolağının diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi (Srivastava *et al.* 2005)

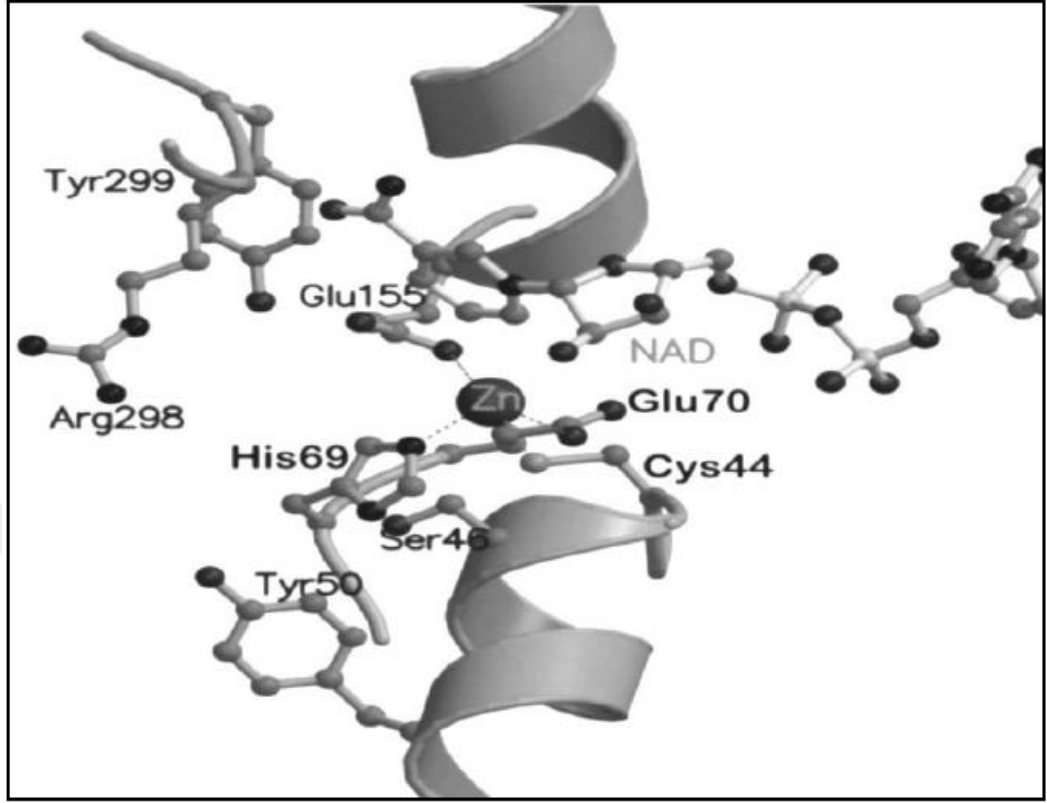
Doku	AR miktarı (µg/mg protein)
Böbrek (medulla)	29,3
Siyatik sinirler	5,1
Lens	2,8
Testis	1,9
Kalp	1,7
Kornea	1,4
Karaciğer	0,8
Böbrek (korteks)	0,7
Mide	0,7
Dalak	0,7
Akciğer	0,5
İnce bağırsak	0,4
Kolon	0,4

Pek çok kanser hücresinde aldoz redüktaz enziminin fazla miktarda eksprese olduğu belirtilmiştir (Kang *et al.* 2005). Kolon kanserinin tipik özelliklerinden biri olan iCOX-2 enziminin aşırı ekspresyonudur. iCOX-2 enzimi kolon epitel hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını sağlayan prostaglandinlerin, araşidonik asitten sentezini gerçekleştirmektedir. Kolon epitel hücrelerinde, COX-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesi çeşitli büyüme faktörleri (TGF, IGF, VEGF, FGF) ve sitokinler (TNF- α) tarafından sağlanmaktadır. Bununla beraber, büyüme faktörleri ve sitokinler aldoz redüktaz enziminin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Tammali *et al.* 2006). TNF- α gibi sitokinler de kolon kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Aldoza redüktaz inhibisyonu, TNF- α uyarımlı PKC ve NF-kappaB'nin aktivasyonunu engellemektedir ve böylece COX-2 enzimi eksprese olamamaktadır. Bu durum AR enziminin, NF-kappaB'nin aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Tammali *et al.* 2006; Tammali *et al.* 2007).

1.4. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi

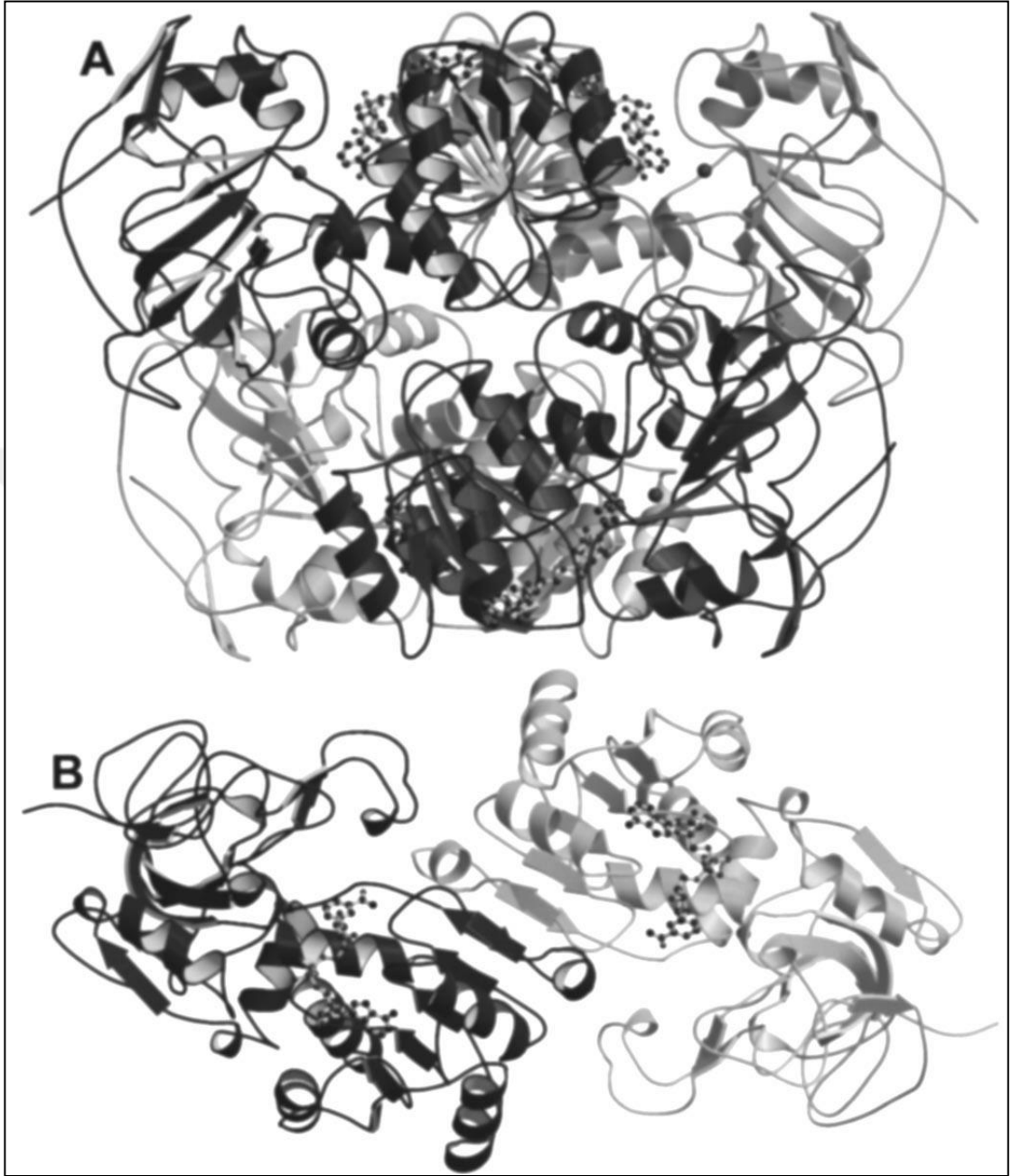
Sistemik adı L-İditol olan sorbitol dehidrogenaz (SDH) (L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) enzimi koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'i kullanarak alkol ürünü olan ve hidrofilik özellik taşıyan sorbitolün fruktoza oksidasyon reaksiyonunu katalizler (Lindstad *et al.* 1994). Sorbitol dehidrogenaz enzimi dehidrogenaz/redüktaz protein ailesinin üyesi olan bir metaloenzimdir (Jeffery *et al.* 1984; Jörnvall *et al.* 1984).

Homotetramer yapıya sahip olan ve her alt birimde çinko atomu bulunduran insan SDH enziminin bütün alt birimleri katalitik aktiviteye sahiptir. Enzimin katalitik bölgesinde bir su molekülü ve His69, Cys44, Glu70 ile koordine olan bir çinko atomu yer almaktadır (Pauly *et al.* 2003). Sorbitol dehidrogenaz enziminin katalitik bölgesinde yer alan çinko atomunun görevi, sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü yükseltgenme-indirgenme reaksiyonunun katalizi boyunca sorbitol hidroksilinin veya fruktoz karbonilinin oksijenini bağlamaktır (Jeffery *et al.* 1984; Eklund *et al.* 1985; Karlsson *et al.* 1989, 1995). Katalitik bölgede yer alan çinko atomunun koordinasyonun geometrisi oktahedraldir (Johansson *et al.* 2001). Homotetramer olan SDH enziminin alt birimleri 355 rezidüden oluşmakta ve (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989) her alt birim koenzim bağlama bölgesi ve çinko atomunun bulunduğu katalitik bölge olmak üzere iki farklı bölgeye sahiptir (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989; Johansson *et al.* 2001).



Şekil 1.8. Sorbitol dehidrogenaz enziminin aktif bölgesindeki çinko iyonunun koordinasyonu (Johansson *et al.* 2001)

Poliol yolunun ilk basamağını katalizleyen aldoz redüktaz enzimi glukozun sorbitole dönüşümünü NADPH'a bağımlı olarak gerçekleştirir. Bu yolu kofaktör olarak NAD^{+} 'ı kullanan sorbitol dehidrogenaz enzimi sorbitolün fruktoza oksidasyonu reaksiyonunu katalizleyerek tamamlar ve poliol yolağında SDH enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşturulan fruktoz, *in vitro* ortamda fosfokinaz aracılığı ile fruktoz 3-fosfata dönüştürülmekte ve bu molekülün hidroliziyle yeniden 3-deoksiglukoz (3-DG) oluşmasına neden olmaktadır. 3-deoksiglukoz ise AGE oluşumunda merkezi bir öncü olup hücrel hasara sebep olmaktadır (Szwergold *et al.* 1990; Brownlee 1992; Hamada *et al.* 1996; Yan *et al.* 2003).



Şekil 1.9. (A) Sıçan Sorbital dehidrogenaz enziminin kuarterner yapısı (Johansson *et al.* 2001), (B) Enzimin dimer yapısı (Johansson *et al.* 2001)

AR enzimi aromatik ve alifatik aldehitleri substrat olarak kullanır. Enzimin hücre içi temel substratı glukoz ve galaktozdur (Vander Jagt *et al.* 1995). Enzim glukozu substrat olarak kullandığında sorbitol, galaktozu kullandığında ise galaktitol oluşur. Fakat, oluşan galaktitol, SDH enzimi için iyi bir substrat değildir (Kinoshita *et al.* 1963). Bu

sebeple, hiperglisemi durumunda galaktitol, sorbitolden daha hızlı birikir (Jedziniak *et al.* 1973).

Glukozun aldoz redüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sorbitole indirgenmesi sırasında proton vericisi olarak NADPH kullanılması NADPH/NADP⁺ oranında azalmaya neden olmaktadır (Morrisey vd. 1999). Glutasyon redüktaz (GR) enzimi antioksidan savunma sisteminde görevli olan glutasyonu (GSH) indirgerken NADPH'e ihtiyaç duymaktadır. Polioliol yolunda da NADPH'in kullanılması, GR enzimin aktivitesinde düşüşe ve hücrede oksidatif stresin artmasına sebep olmaktadır (Bravi *et al.* 1997; Yabe-Nishimura 1998).

Aldoz redüktaz enzimi yüksek derecede eksprese edilmiş transgenik farelerde, redükte glutasyon miktarının düştüğü belirtilmiş olup, polioliol yolunun antioksidan savunma sistemine olan zararları bu mekanizma ile açıklanmaktadır (Giugliano *et al.* 1996; Nishimura 1998; Nishikawa *et al.* 2000). Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin artmasıyla oluşan NADH, NADH-oksidadaz (Nox) enziminin katalizlediği reaksiyonla serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşmasına sebep olmaktadır (Tsfamariam 1994; Morre *et al.* 2000). Serbest oksijen radikalleri, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enziminin inhibe olmasına, AR enzim aktivitesi artışına ve polioliol yoluna daha çok glukozun girişine sebep olmaktadır (Stevens *et al.* 2000).

İlk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılan ve hemen hemen birçok dokuda bulunan SDH enziminin en fazla olduğu doku karaciğer olup enzim çalışmalarında kaynak olarak kullanılmaktadır (Brakley 1951; Hoshi *et al.* 1996), (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Sıçan dokularındaki Sorbitol dehidrogenaz miktarı (Hoshi *et al.* 1996)

Doku	SDH miktarı (ünite/mg protein)
Karaciğer	13,9±3,9
Böbrek	12,1±1,4
Testis	3,1±0,6
İskelet kası	0,6±0,3
Mide	4,8±1,5
Akciğer	5,0±4,2
Beyin	3,5±1,5
Dalak	0,7±0,2

SDH enzimi karaciğer için kısmen spesifik bir enzim olup hepatosit sitoplazmasında bulunmaktadır (Turgut 1997). Sağlıklı bireylerde serumda bulunmayan SDH enzimi karaciğer harabiyeti halinde hastalıklı bireylerde seruma geçerek yüksek aktiviteye sahip olmaktadır. Bundan dolayı karaciğer hastalıklarının teşhisinde, serum SDH enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklikler faydalı olmaktadır (Dixon *et al.* 1987).

Diyabetli hastalarda glukozun hücre içi konsantrasyonunun fizyolojik seviyenin üzerine çıkmasıyla AR enzimi aktif hale geçmekte, aldoz redüktaz enziminin aktivitesine bağlı olarak sorbitolün hücre içi konsantrasyonu artmakta bu durum elektrolit dengesizliğe ve osmotik strese sebebiyet vermektedir. Sorbitolün hücre içi konsantrasyonundaki bu artışın sebepleri AR enziminin SDH enzimine göre aktivitesinin daha yüksek olması, yani SDH'ın glukozun şeker alkolü olan sorbitolü fruktoza dönüştürme hızının düşük olması, sorbitolün metabolik olarak kullanılmaması ve sorbitolün polaritesinden dolayı difüzyonunun çok yavaş olmasıdır. Difüzyonu çok yavaş olan sorbitol hücre membranı dışına kolaylıkla çıkamaz dokularda birikir. Osmotik strese sebep olan sorbitol fazla miktarda suyun hücre içinde çekilmesine ve böylece hücre ödemine sebep olur. Sorbitolün kendisi bir doku toksini gibi hareket eder ve bu nedenle retinopati, nöropati, nefropati ve kalp hastalığına yol açar (Karasu vd 1990; Bukan vd 2004, Demopoulos *et al.* 2005; Srivastava *et al.* 2005).

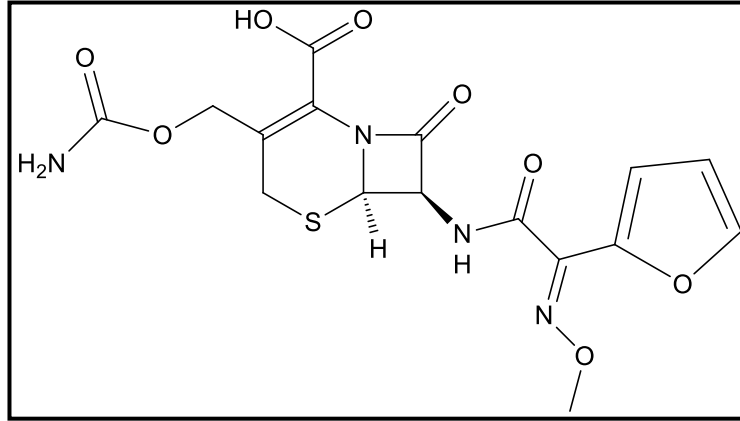
Sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi enzimin aktif bölgesinde yer alan -SH grubu sebebiyle alkilleyici maddeler ve ağır metal iyonları tarafından geçici veya kalıcı olarak etkilenebilir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko (Zn) iyonu sebebiyle metal şelatlayıcı özelliğe sahip EDTA, eriokrom siyahı T, fenantrolinler gibi maddeler inhibisyona uğratırlar. Bu maddelerin inhibisyonu enzimin aktivitesinde kalıcı aktivite kaybına sebep olur. Ditiyotreitol ve 1-tiyosorbitol gibi alkaloidler enzimin substrat veya kofaktör bölgelerine bağlanarak enzimi tersinir olarak inhibe ederler (Kvernmo *et al.* 1996; Lindstad and McKinley-McKee 1996)

1.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar

Keçi böbreği aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerine etkileri incelenen ilaçlarının özellikleri şöyledir:

1.5.1. Sefuroksim

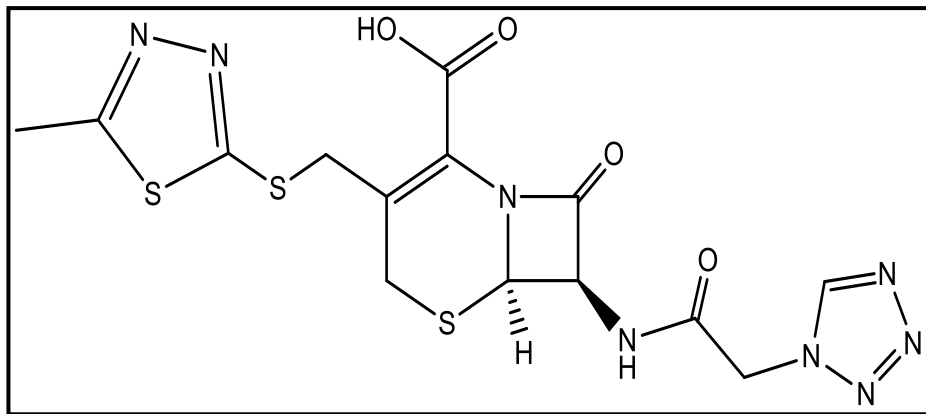
Sefalosporin sınıfından olan sefuroksim ikinci kuşak antibiyotiktir. Sefalosporinler antibakteriyal etki mekanizmaları ve kimyasal yapı bakımından penisilinlere benzerler. Bu antibiyotik sınıfının ana çekirdeğini sefem türevi olan 7-aminosefalosporanik asid oluşturur. Sefuroksim, Neisseria'lara karşı (beta-laktamaz salgılayanlar dahil) ve H.influenzae'ye karşı (ampisilin'e rezistan olanlar dahil) güçlü etki gösterir. Sefuroksimin antistafilokokal etkinliği sefalotininkinden daha zayıf olup antipnökokal etkinliği sefalotininkinden fazladır. Plazma proteinlerine az bağlandığı bilinmektedir (%33) (Kayaalp 2002).



Şekil 1.10. Sefuroksim'in molekül yapısı

1.5.2. Sefazolin

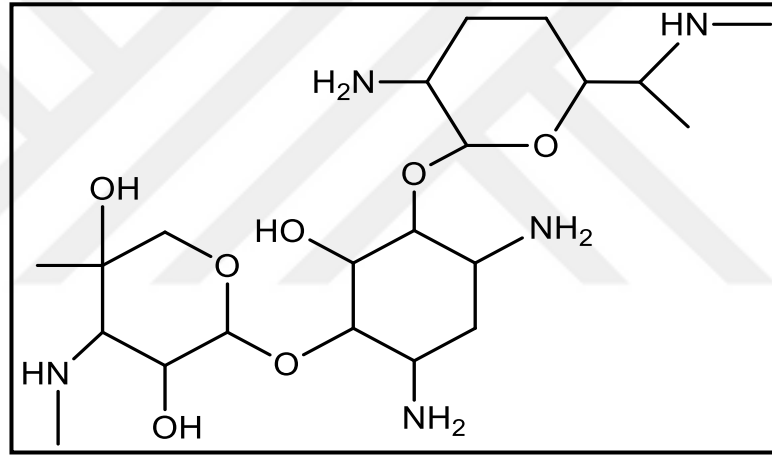
Plazma proteinlerine en fazla bağlanan sefalosporin olan sefazolin, birinci kuşak antibiyotik olup böbreklerden glomerüler filtrasyonla atılması sebebiyle parenteral olarak kullanılan birinci kuşak ilaçlar arasında eliminasyon yarılanma ömrü en fazla olanıdır (yaklaşık 1,5 saat). Bu sebeple cerrahideki profilaktik uygulamalarda diğer sefalosporinlere göre daha fazla tercih edilir. Sefazolin, sefalotine oranla stafilokokal beta-laktamaza daha fazla duyarlı olduğu belirtilmiştir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.11. Sefazolin'in molekül yapısı

1.5.3. Gentamisin

Aminoglozid sınıfından olan gentamisin *Micromonospora purpurea*'dan elde edilir. Aminoglikozid sınıfından olan antibiyotikler içerisinde, spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olan antibiyotik amikasin'den sonra, gentamisin olup, bu antibiyotik; streptomisin, kanamisin ve amikasin'den çok daha güçlüdür. Bakterisid etki yapan gentamisin özellikle Enterobacteriaceae grubu bakteriler ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif basiller, penisilin ve metisiline dayanıklı *Staph aureus* suşları üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Kayaalp 2002).



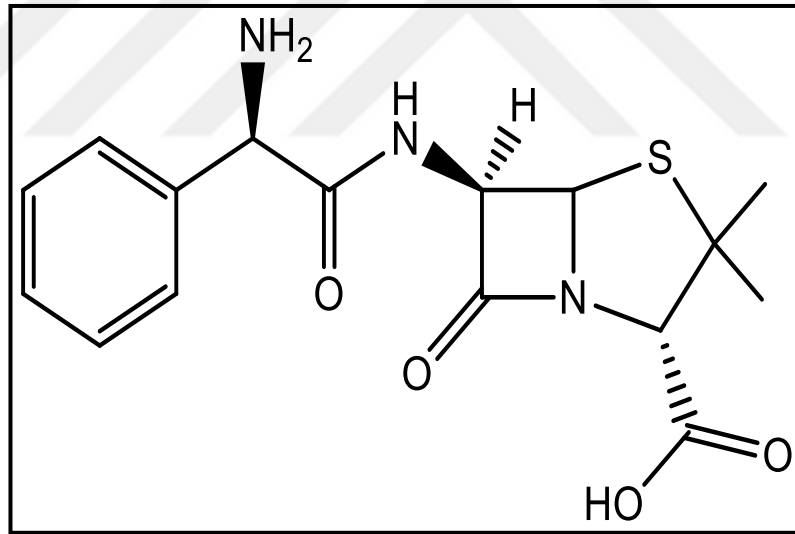
Şekil 1.12. Gentamisin'in molekül yapısı

1.5.4. Amikasin

Aminoglikozidler sınıfında yer alan ve semisentetik yöntemlerle elde edilen ilk türevidir. Semisentetik olan amikasin doğal bir antibiyotik olan kanamisin A'dan elde edilir. Yapısıyla ilgili bu özelliğinden dolayı; doğal aminoglikozidlerden olan gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi antibiyotikleri inaktif hale getiren bakteriyel enzimlere karşı dayanıklı olması sebebiyle en geniş spektrumlu aminoglikozittir (Kayaalp 2002).

1.5.6. Ampisilin

Penisilinler, güçlü bakterisid etkileri yanında toksiteleri nisbeten düşük olan ve sık kullanılan doğal ve yarı sentetik antibiyotiklerdir. Ampisilin penisilin sınıfından olup geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Ampisilin'in etki gücü pnömokoklara, neisserialara, grup A streptokoklara ve clostridiumlara karşı *in vitro* penisilin G'ye göre biraz daha düşük olup enterokoklara, viridans grubu streptokoklara ve *Listeria monocytogenes*'e karşı penisilin G'den biraz daha etkilidir. Gram-negatif bakterilerinden; E.coli, *Haemophilus influenzae*, Salmonella ve Shigella, gibi basillerin suşlarından beta laktamaz sentezlemeyenlere karşı ampisilin bakterisid etki gösterir. Ülkemizde izole edilen E.coli suşlarından yaklaşık %60-80'nin ampisilin'e dirençli olduğu belirtilmiştir (Kayaalp 2002).

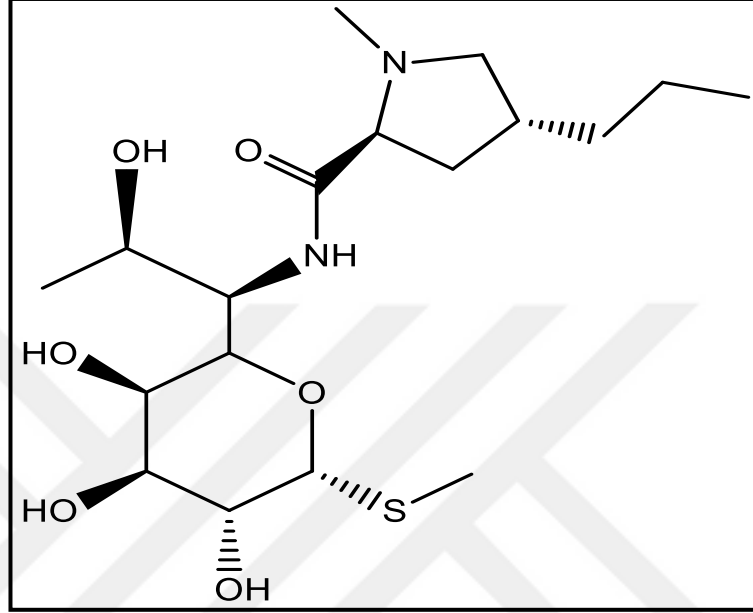


Şekil 1.15. Ampisilin'in molekül yapısı

1.5.7. Linkomisin

Linkozamidler sınıfında yer alan linkomisin dar spektrumlu doğal antibiyotiktir. Linkomisin; süstitüe edilmiş prolin amino asidi ile kükürtlü amino-oktoz molekülünün

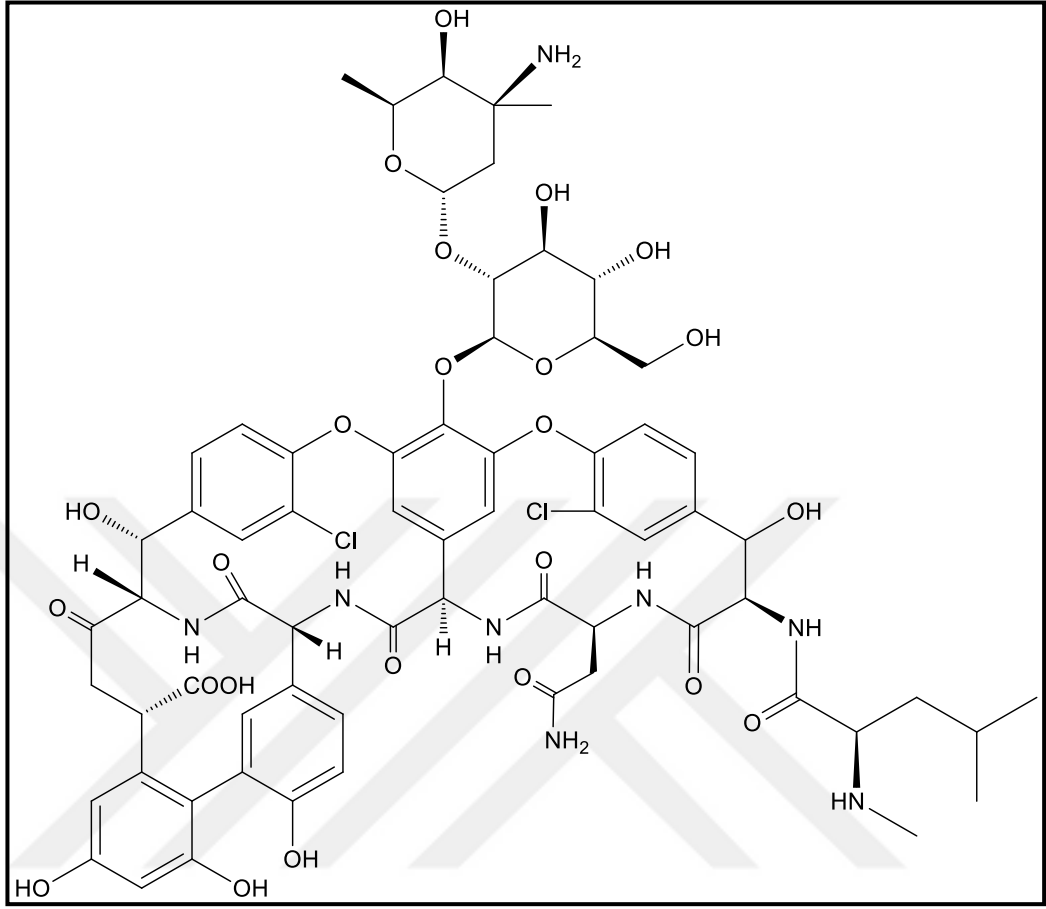
oluşturduğu, tıbbi kullanıma ilk giren linkozamiddir. Linkomisin yetersiz derecede BOS'a girebilir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.16. Linkomisin'in molekül yapısı

1.5.8. Vankomisin

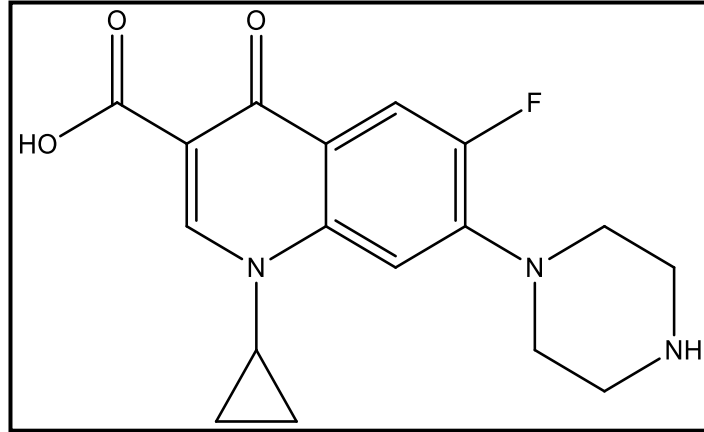
Yapıca diğer antibiyotiklerin hiçbirine benzemez. Etki mekanizması penisilinlere göre farklıdır. Bakteride peptidoglikan zincirinin devamını kırar. Vankomisin, *Streptomyces orientalis*'den elde edilen kompleks bir glikopeptiddir. Suda çözünebilen stabil bir bileşiktir. Antibakteriyel spektrumunu dardır. Esas olarak gram (+) kokları ve clostridiumlar üzerinde etkilidir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.17. Vankomisin'in molekül yapısı

1.5.9. Siprofloksasin

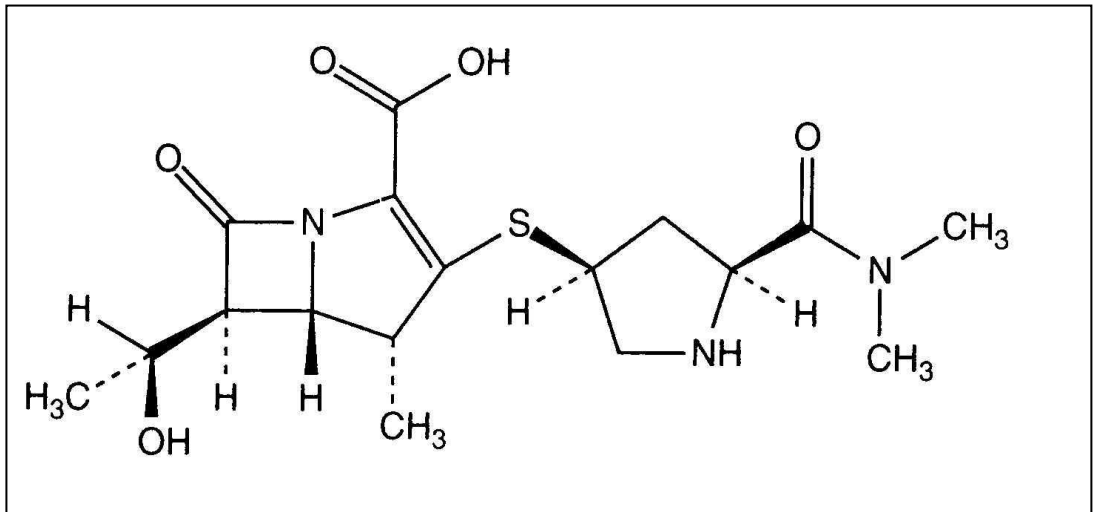
Florokinolon sınıfından ilk kuşak antibiyotiktir. Sistemik enfeksiyonlara karşı çok sık kullanılan antibiyotiklerden biri olup pekçok patojen gram (+) bakteriler ve gram (-) bakteriler üzerinde etkilidir. Antibiyotiğin üzerinde bulunan 6 numaralı karbona bağlı flor gram (+) bakterilerine karşı, 8 numaralı karbona bağlı piperazin halkası ise gram (-) bakterilerine karşı etkinliği artırır. *Siprofloksasin salmonella*, *E-coli*, *klebsiella*, *shigella* gibi bakteri türlerine karşı oldukça etkilidir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.18. Siprofloksasin'in molekül yapısı

1.5.10. Meropenem

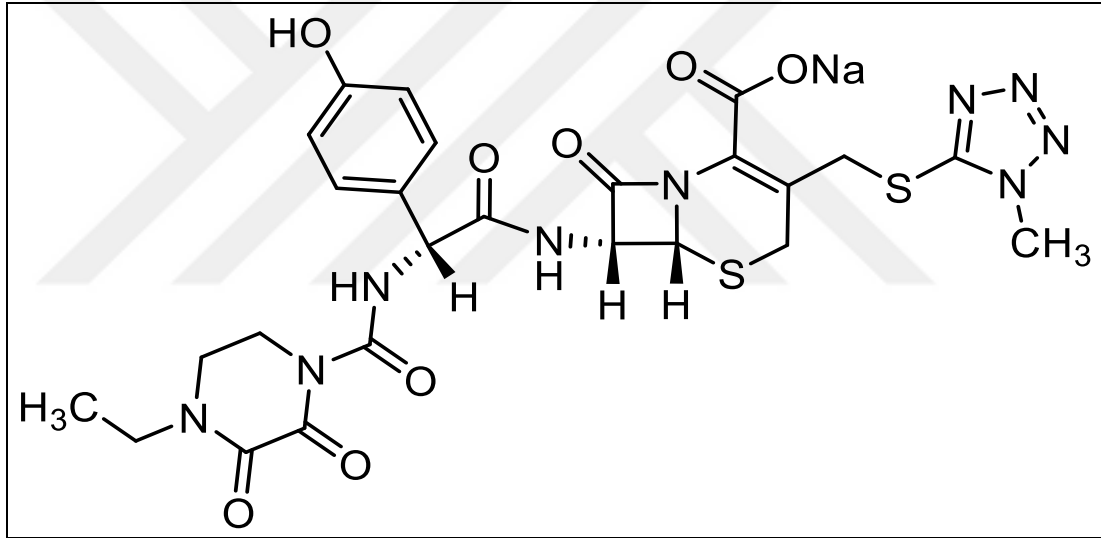
Meropenem bir β -laktam olup karbapenem alt sınıfındandır. Penisilin ve sefalosporinlere rezistan bakteri türlerinin çoğuna karşı etkilidir. Meropenem çok geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer β -laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eder.



Şekil 1.19. Meropenem'in molekül yapısı

1.5.11. Sefoperazon

Sefalosporin sınıfından olan Sefoperazon üçüncü kuşak antibiyotik olup geniş spektrumludur. Sefalosporinler antibakteriyal etki mekanizmaları ve kimyasal yapı bakımından penisilinlere benzerler. Bu antibiyotik sınıfının ana çekirdeğini sefam türevi olan 7-aminosefalosporanik asid oluşturur. Sefalosporin sınıfında 1.kuşaktan 3.kuşağa, gram (+) etkinliği azalırken, gram (-) etkinliği artar. β -laktamazlara karşı daha dayanıklı olan Sefoperazon, *Pseudo monas aeruginosa* karşı etkinliği en yüksek iki sefalosporinden biridir. Enterobakterlere karşı da etkinliği yüksektir.



Şekil 1.20. Sefoperazon Sodyum'un molekül yapısı

1.5.12. Rifamisin

Rifamisin semisentetik bir antibiyotiktir. Özellikle *Staph.aureus*, *Staph.epidermidis*, *Strep.viridans* ve *Mycobacterium tuberculosis* üzerinde çok küçük dozlarda bile etkilidir. *Strep.pyogenes* ve *Strep.faecalis*'in pek çok suşları ise rifamisinin yüksek konsantrasyonuna karşı hassastır. Gram negatif bakteriler genellikle rifamisin SV'nin 10 mcg/ml'nin altındaki konsantrasyonlarına karşı hassas değildir. Rifamisin hassas

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hücreler, enerjilerinin büyük bir kısmını glukozdan sağlarlar. Glukozun hücreye girişi farklı yollarla olmaktadır. Pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonu, glukozun hücreye girişinde en önemli etmendir. Bu hormon, granüller halinde hücrelerde depolanır. İnsülin hormonunun kanda belirli düzeyde olması gerekir, insülin glukozun kanda yükselmesiyle artar ve glukozun hücre içine girmesini sağlar. Sağlıklı bireylerde kan glukoz seviyesi uzun süre yüksek olabilir, fakat hiçbir zaman 140 mg/dL üstüne çıkmaz. İnsülin hormonunun fonksiyonel yetmezliği sonucu oluşan diyabetin sebep olduğu komplikasyonlar bireylerde organ ve işlev kayıplarına sebep olarak bireylerin yaşam sürelerini ve yaşam kalitelerini düşüren ve sürekli tedavi ve kontrol isteyen bir hastalıktır (Yılmaz *et al.* 2000).

Diyabetin tarihçesi çok eskilere dayanmakta olup milattan önce 1500'lerde Mısır Ebers Papiruslarında çok fazla idrara çıkan ve yapılan idrarla şeker kaybeden hastalar için tanımlanmış bir hastalıktır. Aretheaus, M.S. 2.yüzyılda hastalığa diyabet ismini vermiş, Willis ise bu hastaların idrarlarının tatlı olması sebebiyle bal anlamına gelen Mellitus dan dolayı 'Diabetes Mellitus' ismini vermiştir (Frystyk *et al.* 2005). Chevreul ise 1915 de idrarın tatlı olmasının sebebinin idrarda bulunan 'Glukoz' un varlığından kaynaklandığını açıklamıştır. Claude-Bernard 19. yüzyılda glukozun karaciğerde glikojen olarak depo edildiğini belirtti. Paul Langerhans 1869'da pankreas adacık hücrelerinin varlığını belirtti (Kılınç 2015).

İnsülin hormonunun biyosentezi preproinsülin ve proinsülinin ardışık olmak üzere parçalanarak sonunda aktif hormon ve C-peptid oluşması aşamalarını içerir. İnsülin sitozoldeki granüllerde toplanır ve uygun uyarı ile ekzositozla salınır. Proinsülin, organizma türüne göre 81 ila 86 aminoasitten meydana gelen tek bir polipeptid zincirinden oluşur. İnsülin hormonu 51 aminoasitten ve birbirine disülfid bağıyla bağlı Ave B olmak üzere iki polipeptid zincirinden meydana gelir. İnsülin hormonu karaciğerde ve daha az miktarda böbreklerde bulunan insülinaz enzimi aracılığı ile

yıkılır. Bu hormonun plazma ömrü yaklaşık olarak 6 dakikadır (Champe and Harvey 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Oskar Minkowski ise 1889 yılında yapmış olduğu deneylerle diyabetten sorumlu olan organın pankreas olduğunu belirtti. Banting ve Best 1921 yılında insülin hormonunu buldular ve 1922 yılında Leonard Thompson adında diyabetli bir hastanın tedavisinde kullandılar. Oral antidiyabetik ilaçlar 1955’de kullanılmaya başlandı. 1960 ve 1970’lerde yüksek oranda saflaştırılmış ve antikör oluşturmeyen insülin tipleri geliştirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisiyle insülin üretimine 1980’li yıllarda başlanmıştır (Galloway 1994, Hatemi 1996; Erdoğan 1993).

Diyabet, insülin hormonunun yokluğu, eksikliği veya etkisizliği sonucu oluşan, hiperglisemiyle karakterize multisistemik kronik bir metabolizma sendromudur (Abacı *et al.* 2007; Anonymous 2013; Kılınç 2015). Diyabet hastalarında hiperglisemi gibi durumlarda büyük rol oynadığı varsayılan polioll yolunun, glukoz metabolizmasının küçük bir yolu olduğu belirtilmektedir. Bu yol için sorbitol dehidrogenaz ve aldoz reduktaz enzimleri gerekmektedir. Polioll yolunda AR ve SDH enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla glukozun sorbitole redüksiyonu ve sorbitolünde fruktoza oksidasyonu gerçekleşmektedir (Gabray 1973; Wyngaarden and Smith 1988).

Diyabet teşhisi kan glukoz düzeyine göre yapılır. Aşağıdaki kriterlerden herhangi birinin varlığında hasta diyabetli kabul edilmektedir (Anonymous 2011).

Teşhis kriterleri:

- I. Açlık kan glukoz seviyesi >126mg/dl.
- II. Çok fazla su tüketimi, çok idrara çıkma ve açıklanamayan kilo kayıpları gibi semptomları olan kişilerde rastgele bakılan venöz kan glukoz seviyesi >200mg/dl
- III. 75 gram oral glukoz tolerans testinde 2. saat kan glukoz seviyesi >200mg/dl
- IV. HbA1c düzeylerinin >6,5

Glukozun şeker alkolü olan sorbitol şekerli tatlandırıcı yapımında kullanılmaktadır. Ağız yolu ile alınan sorbitol barsakta bakterilerin fermentasyonu sonucunda asetat ve H₂ ürünleri oluşur ve bu ürünler karın ağrısına sebep olabilmektedir. Sorbitol damar yolundan verildiğinde ise fruktoza dönüşmektedir (Muray *et al.* 1988).

Kronik hiperglisemi, pankreasın beta hücrelerinin %90'dan fazlasının harap olması sonucu meydana gelir. Pankreasın beta hücrelerinde gerçekleşen bu harabiyet sonucu, tip 1 diyabetli bireylerde insülin hormonu sekresyonu ya yetersizdir ya da yoktur. Bunun sonucunda serum glukoz normalden daha yüksek olacaktır (İliçin *et al.* 2003) Genetik, çevresel ve otoimmün faktörler hastalığı tetikleyerek insülin salgılayan pankreasın beta adacık hücrelerine otoimmün saldırı başlatmaktadır ve tip 1 diyabet, 5-10 yıllık bir sürecin sonucunda ortaya çıkmaktadır (Haller *et al.* 2005). 'İnsüline Bağımlı Diyabet' olarak bilinen Tip 1 diyabette, hastalar yaşamlarını devam ettirebilmek için insülin tedavisine ihtiyaç duymaktadırlar.

İnsülin direncinin değişmesiyle, insüline bağımlı veya insülin eksikliği olan periferik dokularda tip 2 diyabet gelişir (Patricia *et al.* 2003). Tip 2 diyabetlilerde meydana gelen komplikasyonların en önemli sebebi insülin direncidir, (Gilligan and Spector, 1984). İnsülin hormonunun görevi kandaki glukozun enerji üretiminde kullanılması için kas dokusuna ve glikojen şeklinde depolanması içinde yağ dokusuna taşınmasını sağlamak ve karaciğerdeki glukoneogenezi ve glikojen yıkımını (glikojenoliz) baskılayarak hepatic glukoz oluşumunu engellemektir (Donkin *et al.* 1997).

İnsüline cevap verme yeteneğinin azalmasıyla kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda insülin aracılı glukoz tüketimi düşmekte ve karaciğerdeki glukoz supresyonu bozulmaktadır. Bundan dolayı pankreas beta hücreleri dengeyi sağlamak için normalden 1,5-2 kat daha çok insülin hormonu üretmekte bu da zamanla pankreas beta hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmelerine sebep olmaktadır. Sonuç olarak insülin hormonunun sentezi azalmakta ve tip 2 diyabet oluşmaktadır (Ferrannini *et al.* 1987; Hollenbeck and Reaven 1987).

Diyabetin sebep olduğu göz, deri, vasküler ve böbrek komplikasyonları ile yaşam kalitesi düşürerek, bireylerde fiziksel değişikliklerin yanısıra ruhsal ve sosyal sorunların oluşumuna neden olur (Choi *et al.* 2003). Bu sebeple Tip I ve Tip II diyabetiklerde glukoz seviyesini normal düzeyde tutabilmek için sürekli olarak çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Artan diyabet süresi, komplikasyonların çeşitliliğini ve görülme sıklığını artırır. Bundan dolayı diyabetin erken tanı ve tedavisi çok önemlidir (Choi *et al.* 2003).

Glukoz girişı için karaciğer, böbrek, beyin, lens, retina, sinirler, pankreas adacıkları, aort, eritrosit, kapiller damar hücrelerinde insülin hormonuna gerek olmadığından dolayı, diabete bağlı hiperglisemi durumunda çok fazla oranda glukoz bu hücelere girebilir. Glukoz konsantrasyonundaki artış ve yeterli miktardaki NADPH varlığında, aldoz redüktaz enzimi fazla miktarda sorbitol sentezine sebep olur. AR enzimi tarafından sentezlenen sorbitol, membranları kolayca geçemeyeceği için hücre içerisinde birikir. SDH enziminin olmadığı veya çok az olduğu böbrek, retina ve sinir hücrelerinde sorbitol artışı oldukça fazladır. Bunun sonucunda hücelerde sorbitol birikimi gerçekleşir ve biriken bu sorbitol, hücrelerin su çekip şişmesine, osmotik strese sebep olur. Bu da redoks dengesinin bozulmasına ve bu bozulma da proteinlerin çözünürlükleri etkileyerek membran direncinin zarar görmesine sebep olur. Katarakt oluşumu osmotik stres sonucu lenste membran yapısının bozulmasından kaynaklanmaktadır. Diyabet hastalarında görülen, nöropati, nefropati ve retinopatiye sebep olan damarsal sorunlar buna bağlanabilir (Kinoshita 1965; Kinoshita 1974; Varma *et al.* 1977; Brownlec *et al.* 1984; Tornlinson 1989; Champe and Harvey 1997; Lee and Chung 1999).

Diyabetin sebep olduğu komplikasyonlar; akut ve kronik olmak üzere iki sınıfa ayrılır ve bu komplikasyonlar hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir. Akut komplikasyonlar; laktik asidoz, ketoasidoz, hipoglisemi, koma ve nonketotik hiperosmolar komasından oluşur. Kronik komplikasyonlar; makrovasküler komplikasyonlar ve mikrovasküler komplikasyonlardır. Kardiyovasküler hastalıklar, periferik arter hastalıklar ve serebrovasküler hastalıklar makrovasküler komplikasyonlar

arasında yer almaktadır. Nefropati, diyabetik, nöropati ve retinopati ise mikrovasküler komplikasyonlar arasında yer almaktadır (Fishbein and Palumbo 1995; Wiernsperger and Bouskela 2003; Cheung *et al.* 2007; Juutilainen *et al.* 2007).

Diabetik bireylerde hiperglisemi poliol yolağı, ileri glikasyon ürünleri (AGE), glukoz oksidasyonu, nonenzimatik glikasyon ve PKC aktivasyonu gibi yolakların aktivitesini artırarak ve bu yolakların birbiriyle olan etkileşmelerini değıştirerek makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların oluşumunda büyük bir risk faktörü olup vasküler komplikasyon oluşumuna sebep olmaktadır. (UKPDS Research Group 1998; Kurkschiev *et al.* 2000; Lipinski 2001; Brownlee 2001; Yamagishi and Takeuchi 2004; Jakus and Rietbrock 2004; Oates 2008).

Sağlıklı bireylerde kan glukoz miktarı belirli seviyede iken, aldoz redüktaz enziminin glukozu olan ilgisi düşüktür ve bundan dolayı enzim glukozu substrat olarak kullanmaz. Diyabetik hiperglisemi durumunda ise aldoz redüktaz enzimi uyarılarak; glukoz, aldoz redüktaz enzimi aracılığı ile sorbitole dönüştürülür ve sorbitol dehidrogenaz enzimi tarafından fruktoza dönüşür ve oluşan fruktoz enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. 1956 yılında sperm hücrelerinin fruktozu enerji kaynağı olarak kullandığı Hers tarafından belirtilmiştir (Hers 1956) Yabe ve Nishimura diyabetik komplikasyonların patogeneğinde aldoz redüktaz enziminin çok önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir (Yabe-Nishimura 1998).

Hers tarafından 1956 yılında sperm hücrelerinin enerji kaynağı olarak, poliol yolağında glukozun aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole redüksiyonu ve onu takip eden bir reaksiyonla sorbitol dehidrogenaz enziminin katalizlediğı bir reaksiyonla oluşan sorbitolün fruktoza oksidasyonunu seminal kesede göstermiştir (Hers 1956). Yine 1959 yılında Van Heyningen diyabetik sıçan lensinde de poliol yolağının varlığını belirtmiştir (Van Heyningen 1959). Aldoz redüktaz enzimi mRNA'sının fare testisinde yüksek miktarda olduğu tesbit edilmiştir (Gui *et al.* 1995).

Aldoz redüktaz enzimi polioll yolunun ilk enzimi olup alifatik ve aromatik aldehitleri substrat olarak kullanır. Enzimin hücre içi substratı glukoz ve galaktozdur (Vander Jagt *et al.* 1995). AR substrat olarak glukoz ve galaktozu kullandığında bunların şeker alkolleri olan sobitol ve galaktitol oluşur. Fakat galaktitol sorbitol dehidrogenaz için iyi bir substrat olmadığından hiperglisemi durumunda sorbitolden daha hızlı birikir (Kinoshita *et al.* 1963; Jedziniak *et al.* 1973).

Aldo-keto redüktaz süper ailesinin üyesi olup sitozolik bir enzim olan aldoz redüktaz enziminin detoksifikasyon sistemlerinde görevli olduğu düşünülmekte olup (Vander Jagt *et al.* 1995), bu enzim steroid metabolizmasında görevlidir (Warren *et al.* 1993). Aynı zamanda lipid peroksidasyonunda oluşan orta ve uzun zincirli aldehitlerin ve glutatyon konjugatlarının redüksiyonundan sorumludur. Enzim, glutatyon konjugatlarının indirgenmesini sağlayarak glutatyonlanmış aldehitlerin reaktivitesini azaltmakta ve sonuç olarak savunma sistemine katkı sağlamaktadır (Srivastava *et al.* 2005).

Nishimura ve arkadaşları Schwann hücrelerinde eksprese olan aldoz redüktazın farklı tür ve dokularda aynı yapısal ve kinetik özelliğe sahip olduğunu belirtmiştir (Nishimura *et al.* 1990). Aldoz redüktaz enziminin insan dokularından lens, plasenta ve kas dokusundan izole edilmiş (Bohren *et al.* 1989) ve farklı dokularda bulunan bu enzim beyin, iskelet kası, lens ve karaciğerde yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir (Flynn *et al.* 1975; Wermuth *et al.* 1977).

E.coli bakterisinin rekombinant aldoz redüktaz enzimi ile hücre kültürü veya doku aldoz redüktaz enziminin yapısal ve kinetik özelliklerinin aynı olduğu tespit edilmiştir (Nishimura *et al.* 1990; Petrash *et al.* 1992). İnsan ve sıçan aldoz redüktaz enziminin amino asit dizilişlerinde yüksek oranda benzerlik olduğu belirtilmiştir (Carper *et al.* 1987; Fabre *et al.* 1994). Aldoz redüktaz enziminin dağılımının insan ve sıçan böbreğinde benzer olduğunu gösterilmiştir (Terubayashi *et al.* 1989).

Çeşitli insan dokularından izole edilen aldoz redüktaz enziminin dokulardaki konsantrasyonunun en fazla böbrek medullasında, siyatik sinirlerde ve lensde olduğu belirtilmiştir. Enzim konsantrasyonlarının, diyabetin sebep olduğu komplikasyonların hedefindeki dokularda yüksek olması, aldoz redüktaz enziminin oluşan bu komplikasyonlardan sorumlu olduğunu göstermektedir (Tanimoto *et al.* 1998).

İnsülden bağımsız dokulardan; sinir, lens, retina, vasküler ve glomerüler hücreler olmak üzere birçok dokuda farklı oranlarda eksprese olan aldoz redüktaz enzimi aldehit metabolizmasında görev yapan bir enzimdir. Diyabetli bireylerde glukozun poliol yolunda aldoz redüktaz enzimi aracılığı redüksiyonu, diabete bağlı komplikasyonların gelişiminde önem arz etmektedir. Aldoz redüktaz enziminin ekspresyonunun özellikle retinal hücrelerde yüksek olması, aldoz redüktaz enziminin diabetik retinopati oluşumunda önemli roller üstlendiğini ve bu enzimin aktivitesi üzerinde sıklıkla çalışıldığı belirtilmiştir (Srivastava *et al.* 2005; Obrosova and Kador 2011).

Aldoz redüktaz enziminin artmasıyla sorbitolun fruktoza oksidasyonu ile artan NADH yalancı hipoksiye neden olur (Dunlop 2000). Bunun sonucunda NADH/NAD⁺ oranının artmasıyla gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimi inhibe olur ve bunun sonucunda gliseraldehit-3-P konsantrasyonu ve NADP miktarı artarak pentoz fosfat yolu aktive olur. Pentoz fosfat yolunun aktivasyonu ile AGE öncülü olan metilglioksal ve protein kinaz C'nin aktivatörü DAG oluşumunu arttıran trioz fosfat seviyesi de artmaktadır (Dunlop 2000; Garcia *et al.* 2001; Setter *et al.* 2003).

Aldoz redüktaz enziminin beyin, kalp, kan damarları ya da iskelet kası gibi dokularda aşırı ekspresyonu, ozmotik regülasyon ve glukoz metabolizmasının dışında; vasküler inflamasyon (Rittner *et al.* 1999), restenoz (damar genişletilmesi) (Ruef *et al.* 2000), miyokardial iskemi (Shinmura *et al.* 2000), kalp yetmezliği (Yang *et al.* 2000) ve aşırı demir yükselmesi (Barisani *et al.* 2000) gibi durumlarla da ilgili olabileceği düşünülmektedir (Ramana *et al.* 2002).

Aldoz redüktaz enzimi diyabetik komplikasyonlar başta olmak üzere değişik kanser türlerinde (Lee *et al.* 2001; Saraswat *et al.* 2006), renal hastalıklarda (Hasuike *et al.* 2002), ovaryum anormalliklerinde (Meyer *et al.* 1992) ve inflamasyonda (Yang *et al.* 1998; Miller *et al.* 2005) çok önemli görevler üstlenmiştir.

Van Heyningen, ilk kez 1959 yılında aldoz redüktaz enziminin diyabetik rat lenslerinde sorbitol ve galaktitol gibi poliollerin birikmesine ve bundan dolayı da ozmotik dengenin değişmesine sebep olduğunu belirtmiştir (Van Heyningen 1959). Buna dayanarak yapılan deneyler sonucunda, aldoz redüktaz enziminin farmakolojik inhibitörlerinin, diyabetik ratlar ve galaktoza uygulanan tavşanlarda katarakt oluşumunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Kinoshita *et al.* 1965; Varma *et al.* 1976).

Aldoz redüktaz enziminin inhibitörleri yapısal olmak üzere üç gruba ayrılır (Oka *et al.* 2000; Da Settimo *et al.* 2001; Kurono *et al.* 2001; Oka and Kato 2001) (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.1. Aldoz redüktaz enziminin inhibitörlerinin sınıflandırılması (Oka and Kato 2001)

Sınıflandırma	İnhibitör Madde	Kullanım Durumu
1) Asetik asit bileşikleri	Epalrestat	Japonya'da kullanılmakta
	Alrestatin	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
	Tolrestat	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
	Zenarestat	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
	Zopolrestat	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
	NZ-314	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
2) Spirohidantiyonlar	Sorbinal	Yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır
	Fidarestat	Japonya'daki satışları durdurulmuştur
3) Suksinamid	AS-3201 (Ranirestat)	ABD'de üçüncü faz denemelerindedir

Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesinde bulunan hidrofilik ve hidrofobik iki domain aracılığı ile inhibitör bağlanması gerçekleşmektedir.

1) Hidrofilik domain hidrojen bağı kurabilmek için kofaktörün yakınında yer almakta ve belli bir diziden oluşmaktadır.

2) Hidrofobik domain özgül cebi taşımaktadır (Urzhumtsev *et al.* 1997).

Enzimin anyonik bölgesinde Tyr48, His110 amino asitleri ve NADP bulunmaktadır (Harrison *et al.* 1994). Anyonik bağlanma bölgesi ile yan yana olan özgül cep Trp111, Phe122, Leu300 ve Ser302 amino asitlerinden oluşmaktadır (Zandt *et al.* 2009).

Bütün aldoz redüktaz inhibitörleri, fizyolojik pH'da negatif yüke sahiptir. İnhibitörler, enzimin anyonik bağlanma bölgesine bu negatif yüklü kısımlar ile bağlanmaktadır. Bundan dolayı da NADPH'nin okside formu olan NADP⁺'yi inhibitörler tercih etmektedir (Podjarny *et al.* 2004). Enzimin aktif bölgesi, inhibitöre uyum sağlayabilmek için konformasyonel değişiklikler yapmaktadır. Aldoz redüktaz inhibitörleri, enzimin aktif bölgesindeki hidrofobik bölge kalıntıları ile birçok van der Waals bağı kurmaktadır (Wilson *et al.* 1995; Steuber *et al.* 2008).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi poliols yolunun ikinci enzimi olup NAD⁺ kofaktörüne bağımlı olarak halkalı yapıda olmayan poliollerin oksidasyonundan sorumludur (Rehg and Torack 1977). Sorbitol dehidrogenaz enzimi poliols yolunu sorbitolün fruktoza dönüşüm reaksiyonunu katalizleyerek tamamlar. Hiperglisemi durumunda heksokinaz enzimlerinin doygunluğu sonucu hücre içerisindeki glukozun 1/3'ü poliols yolunda metabolize olmaktadır (Kinoshita 1974; Kinoshita *et al.* 1983; Gonzales *et al.* 1984)

Hiperglisemi şartlarında poliols yolunun artan aktivitesi sonucu glukoz fruktoza dönüşür. Sorbitolün NAD⁺ bağımlı sorbitol dehidrogenaz enzimi tarafından oksidasyonu sonucunda oluşan fruktoz, fruktoz-3- fosfat (F3P) ve 3-deoksiglukoza (3DG) dönüşür (Grandhee and Monnier 1991; Lal vd 1995; Hamada *et al.* 2000). Bu sonucunda, poliols yolunda 3-deoksiglukozun oluşabileceği gösterilmektedir (Tsukushi *et al.* 1999). F3P ve

3DG ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunda görev alırlar (Szwergold *et al.* 1990; Brownlee 1992; Hamada *et al.* 1996).

Glukozun, sorbitole ve sonra da fruktoza hızla dönüşmesi GSH düzeyinin azalmasına sebep olmaktadır. Oluşan NADH, NADH oksidaz enzimi tarafından substrat olarak kullanılmakta (Lorenzi 2007) ve bu enzimin etkisiyle serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşumunun artmasına sebep olmaktadır (Kashiwagi *et al.* 1994). ROS ve NADH/NAD⁺ oranındaki artış, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim (GAPDH) inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliollara yönelmesine, gliseraldehit-3-P konsantrasyonunun ve aldoz redüktaz enzim aktivitesinin artmasına sebep olmaktadır (Stevens *et al.* 2000). NADP miktarındaki artış ise pentoz fosfat yolunu aktive eder (Dunlop 2000; Setter *et al.* 2003). Konsantrasyonu artan trioz fosfatlar ise bir ileri glikasyon ürünü öncülü olan metilloglioksal ve Protein Kinaz C aktivasyonunu sağlayan hiperglisemi diaçil gliserol oluşumunu arttırmaktadır (Dunlop 2000; Setter *et al.* 2003). Diğer yünden de aldoz redüktaz enzimi, reaktif karbonilleri ve lipit aldehytlerini detoksifiye ederek oksidatif stresi azaltmaktadır (Dunlop 2000).

SDH enziminin aktivitesi ilk kez 1942 yılında memeli dokusunda saptanmıştır (Breusch 1942). Hemen hemen bütün canlılarda bulunan SDH enzimi Brakley tarafından 1951'de ilk kez fare karaciğerinden saflaştırılmış (Brakley 1951), bitkilerde ise elma, şeftali ve armut gibi meyve türlerinde incelenmiştir (Yamaguchi *et al.* 1994; Bianco *et al.* 1998). Enzimin sorbitol ve galaktitol'u içeren çeşitli asiklik poliollerin oksidasyonunu katalizlediği belirtilmiştir (Brakley 1951). SDH enzimi sorbitolün kullanımında önemli bir rol izlerken, bitkilerde meyve gelişiminde karbon sağlamada anahtar rol üstlendiği belirtilmiştir (Oura *et al.* 2000) SDH enzimi *Bacillus subtilis* ve *Gluconobacter* gibi bakterilerde çalışılmıştır (Ng *et al.* 1992; Hosino *et al.* 2003)

Barsak bölgesi hariç bütün memeli dokularında eksprese olduğu belirtilen sorbitol dehidrogenaz enzimi özellikle karaciğer ve testis dokularında bol miktarda bulunmaktadır (Jeffery *et al.* 1984; Estonius *et al.* 1993). Enzim, insan ve koyun (Smith

M.G.1962) dokuları gibi birçok dokudan saflaştırılmıştır (Baretto and Beutler 1975; Jedziniak *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983; Maret and Auld 1988).

Çizelge 2.2. SDH enziminin saflaştırıldığı memeli dokuları

Enzim kaynağı	Kaynak
Sıçan karaciğeri	(Brakley 1951)
Domuz sperm kesesi	(Williams-Ashman <i>et al.</i> 1957)
Koyun karaciğeri	(Smith 1962)
Sıçan beyni	(Rehg and Torack 1977)
At karaciğeri	(Bailey <i>et al.</i> 1981)
İnsan beyni	(O'Brien <i>et al.</i> 1982)
Sığır beyni	(Wiesinger and Hamprecht 1987)
İnsan karaciğeri	(Maret and Auld 1988)
Sığır lensi	(Marini <i>et al.</i> 1997)

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, karaciğer tümör hücrelerindeki aldoz redüktaz enziminin, karbonil metabolitlerinin (3-DG, gliseraldehit) işlevlerini baskılayarak hücrenin kontrolsüz bölünmesinin devamını sağladığı belirtilmiştir. Bundan dolayı karaciğerde tümör oluşumunda aldoz redüktaz enziminin ekspresyonundaki artışın, kanser hücrelerinin yok edilememesi ile ilişkili olabildiği düşünülmektedir (Jin *et al.* 2006).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin inhibisyonu sonucu sorbitol birikimi artmıştır. Buna karşın bu çalışmada sorbitol birikiminin yan etkileri olmaksızın bozulan sinir iletimi ve sinirlerde, gözde ve aortla ilgili dokularda vasküler komplikasyonların azaldığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda sinir, göz ve aortla ilgili dokularda oluşan patogenezin glukozun aldoz redüktaz enzimi aracılığı ile sorbitole redüksiyonundan ziyade sorbitolün, sorbitol dehidrogenaz enzimi tarafından fruktoza oksidasyonu ile daha çok ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple diyabetiklerde NADH/NAD+

oranındaki artış diyabetik dokulardaki patogenezlerin çok önemli belirleyicisi olarak görülmektedir (Tilton *et al.* 1995).

Quercetin'in spesifik bir aldoz redüktaz enzim inhibitörü olduğu düşünülmektedir (Kador *et al.* 1985). Sığır beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine yapılan çalışmada quercetin'in enzimi önemli oranda inhibe ettiği (Wiesinger and Hamprecht 1989) ve aynı inhibitörün insan sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde de benzer oranda inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1983). Yapılan bu denemeler sonucunda aldoz redüktaz enzimi inhibitörlerinin *in vivo* koşullarda ilk olarak sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine denenmesinin pozitif sonuçlar verebileceği belirtilmiştir (Wiesinger and Hamprecht 1989).

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon çalışmaları genellikle tiyollerin bu enzimin güçlü inhibitörleri olduğunu ve aldoz redüktaz inhibitörü olan sorbinilin koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği belirtilmiştir. Fakat aldoz redüktaz inhibitörlerinden tolrestat, quercetin ve alrestatinin koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Lindstad and McKinley-McKee 1996).

Sorbitol dehidrogenaz enzim inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar; inhibisyonun hiperglisemi şartlarında ortaya çıkan poliol yolu aktivitesiyle ilişkili redoks bozukluklarını düzelterek diyabetin sebep olduğu komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirmede faydalı olabileceği belirtilmektedir (Kador *et al.* 1998). Bu nedenle güçlü ve etkili Sorbitol dehidrogenaz inhibitörleri geliştirmek amacıyla çalışmalar devam etmektedir (Lindstad and McKinley-McKee 1997).

Hücre içi şartlarda sadece bir sınıf (piperazin pirimidinler) aktif sorbitol dehidrogenaz enzim inhibitörleri olduğu belirtilmiştir (Geisen *et al.* 1992). Bunun dışında ditiyotritol ve diğer metal şelatlayıcı tiyolları içeren ikinci bir sınıfın, SDH enziminin katalitik

Çinko atomuyla etkileşerek *in vitro* şartlar altında güçlü inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Lindstad and McKinley-McKee 1996).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin ilk inhibitörünün Geisen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda 2-hidroksimetil- 4- 4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1-piperazin) pirimidin olduğunu kanıtlanmıştır (Geisen *et al.* 1994).

Uzun zamandır yapılmakta olan çalışmalar; SDH enziminin inhibisyonu, hiperglisemi durumunda aktif hale gelen poliol mekanizması ile ilgili redoks bozukluklarını düzelterek diyabetin sebebiyet verdiği komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirmede yararlı olabileceğini göstermektedir (Kador *et al.* 1998). Bu sebeple birçok araştırmacı güçlü ve etkili SDH inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır (Lindstad and McKinley-McKee 1997).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar

2', 5' ADP-sepharose 4B	Pharmacia
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Amonyum Sülfat	E.Merc AG
Asetik Asit	E.Merc AG
Brom timol mavisi	Sigma
CM-Sephadex	E.Merc AG
Coomessie Brillant Blue G-250	Sigma
Coomessie Brillant Blue R-250	Sigma
DEAE Sephadex	E.Merc AG
Diyaliz Torbaları	sigma
DL-Gliseraldehit	sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Fluka
Gliserin	E.Merc AG
Gliserol	Sigma Chemical Comp.
Metanol	E.Merc AG
Glisin	E.Merc AG
Glutaraldehit	Sigma
Hidroklorik Asit	E.Merc AG
İzopropanol	E.Merc AG

Çizelge 3.1. (devam)

Jel filtrasyon için Molekül kütlesi Standartları	Sigma
N,,N'- metilen bisakrilamid	Sigma
N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum fosfat	Riedel de Haen
Potasyum Fosfat	E.Merc AG
Protein Marker	BioRad 0375
Protein Marker V	peqGOLD/peqlab
Sephadex G-100	Sigma
Sephadex G-100	E.Merc AG
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	E.Merc AG
Sodyum Fosfat	E.Merc AG
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum Klorür	E.Merc AG
Sorbitol	E.Merc AG
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Sigma
Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
β -merkapt etanol	Fluka
β -merkapt etanol	E.Merc AG
β -NAD ⁺	E.Merc AG
NADPH	Sigma
NADP ⁺	Sigma

Çalışmamızda kullanılan diğer kimyasallar Sigma Chemical Comp.'den ya da E.Merc AG'den, temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	: Beckman coulturn
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midii Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Siemens Derindondurucu
(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Madical Freezer
(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

AR enzimi için aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. pH=5,5 olan 1 M Na-fosfat tampon çözeltisi: 6 gram NaH_2PO_4 tartıldı ve 40 ml saf suda çözüldü sonrasında pH=5,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 0,11 mM NADPH çözeltisi: 0,0045 gram NADPH tartıldı ve 5 ml saf suda çözüldü.
3. 4,7 mM DL-gliseraldehit çözeltisi: 0,021 gram DL-gliseraldehit tartıldı ve 10 ml saf suda çözüldü.

SDH enzimi için aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. pH=9,5 olan 100 mM Glisin/NaOH tamponu: 0,75 gram Glisin 90 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=9,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. 4,7 mM β -NAD⁺ çözeltisi: 0,0155 g β -NAD⁺ tartıldı ve pH=9,5 olan 100 mM 5 ml Glisin/NaOH tampon çözeltisinde çözüldü.
3. 100 mM sorbitol çözeltisi: 0,182 g sorbitol tartıldı ve pH=9,5 olan 100 mM 10 ml olan Glisin/NaOH tampon çözeltisinde çözüldü.

AR enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu: 1,2 gram NaH₂PO₄ tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. pH= 7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDH enzimi için homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

pH= 7,0 olan 5 mM K-fosfat: 0,068 gram KH₂PO₄ tartıldı. 90 ml saf suda çözüldü. pH=7,0'a getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

AR enziminin diyalizinde kullanılan çözelti

pH=7,4 olan 5 mM β -merkaptöetanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu: 1,2 gram NaH₂PO₄ tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. İçerisine 72 μ l β -merkaptöetanol eklendi ve pH= 7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDH enziminin diyalizinde kullanılan çözelti

1. pH=7,9 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi, (Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası yapılan diyalizde kullanılan tampon): 0,68 gram KH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra içerisine 72 μl β -merkaptotanol eklenerek son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. pH=6,2 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi, (DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonrası yapılan diyalizde kullanılan tampon): 0,68 gram KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'ye getirildikten sonra içerisine 72 μl β -merkaptotanol eklenerek son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu, (DEAE-Sephadex iyon değişim kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tampon): 1,2 gram NaH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. pH= 7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu, (Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonunda kullanılan tampon): 1,2 gram NaH_2PO_4 tartılarak yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. pH= 7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu, (2'5' ADP-Sepharose afinite kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tampon): 1,2 gram NaH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. pH=7,4'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDH için hazırlanan DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

pH=7,9 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi: 0,68 gram KH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=7,9'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDH için hazırlanan CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

pH=6,2 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi: 0,68 gram KH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'ye ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDH için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

pH=6,2 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi: 0,68 gram KH_2PO_4 tartıldı ve yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'ye getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:

1. 100 mg Coomassie brillant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin toplama hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.
2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 1 mg standart serum albuminin 1 ml saf suda çözüldü.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. pH=8,8 olan 1M Tris-HCl: 12,11 gram Tris (0,1 mol) tartıldı ve 80 ml saf suda çözüldü ve 1M HCl ile pH=8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. pH=6,8 olan 1 M Tris-HCl:12,11 gram Tris (0,1 mol) tartıldı ve 80 ml saf suda çözüldü ve 1M HCl ile pH=6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrlamid-%0,8 Bisakrlamid çözeltisi: 15 gram akrilamid, 0,4 gram bisakrlamid ve 34,6 gram saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 gram amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 gram SDS, 9 gram saf suda çözümlenerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 gram Tris (12,5 mmol) ve 7,51 gram glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml saf suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e getirildi ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8,0)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik brom timol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptolanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml saf su içerisinde 0,1 gram Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml saf su karıştırılarak elde edildi.
11. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin toplam hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 gram indikatör 16 ml 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin hazırlanması

1. 0,314 M Gentamisin sülfat çözeltisi: 150 mg gentamisin sülfat tartılıp, hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.
2. 0,18 M Seftriakson Disodyum 3,5 H₂O: 1 g Seftriakson Disodyum 3,5 H₂O tartılıp, hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
3. 0,0345 M Vankomisin HCl: 1 g Vankomisin HCl tartılıp, hacim saf su ile 20 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 20 kat seyreltildi.
4. 0,294 M Sefuroksim Sodyum: 250 mg Sefuroksim Sodyum tartılıp, hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
5. 0,55 M Sefozolin Sodyum: 1 g Sefozolin Sodyum tartılıp, hacim saf su ile 4 ml'ye tamamlandı.
6. 0,737 M Linkomisin HCl: 600 mg Linkomisin HCl tartılıp, hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı.
7. 0,073 M Amikasin Sülfat: 100 mg Amikasin Sülfat tartılıp, hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı.
8. 6 mM Siprofloksasin: 400 mg Siprofloksasin tartılıp, hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
9. 0,715 M Ampisilin: 1 gr ampisilin tartılıp, hacim saf su ile 4 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 5 kat seyreltildi.

10. 0,013 M Meropenem: 500 mg meropenem tartılıp, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 4 kat seyreltildi.

11. 0,15 M Sefoperazon: 1g sefoperazon tartılıp, hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 4 kat seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü

Kullanılan çözeltiler:

1. pH=5,5 olan 0,8 M Na-fosfat tamponu,
2. 0,11 mM NADPH çözeltisi
3. 4,7 mM DL-gliseraldehit çözeltisi

1986 yılında Cerelli ve arkadaşları tarafından aldoz redüktaz enziminin aktivite ölçüm prosedürü geliştirildi ve prosedür modifiye edilerek bu çalışma yapıldı. Reaksiyon ortamı, 0,25 ml Na-fosfat tamponu, 0,1 ml NADPH, 0,45 ml saf su üzerine 0,1 ml izole edilen enzim ve 0,1 ml DL-gliseraldehit ilavesi ile toplam hacim 1 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan küvete DL-gliseraldehit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Oda sıcaklığında ve spektrofotometre kullanılarak 340 nm'de 3 dakika boyunca NADPH konsantrasyonundaki azalma takip edildi ve sonrasında lineer olan absorbans değerler aralığı belirlenip, eğim hesaplamaları yapıldı. Enzim aktivitesinin U/L cinsinden hesaplanması için eğim değerleri, aşağıdaki formüle uygulanarak hesaplandı.

$$U/L = \Delta A \times V(L) \times 1000 \text{ (}\mu\text{mol/dk}^{-1}/L^{-1}\text{)}$$

$$\Delta t = v(L) \epsilon \times d$$

ΔA = Test tüpündeki absorbans farkı

Δt = Zaman (dakika)

$\Delta A/\Delta t$ = Eğim

ϵ = Ekstinsiyon Katsayısı ($3.4 \times 10^2 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$)

d = Işık Yolu (10 mm)

$V(L)$ = Total Hacim

$v(L)$ = Enzim Hacmi

3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini Warburg metoduna göre, spektrofotometre ile 280 nm'de proteinlerin yapısını oluşturan aromatik gruplara sahip aminoasitlerden tirozin, fenilalanin ve triptofan amino asitlerinin maksimum absorbansının ölçülmesi ile bulunur (Segel 1968). Kromatografik yöntemlerle elde edilen fraksiyonlar eşit hacimlerde alınarak 280 nm de absorbansları köre karşı okunarak belirlendi.

3.2.2.b. Kantitatif protein tayini

Bradford metoduna göre kantitatif protein miktarı keçi böbreğinden elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve CM-Selüloz C-50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri için belirlendi. Negatif yüke sahip, proteinler üzerindeki pozitif yüklere bağlanan, kırmızı ($\lambda_{\text{max}}=465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{\text{max}}=595 \text{ nm}$) formları bulunan Coomassie brilliant blue G-250 bu yöntemde boyaya olarak kullanıldı. Proteinin boyaya bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlamaktadır. Uygulanan bu yöntemin bozucu etkilere karşı hassasiyeti oldukça düşüktür (1-100 μg arası). Yapılan bu reaksiyon hızlı cereyan eder, yüksek oranda tekrarlanır ve iki dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. Kantitatif protein tayini prosedürü;

Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı ve saf su ile tüplerin toplam hacimleri 100 µl'ye tamamlandı. Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden 5 ml ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyon sonrası 3 ml'lik cam küvetlerde 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ile 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda standart grafik absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile yapıldı. Saflaştırma işleminin bütün safhalarında ortamdaki protein miktarını bulmak için numunelerde 20 kat veya daha çok seyreltme yapıldı. Elde edilen seyreltilmiş çözeltilerden ayrı tüplere sırasıyla 50, 100 ve 200 µl alınarak üzerlerine 5'er ml Coomessie brilliant blue G-250 eklendi. Numuneler vorteksle karıştırıldı ardından 10 dakika inkübe edildi ve sonra 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı ve 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınarak standart grafikten protein miktarları bulundu (Bradford 1976).

3.2.3. Keçi böbrek AR enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması

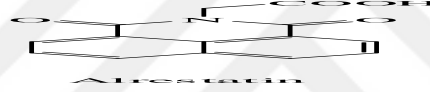
Homojenat hazırlamak için, -80°C'de saklanmış olan dokular tartıldı. Daha sonra sıvı azot kullanılarak dondurma-çözme tekniği ile parçalandı ve ağırlıklarının (gr) 3 katı oranında 5 mM β-merkaptolanol içeren pH'ı 7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat, +4°C'de 13,500g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant saflaştırma işlemlerinde kullanmak için +4°C'de saklandı.

3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Çok değerlikli elektrolit olan proteinler, iyonlara benzer bir şekilde hareket ederler. Su molekülleri, yüksek tuz konsantrasyonunda, protein moleküllerini çevreler ve çözünür halde kalmasını sağlarlar. Bu su molekülleri amonyum sülfat tuzundaki iyonlar

tarafından çekilir ve proteinlerin çökmesine sebep olurlar (salting-out). Amonyum sülfat çöktürmesi salting-out esasına dayanmaktadır.

Amonyum sülfat çöktürmesinde; keçi böbreğinden elde edilen homojenat sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 ve %70-80 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Amonyum sülfat tuzunun homojenatta çözünme işlemi manyetik karıştırıcı ile buz banyosunda yapıldı. Çöktürme işlemi yapıldıktan sonra homojenat 30 dakika, +4°C, 13.500g'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra elde edilen peletler, homojenat tamponu içinde çözüldü ve aktivite ölçümü yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı ve çöktürme aralığı bulundu. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.



m: Kullanılacak amonyum sülfat miktarı (g)

V: Enzim çözeltisinin hacmi (ml)

S1: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Yapılan işlemler sonucu AR enziminin aktivitesinin %20-70 aralığında çöktüğü tespit edildi. Daha sonra saflaştırma işlemlerinde %20-70 amonyum sülfat aralığı uygulandı. Elde edilen numune 30 dakika 13000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (5 mM K-fosfat, pH=7,9) çözüldü. Yapılan bütün işlemler buz banyosunda gerçekleştirildi.

3.2.3.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune +4°C'de diyaliz torbasında iki saat süreyle diyaliz tamponuna (5 mM β-merkaptotanol içeren, 10 mM Na-fosfat pH=7,4) karşı 2 kez diyaliz edildi.

3.2.3.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılabilmesi için önce şişirilmesi gerekmektedir. 100-120 ml yatak hacmi oluşturabilmek için 5 gram jel 100 ml saf suda 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. şişirilen jel daha sonra 0,5 N 100 ml soğuk HCl içerisinde 1 saat bekletildi ve sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jelde znmş olan gazlar su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. 3x2x30 cm boyutundaki kolona tatbik edildikten sonra 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa ile 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi jel üstündeki tampon seviyesi jel seviyesine getirildikten sonra pipet yardımı ile kolona tatbik edildi. Saflaştırma işlemi esnasında kolon 0,5 L dengeleme tamponuyla yıkanıp 20 mM ile 500 mM arasındaki NaCl gradienti ile elüsyon gerçekleştirildi. Böylelikle AR enzimi DEAE-Sephadex kolonu ile saflaştırılmış oldu. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakılarak aktiviteye sahip olan tüpler birleştirildi ve diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle +4°C 5 mM ̢-merkптоetanol içeren, 10 mM Na-fosfat pH=7,4 olan tamponuna karşı diyaliz edildi. Birleştirilen elüat zelteleri böylece jel filtrasyon kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirilmış oldu. Kolona tatbik edilen numuneler ve birleştirilen elüat zeltelerinin Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldı ve spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Sephadex G-100 kolona tatbik edilmeden önce şişirilmesi gerekmektedir. Bunun için jelden 5 g alınarak 200 ml saf suda 1 gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek şişirildi. şişirilmış jelin içinde bulunan hava kabarcıkları vakum yardımıyla uzaklaştırıldı. şişirilmış ve havası alınmış jel pH=7,0 olan 200 mM Na- fosfat tamponuyla dolu kolona pakelendi. Kolonu dengelemek amacıyla pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu kullanıldı ve kapalı sistem oluşturuldu. Peristaltik pompa yardımı ile kolon akış hızı 3 ml/saat'e ayarlandı. Kolonun dengelendiğini; dengeleme tamponu

kolondan uzun süre geçtikten sonra üstten ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun pH değerinin ve 280 nm'de absorbansının aynı olduğu anda anlaşılır. Dengelenen kolona numunenin paketlenebilmesi için öncelikle kolon üzerindeki kapalı sistem açıldı ve jelin üzerinde birikmiş tamponun jel seviyesine gelmesi beklendi. Tampon oranı jel seviyesine geldiğinde iyon değişim kolonundan elde edilen numune 0,25 ml gliserol ile karıştırıldıktan sonra jelin üzerine tatbik edildi. Numune tatbikinden sonra numunenin jel seviyesine gelmesi beklendi ve numune jel seviyesine geldikten sonra tampon ilave edildi. Stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturuldu ve sabit hızla akış sağlandı. Elüatlar alındı ve alınan her bir elüatın 280 nm deki absorbans değerlerin bakılıp elüat ve kör olarak kullanılan elüsyon tamponunun absorbans farkı sıfır olana kadar elüatlar alındı ve sonuçlar kaydedildi.

3.2.3.f. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve Keçi böbrek AR enziminin saflaştırılması

2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu hazırlamak için, 2 gram jel 10 ml'lik yatak hacmine sahip kolon hazırlamak için tartıldı. Jel katı maddelerin uzaklaştırılması için 400 ml saf su ile birkaç kez yıkandı ve yıkama sonucunda jel şişirilmiş oldu. Şişirilen jelin havası vakum ile alındı. Jel havası alındıktan sonra 5 mM β -merkaptolanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile süspanse edildi. Daha sonra jel 1x10 cm'lik kolona paketleni ve kolona soğutmalı kapalı sistem kuruldu. Kolon peristaltik pompa yardımı ile Na-fosfat tamponuyla yıkanarak dengelendi. Kolonun dengelendiğini anlamak için elüat ile tampon çözeltinin pH değerinin ve 280 nm'de absorbanslarının eşitliği dikkate alındı ve böylece kolon hazırlanmış oldu. Numune dengelenmiş olan kolona paketleni. Sonrasında kolon 5 mM β -merkaptolanol içeren pH=7,4 olan 10 mM Na-fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm'deki absorbans değeri sıfır oluncaya kadar sürdürüldü. Daha sonra 0,2-2,5 mM NaCl gradientli Na-fosfat tampon çözeltisi ile elüsyon yapıldı ve AR enzimi elde edilmiş oldu.

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

Laemmli metoduna göre saflaştırılan enzimin saflık derecesini belirlemek için %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve enzimin saflık derecesi belirlenmiş oldu (Laemmli 1970). Bunun için öncelikle elektroforez plakaları önce saf su ile yıkandı daha sonra da alkol ile yıkandı. Plaklar yıkandıktan sonra her iki kenarında aralık oluşturucu bir plakayla düz bir plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildikten sonra, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra, jel enjektör yardımıyla plakaların üst kısmında 0,5 cm yer kalacak kadar şekilde dolduruldu ve jelin donması için belirli bir süre beklendi. Ayırma jeli katılaştıktan sonra yağma jeli hazırlandı ve jelin üst kısmında kalan boşluğa dolduruldu. Numune kuyularının oluşturulması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Jelin kurummasını engellemek için ıslak süzgeç kağıdı sistem üzerine kapatıldı ve yağma jelinin katılması beklendi. Yağma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartıldı ve numune kuyuları oluşturuldu. Önce jel saf su, daha sonra da yürütme tamponuyla yıkandıktan sonra plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısımları yürütme tamponuyla dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık olarak 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılarak üç dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Elektroforez tankı üst tarafa katot (-), alt tarafa anot (+) gelecek şekilde yerleştirilerek kapatıldı. Örnekler öncelikle akım 80 volta getirilerek 20 dakika boyunca yürütüldü ve örneklerin ayırma jeline kadar gelip yığılması sağlandı. Daha sonra akım 120 volta getirildi ve boya jelin alt kısmına gelinceye kadar yürütüldü. Numune tamponunda bulunan brom timol mavisi numunelerin takip edilebilmesi için yardımcıdır. Yürütme işlemi bittikten sonra elektrik akım kesildi ve plakalar arasındaki jel dikkatle çıkarıldı ve sonra 20 dakika sabitleştirme çözeltisine konuldu. Bu işlemden sonra jel çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcıda 2 saat süreyle bekletildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra çıkarılan jel yıkama çözeltisine konuldu. Yıkama tamponunda rengi açılan ve protein bantları belirginleşen jel tampon çözeltiden çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayırma jelinin hazırlanması: pH=8,8 olan 1M 5 ml Tris-HCl, 4,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,130 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %10'luk PER ve 3,13 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jelinin hazırlanması: 0,410 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %10'luk SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %10'luk PER ve 2,45 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karışıma eklenerek jel hazırlandı.

3.2.5. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.5.a. AR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'ları 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 0,8 M Na-fosfat, Tris-HCl ve Glisin/NaOH tamponları hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon çözeltisi için ayrı ayrı enzim aktiviteleri ölçüldü (Soyut and Beydemir 2008).

3.2.5.b AR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Aldoz redüktaz enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi için enzimin optimum pH belirlendikten sonra belirlenen bu optimum pH'da 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM Na-Fosfat tamponları hazırlandı ve optimum iyonik şiddet belirlendi.

3.2.5.c. AR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümünde kullanılan tampon çözelti ve substrat

karışımından oluşan küvet içeriği ilgili sıcaklığa getirilen su banyosunda bekletildi. 0°C ile 60°C arasında 10'ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı (Demir *et al.* 2009).

3.2.5.d. AR enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Aldoz redüktaz enzimin stabil pH'ını belirlemek için pH'ları 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olan Na-fosfat tamponları kullanıldı. Hazırlanan bu pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2ml'si 1ml enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de saklandı ve 4 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümüyle enzimin stabil olduğu pH bulundu (Soyut *et al.* 2008).

3.2.5.e. DL-Gliseraldehit substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

DL-Gliseraldehit substratı için keçi böbrek dokusundan elde edilen AR enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonu hazırlandı ve optimum şartlarda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

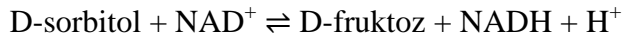
3.2.6. Keçi böbrek AR enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metallerin etkilerinin belirlenmesi

Aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metallerin etkilerini belirlemek için küvet ortamına farklı konsantrasyonlarda ilaç ve metal çözeltileri ilave edildi ve aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın ve metal çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken konsantrasyonu sağlamadığında küvete ilave edilen tampon hacmi azaltıldı, ilaç veya metal çözelti konsantrasyonu arttırıldı ve bu şekilde gerekli olan konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.6.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller, farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Bu ilaç ve metallere yüksek inhibisyon etkisine sahip olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı ilaç ve metallere K_i değerlerini belirlemek için keçi böbreği AR enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç veya metal konsantrasyonu ile bu değerin üstünde ve altında iki sabit ilaç veya metal konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda kullanılan ve uygun olan beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen sonuçlarla her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max}=V_{I_{max}}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

3.2.7. Keçi böbrek SDH enziminin aktivitesinin ölçümü



Sorbitolün fruktoza yükseltgenme reaksiyonu sırasında NAD⁺ 'nin NADH indirgenmesiyle oluşan absorban artışı 340 nm'de 3 dk süreyle ölçüldü. Bu ölçüm için 1 ml'lik kuvartz küvet içeriği; 50 mM Glisin/NaOH tamponu (pH=10,0), 10 mM sorbitol, 470 µM NAD⁺ ve enzim olarak hazırlandı (Lindstad *et al.* 1992) ve 340 nm'de köre karşı absorban değerleri ölçüldü. NADH'in milimolar ekstinksiyon katsayısı aktivite hesabı için kullanıldı. SDH enzimi Nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) sorbitol varlığında indirger. NADH'in oluşum oranını 340 nm'deki absorban artışı ile ölçebiliriz ve bu oran SDH enziminin aktivitesine bağlıdır. SDH enzim ünitesi dakika başına okside olan sorbitolün mikromol cinsinden değerini verir. Enzim ünitesi hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Bu formüldeki simgeler aşağıda açıklandı;

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

ΔOD : Bir dk absorbans değişimi

6,22 : β -NADH 'ın 340 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3.2.8. Protein tayini

3.2.8.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, Warburg metoduna göre 280 nm'de proteinlerin yapısında yer alan fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik gruplara sahip olan amino asitlerin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanarak gerçekleştirildi (Segel 1968). Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi işleminin sonrası eşit hacimde alınan tüm tüpler için kalitatif protein tayini yapıldı. 280 nm'de spektrofotometrede kuvarz küvetler kullanılarak absorbans ölçümü köre karşı gerçekleştirildi.

3.2.8.b. Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini keçi böbreği numunesinden elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarlarını ölçmek için kullanıldı. Negatif yüke sahip olan Coomassie brilliant blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanıldı. Bu boya sahip olduğu negatif yükten dolayı proteinlerin üzerinde yer alan pozitif yüklere bağlanırlar. Coomassie brilliant blue G-250'nin kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm)

ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Proteinin boyaya bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde bozucu faktörlerin etkisi oldukça düşüktür ve hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir, hızlı cerayan eder ve iki dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. İki saatin üzerinde renk stabilitesi devam edebilmektedir (Bradford 1976). Bu yöntemle protein tayini yapabilmek amacıyla standart grafiğe ihtiyaç vardır. Bu nedenle 1 ml'sinde 1 mg protein olan standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl konuldu. Saf su ile tüplerin hacimleri 0,1 ml'ye tamamlandı ve Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden 5 ml tüplere ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyon sonrası köre karşı absorbens değerleri 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde okundu. 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı. Standart grafik, elde edilen absorbens değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile elde edildi. Keçi böbreğinden elde edilen homojenat ve saflaştırma basamaklarının her birinden elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er ml tüplere konuldu ve üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 ilave edildi. Vorteksten sonra 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 595 nm'de absorbens değerleri ölçüldü. Bütün numunelerden üçer deneme yapıldı. Bu üç değer aritmetik ortalaması gerçek değer olarak belirlendi ve bu değerlere göre standart grafik yardımı ile protein miktarları tespit edildi. Saflaştırılan enzim çözeltileri ve homojenatta protein tayini bu metoda göre yapıldı.

3.2.9. Keçi böbrek SDH enziminin saflaştırılması

3.2.9.a. Homojenat hazırlanması

Deneyde kullanılan keçi böbrek dokusu taze olarak temin edildi. %0,9'luk NaCl çözeltisi, doku örneğinden kan ve diğer kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla üç defa kullanıldı. Homojenat hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalar haline getirildi. Sonra sıvı azot içerisinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde pH=7,0 olan 5 mM K-fosfat tampon çözeltisi içerisinde homojenize edildi ve homojenat süzgeç kağıdı

yardımı ile süzüldü. Yapılan bu işlem sonrası süspansiyon 13000 rpm'de 60 dakika 2 kez santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çökelek atıldı ve süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.9.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır. Keçi böbreğinden elde edilen SDH enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çöktürme işlemleri sırasında 13000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katıldı ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda SDH aktivitesinin tamamının %40-70 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında ilk basamak olarak %40-70 amonyum sülfat kesitlemesi uygulandı. Önce %40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı

(böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (5 mM K-fosfat, pH=7,9) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.9.c. Diyaliz

Diyalizde, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu edinilen numune +4°C'de diyaliz torbasında diyaliz tamponuna (5 mM β -merkaptolanol içeren, 10 mM Na-fosfat pH=7,4) karşı iki saat süreyle 2 kez diyaliz edildi.

3.2.9.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılabilmesi için önce şişirilmesi gerekmektedir. 100-120 ml yatak hacmi oluşturabilmek için 5 gram jel 100 ml saf suda 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilen jel daha sonra 0,5 N 100 ml soğuk HCl içerisinde 1 saat bekletildi ve sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötrale edildi. Jelde çözülmüş olan gazlar su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. 3 cm 2x30 cm boyutundaki kolona tatbik edildikten sonra 5 mM K-fosfat tamponu (pH=7,9) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa ile 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi jel üstündeki tampon seviyesi jel seviyesine getirildikten sonra pipet yardımı ile kolona tatbik edildi. Saflaştırma işlemi esnasında kolon 0,5 L dengeleme tamponuyla yıkanıp 20 mM ile 500 mM arasındaki NaCl gradienti ile elüsyon gerçekleştirildi. Böylelikle AR enzimi DEAE-Sephadex kolonu ile saflaştırılmış oldu. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakılarak aktiviteye sahip olan tüpler birleştirildi ve diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle +4°C 5 mM β -merkaptolanol içeren, 5 mM K-fosfat pH=6,2 olan tamponuna karşı diyaliz edildi. Birleştirilen elüat çözeltileri böylece jel filtrasyon kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirilmiş oldu. Kolona tatbik edilen numuneler ve birleştirilen elüat çözeltilerinin Bradford metoduyla kantitatif protein

taini ve aktivite tainleri yapıldı ve spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.9.e. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi

CM-Sephadex C-50 iyon değişim reçinesinin çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılabilmesi için önce şişirilmesi gerekmektedir. 100-120 ml yatak hacmi oluşturabilmek için 5 gram jel 100 ml saf suda 80-90°C’de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. şişirilen jel daha sonra 0,5 N 100 ml soğuk HCl içerisinde 1 saat bekletildi ve sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jelde znmş olan gazlar su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. 3 cm 2x30 cm boyutundaki kolona tatbik edildikten sonra 5 mM K-fosfat tamponu (pH=6,2) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa ile 15-20 ml/saat’e ayarlandı. DEAE Sephadex iyon değişim kolonundan toplanan ve diyaliz edilen enzim çözeltisi, jel üstündeki tampon seviyesi jel seviyesine getirildikten sonra pipet yardımı ile kolona tatbik edildi. Saflaştırma işlemi esnasında kolon 0,5 L 5 mM K-fosfat tamponu (pH=6,2) ile yıkanıp elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml 5 mM K-fosfat tamponu (pH=6,2) ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml 1,5 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başladı. Böylelikle SDH enzimi CM-Sephadex kolonu ile saflaştırılmış oldu. Her bir elüatın 340 nm’de aktivitesine bakılarak aktiviteye sahip olan tüpler birleştirildi ve diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle +4°C 5 mM ̢-merkaptolanol içeren, 5 mM K-fosfat pH=6,2 olan tamponuna karşı diyaliz edildi. Birleştirilen elüat zelteleri böylece jel filtrasyon kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirilmış oldu. Kolona tatbik edilen numuneler ve birleştirilen elüat zeltelerinin Bradford metoduyla kantitatif protein taini ve aktivite tainleri yapıldı ve spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.9.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Sephadex G-100 kolona tatbik edilmeden önce şişirilmesi gerekmektedir. Bunun için jelden 5 g alınarak 200 ml saf suda 1 gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek

şişirildi. Şişirilmiş jelin içinde bulunan hava kabarcıkları vakum yardımıyla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası alınmış jel pH=7,0 olan 200 mM Na- fosfat tamponuyla dolu kolona paketlenildi. Kolonu dengelemek amacıyla 5 mM K-fosfat tamponu kullanıldı ve kapalı sistem oluşturuldu. Peristaltik pompa yardımı ile kolon akış hızı 3 ml/saat'e ayarlandı. Kolonun dengelendiğini; dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçtikten sonra üstten ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun pH değerinin ve 280 nm'de absorbansının aynı olduğu anda anlaşılır. Dengelenen kolona numunenin paketlenebilmesi için öncelikle kolon üzerindeki kapalı sistem açıldı ve jelin üzerinde birikmiş tamponun jel seviyesine gelmesi beklendi. Tampon oranı jel seviyesine geldiğinde iyon değişim kolonundan elde edilen numune 0,25 ml gliserol ile karıştırıldıktan sonra jelin üzerine tatbik edildi. Numune tatbikinden sonra numunenin jel seviyesine gelmesi beklendi ve numune jel seviyesine geldikten sonra tampon ilave edildi. Stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturuldu ve sabit hızla akış sağlandı. Elüatlar alındı ve alınan her bir elüatın 280 nm deki absorbans değerlerin bakılıp elüat ve kör olarak kullanılan elüsyon tamponunun absorbans farkı sıfır olana kadar elüatlar alındı ve sonuçlar kaydedildi.

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

Laemmli metoduna göre saflaştırılan enzimin saflık derecesini belirlemek için %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve enzimin saflık derecesi belirlenmiş oldu (Laemmli 1970). Bunun için öncelikle elektroforez plakaları önce saf su ile yıkandı daha sonra alkol ile yıkandı. Plaklar yıkandıktan sonra her iki kenarında aralık oluşturucu bir plakayla düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildikten sonra, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra, jel enjektör yardımıyla plakaların üst kısmında 0,5 cm yer kalacak şekilde dolduruldu ve jelin donması için belirli bir süre beklendi. Ayırma jeli katılaştıktan sonra yığma jeli hazırlandı ve jelin üst kısmında kalan boşluğa dolduruldu. Numune kuyularının oluşturulması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Jelin kurumasını engellemek

için ıslak süzgeç kağıdı sistem üzerine kapatıldı ve yığma jelinin katılaşması beklendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartıldı ve numune kuyuları oluşturuldu. Önce jel saf su, daha sonra da yürütme tamponuyla yıkandıktan sonra plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısımları yürütme tamponuyla dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık olarak 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılarak üç dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Elektroforez tankı üst tarafa katot (-), alt tarafa anot (+) gelecek şekilde yerleştirilerek kapatıldı. Örnekler öncelikle akım 80 volta getirilerek 20 dakika boyunca yürütüldü ve örneklerin ayırma jeline kadar gelip yığılması sağlandı. Daha sonra akım 120 volta getirildi ve boya jelin alt kısmına gelinceye kadar yürütüldü. Numune tamponunda bulunan brom timol mavisi numunelerin takip edilebilmesi için yardımcıdır. Yürütme işlemi bittikten sonra elektrik akım kesildi ve plakalar arasındaki jel dikkatle çıkarıldı ve sonra 20 dakika sabitleştirme çözeltisine konuldu. Bu işlemden sonra jel çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcıda 2 saat süreyle bekletildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra çıkarılan jel yıkama çözeltisine konuldu. Yıkama tamponunda rengi açılan ve protein bantları belirginleşen jel tampon çözeltiden çıkarılarak fotoğrafı çekildi. Ayırma jelinin hazırlanması: pH=8,8 olan 1M 5 ml Tris-HCl, 4,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,130 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %10'luk PER ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Yığma jelinin hazırlanması: 0,410 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %10'luk SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %10'luk PER ve 2,45 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karışıma eklenerek jel hazırlandı.

3.2.11. SDH enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.11.a. SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'ları 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, ve 8.0 olan 0.2 M Na-fosfat, pH'ları 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 olan 0.2 M Tris/HCl ve pH'ları 9.0, 9.5, 10.0 ve 10.5 olan 0.2 M Glisin/NaOH tamponları hazırlandı ve uygun substrat

çözeltisi ile her bir tampon çözelti için ayrı ayrı enzim aktiviteleri ölçüldü (Soyut and Beydemir 2008).

3.2.11.b. SDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi için enzimin optimum pH belirlendikten sonra belirlenen bu optimum pH'da 20, 40, 60, 80, 160, 240, 480, 640, 800 mM Glisin/NaOH tamponları hazırlandı ve optimum iyonik şiddet belirlendi.

3.2.11.c. SDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümünde kullanılan tampon çözelti ve substrat karışımından oluşan küvet içeriği ilgili sıcaklığa getirilen su banyosunda bekletildi. 0°C ile 60°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı (Demir *et al.* 2009).

3.2.11.d. SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

SDH enzimin stabil pH'ını belirlemek için pH'ları 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 ve 10.5 olan Na-fosfat, Glisin/NaOH ve Tris/HCl tamponları kullanıldı. Hazırlanan bu pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2ml'si 1ml enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de saklandı ve 4 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümüyle enzimin stabil olduğu pH bulundu (Soyut *et al.* 2008).

3.2.11.e. Sorbitol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Sorbitol substratı için keçi böbrek dokusundan elde edilen SDH enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için 5 farklı sorbitol konsantrasyonu hazırlandı ve optimum şartlarda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.12. Keçi böbrek SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi

Keçi böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak ilaç konsantrasyonu arttırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.12.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metaller, farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Bu ilaç ve metallere yüksek inhibisyon etkisine sahip olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değerleri hesaplanan bazı ilaç ve metallere K_i değerlerini belirlemek için keçi böbreği AR enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç veya metal konsantrasyonu ile bu değerin üstünde ve altında iki sabit ilaç veya metal konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda kullanılan ve uygun olan beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen sonuçlarla her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$

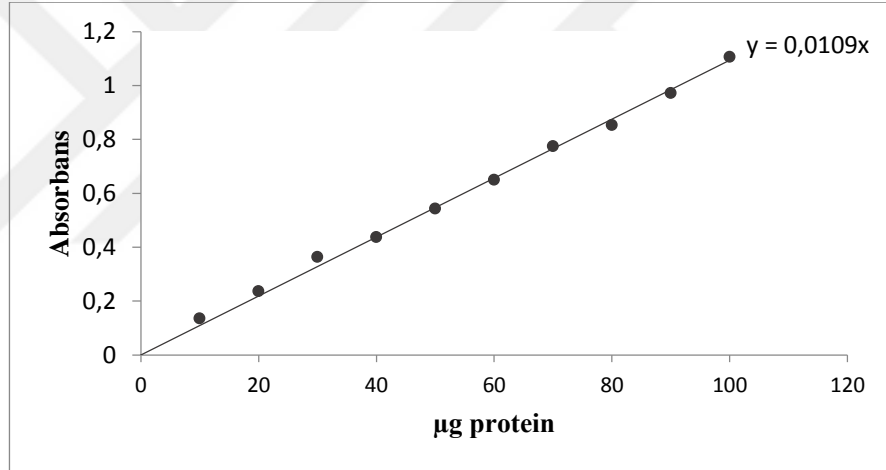
ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{\max}=VI_{\max}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford metodu ile elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini yapıldı. Standart grafik bölüm 3.2.2.b’de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Homojenat, iyon değişim, jel filtrasyon ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterildi.

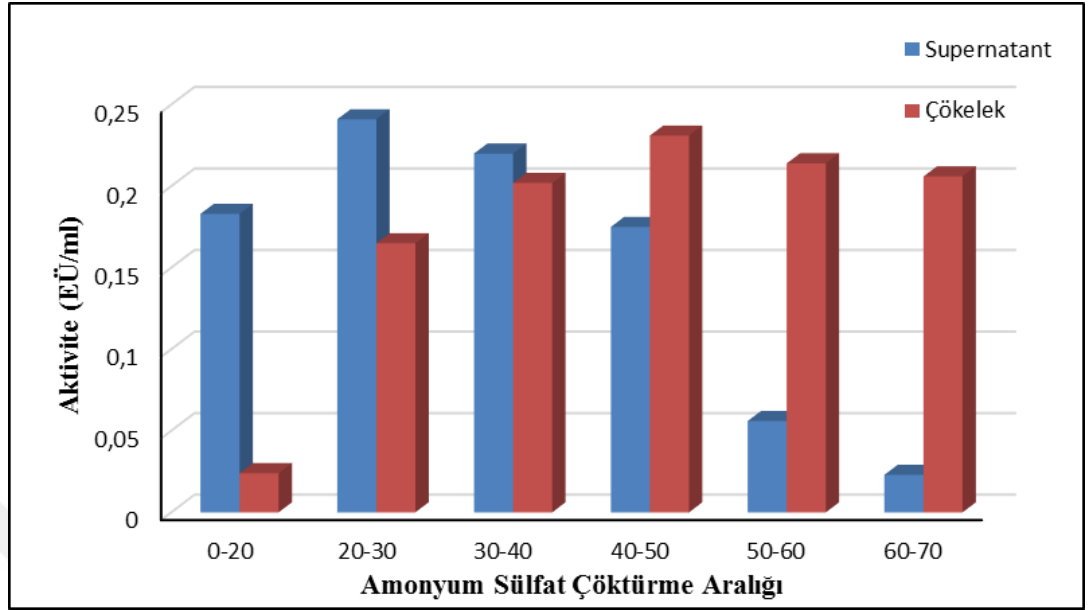


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Keçi Böbreğinden Aldoz Redüktaz Enziminin saflaştırılması

4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi yapıldı. Çöktürme aralığı her seferinde çökelek ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılarak %20-%70 olarak belirlendi. Amonyum sülfat çöktürme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı.



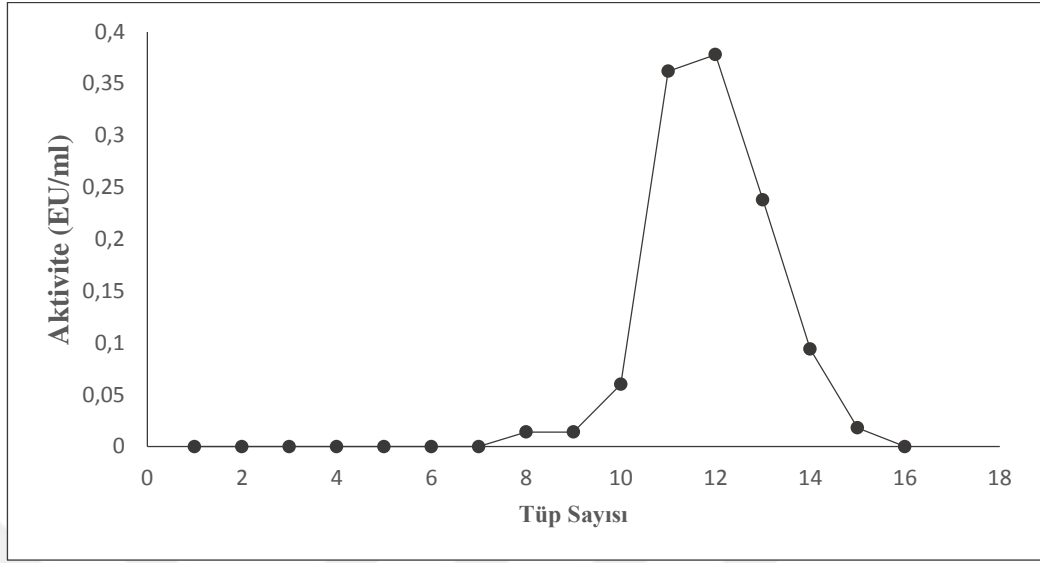
Şekil 4.2. Keçi böbrek AR enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

4.2.2. Diyaliz

Diyaliz işlemi bölüm 3.2.3.c'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Uygun diyaliz tamponu uygulanan yöntemle göre her seferinde değiştirildi.

4.2.3. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

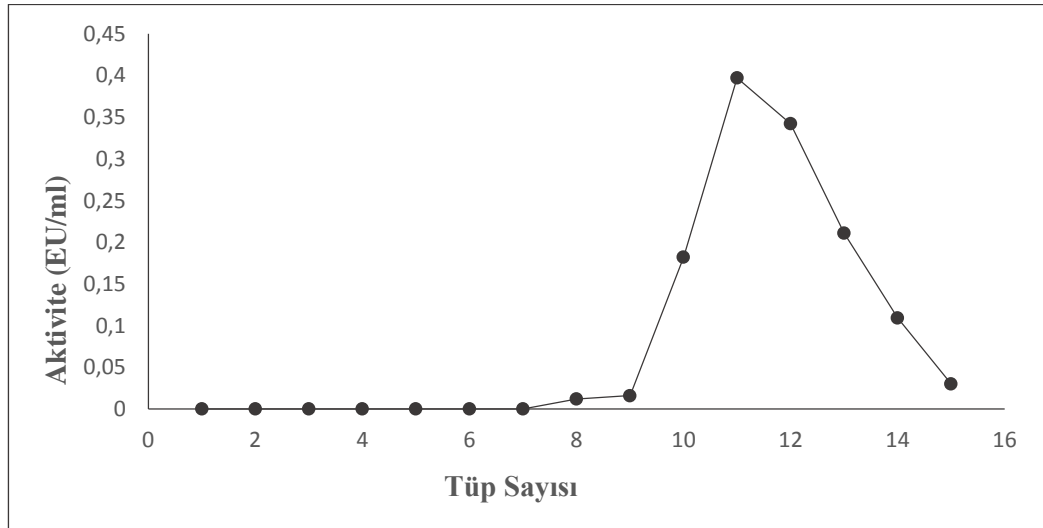
Bölüm 3.2.3.d'de anlatıldığı gibi DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi yapıldı.



Şekil 4.3. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.4. DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

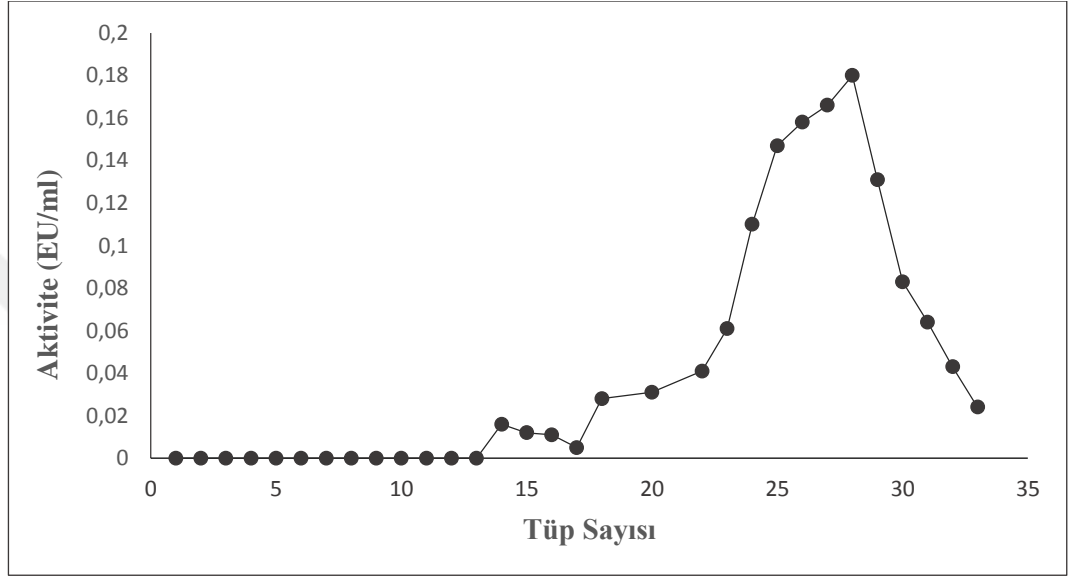
Bölüm 3.2.3.d'de anlatıldığı gibi DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi yapıldı.



Şekil 4.4. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları

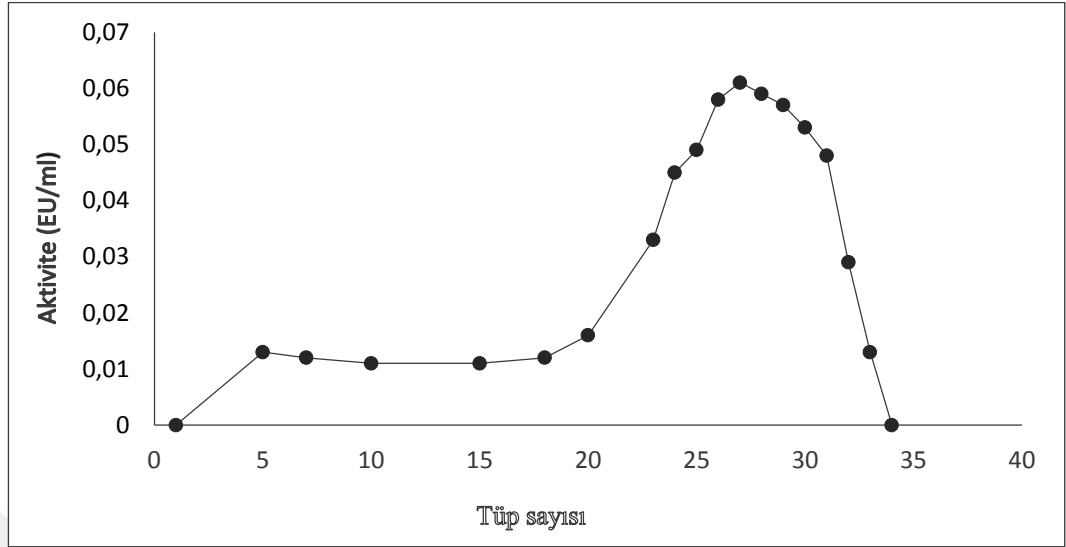
Bölüm 3.2.3.c.'de anlatıldığı gibi jel filtrasyon kromatografisi yapıldı.



Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları

Bölüm 3.2.3.f.'de anlatıldığı gibi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yapıldı.



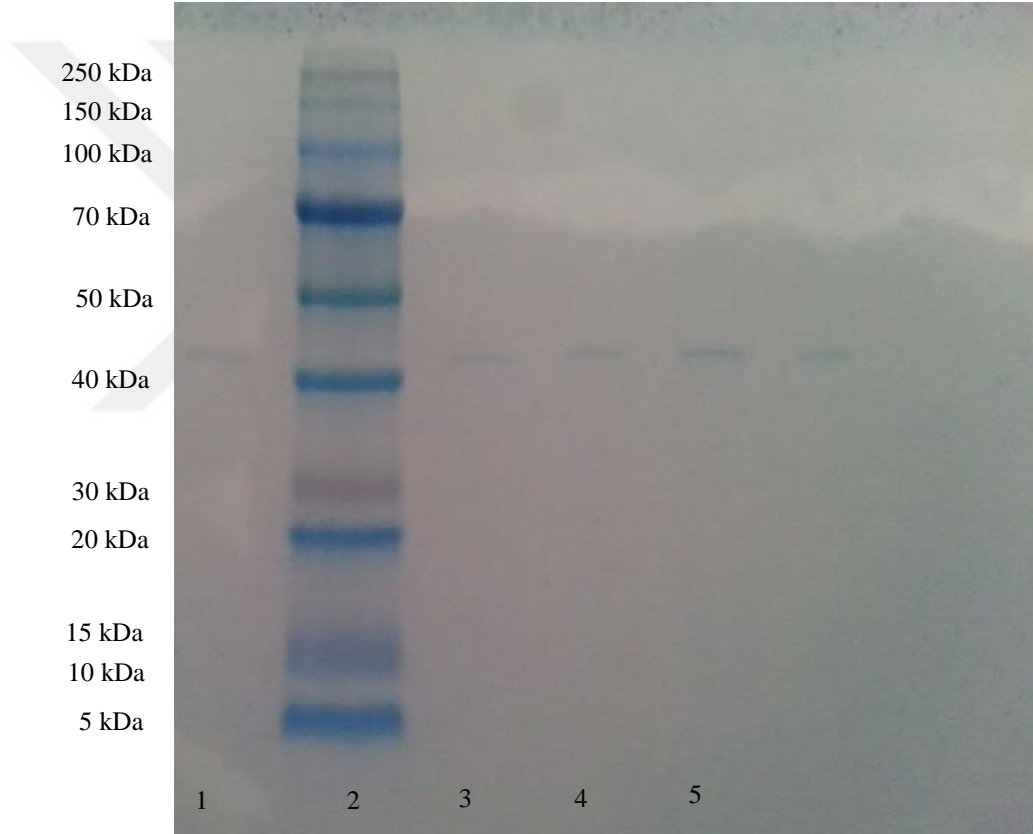
Şekil 4.6. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren grafik

Çizelge 4.1. Keçi böbreği aldoz redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	0,206	2,65	25	5,15	66,25	0,078	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ve Diyaliz	0,273	2,64	8,5	2,32	22,44	0,1	1,3	33,9
1.DEAE İyon Değişim Kromatografisi	0,392	2,63	7	2,75	18,4	0,15	1,9	27,8
2.DEAE İyon Değişim Kromatografisi	0,256	2,01	6,5	1,67	13,1	0,27	3,47	19,8
Jel filtrasyon kromatografisi	0,166	0,442	5	0,83	2,21	0,375	4,8	3,34
Afinite kromatografisi	0,06	0,022	4	0,24	0,088	2,73	35	0,14

4.2.7. Keçi böbreğinden aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Keçi böbreği aldoz redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucunda elde edilen elüatların saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu sebeple bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi elektroforez sistemi kuruldu ve enzim numuneleri sırayla kuyulara yüklenerek yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.7'de gösterildi.

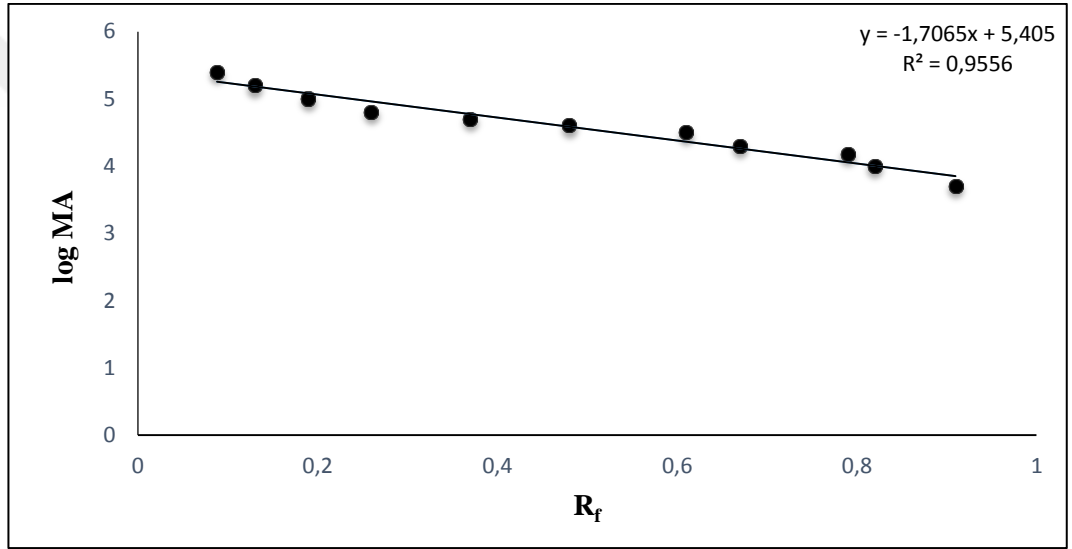


Şekil 4.7. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu standart proteinler (*1. kuyu standart proteinler (Thermo scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 2. ve 3. kuyu Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi.

4.2.8. Keçi böbrek aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütlelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Daha sonra SDS-PAGE’te yürütülen saf enzimin fotoğrafı çekildi (Şekil 4.8) Standart proteinler ve enzim için jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $\log MK-R_f$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.7). Grafikten faydalanarak keçi böbreği aldoz redüktaz enziminin mol kütleleri ise yaklaşık 47 kDa olarak hesaplandı.

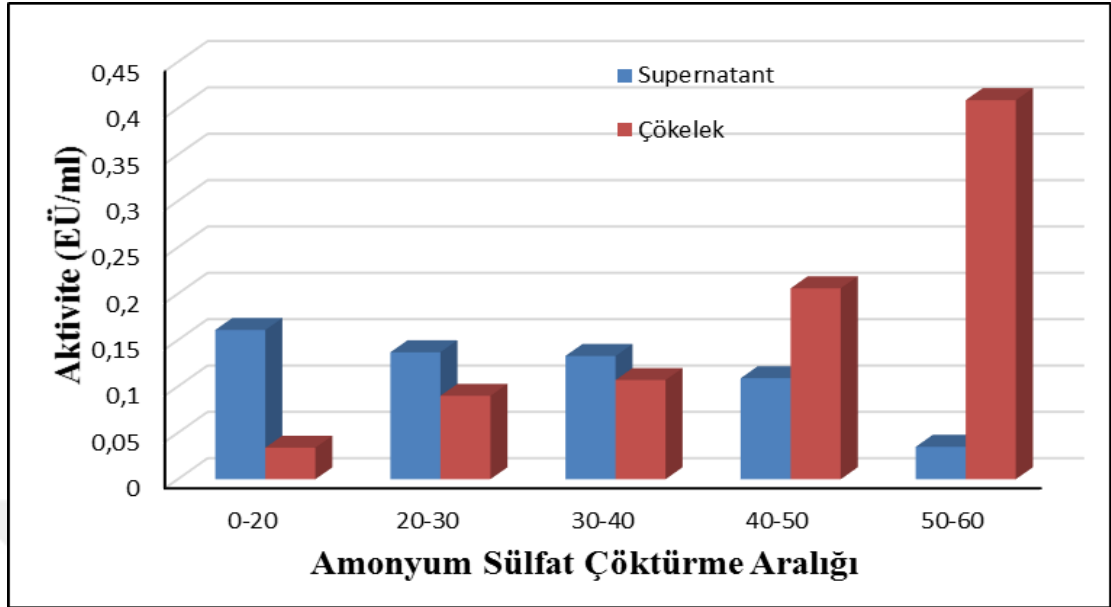


Şekil 4.8. SDS-PAGE sonucu çizilen $\log MA-R_f$ grafiği

4.3. Keçi Böbreğinden SDH Enziminin Saflaştırılması

4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Bölüm 3.2.9.b.’de anlatıldığı gibi amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılarak çöktürme aralığı %40-%60 olarak belirlendi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı.



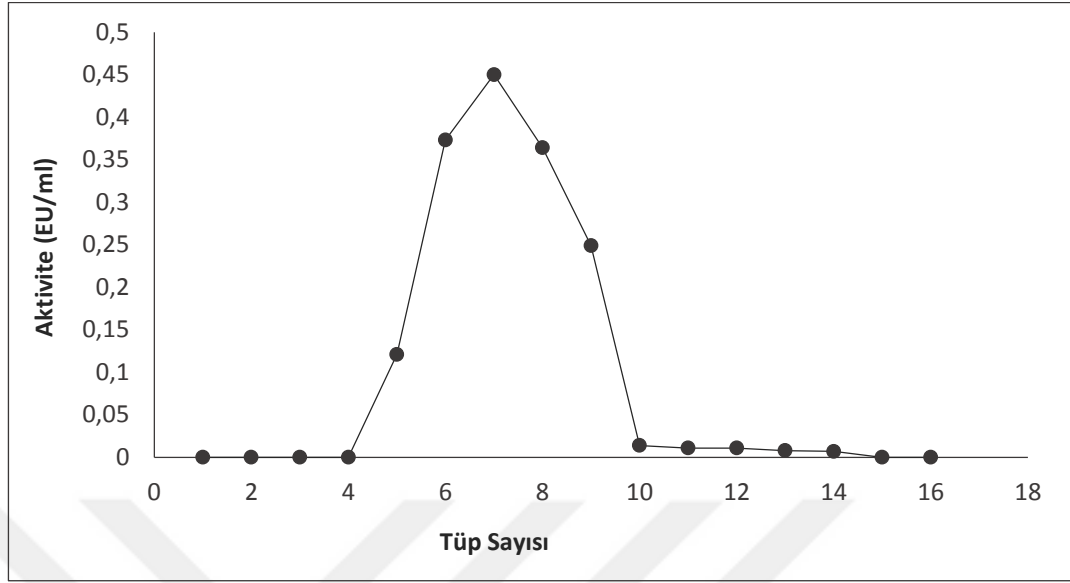
Şekil 4.9. Keçi böbrek SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

4.3.2. Diyaliz

Bölüm 3.2.9.c.'de anlatıldığı gibi diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Uygun diyaliz tamponu kullanılan yöntemle göre her defasında değiştirildi.

4.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçları

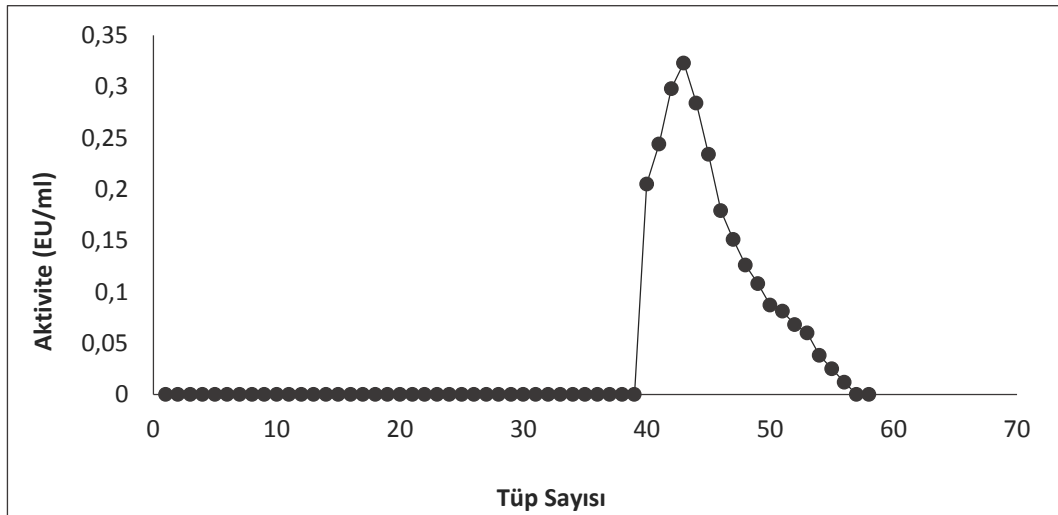
DEAE- sephadex iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.9.d.'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.10. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.4. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

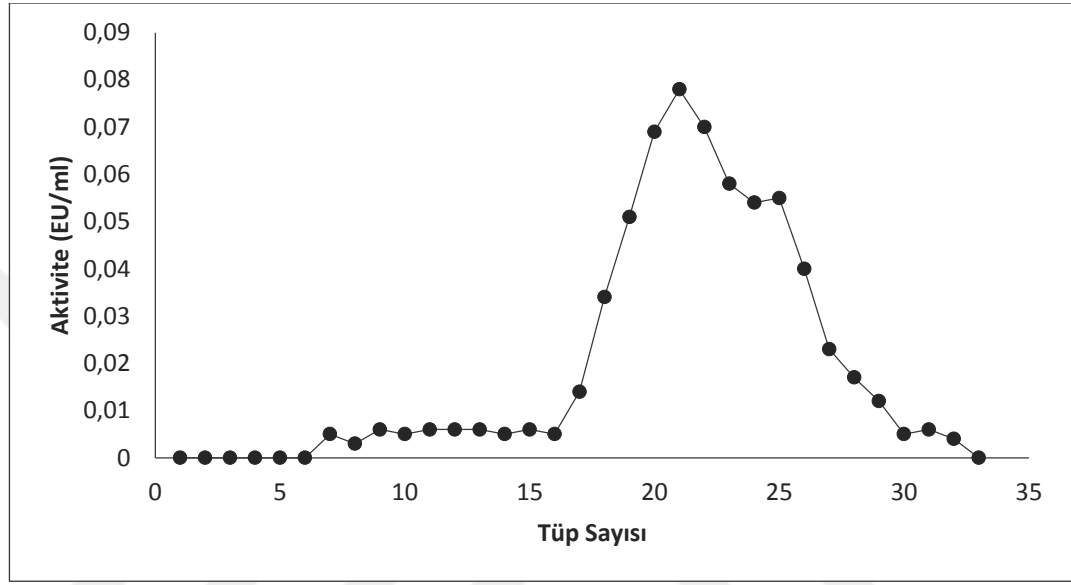
CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi Bölüm 3.2.9.e'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.11. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları

CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi Bölüm 3.2.9.f.'de anlatıldığı gibi yapıldı.



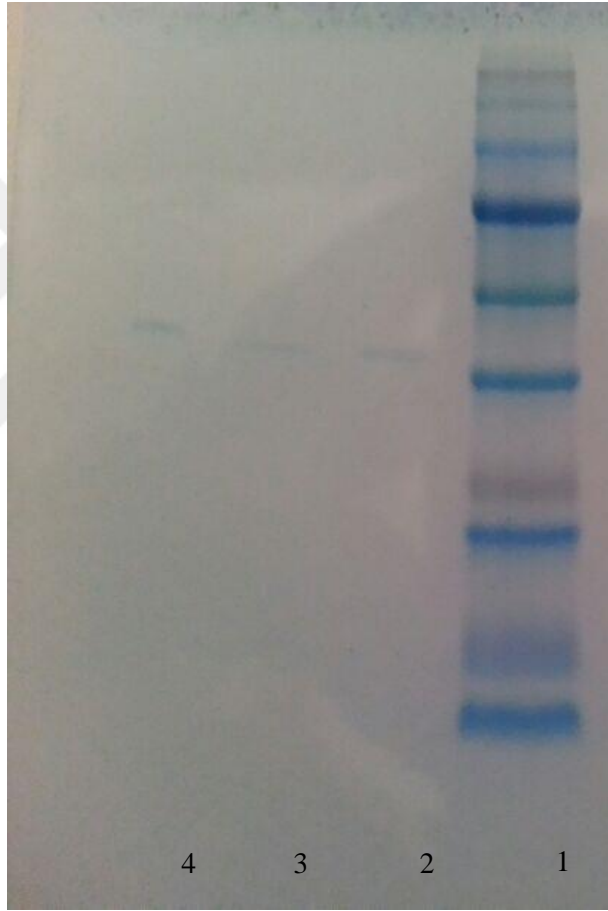
Şekil 4.12. Keçi böbreği Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

Çizelge 4.2. Keçi böbreği SDH enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	%Verim
Homojenat	0,221	1,398	30	6,63	41,94	0,158	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürmesi ve Diyaliz	0,460	0,94	7	3,22	6,58	0,49	3,1	15,69
DEAE İyon Değişim Kromatografisi	0,508	0,254	5	2,54	1,27	2	12,66	3,02
CM iyon değişim Kromatografisi	0,316	0,185	2,5	0,98	0,46	2,13	13,4	1,1
Jel filtrasyon Kromatografisi	0,216	0,011	2	0,432	0,022	19,6	124,05	0,05

4.3.6. Keçi böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Saflaştırma işlemleri sonucu keçi böbreği SDH enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.10'da izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve elektrik alanda yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.12'de gösterildi.

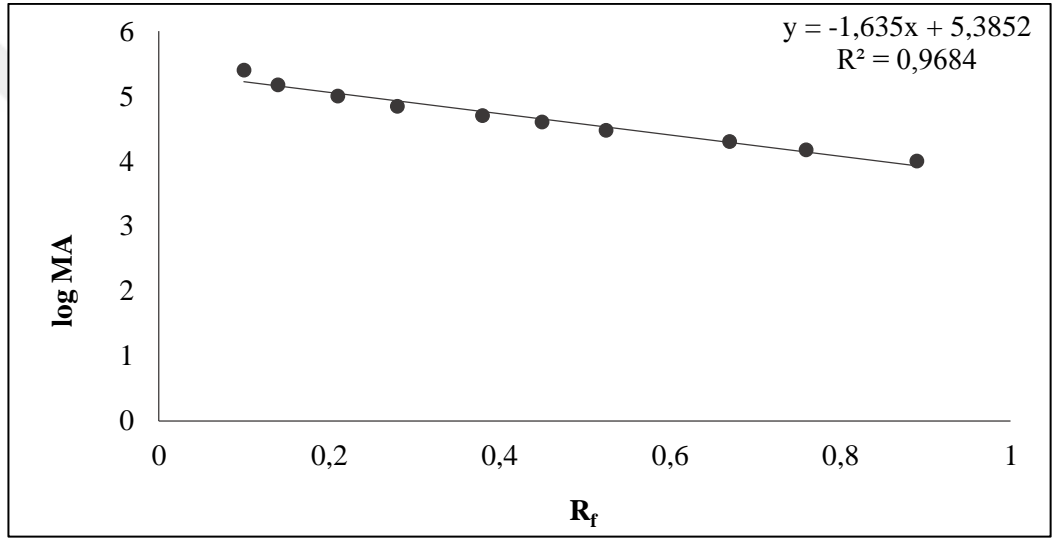


Şekil 4.13. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu standart proteinler (Thermo scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 4. kuyu Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi.

4.3.7. Keçi böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Elde edilen saf enzim SDS-PAGE’te yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.12) Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.13). Grafikten faydalanarak keçi böbreği SDH enziminin mol kütesi yaklaşık 48,11 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.14. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA- R_f grafiği

4.4. Keçi böbreği Aldoz Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

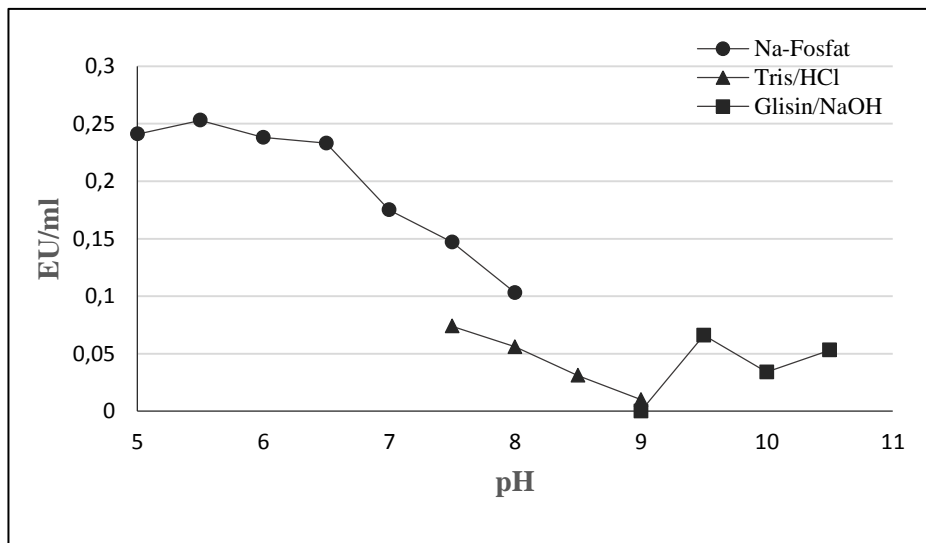
4.4.1. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bölüm 3.2.5.a’da anlatıldığı şekilde; pH’ları 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 800 mM Na-fosfat tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.14 ve

Çizelge 4.3). Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için optimum pH=6,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 800 mM Na-fosfat tamponu kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5	0,241
5,5	0,253
6	0,238
6,5	0,233
7	0,175
7,5	0,147
7,5	0,074
8	0,103
8	0,056
8,5	0,031
9	0,01
9	0
9,5	0,066
10	0,034
10,5	0,053



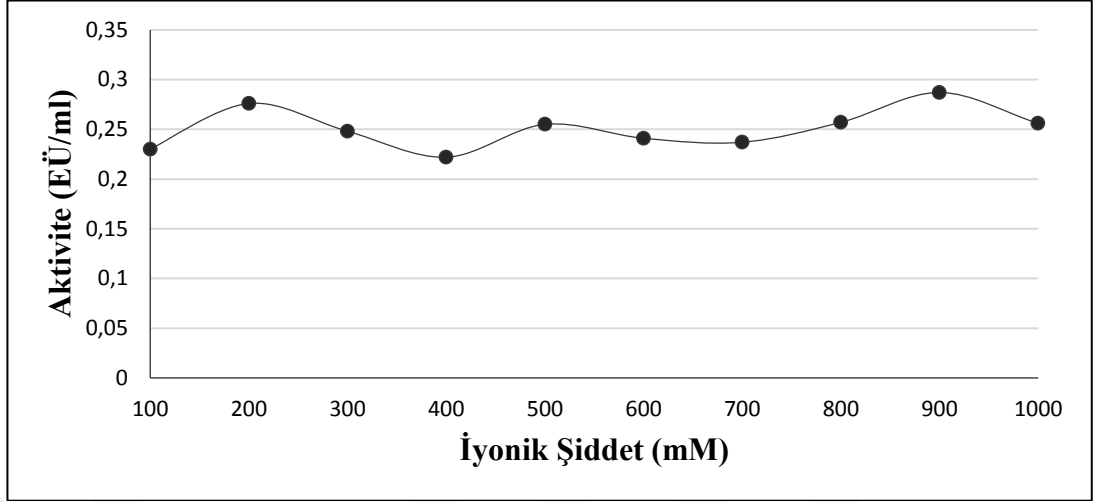
Şekil 4.15. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği

4.4.2. Keçi böbrek aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda uygunluğu belirlenen Na-fosfat tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Na-fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Na-fosfat konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim için en uygun iyonik şiddetin 900 mM Na-fosfat (pH=6,0) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=6,8) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Na-fosfat] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
100	0,23
200	0,276
300	0,248
400	0,222
500	0,255
600	0,241
700	0,237
800	0,257
900	0,287
1000	0,256



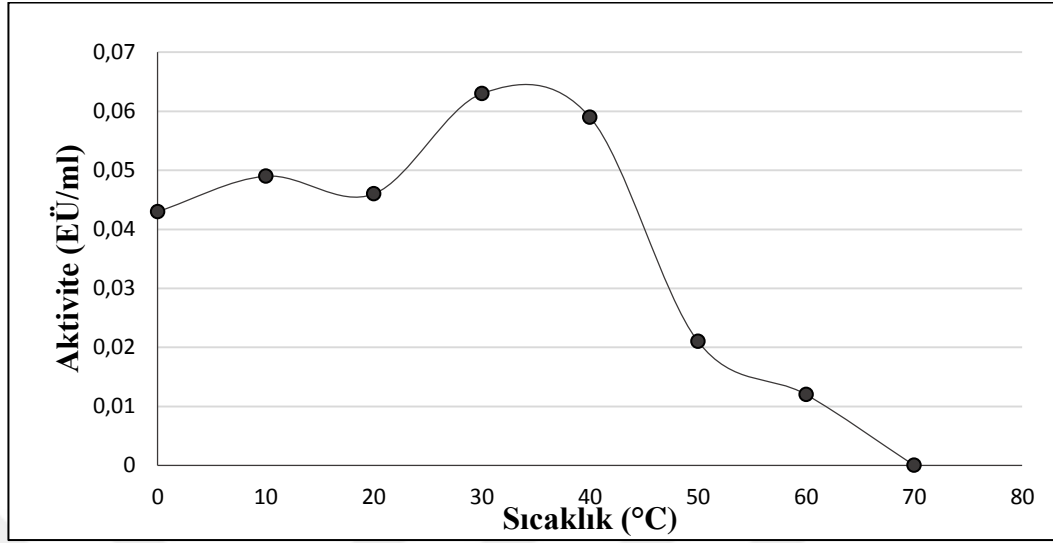
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=6,8) tampon çözeltileri kullanılarak Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.4.3. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 200 mM Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 60°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.5.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da ve Çizelge 4.5'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

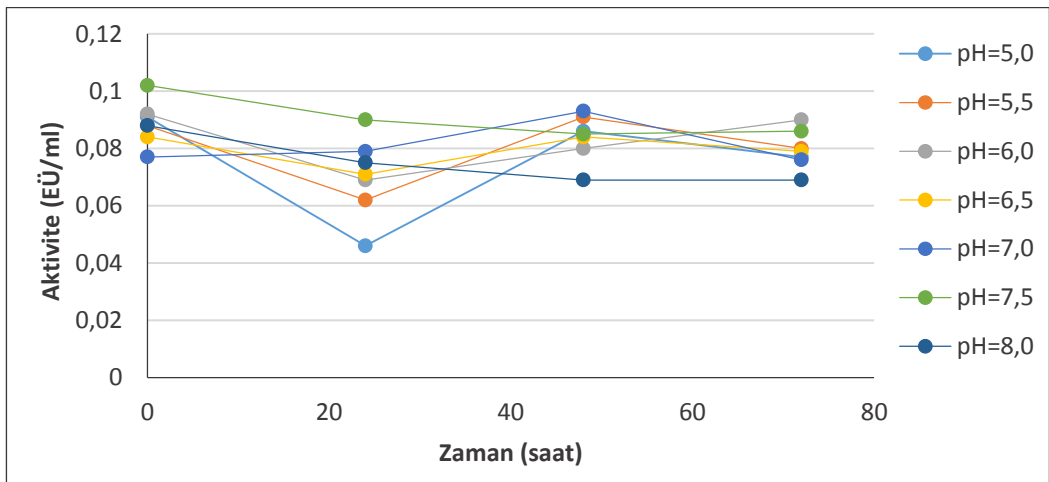
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,043
10	0,049
20	0,046
30	0,063
40	0,059
50	0,021
60	0,012



Şekil 4.17. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.4.4. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

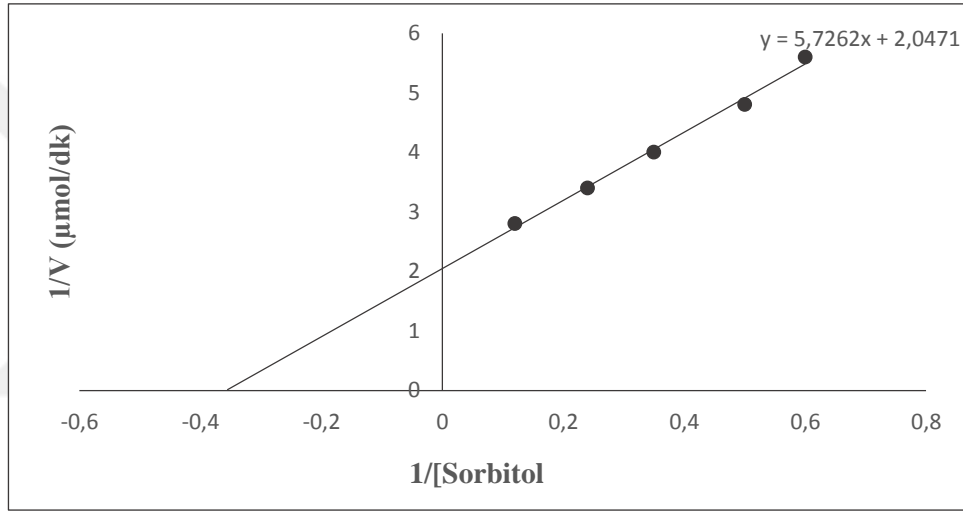
Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin stabil pH'sını belirlemek üzere Bölüm 3.2.5.d'de anlatıldığı gibi stabil pH çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu stabil pH=7,5 olarak tespit edildi.



Şekil 4.18. Değişik pH'lardaki Na-fosfat tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbrek AR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.4.5. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere Bölüm 3.2.5.e’de anlatıldığı gibi K_M - V_{max} çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu K_M 0,18 mM ve V_{max} 0,106 EU/ml olarak tespit edildi.



Şekil 4.19. Keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

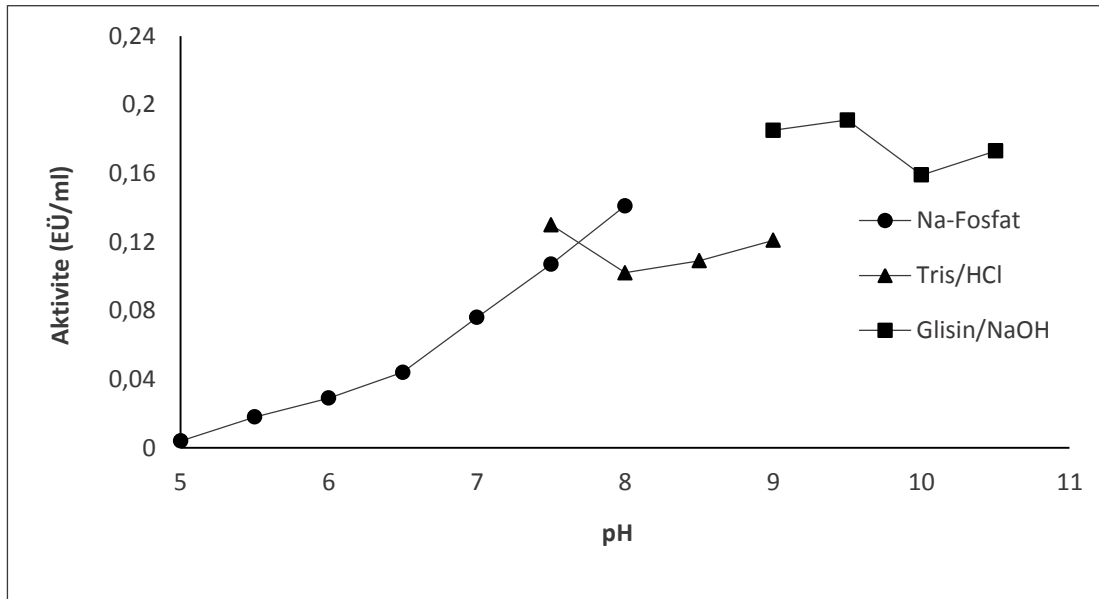
4.5. Keçi Böbrek SDH Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.5.1. Keçi böbrek SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için optimum pH bölüm 3.2.11.a.’da anlatıldığı şekilde; pH’ları 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 40 mM Na-fosfat, pH’ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 40 mM Tris/HCl, pH’ları 9,0, 9,5, 10,0 ve 10,5 olan 40 mM Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.19 ve Çizelge 4.6). Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için optimum pH Glisin/NaOH tamponunda 9,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.6. 40 mM Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5	0,004
5,5	0,018
6	0,029
6,5	0,044
7	0,076
7,5	0,107
7,5	0,13
8	0,141
8	0,102
8,5	0,109
9	0,121
9	0,185
9,5	0,191
10	0,159
10,5	0,173



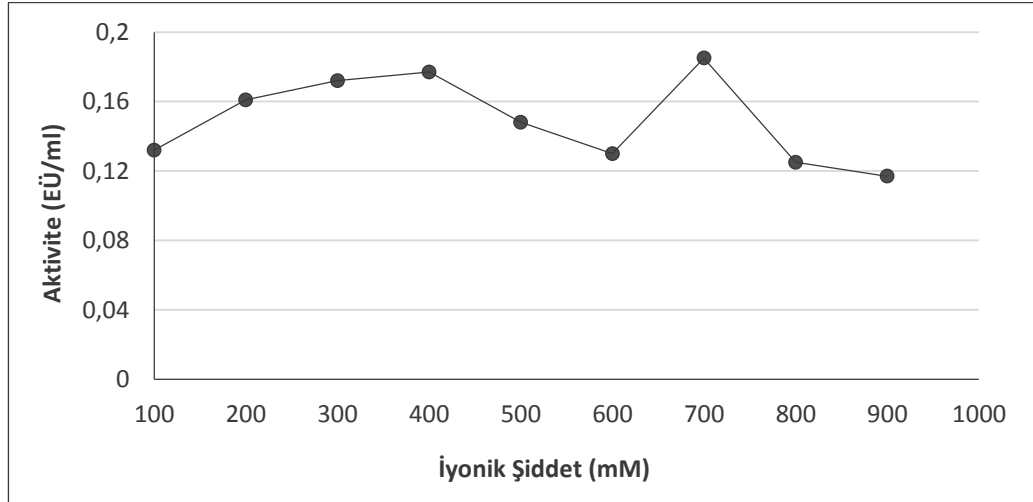
Şekil 4.20. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği

4.5.2. Keçi böbrek SDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Glisin/NaOH tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.11.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı glisin konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak glisin konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için en uygun iyonik şiddetin 25 mM glisin/NaOH (pH=9,5) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.20 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum iyonik şiddeti için Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Glisin/NaOH] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
100	0,142
200	0,161
300	0,172
400	0,177
500	0,148
600	0,130
700	0,185
800	0,125
900	0,117
1000	0,181



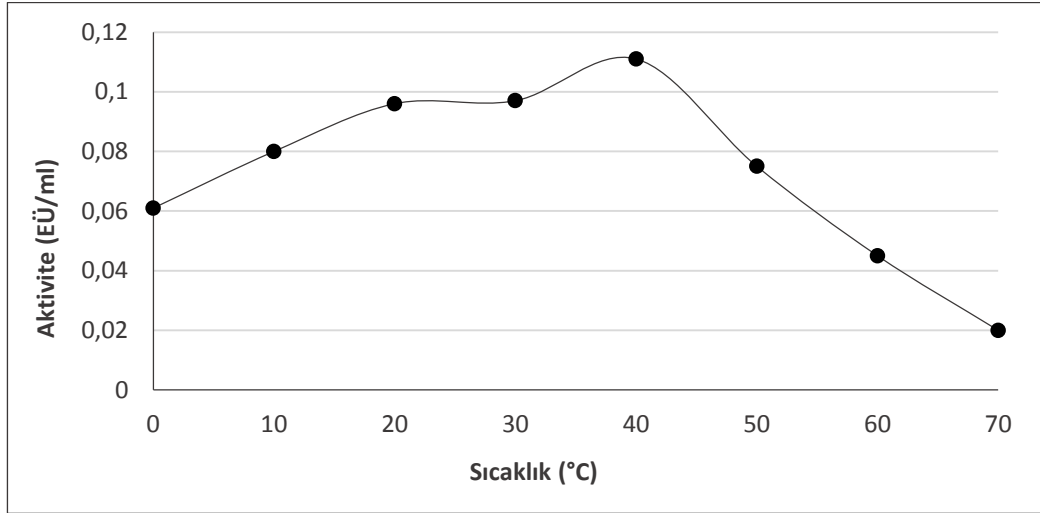
Şekil 4.21. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.5.3. Keçi böbreği SDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 25 mM Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 80°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.11.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.8. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

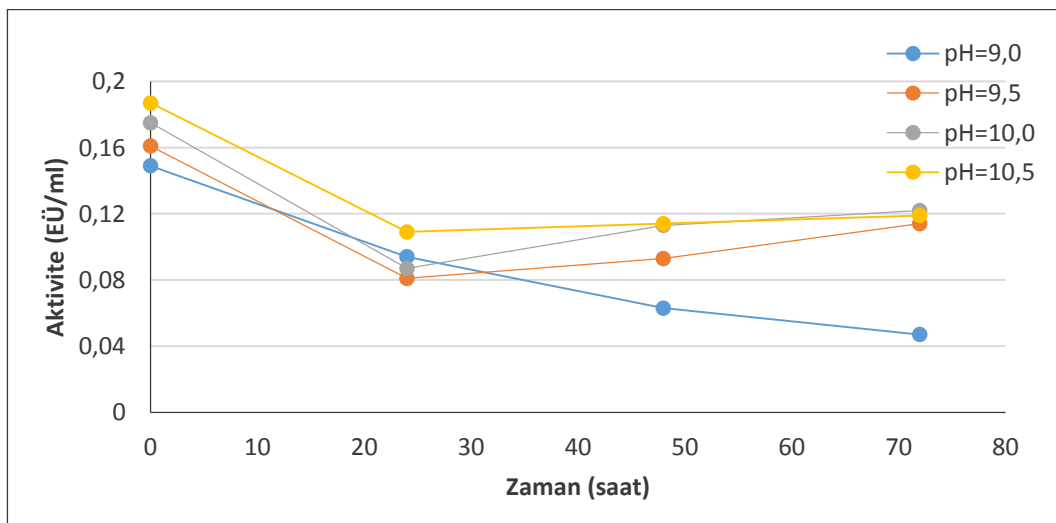
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,061
10	0,080
20	0,096
30	0,097
40	0,111
50	0,075
60	0,045
70	0,020



Şekil 4.22. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.5.4. Keçi böbreği SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

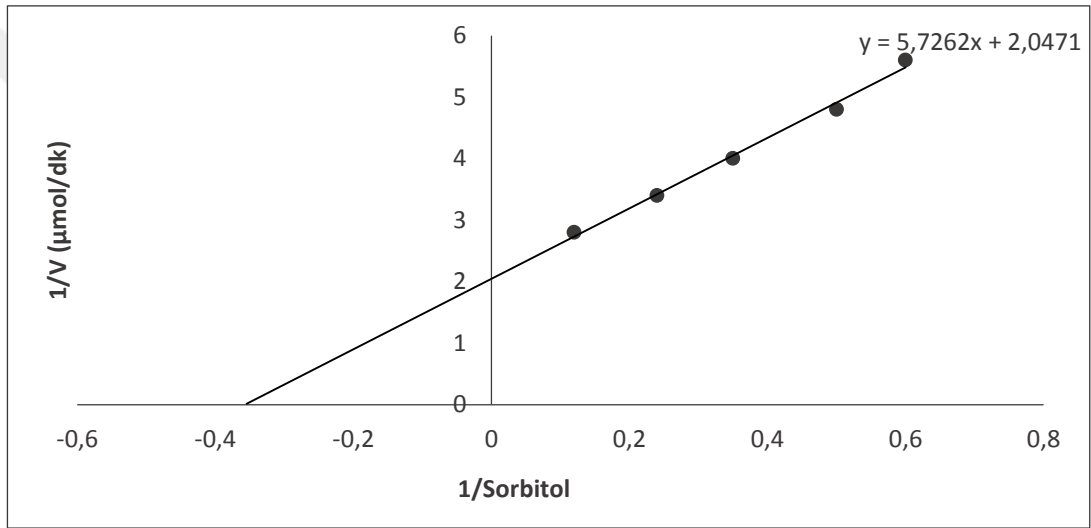
Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin stabil pH'sını belirlemek üzere bölüm 3.2.11.d.'de anlatıldığı gibi stabil pH çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te gösterildi. Bu çalışmalar sonucu stabil pH=10,5 olarak tespit edildi.



Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak keçi böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.5.5. Keçi böbrek SDH enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere bölüm 3.2.11.e.'de anlatıldığı gibi K_M - V_{max} çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.25'te gösterildi. Bu çalışmalar sonucu K_M 2,8 mM ve V_{max} 0,49 EU/ml olarak tespit edildi.



Şekil 4.24. Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin için 5 farklı sorbitol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

4.6. Keçi Böbrek Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve yok edilmesine inhibisyon denir. Buna neden olan bileşiklere ise inhibitör adı verilir (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

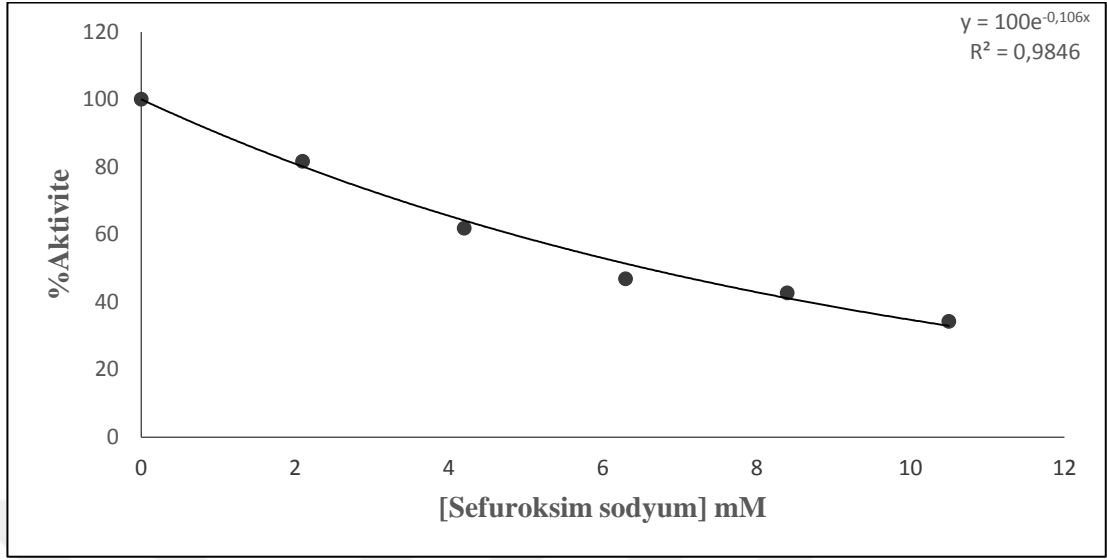
Yarışmalı inhibisyonda yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Fakat enzime dönüşümlü bağlanan inhibitörün substrat konsantrasyonu artırıldığı durumlarda

inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Başka bir söylemle enzimin V_{max} değeri değişmezken K_M değerinde artış gözlenir (Segel *et al.* 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ile substrat arasında enzimin aktif bölgesine bağlanma hususunda bir yarış söz konusu değildir. Çünkü inhibitör enzimin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için $K_M I = K_M (1 + [I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max} I = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Bu çalışma kapsamında keçi böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.9. Keçi böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi

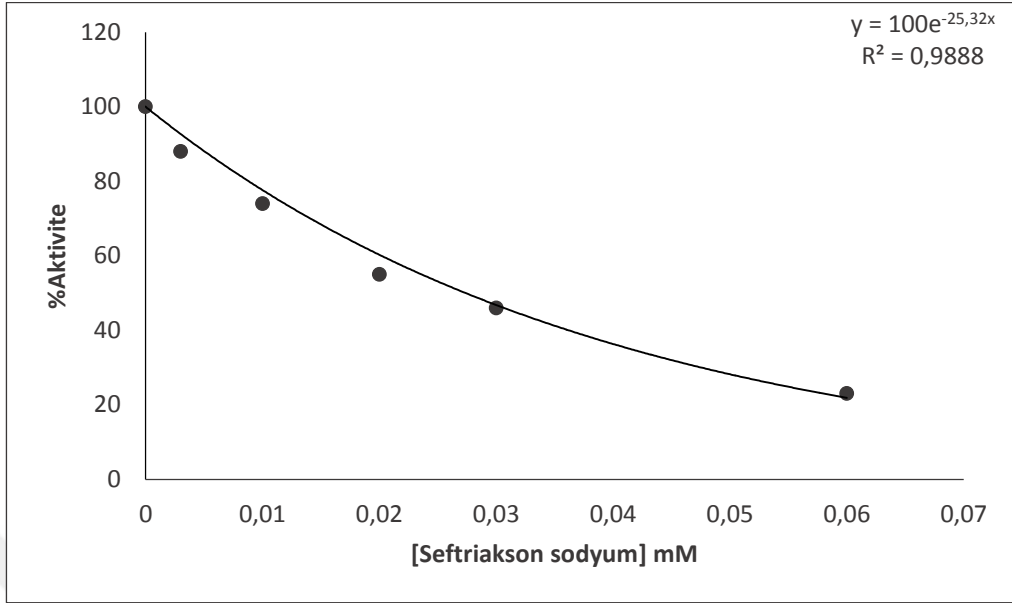
%Aktivite	[Sefuroksim Sodyum] mM
100	0
81,58	2,1
61,84	4,2
46,84	6,3
42,63	8,4
34,21	10,5



Şekil 4.25. Sefuroksim Sodyum'un keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.10. Keçi böbreği aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Seftriakson sodyum'un etkisi

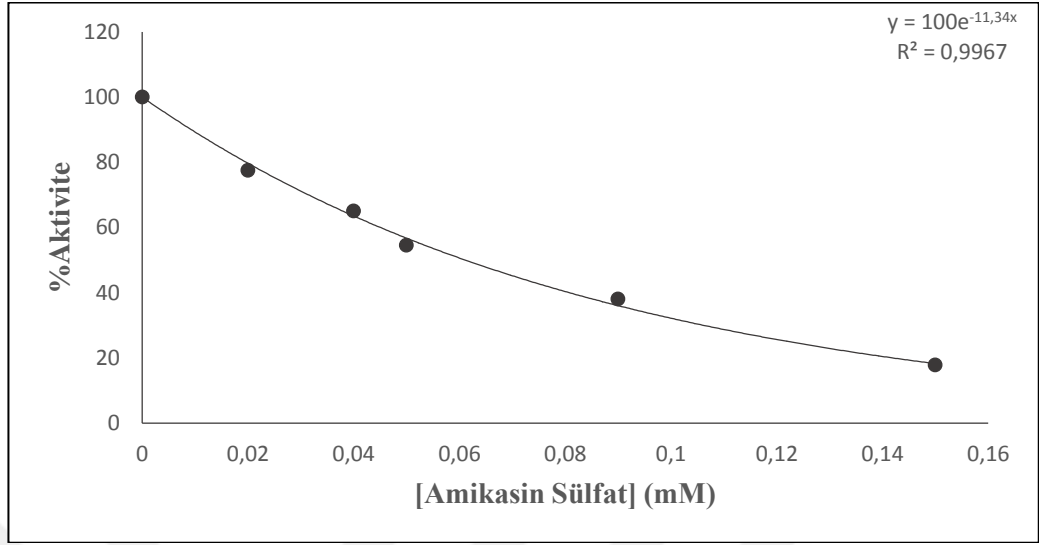
%Aktivite	[Seftriakson Sodyum] mM
100	0
88	0,003
74	0,01
55	0,02
46	0,03
23	0,06



Şekil 4.26. Seftriakson'un Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.11. Keçi böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi

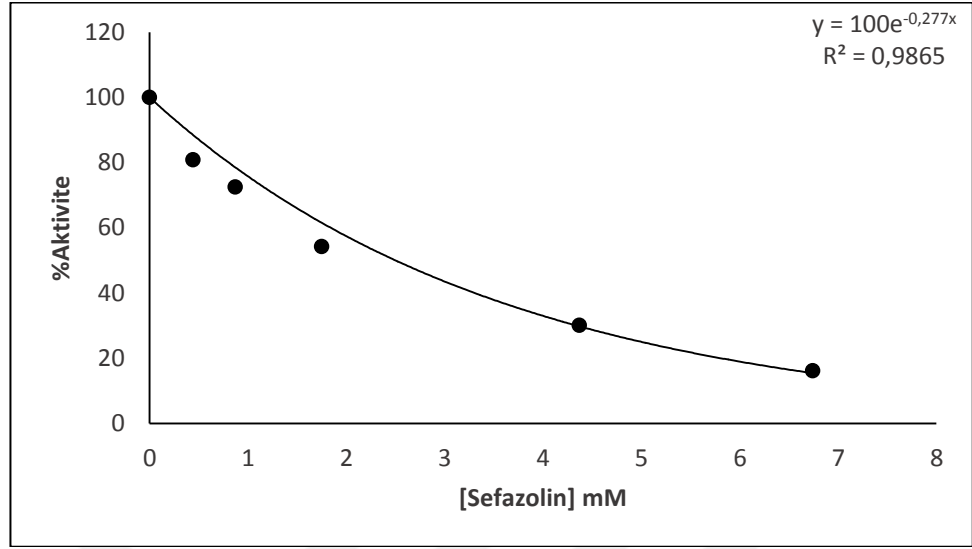
%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
77,51	0,02
65	0,04
54,57	0,05
38,05	0,09
17,84	0,15



Şekil 4.27. Amikasin Sulfat'ın keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.12. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin'in etkisi

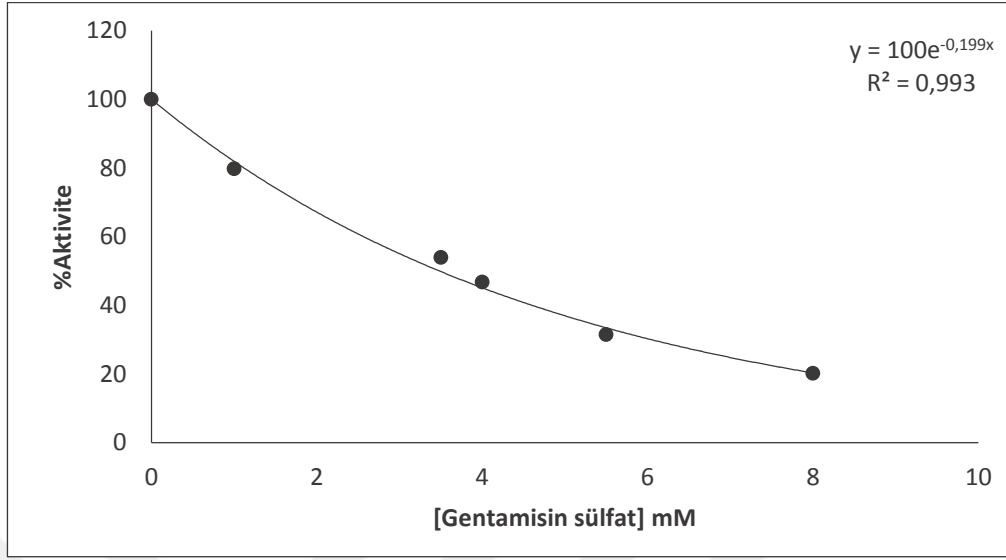
%Aktivite	[Sefazolin] mM
100	0
80,86	0,44
72,52	0,87
54,25	1,75
30,03	4,37
16,09	6,74



Şekil 4.28. Sefazolin'in keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.13. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Gentamisin sülfat'ın etkisi

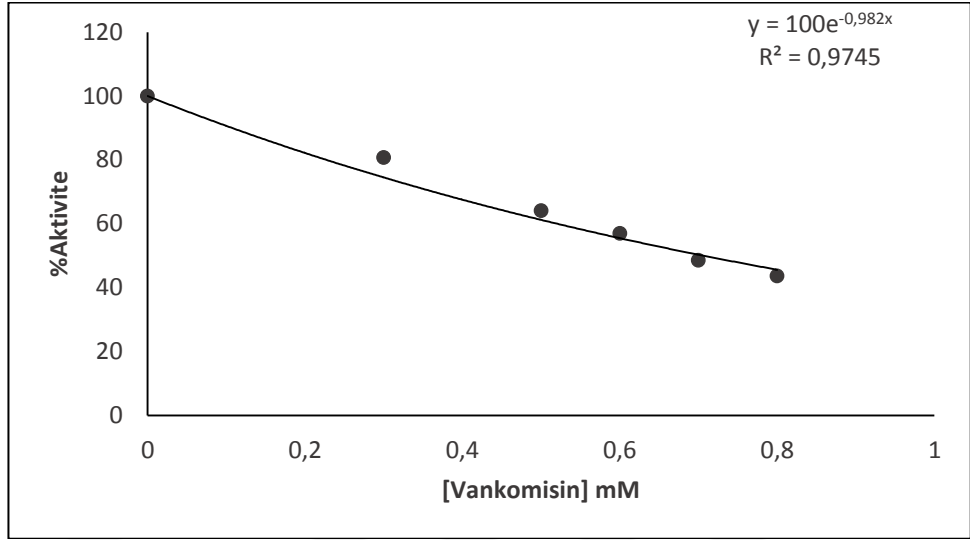
%Aktivite	[Gentamisin Sülfat] mM
100	0
79,78	1
53,93	3,5
46,82	4
31,46	5,5
20,22	8



Şekil 4.29. Gentamisin sülfat'ın keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.14. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Vankomisin'in etkisi

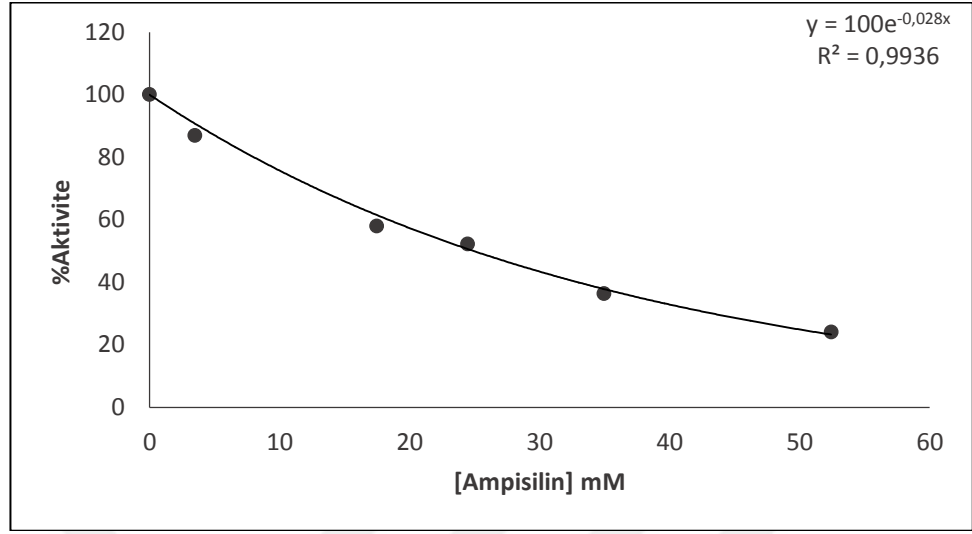
%Aktivite	[Vankomisin] mM
100	0
80,67	0,3
64,05	0,5
56,95	0,6
48,48	0,7
43,57	0,8



Şekil 4.30. Vankomisin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.15. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ampisilin'in etkisi

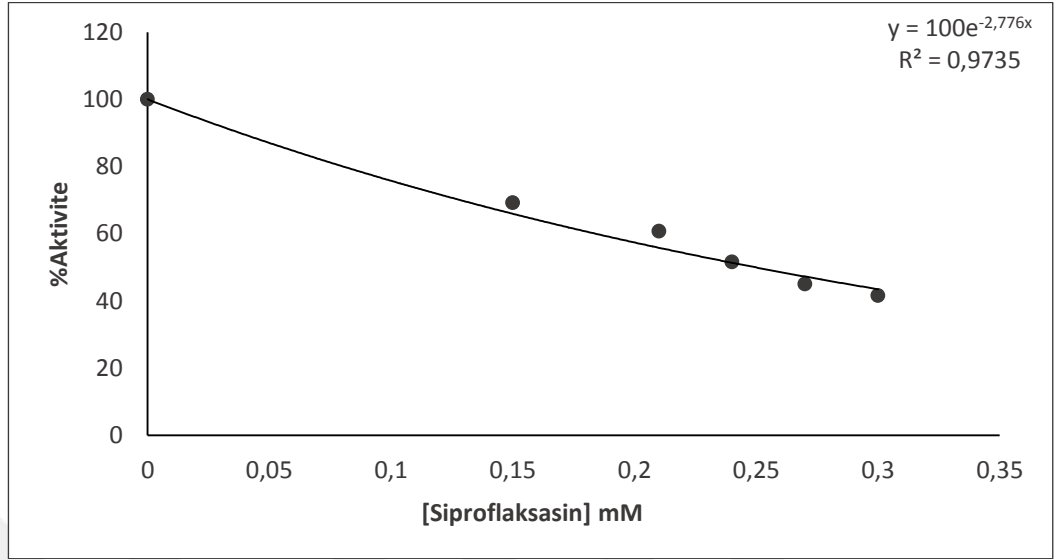
%Aktivite	[Ampisilin] mM
100	0
86,93	3,49
57,98	17,47
52,27	24,46
36,36	34,94
24,09	52,41



Şekil 4.31. Ampisilin'in keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.16. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi

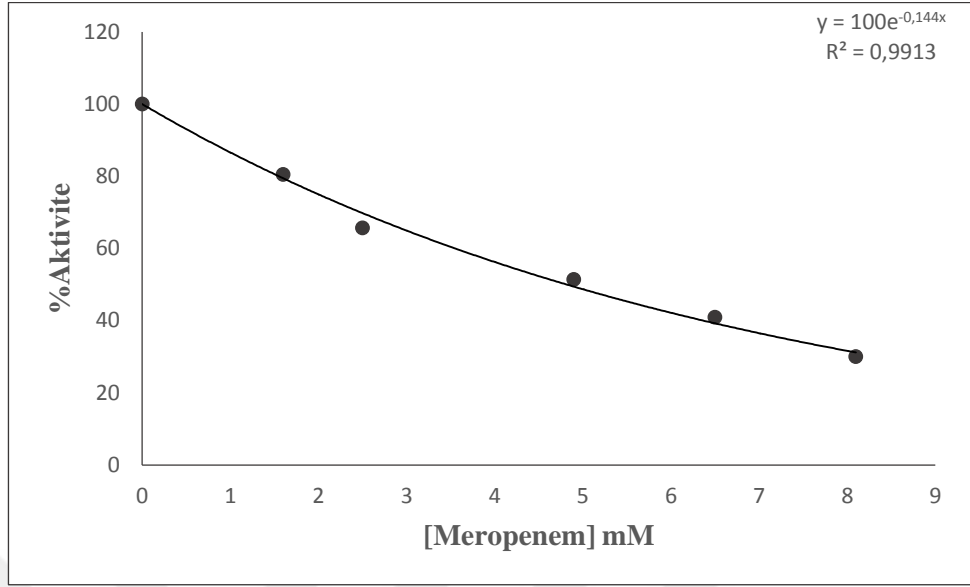
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
69,2	0,15
60,76	0,21
51,57	0,24
45,06	0,27
41,63	0,3



Şekil 4.32. Siprofloksasin'in keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.17. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Meropenem'in etkisi

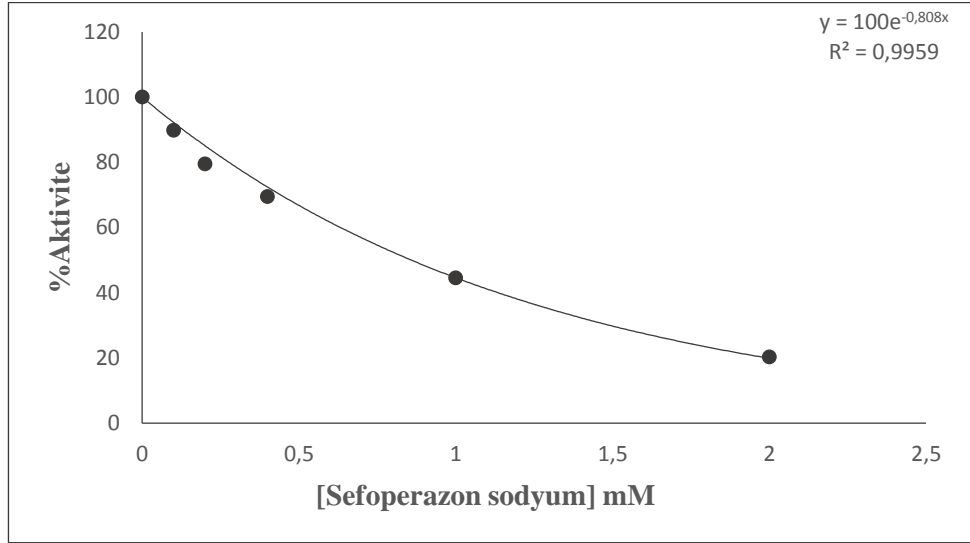
%Aktivite	[Meropenem] mM
100	0
80,45	1,6
65,64	2,5
51,36	4,9
40,91	6,5
30	8,1



Şekil 4.33. Meropenem'in keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.18. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefoperazon Sodyum'un etkisi

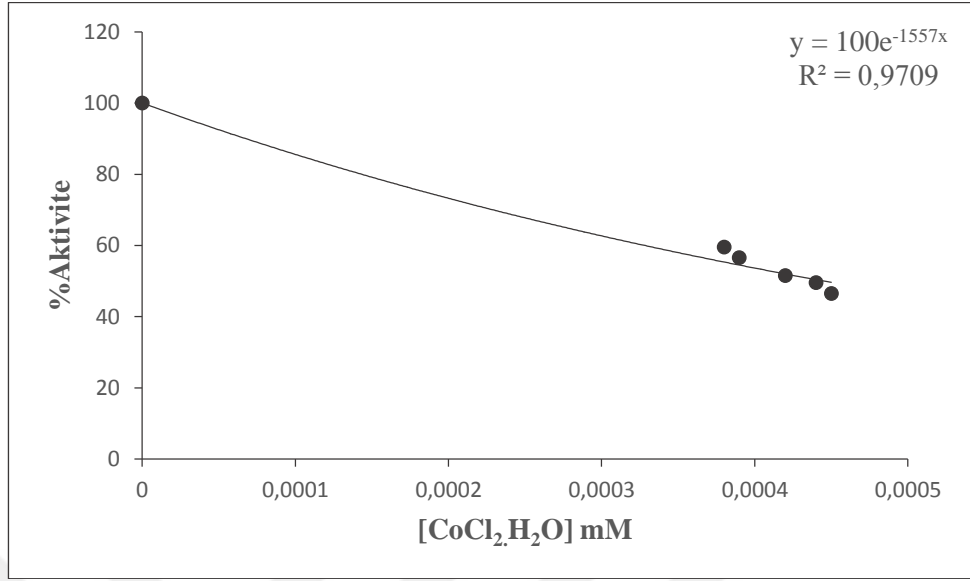
%Aktivite	[Sefoperazon sodyum] mM
100	0
89,75	0,1
79,49	0,2
69,48	0,4
44,52	1
20,22	2



Şekil 4.34. Sefoperazon sodyum'un keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.19. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'nun etkisi

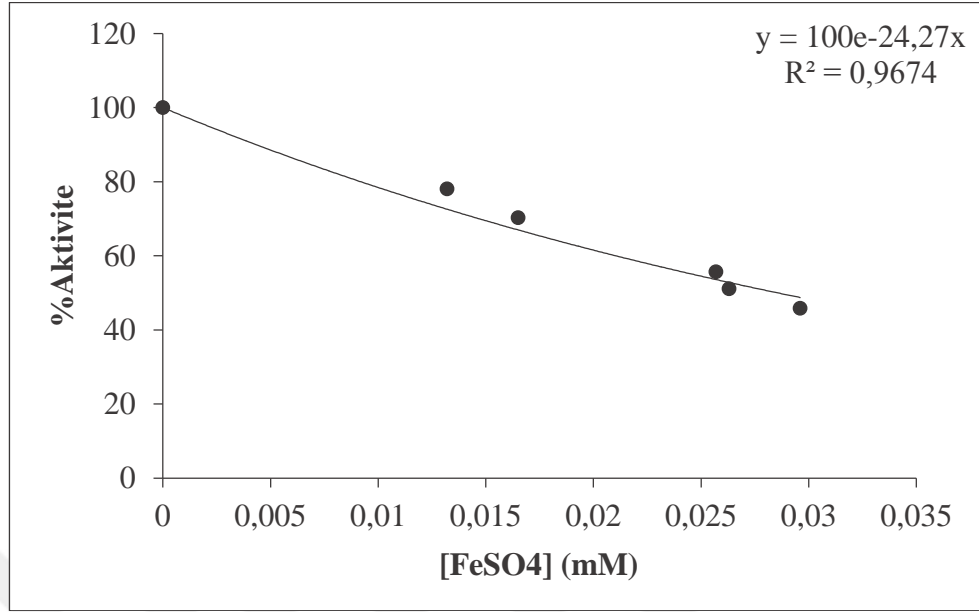
%Aktivite	$[\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ mM
100	0
59,5	0,00038
56,5	0,00039
51,5	0,00042
49,5	0,00044
46,5	0,00045



Şekil 4.35. $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.20. Keçi böbrek aldöz redüktaz enzim aktivitesi üzerine FeSO_4 'ın etkisi

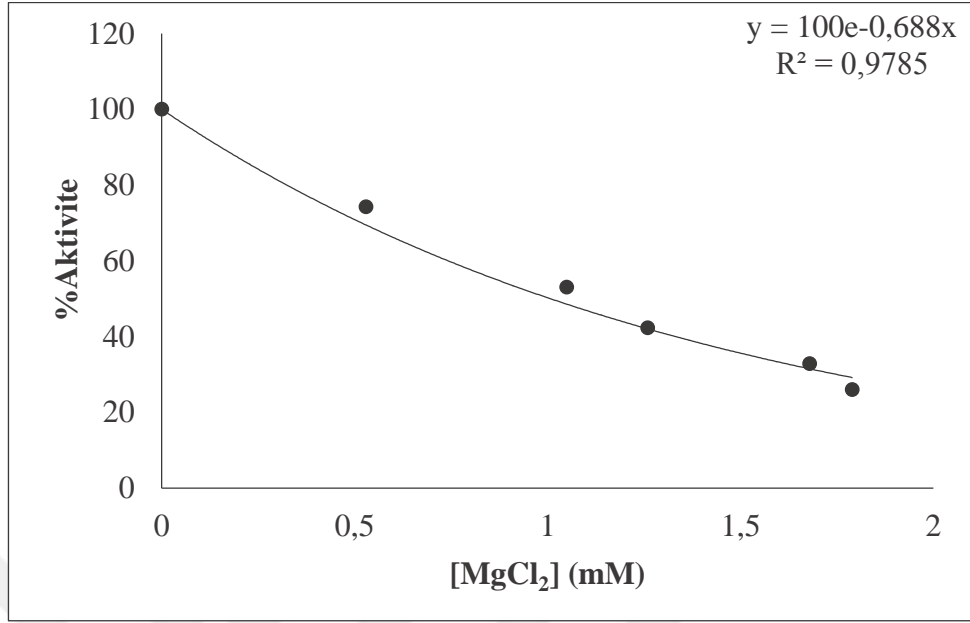
%Aktivite	[FeSO ₄] mM
100	0
78,01	0,0132
70,31	0,0165
55,67	0,0257
51,09	0,0263
45,79	0,0296



Şekil 4.36. FeSO₄'ün keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.21. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine MgCl₂'ün etkisi

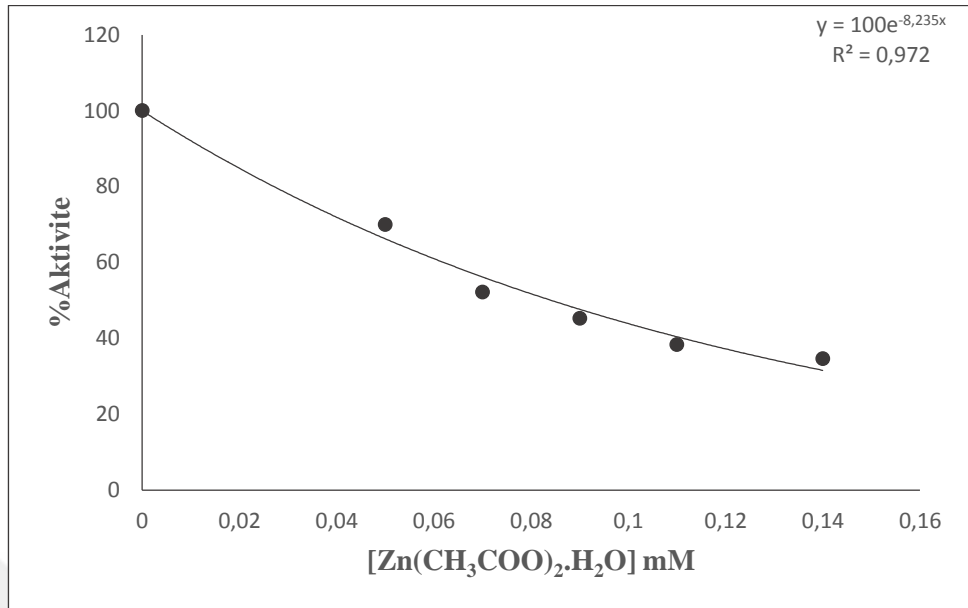
%Aktivite	[MgCl ₂] mM
100	0
74,23	0,53
53	1,05
42,31	1,26
32,85	1,68
26	1,79



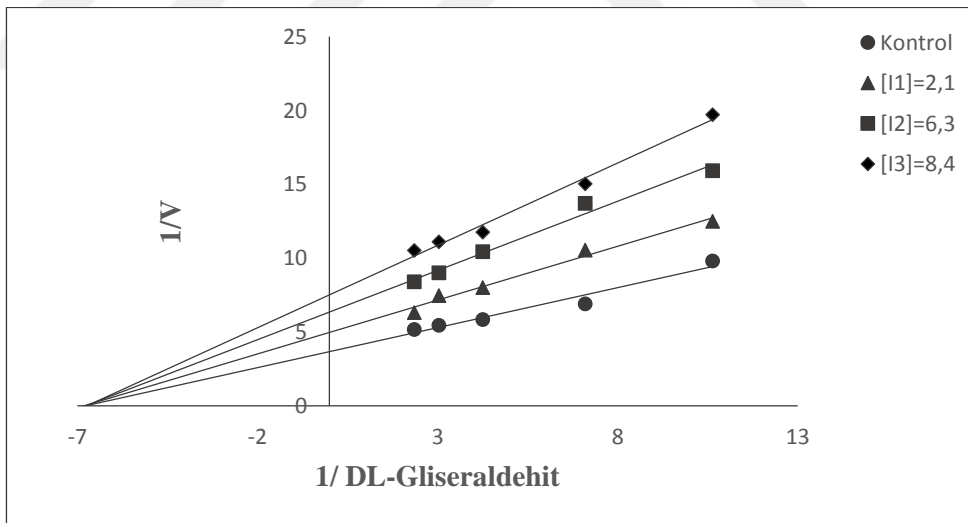
Şekil 4.37. MgCl₂'ün keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.22. Keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Zn(CH₃COO)₂.H₂O'nun etkisi

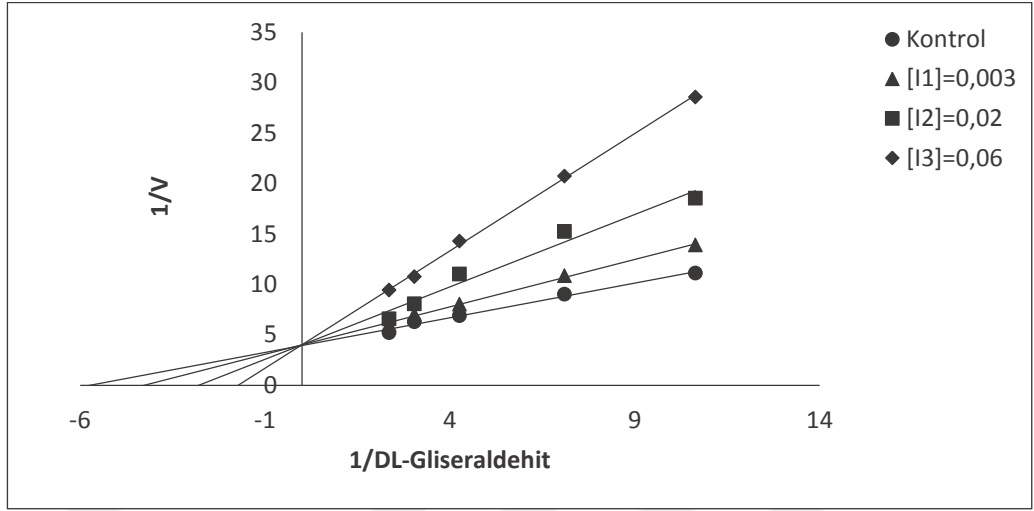
%Aktivite	[Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O] mM
100	0
70	0,05
52,2	0,07
45,28	0,09
38,36	0,11
34,59	0,14



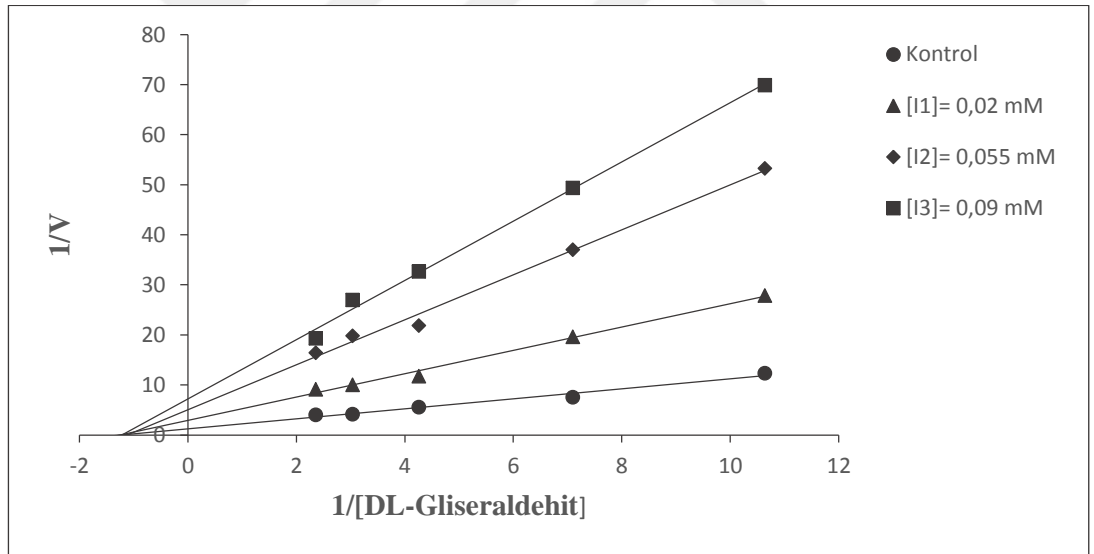
Şekil 4.38. Zn(CH₃COO)₂.H₂O'nun keçi böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



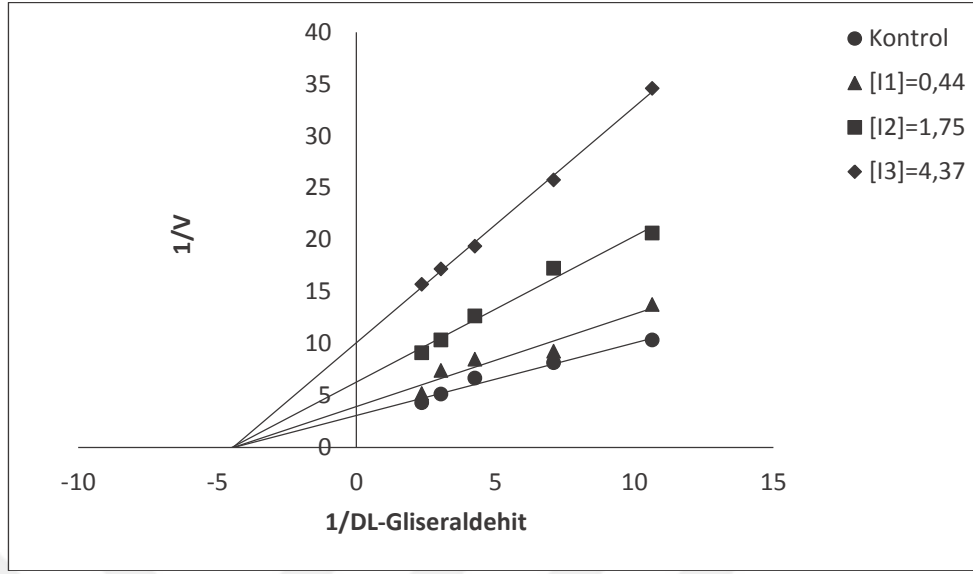
Şekil 4.39. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefuroksim'in Lineweaver-Burk grafiği



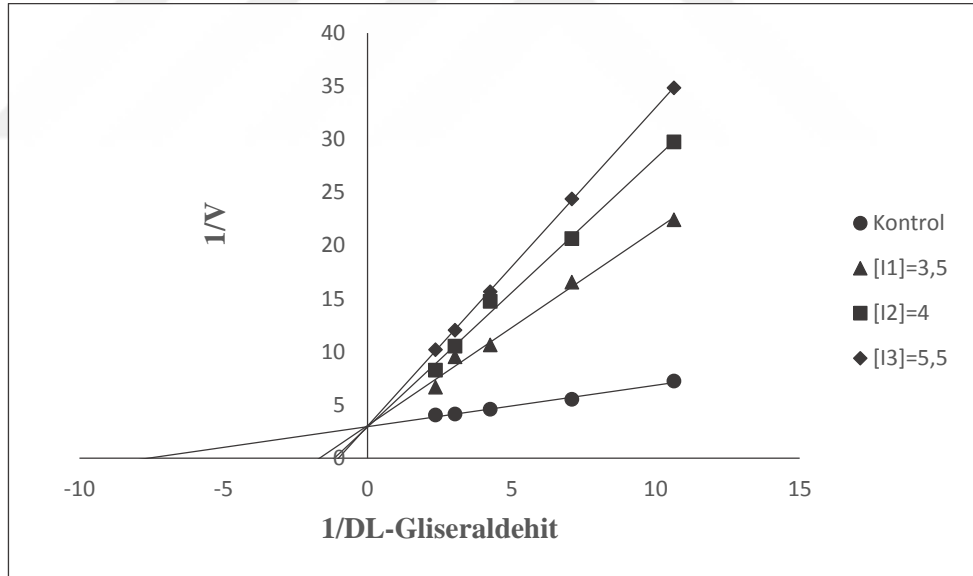
Şekil 4.40. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Seftriakson Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



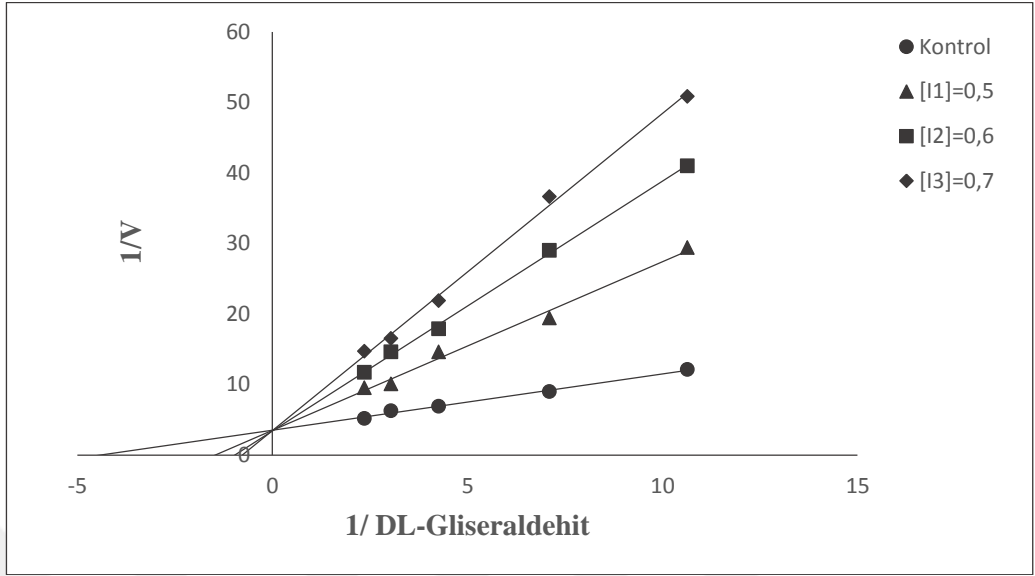
Şekil 4.41. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Amikasin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği



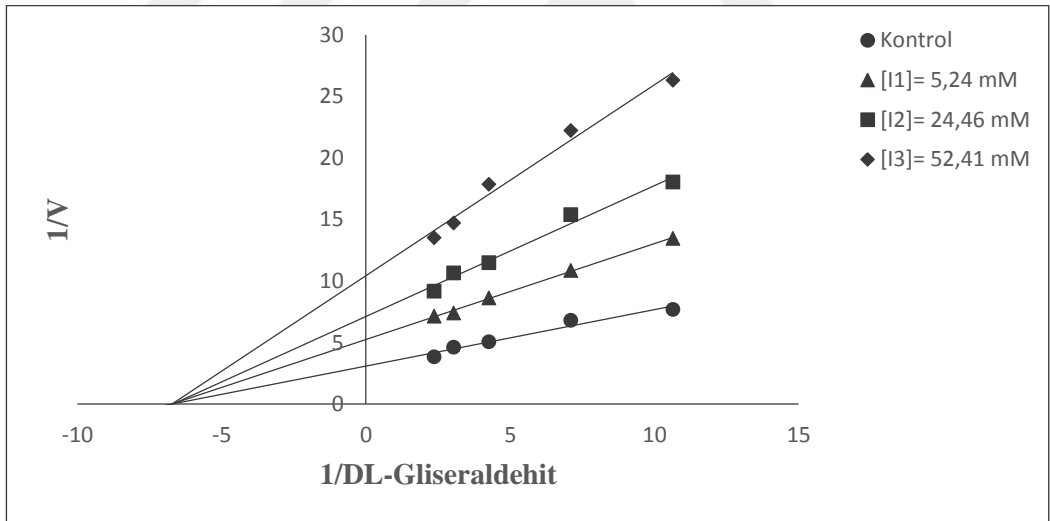
Şekil 4.42. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği



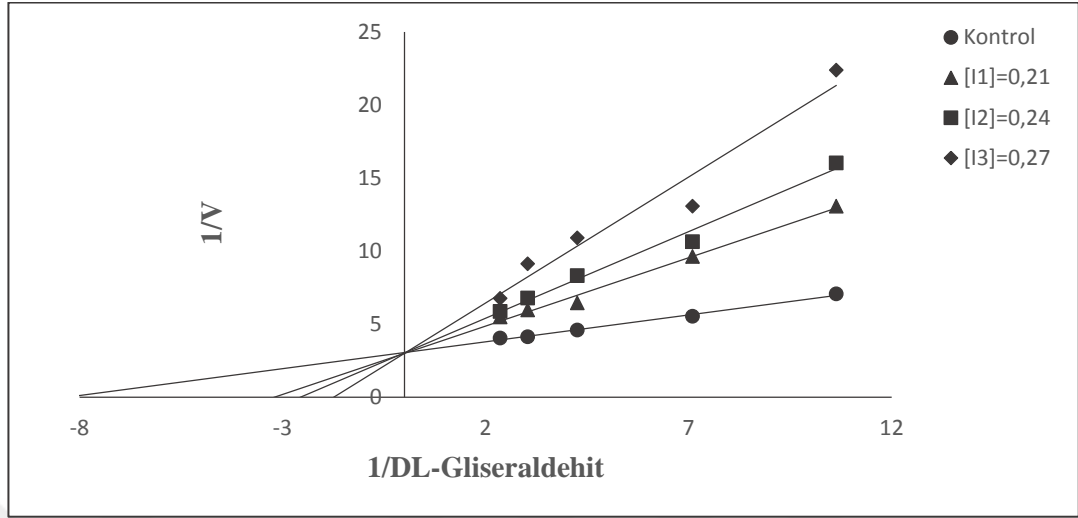
Şekil 4.43. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Gentamisin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği



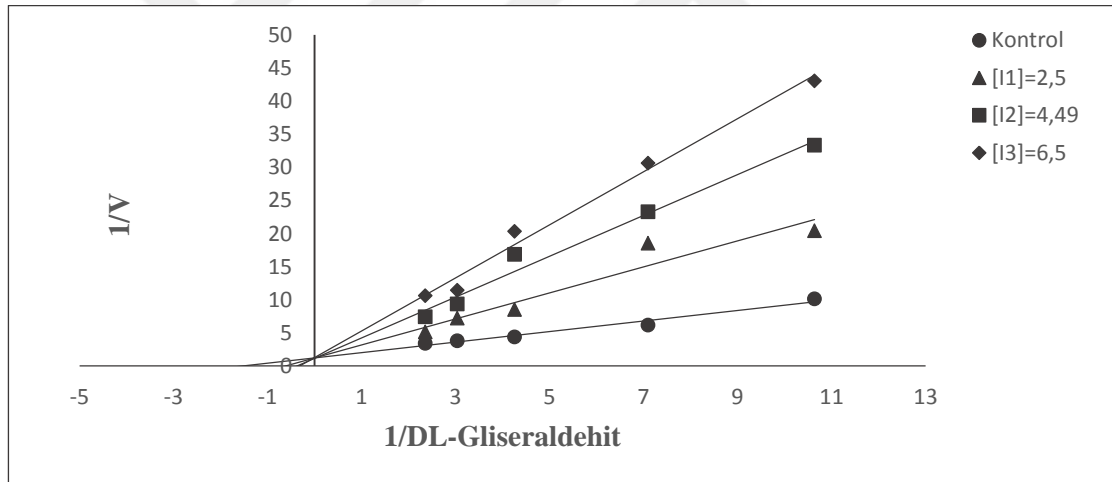
Şekil 4.44. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Vankomisin'in Lineweaver-Burk grafiği



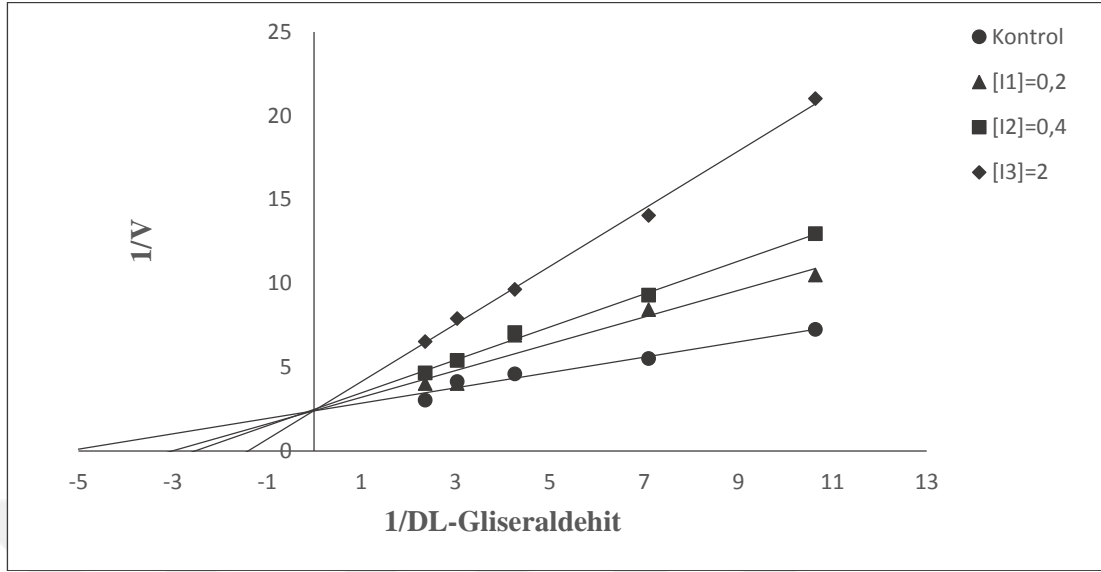
Şekil 4.45. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği



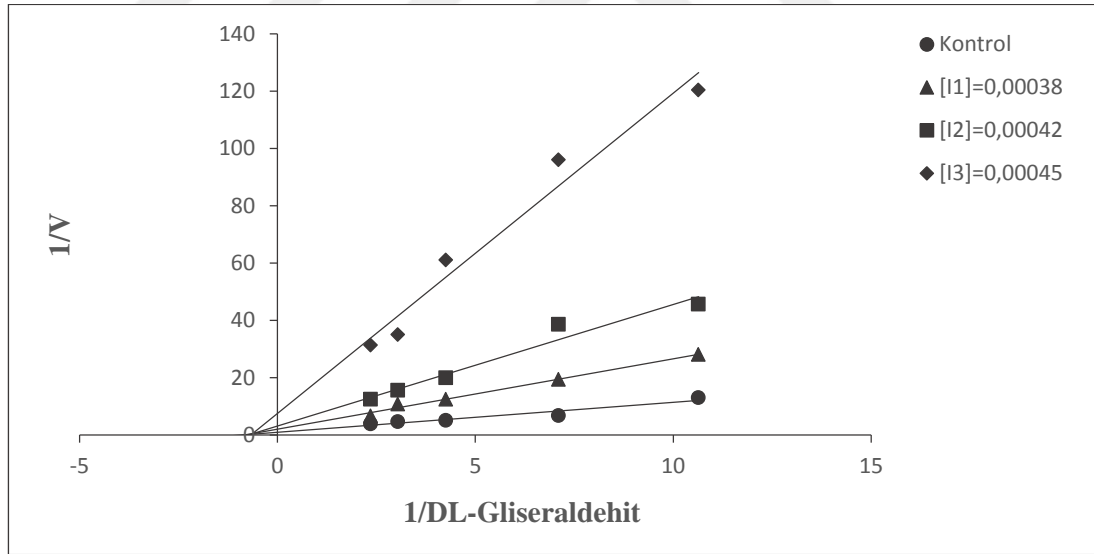
Şekil 4.46. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Siproflaksasin'in Lineweaver-Burk grafiği



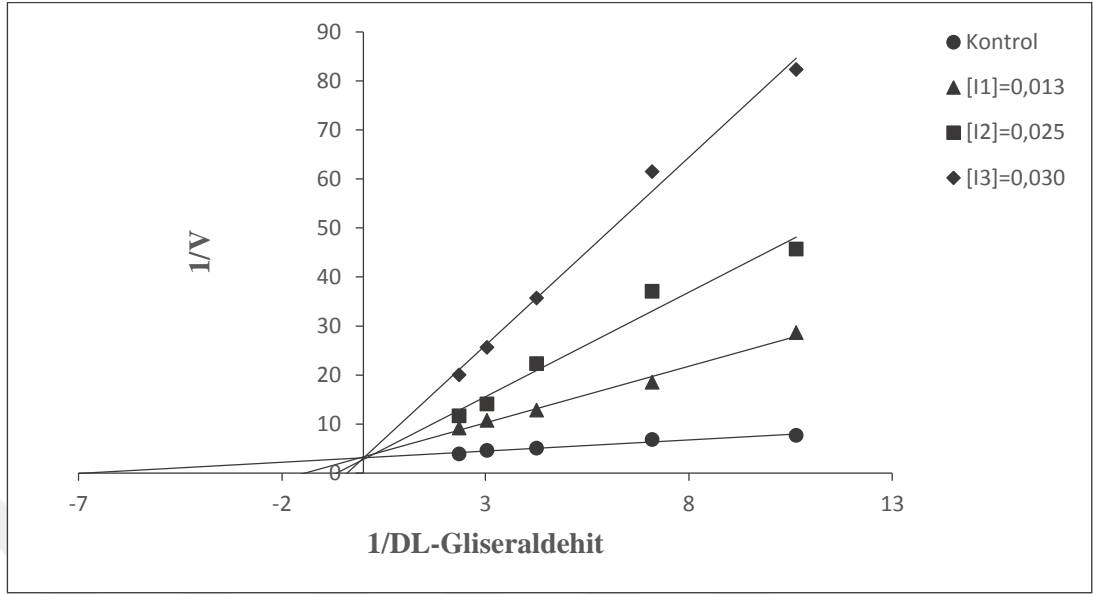
Şekil 4.47. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Meropenem'in Lineweaver-Burk grafiği



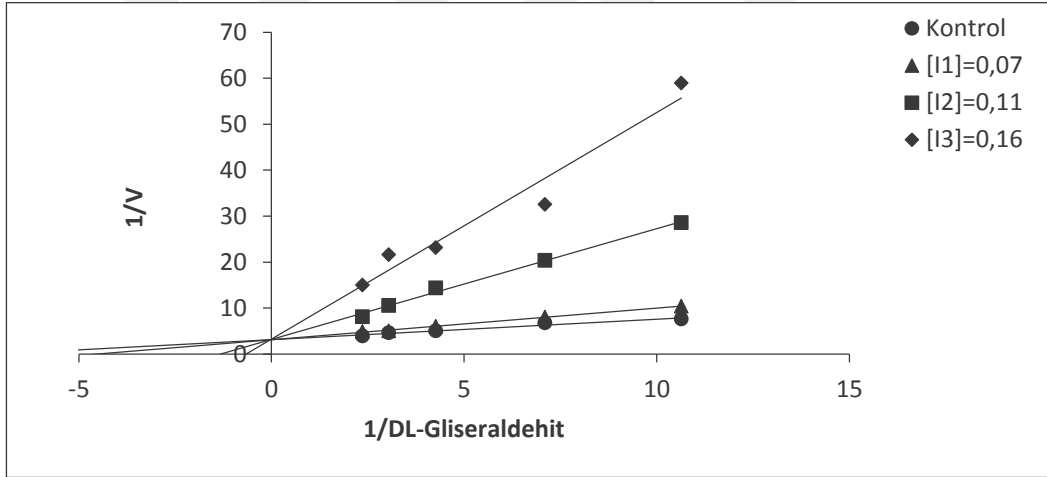
Şekil 4.48. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Sefoperazon Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.49. Keçi böbrek AR enzimi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.50. Keçi böbrek AR enzimi üzerine FeSO₄'ün Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.51. Keçi böbrek AR enzimi üzerine Zn(CH₃COO)₂.6H₂O'nun Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.23. Keçi böbrek AR enzimi için bulunan IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

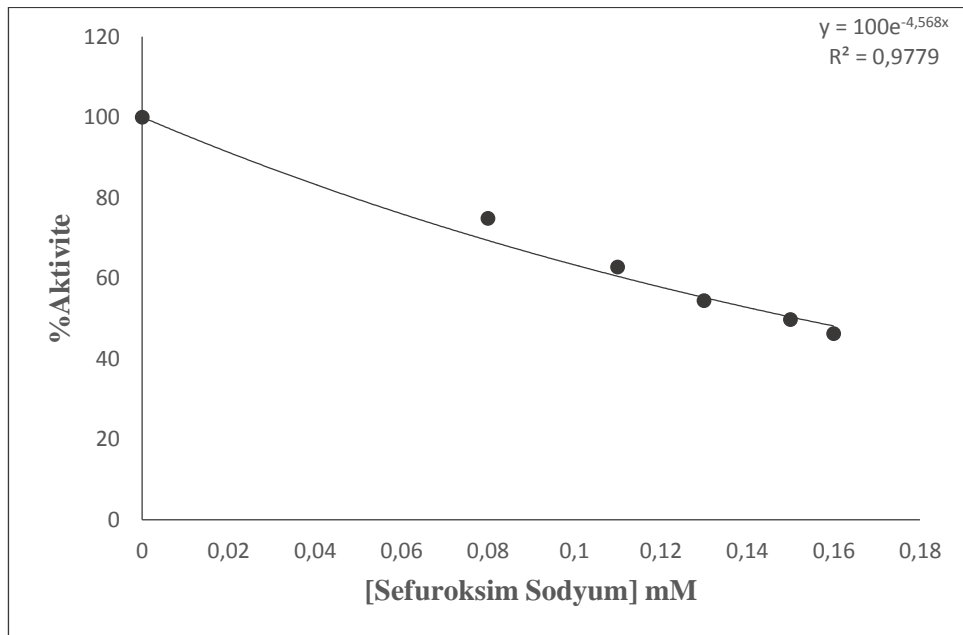
Antibiyotik Türü	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefuroksim	6,54	7,52± 1,41	Yarışmasız
Seftriakson	0,0274	0,018±0,009	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,061	0,017±0,002	Yarışmasız
Sefzolin	2,5	1,73±0,18	Yarışmasız
Gentamisin Sülfat	3,483	0,84±0,13	Yarışmalı
Vankomisin	0,706	0,19±0,054	Yarışmalı
Ampisilin	24,755	16,06±7,59	Yarışmasız
Siproflaksasin	0,25	0,103±0,03	Yarışmalı
Meropenem	4,814	1,66±0,066	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,858	0,46±0,24	Yarışmalı
Linkomisiin	Yeterli inhibison yok	-	-
Metal Türü	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,000445	0,00019±0,0004	Yarışmasız
$FeSO_4$	0,0286	0,00264±0,00081	Yarışmalı
$MgCl_2$	1,007	-	-
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$	0,084	0,017±0,002	Yarışmalı
$CaCl_2$	Yeterli inhibison yok	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Yeterli inhibison yok	-	-
KCl	Yeterli inhibison yok	-	-

4.7. Keçi Böbrek SDH Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.24. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi

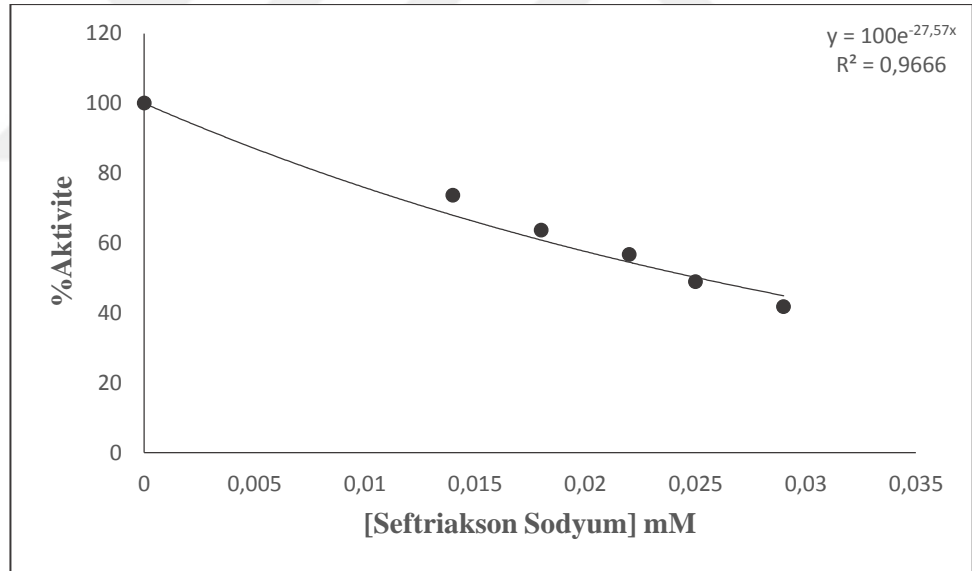
%Aktivite	[Sefuroksim Sodyum] mM
100	0
74,9	0,08
62,77	0,11
54,46	0,13
49,77	0,15
46,23	0,16



Şekil 4.52. Sefuroksim Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.25. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Seftriakson'un etkisi

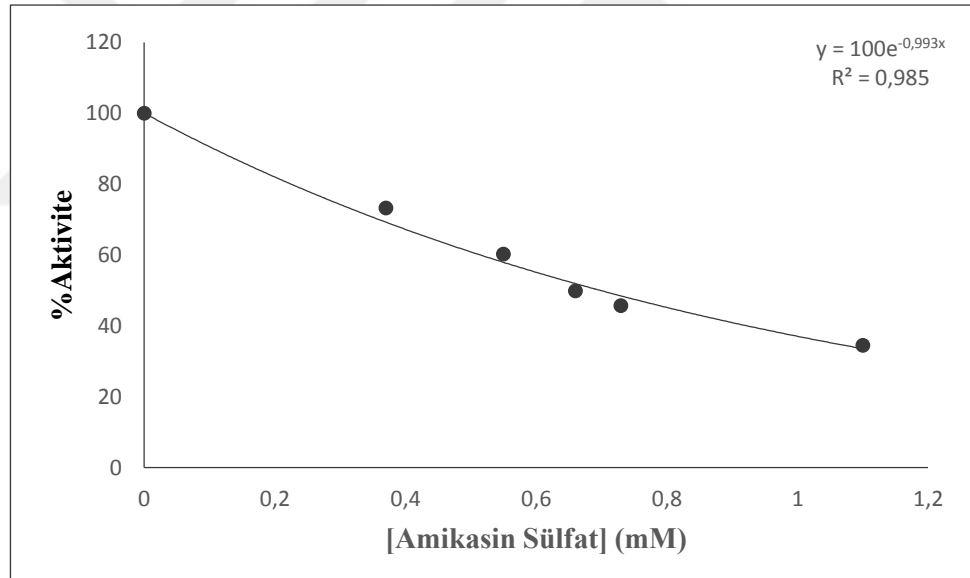
%Aktivite	[Seftriakson Sodyum] mM
100	0
73,67	0,014
63,67	0,018
56,67	0,022
48,89	0,025
41,78	0,029



Şekil 4.53. Seftriakson sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.26. Keçi böbreği sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi

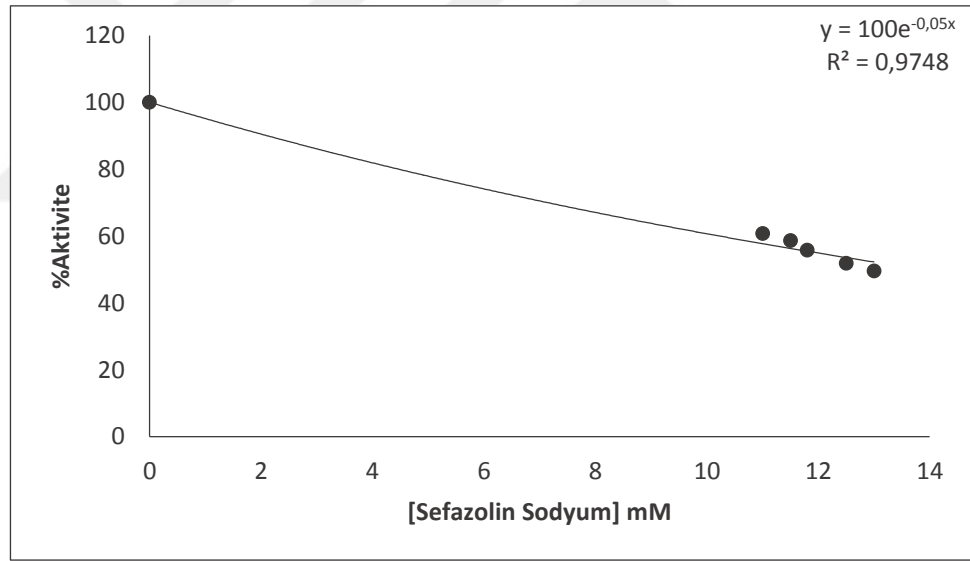
%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
73,25	0,037
60,17	0,55
49,79	0,66
45,66	0,73
34,44	1,1



Şekil 4.54. Amikasin Sülfat'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.27. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin sodyum'un etkisi

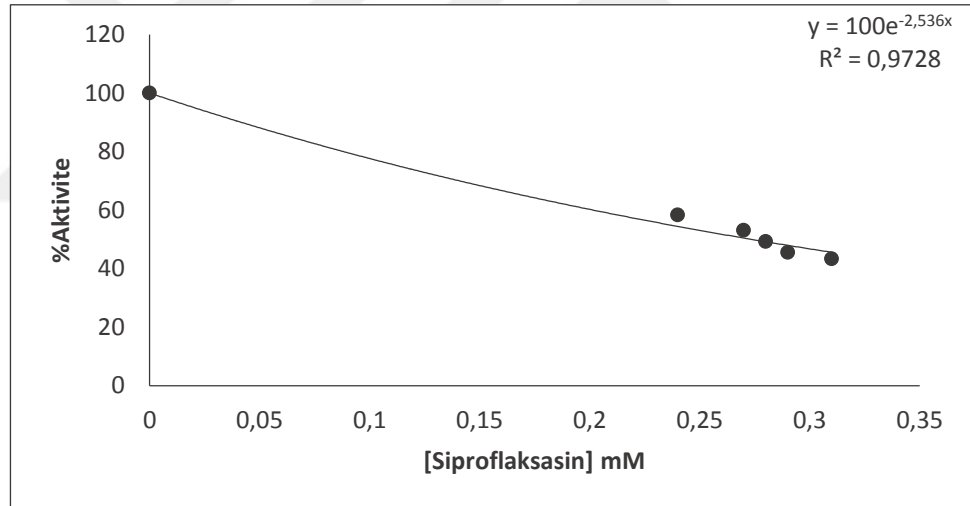
%Aktivite	[Sefazolin Sodyum] mM
100	0
60,76	11
58,62	11,5
55,71	11,8
51,86	12,5
49,52	13



Şekil 4.55. Sefazolin'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.28. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi

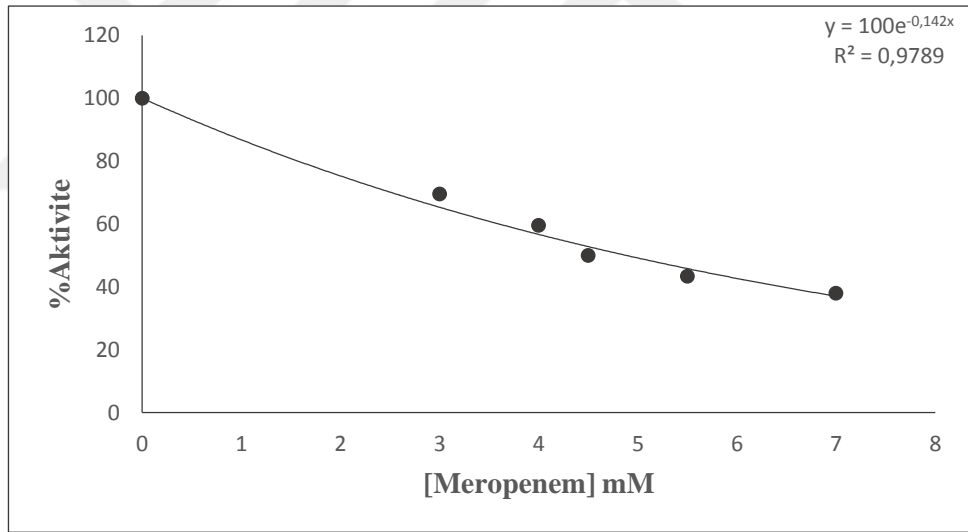
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
58,35	0,24
53,05	0,27
49,21	0,28
45,48	0,29
43,35	0,31



Şekil 4.56. Siprofloksasin'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.29. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Meropenem'in etkisi

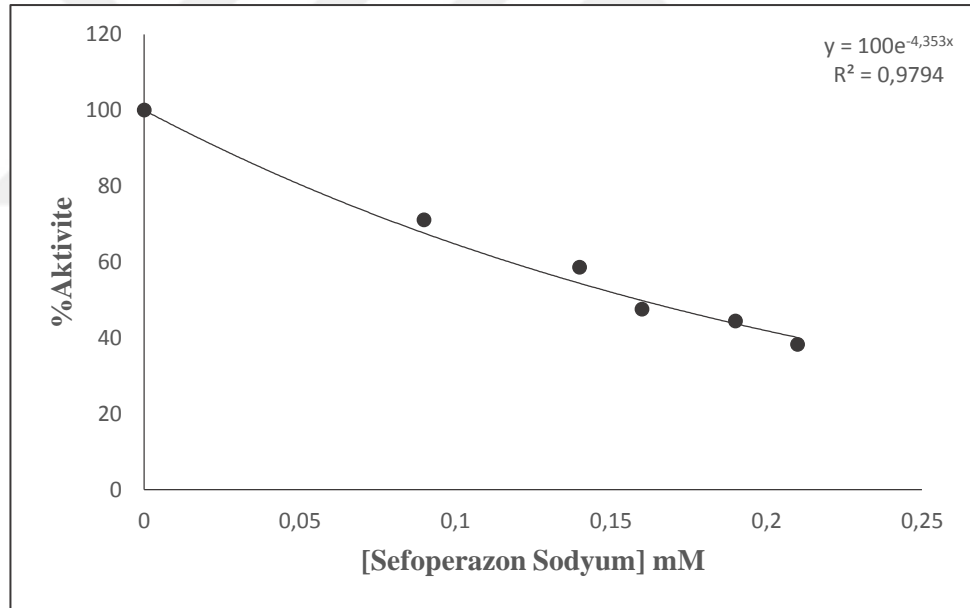
%Aktivite	[Meropenem] mM
100	0
69,5	3
59,5	4
49,98	4,5
43,29	5,5
37,94	7



Şekil 4.57. Meropenem'in keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.30. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Sefoperazon Sodyum'un etkisi

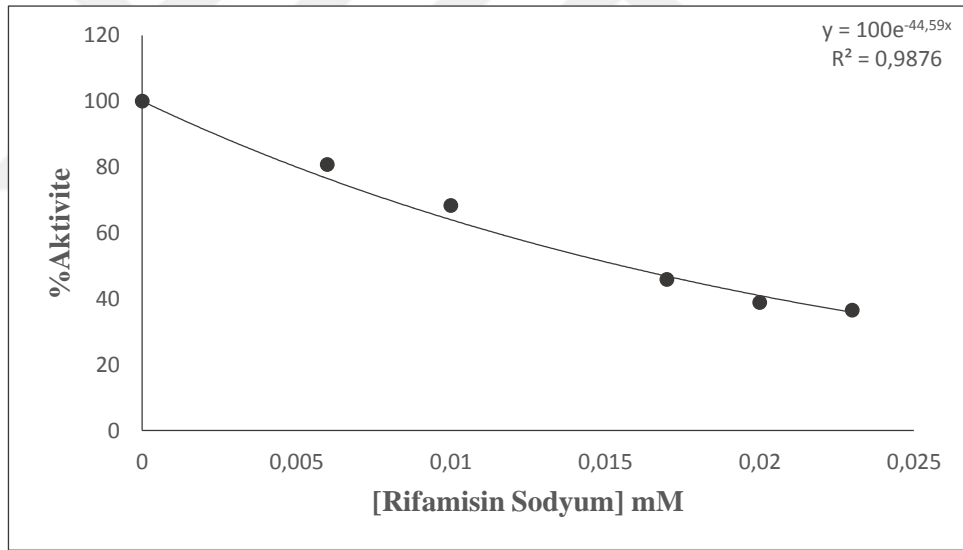
%Aktivite	[Sefoperazon Sodyum] mM
100	0
71,04	0,09
58,55	0,14
47,49	0,16
44,4	0,19
38,22	0,21



Şekil 4.58. Sefoperazon Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.31. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Rifamisin Sodyum'un etkisi

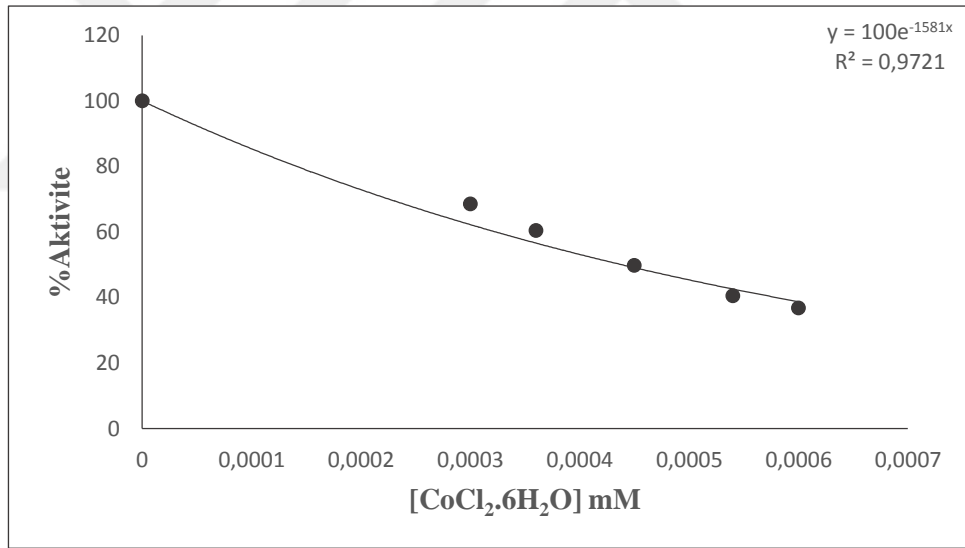
%Aktivite	[Rifamisin Sodyum] mM
100	0
80,72	0,006
68,35	0,01
45,85	0,017
38,9	0,02
36,55	0,023



Şekil 4.59. Rifamisin Sodyum'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.32. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'nun etkisi

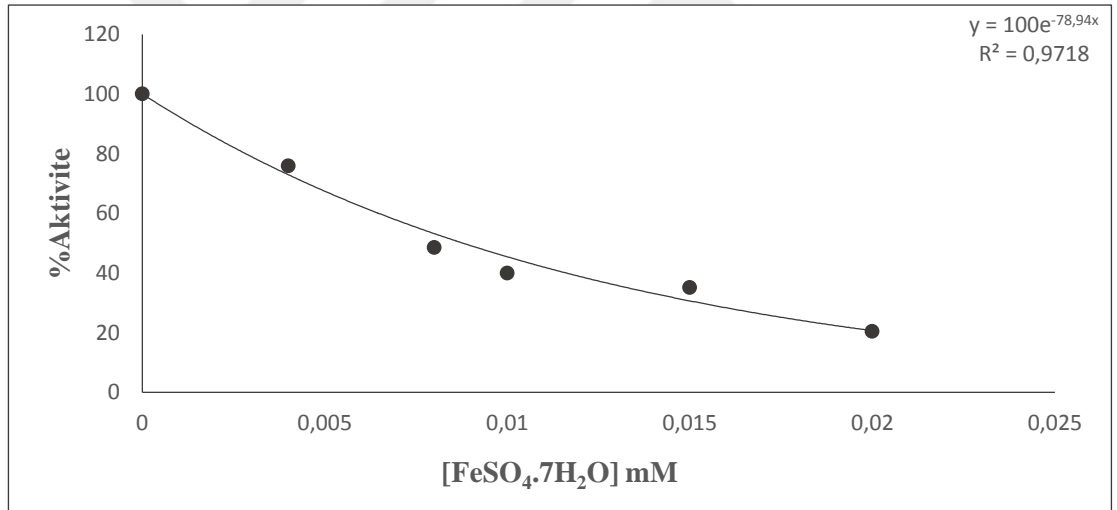
%Aktivite	$[\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ mM
100	0
68,54	0,0003
60,41	0,00036
49,73	0,00045
40,46	0,00054
36,81	0,0006



Şekil 4.60. $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'un keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.33. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine FeSO_4 'ın etkisi

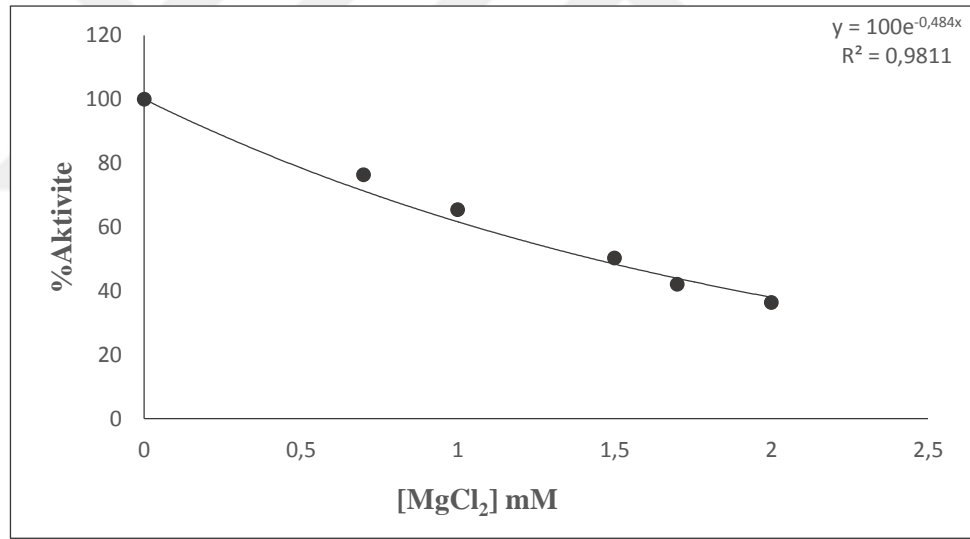
%Aktivite	$[\text{FeSO}_4]$ mM
100	0
75,87	0,004
48,54	0,008
39,98	0,01
35,13	0,015
20,39	0,02



Şekil 4.61. FeSO_4 'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.34. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine $MgCl_2$ 'ün etkisi

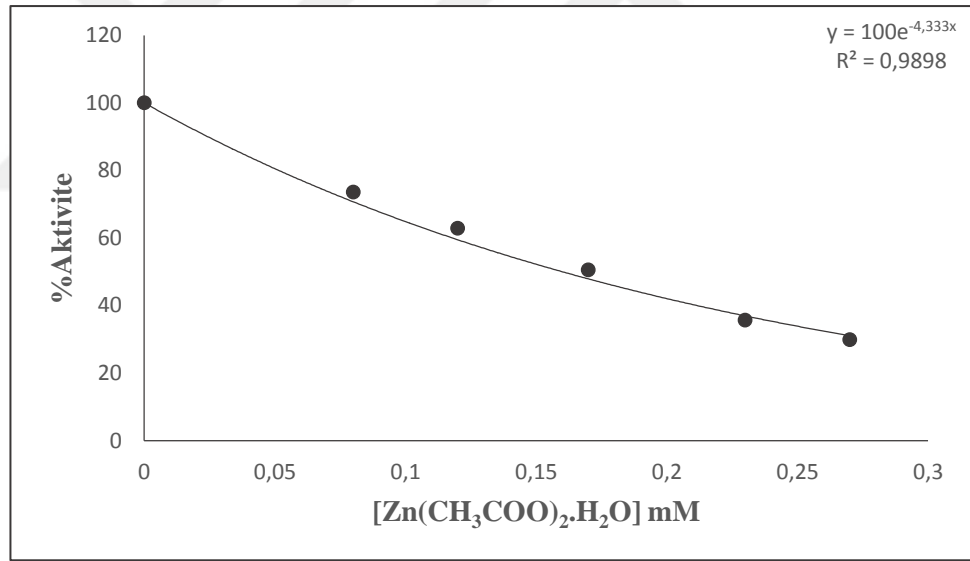
%Aktivite	$[MgCl_2]$ mM
100	0
76,29	0,7
65,43	1
50,29	1,5
42	1,7
36,29	2



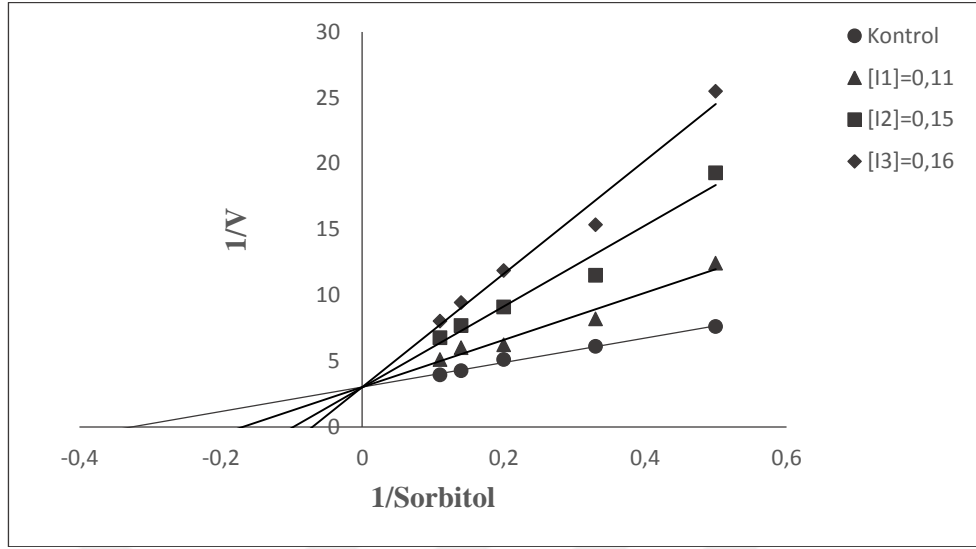
Şekil 4.62. $MgCl_2$ 'ün keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.35. Keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın etkisi

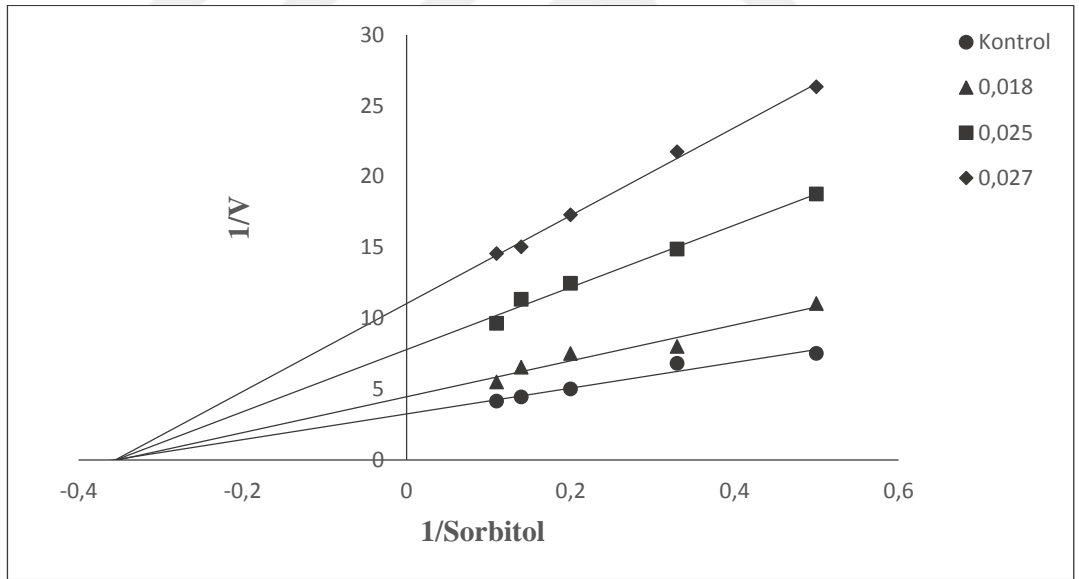
%Aktivite	$[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ mM
100	0
73,57	0,08
62,84	0,12
50,55	0,17
35,62	0,23
29,82	0,27



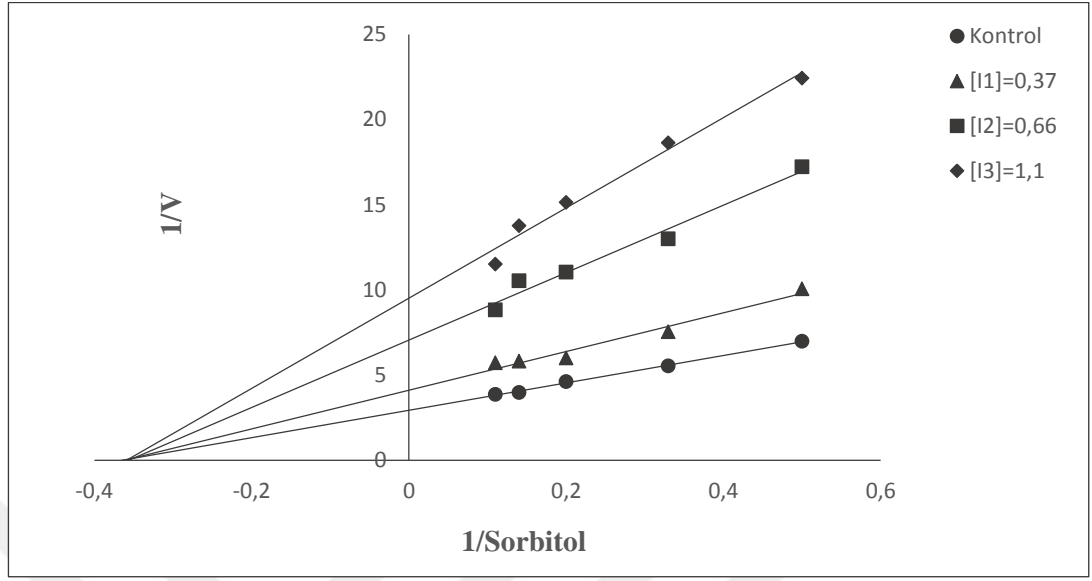
Şekil 4.63. $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın keçi böbrek sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



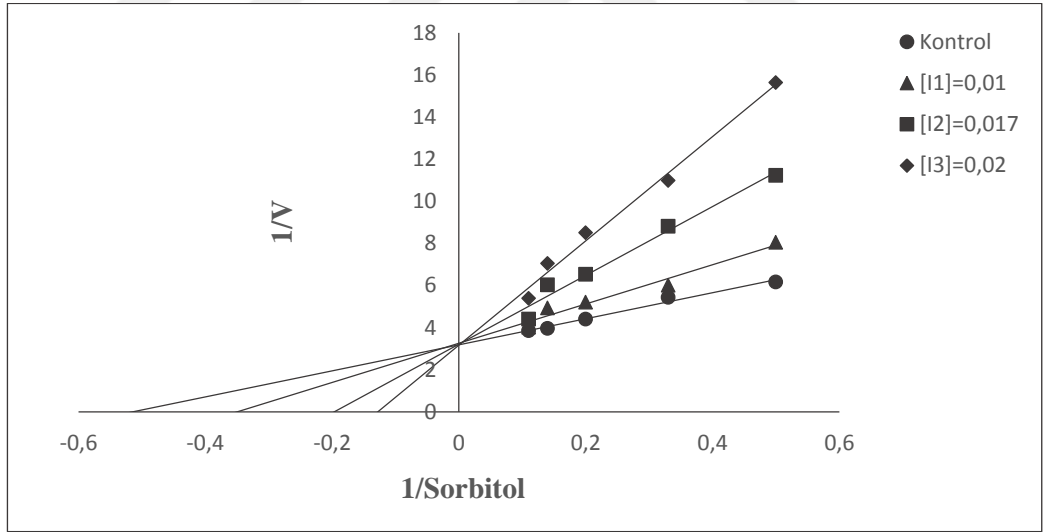
Şekil 4.64. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefuroksim Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



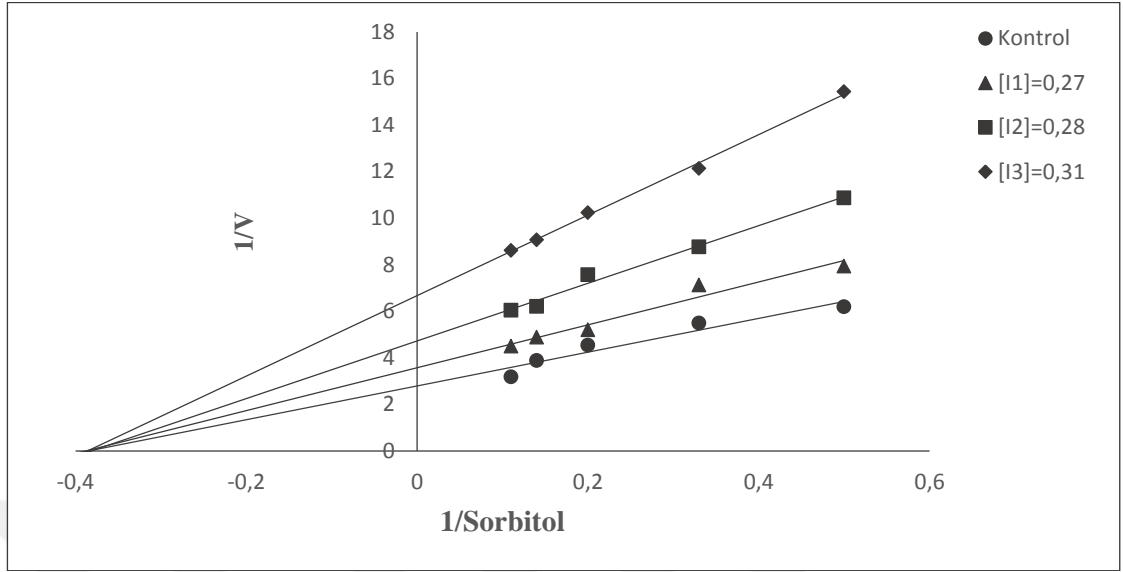
Şekil 4.65. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Seftriakson Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



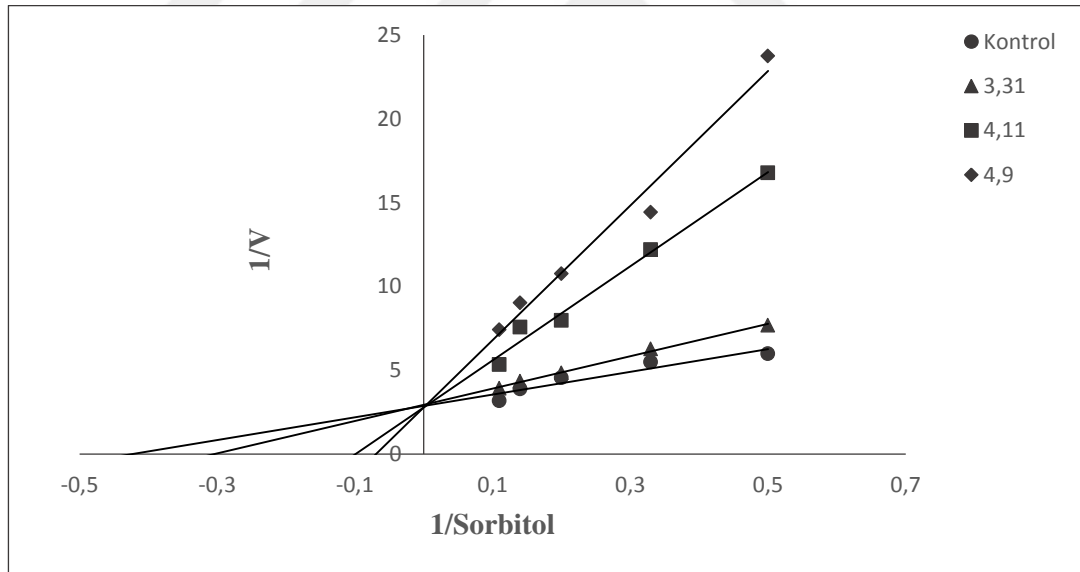
Şekil 4.66. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Amikasin Sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği



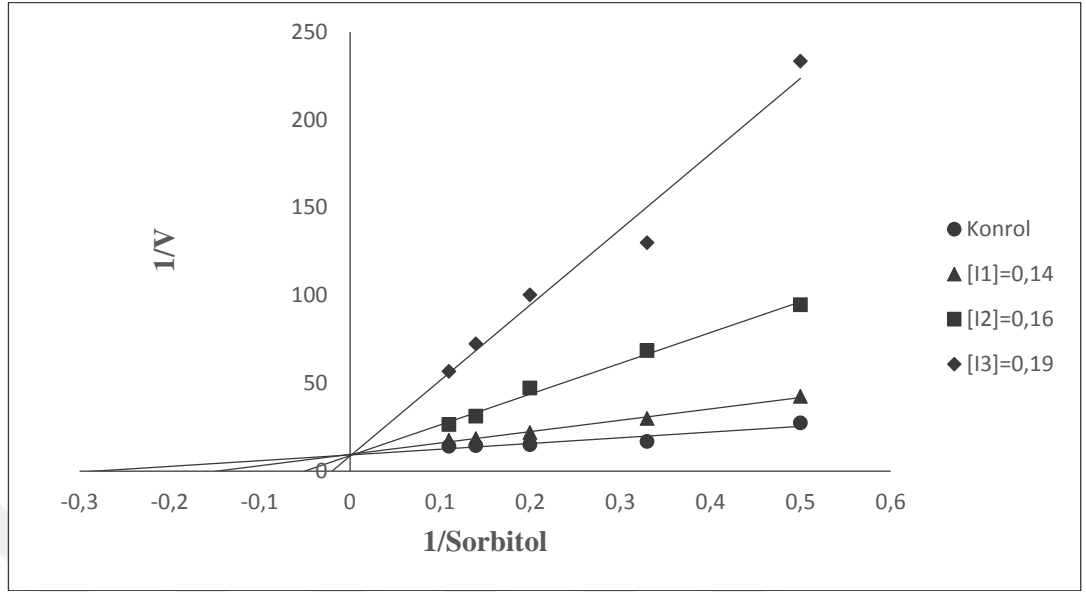
Şekil 4.67. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği



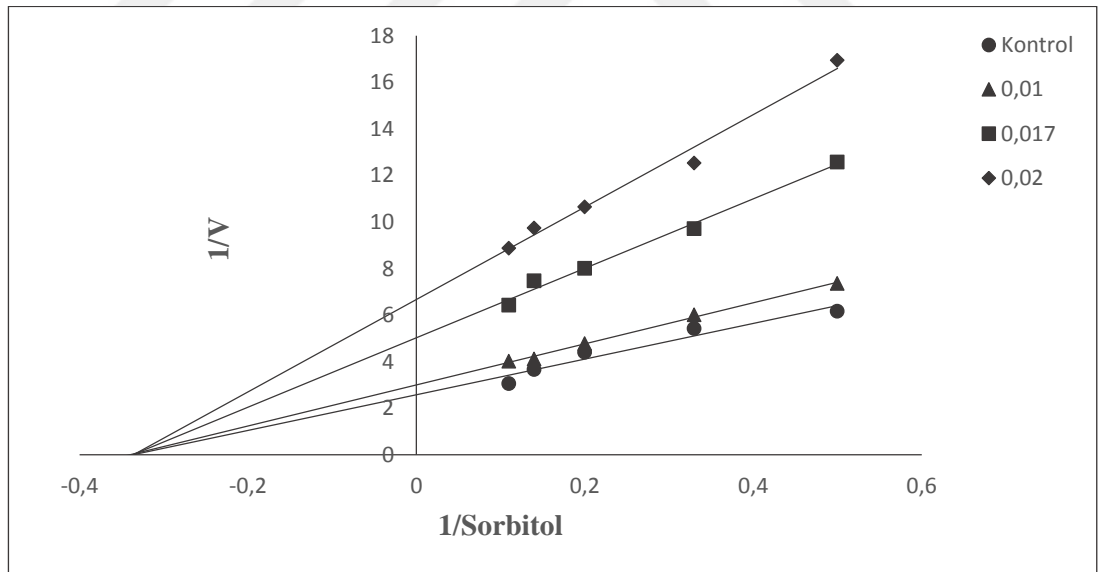
Şekil 4.68. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Siproflaksasin'in Lineweaver-Burk grafiği



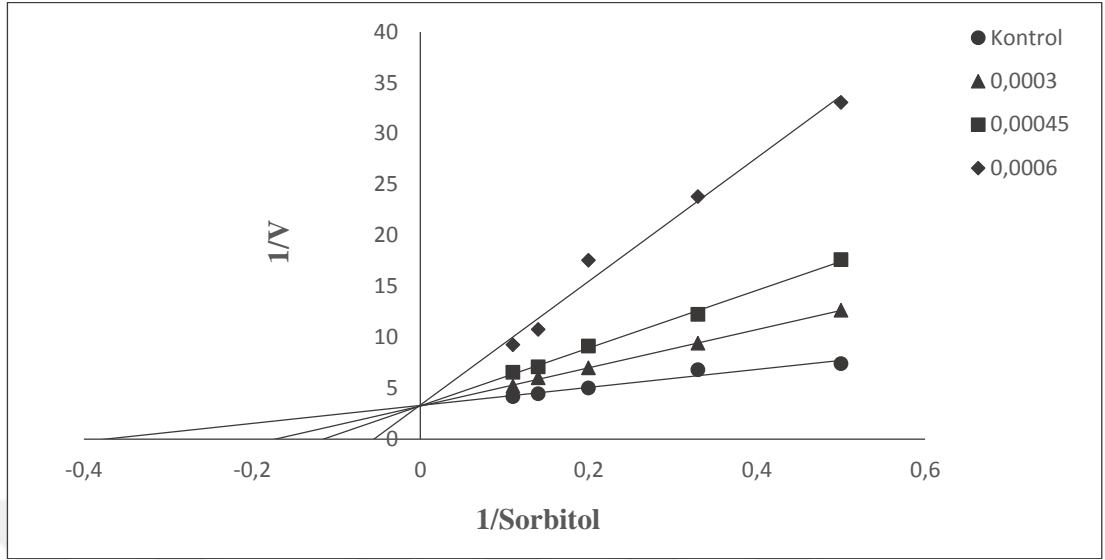
Şekil 4.69. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Meropenem'in Lineweaver-Burk grafiği



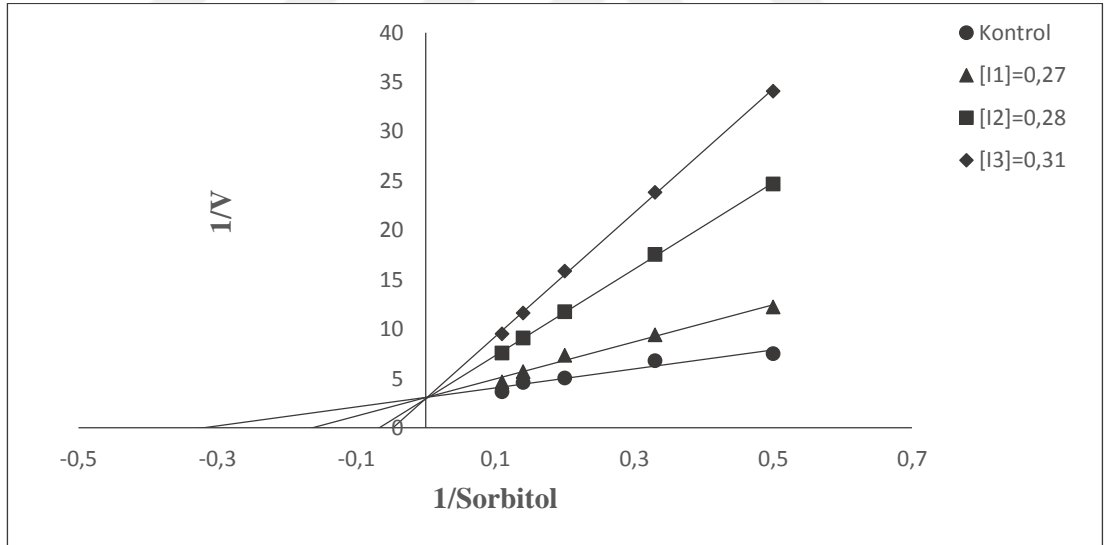
Şekil 4.70. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Sefoperazon Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.71. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine Rifamisin Sodyum'un Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.72. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nun Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.73. Keçi böbrek SDH enzimi üzerine $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.36. Keçi böbrek SDH enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefuroksim	0,15	7,52± 1,41	Yarışmasız
Seftriakson	0,025	0,075±0,038	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,7	0,62±0,25	Yarışmasız
Sefazolin	13,86	0,013±0,0075	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,016	0,031±0,027	Yarışmasız
Siproflaksasin	0,27	0,54±0,39	Yarışmasız
Meropenem	4,88	3,5±4,2	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,16	0,067±0,074	Yarışmalı
Gentamisin	Yeterli inhibison yok	-	-
Vankomisin	Aktivasyon	-	-
Ampisilin	Aktivasyon	-	-
Metal Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,00044	0,00018±0,0003	Yarışmalı
FeSO ₄	0,009	-	-
MgCl ₂	1,43	-	-
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,16	0,14±0,13	Yarışmalı
CaCl ₂	Yeterli inhibison yok	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	Yeterli inhibison yok	-	-
KCl	Yeterli inhibison yok	-	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Aldoz redüktaz, poliol yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup, NADPH kofaktörü aracılığı ile glukozun polihidroksilalkol olan sorbitole dönüşüm reaksiyonunu katalizlemektedir (Hers 1956). Aldoz redüktaz (alditol: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.21, ALR2) enzimi nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktörüne bağlı olarak alifatik ve aromatik yapıdaki aldehitleri, streoidleri, monosakkaritleri, polisiklik aromatik hidrokarbonları ve isoflavonoidleri katalize etmektedir (Kumar and Reddy 2007).

Aldoz redüktaz enziminin poliol yolu dışında birçok metabolik yolakla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlar; kanser (Lee *et al.* 2001), kardiyovasküler hastalıklar (Ramasamy *et al.* 1999), renal yetmezlik (Jiang *et al.* 2006), inflamasyon (Ramana *et al.* 2006), over anomalileri (Meyer *et al.* 1992), depresyon olarak sıralanabilir (Regenold *et al.* 2000). Enzimin bu düzenleyici etkileri, enzim üzerine olan inhibisyon çalışmalarının değerini arttırmaktadır. Aldoz redüktaz inhibitörleri kolon kanseri, romatoit artirit gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Srivastava *et al.* 2005; Ramana and Srivastava 2006; Tammali 2007). Aldoz redüktaz enzim inhibitörleri üzerine son yıllarda birçok çalışma yapılmış olup, bu çalışmaların çoğunda farmokinetik problemler, yan etkiler ve düşük inhibisyon belirtilmiştir (Costantino *et al.* 1997; Costantino 1999; El-Kabbani *et al.* 2004).

Diyabet oldukça sık görülen metabolik bir sendromdur ve bu hastalık nöropati, nefropati, retinopati, katarakt ve ateroskleroza bağlı olarak artan miyokardiyal enfarktüs ve inme riski gibi birçok dejeneratif komplikasyon ile ilişkili olup tip I ve tip II diyabette de bu patolojilere rastlamak mümkündür. Bu komplikasyonların kontrolü ve önlenmesi diabet hastalarının yaşam kalitesi ve ölüm oranları için oldukça ciddi ve önemli terapötik problemdir (Hanefeld *et al.* 1996; Viberti 2005).

Diyabetli hastalarda çok sık görülen ve kronik komplikasyonlardan biri olan diyabetik retinopati bütün diyabetiklerin %90'ından daha fazlasında hayatlarının herhangi bir döneminde görülmektedir (Kempen *et al.* 2004; Roy *et al.* 2004; Hirai *et al.* 2011). Yaşadığımız yüzyılda retinopati hastalığının tedavisinde kullanılan yöntemlerin az olması, diyabetli bireylerin fazlalığı ve retinopatinin patofizyolojisinin tam anlamıyla belirlenememiş olması sağlık sektörü üzerinde büyük etkilere sahiptir.

Hiperglisemi diyabette vasküler komplikasyonların gelişmesinde temel risk faktörüdür. Hiperglisemi durumunda bazı metabolik yolların aktivitesi artarken bu yolların aktivitesi sonucu oluşan oksidatif stres, endotel fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda ise pek çok vasküler komplikasyon oluşmaktadır. (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurkschiev *et al.* 2000).

Dünya nüfusunun yaklaşık %5-7'sinde diyabet görülmektedir ve bu hastalığın neden olduğu makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların ekonomiye maliyeti gün geçtikçe artmaktadır (Gugliucci 2000). 2002 yılında ABD'de yapılan bir çalışmada sadece diyabet sonucu oluşan komplikasyonların sağlık sistemine maliyetinin yaklaşık 132 milyar dolar olduğu belirtilmiştir (Setter *et al.* 2003).

2003 yılı itibarı ile dünyada 180 milyondan fazla insanı etkilemekte olan ve önemli bir sağlık sorunu olan diyabetin sebep olduğu ölüm nedenleri, Türkiye ve dünyada üçüncü sırada yer almaktadır. 2003 Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre (World Health Organization (WHO)), diyabet görülme sıklığının 2025 yılında hızla artarak diyabetik birey sayısının 300 milyon civarında olacağını öngörülmektedir (Sicree *et al.* 2003).

Aldoz redüktaz enzimi ve polioliol yolu, diyabetin kronik komplikasyonlarının oluşumunda önemli bir yer tutmaktadır. Polioliol yolunun aktivitesi hiperglisemi durumunda artar. Bu yolun aktivitesinin artmasıyla glukozun 1/3'ü (Gonzalez *et al.* 1984; Yabe-Nishimura 1998) bu yolda metabolize olur ve bunun sonucunda diyabette istenmeyen sonuçların oluşmasına sebebiyet verir. Aldoz redüktaz enziminin farklı canlılarda ve farklı dokularda çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olması, enzimin fizyolojik özellikleri

üzerinde tartışmaların devam etmesine sebep olmaktadır. Aldoz redüktaz enzimi seminal vezikülerde sperm hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamak için fruktoz üretiminden sorumluyken (Kobayashi *et al.* 2002; Frenette *et al.* 2004), böbreklerde osmotik regülasyonun düzenlenmesinde görevli olan sorbitol üretiminden sorumludur (Garcia-Perez and Burg 1991). Enzim lipid aldehytlerin ve onların GSH konjugatlarının glukozdan daha etkili bir şekilde metabolize olması (Srivastava *et al.* 1999; Srivastava *et al.* 2005) ve aldoz redüktaz enziminin antioksidan savunmasında önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir.

DL-gliseraldehit sıçan lensi aldoz redüktaz enziminin substratı olup, K_M değeri 0,08 mM iken, yine DL-gliseraldehit için sıçan lensi ALR1 enziminin K_M değeri 6,2 mM'dir (Sato and Kador 1989). Hiperglisemi durumunda, aldoz redüktaz enziminin substratı olan heksoz ve trioz şekerler karşılaştırıldığında, trioz şekerlerin K_M değerleri heksoz şekerlere oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu sebeple aldoheksozlardan oluşan triozlar, düşük K_M değerlerine sahip oldukları için aldoz redüktaz enzimi için çok iyi substratlardır (Jagt *et al.* 1995) (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Sıçan lensi AR ve ALR1 enzimleri için çeşitli substratlar ve K_M değerleri (Sato and Kador 1989)

Substrat	Sıçan lens ALR1	Sıçan lens AR
	K_M (mM)	K_M (mM)
DL-Gliseraldehit	6,2	0,08
D-Glukuronat	6,1	19,2
L-Gulonat	10,0	-
D-Ksiloz	749	13,5
D-Glukoz	>2000	204
D-Galaktoz	>2000	83

Aldoz redükaz enzimi bazı fizyolojik ve ksenobiyotik aldehytlerin NADPH bağımlı redüksiyonunu katalizlemektedir. İzokortizol ve izokortikosteron gibi izokortikosteroidler aldoz redükaz enziminin en iyi substratlardır ($K_M < 1 \mu M$). Bunları

biyojenik aldehitlerinde içinde bulunduğu aromatik ve arilalkilaldehitler takip eder ($K_m=3^{-15} \mu\text{M}$). Aldozlara karşı aktivite gliseradehit ile en yüksektir ve şekerdeki karbon sayısının artmasıyla aktivitenin azaldığı bildirilmiştir (Wermuth *et al.* 1982).

Aldoz redüktaz inhibitörleri üç sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar karboksilik asit grubu taşıyanlar, siklik imid grubu taşıyanlar ve sülfonil nitrometan türevleridir (Rogniaux *et al.* 1999; Wang *et al.* 2007). İnhibitörlerin polar uçları ile aktif bölge kalıntıları arasındaki etkileşimler enzim-inhibitör kompleksinin kararlılığında önemli rol oynamaktadır. Siklik imid sınıfına dahil olan minalrestatin flor atomunun ve fidarestatin karbamoil grubunun karboksilat fonksiyonel grubu ile yerdeğiştirmesi sonucu enzim-inhibitor kompleksinin net bağlanma enerjisi artmaktadır (Darmanin *et al.* 2004).

Köpekler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada sorbinilin aldoz redüktaz enzimini inhibe etmesi sonucu diabetik nöropatiyi engelleyebildiği fakat nefropati, retinopati ve kaslarda bazal membran kalınlaşmasını engelleyemediği belirtilmiştir (Engerman *et al.* 1994). Aynı zamanda sorbinil inhibitörünün diyabetik nöropatide sorbitol birikimi ve miyoinositol azalışını engelleyerek pozitif sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Bertimattera *et al.* 1996).

Ponalrestat ve tolrestat gibi aldoz redüktaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar sonucunda retinopatiyi engelleyemediği belirtilmiştir (Chung and Chung 2005). Tiamin türevi olan benfotiamin diabetik retinopatide başarılı bir aldoz redüktaz inhibitörüdür. Pentoz fosfat yolunu aktive eden benfotiamin, serbest radikal oluşumunu engellemektedir. Mitokondrial ROS seviyesinin düşmesi sonucu PKC yolunun aktivasyonunu da önlediği belirtilmektedir (Hammes *et al.* 2003). Yine aynı grup bir inhibitör olan zenalrestatla yapılan çalışmalar sinir iletim hızında belirgin düzeyde düzelmeler olduğu saptanmıştır (Greene *et al.* 1999).

Diyabetik ve galaktosemik fareler üzerine yapılan bir çalışmada AR ve SDH inhibisyonun katarakt oluşumuna etkileri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda SDH inhibitörleri ve AR inhibitörlerinin hem varlığında hemde yokluğunda diyabetik ve

galaktosemik farelerde katarakt oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sunucunda, diabetik ve galaktosemik farelerde AR inhibitörlerinin katarakt oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, diabetik farelerde SDH inhibitörlerinin katarakt oluşumunu arttırdığı fakat galaktosemik farelerde ise katarakt oluşumunu etkilemediği belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda hücrelerde sorbitol birikiminin katarakta sebep olduğu, AR enziminin inhibe edilmesi ise katarakt oluşumunu engelleyebileceğini ortaya koymaktadır (Kador *et al.* 1998).

SDH enziminin nükleosit ve nükleotidler tarafından inhibisyonu sonucu enzimin aktivitesini en fazla Guanosine-2,3-di-P inhibe ettiği ($K_i=1,0$ mM) ve bu inhibisyonun yarışmasız bir inhibisyon olduğu bildirilmiştir (Lindstad *et al.* 2013).

Flavonoid olan rutin ve quercetin aldoz redüktaz enzimini inhibe ettiği bilinmektedir. Yani sülfat iyonları aldoz redüktaz enziminin aktivitesini stimüle eder. Modifiye tiyol reaktiflerinden iyodoasetat ve 4-hidroksicivabenoat zamana bağımlı inaktivasyona sebep olur. 5,9 izoelektrik noktaya sahip olan aldoz redüktaz enzimi tiyol reaktiflerinin etkisiyle izoelektrik nokta 5,1'e değişmektedir (Wermuth *et al.* 1982).

Aldoz redüktaz enziminin spesifik inhibitörü olduğu düşünülen Quercetin'in (Kador *et al.* 1986) SDH enzimi üzerine yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda insan beyni SDH enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği (O'Brien *et al.* 1983) ve benzer şekilde quercetin'in, sıgır beyni SDH enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Wiesinger and Hamprecht 1989).

DeneySEL diabetik hayvanlar üzerine yapılan bir diğer çalışmada aldoz redüktaz inhibitörlerinin periferel sinirlerin fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal bozukluklarını düzelttiği belirtilmiştir (Yagihashi *et al.* 1990; Cameron and Cotter 1992).

Aldoz redüktaz inhibitörü olan zenarestat ile yapılan bir çalışmada, sinir iletim hızını olumlu yönde etkilediği bildirilmiş olup (Setter *et al.* 2003), başka bir ARI'ü olan regenistein lens proteinlerinin zarar görmesini engelleyerek katarakt oluşumunu

engellediği ve polioliol yolağının neden olduğu oksidatif stresi engelleyerek GSH seviyesinin artmasına sebep olduğu belirtilmiştir (Kim *et al.* 2008).

Bir başka ARI'ü olan tiazolil tiazolidinedionun yeni türleri ile fare böbreği aldoz redüktaz inhibisyonu üzerine yapılan bir çalışmada, Tiazolun C2 pozisyonunda piperidin bulunan bileşiğin, aynı pozisyonda 4–klorobenzilsülfanil bulunan bileşikten çok daha iyi inhibisyon etkisine sahip olduğu belirtilmiştir (Bozdağ *et al.* 2007).

Curcumin'in analogları üzerine yapılan bir çalışmada, analogun fenolik halkasının p-hidroksil gruplarının aldoz redüktaz enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği, o-hidroksil gruplarının enzim ile çok sıkı etkileşmesi sonucu inhibe ettiği bildirilmiştir (Du *et al.* 2006).

Sıçan lens aldoz redüktaz ve insan rekombinant aldoz redüktaz enzimi üzerine flavonoidlerin etkileri incelenmiş ve çalışmanın sonucunda flavonoidlerin aldoz redüktaz enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve flavonoidlerin diyabetik komplikasyonların engellenmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Jung *et al.* 2008).

Protokatekuik asidin diyabetik farelerde aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin mRNA ekspresyonları ve onların aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiş ve protokatekuik asidin enzimlerin mRNA ekspresyonları ve aktivitelerini azalttığı, sonuç olarak diyabetik komplikasyonların azaltılmasında etkili olabileceği bildirilmiştir (Lin *et al.* 2011).

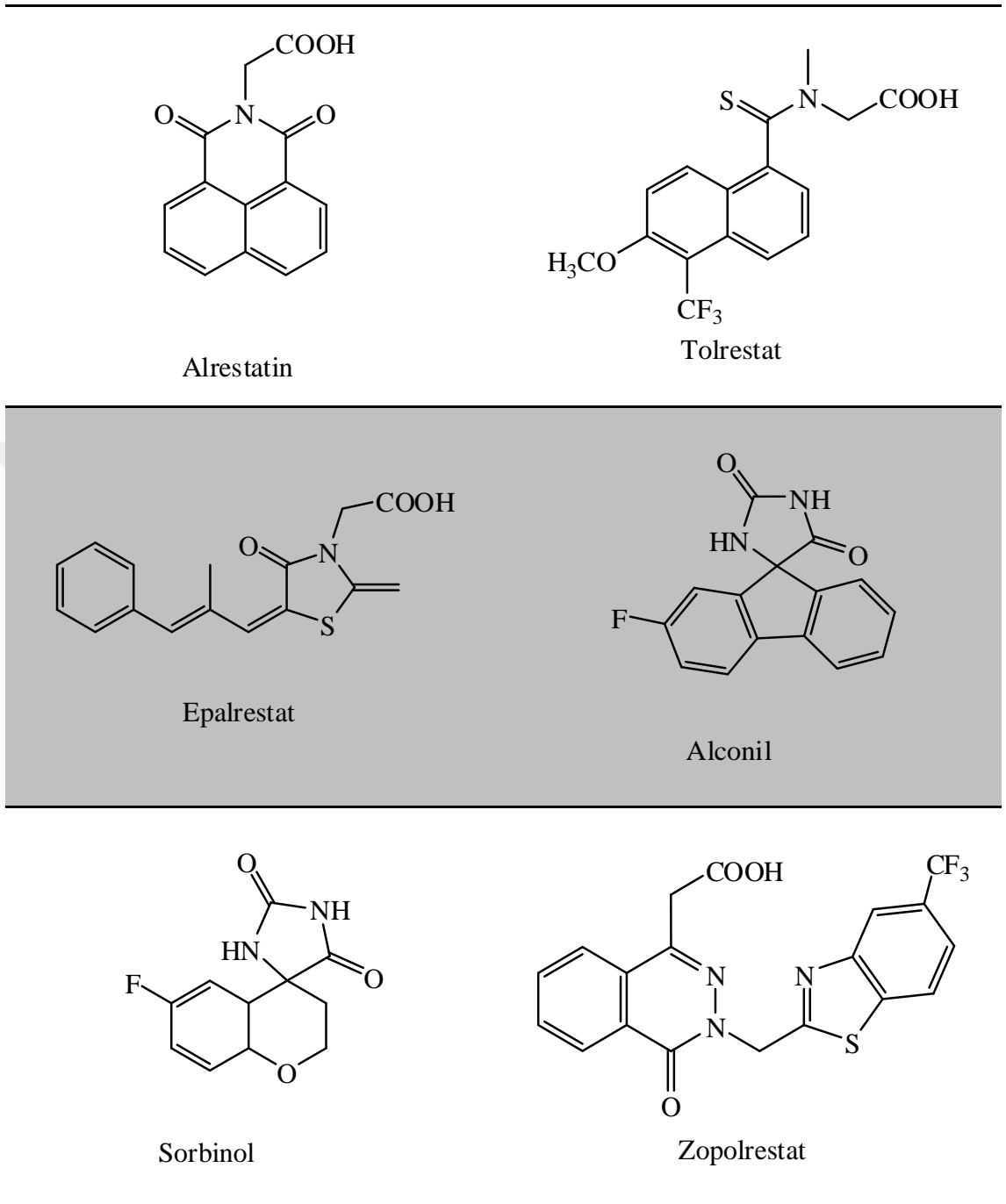
Aldoz redüktaz inhibitörü olduğu rapor edilen ellagic asit diyabetik ratlarda lens, siyatik sinirler ve eritrositlerde sorbitol birikimini engellediği bildirilmiştir (Ueda *et al.* 2004).

Anti diyabetik etkilere sahip olduğu bildirilen ve fenolik bir bileşik olan kafeik asitin glisemik kontroller için kullanılabileceği belirtilmiştir (Jung *et al.* 2006).

Diabetik sıçan aldoz redüktaz enzimi üzerine yapılan bir çalışmada ponalrestatin enzim aktivitesini belirgin bir şekilde düşürdüğü bildirilmiştir (Soulis-Liparota *et al.* 1995). Karboksilik asit grubu taşıyan ve aldoz redüktaz inhibitörü olan ponalrestat anlamlı bir etkiye sahip olmayıp klinik açıdan önemli bir yan etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Miyamoto 2002). Aldoza redüktaz inhibitörü olan NZ-314, ponalrestat ile aynı sınıftan olup siyatik sinirlerdeki kan akışını ve motor sinir iletimini arttırdığı bildirilmiştir (Miyamoto 2002). Asano ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada fidarestatın sinir kan akışını ve sinir hücrelerinde biriken sorbitol düzeyini normal seviyeye getirdiği bildirilmiştir (Asano *et al.* 2002).

ARI'ü olan fidarestatın karbamoil grubunun karboksilat fonksiyonel grubu ve diğer ARI'ü ve siklik imid sınıfından olan minalrestat, yapısındaki flor atomu ile yer değiştirmesi sonucu enzim-inhibitor kompleksinin net bağlanma enerjisinin arttığı gösterilmiştir (Darmanin *et al.* 2004).

Fakat, aldoz redüktaz inhibitörlerinin görevleri bunlardaki sınırlı değildir. ARI'leri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda, inhibitörlerin göğüs, karaciğer, serviks, kolon ve ovaryum kanserleri gibi kanser türlerinin tedavisinde iyileştirici ajan olarak görev aldığı gösterilmiştir (Jin *et al.* 2006; Saraswat *et al.* 2006; Tammali 2006; Alexiou *et al.* 2009).



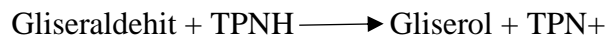
Şekil 5.1. Aldoz redüktaz inhibitörlerinden bazılarının molekül yapıları.

Buzağı lensi AR enzimi 310 EÜ/mg spesifik aktiviteyle saflaştırılmış olup enzimin, DL-gliseraldehit, D-eritroz, D-ksiloz, D-riboz, D-arabinoz, L-arabinoz, D-glukoz, D-galaktoz, D- glukuronolakton, sodyum-D-glukuronat ve substratları için K_M sabitleri

sırayla 3×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-4} , 5×10^{-3} , 7×10^{-3} , 2×10^{-2} , 4×10^{-3} , 7×10^{-2} , 2×10^{-2} , 7×10^{-4} , 4×10^{-3} M olarak bulunmuştur (Hayman and Kinoshita 1965).

Bektaşı üzümü ekstratının sıçan lensi ve insan rekombinant AR'ı inhibe ettiği belirtilmiş olup IC_{50} değerleri sırasıyla 0,72 mg/ml ve 0,88 mg/ml olarak tespit edilmiştir. İnhibisyonun sebebinin Bektaşı üzümündeki hidratize tannoidinden kaynaklandığı ispat edilmiştir ve Tannoidin'in sıçan lens ve insan rekombinant AR için IC_{50} değerleri 6 μ g/ml ve 10 μ g/ml olarak belirtilmiştir (Suryanarayana *et al.* 2004).

AR'nin etkili inhibitörü olan Tetrametilen glutarik asit. Jedziniak and Kinoshita tarafından yapılan bir çalışmada 10^{-3} M Tetrametilen glutarik asit ile karıştırılan enzimin aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. Bir gece boyunca enzim inhibitor karışımı diyaliz edilmiş ve enzimin aktivitesinin % 60'ının geri kazanıldığı belirtilmiştir. Böylece Tetrametilen glutarik asitin enzime geri dönüşümsüz olarak bağlanmadığı gösterilmiştir. Tetrametilen glutarik asit için K_i değerleri $1,0^{-1}, 2 \times 10^{-5}$ M olarak bulunmuş olup inhibisyon tipi yarı yarışmalı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada AR enziminin bu reaksiyon sonucu oluşan ürün tarafından inhibisyonu da incelenmiştir.



Ürünlerden gliserol inhibisyon etkisi göstermezken, TPN^+ belirgin bir şekilde enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir. TPN^+ için K_i değeri $7,5 \times 10^{-5}$ mM ve inhibisyon tipi yarışmalı olduğu tespit edilmiştir (Jedziniak and Kinoshita 1971).

Aldoz redüktaz I ve aldoz redüktaz II enzimleri James ve Flynn tarafından tavşan kasından saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Yapılan çalışma sonucu iki enzimde monomer olduğu SDS-PAGE ve Jel filtrasyon sonuçlarına göre belirtilmiş olup enzimlerin molekül kütleleri sırasıyla 40,2 kDa ve 41,5 kDa olarak tespit edilmiştir. Aldoz redüktaz I ve aldoz redüktaz II enzimlerinin her ikisinin de geniş substrat spesivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Aldo şekerler için Aldoz redüktaz I'in K_M

değeri tavşan lens aldöz redüktaz ile aynıdır. Alrestatin ve Sorbinil gibi ticari aldöz redüktaz inhibitörleri aldöz redüktaz I ve aldöz redüktaz II enzimlerini inhibe eder. Aldöz redüktaz I enzimi için optimum pH 6,5 iken aldöz redüktaz II enzimi için ise 7,0 olarak bulunmuştur. Bu iki enzim p-nitrobenzaldehit yüksek afinite gösterirler. Aldöz redüktaz I'in p-nitrobenzaldehit için K_M sabiti $0,06 \pm 0,013$ mM, V_{max} değeri 12 ± 3 nmol/dk iken aldöz redüktaz II enziminin p-nitrobenzaldehit için K_M sabiti $0,041 \pm 0,002$ mM, V_{max} değeri 81 ± 2 nmol/dk olarak belirtilmiştir. Her iki enzim de $HgCl_2$ ve p-klorocivabenzotat tarafından inhibe edilmiştir Fakat aldöz redüktaz II'nin daha çok inhibisyona uğradığı görülmüştür (James and Flynn 1982).

Enzimler protein yapısında oldukları için ortam şartlarının değişmesine karşı çok hassas olduklarından enzim saflaştırma çalışmaları zor gerçekleşen işlemlerdir. Çözelti içerisindeki enzimlerin varlığı, enzimin etki ettiği substrat, enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan ürün veya enzimin katalizlediği reaksiyona etki eden diğer parametrelerle tespit edilebilmektedir. Enzimlerin aktivitelerine etki eden faktörler, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, hormonlar, allosterik etkiler ve bazen de inhibitör, aktivatör veya amino asitler olabilir.

Koyun karaciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enzimi yaklaşık olarak 14,4 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH'sı sorbitolün fruktoza yükseltgenme reaksiyonu için 9,0-10,0 aralığında iken fruktozun sorbitole indirgenme reaksiyonu için 7,0-8,0 aralığında değiştiği gösterilmiştir (Smith 1962).

Reiersen ve arkadaşları tarafından koyun karaciğeri SDH enziminin stabil pH aralığını belirlemek için yapılan çalışmada, enzimin pH=5,0'ın altında ve pH=8,5-9,0'un üzerinde aktivite kaybettiğini bildirilmiştir (Reiersen *et al.* 1994).

Wiesinger ve Hamprecht tarafından sığır beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DE-52, CM-52, Blue sepharose CL-6B, Green Sepharose 4B, Sephadex G-200 kromatografisi teknikleri ile 6 basamakta %6 verimle 3008 kat saflaştırılmıştır. Bu çalışma ile sığır beyni SDH enziminin molekül kütlesi SDS-

PAGE'de 39 kDa olarak belirlendi. Enzimin doğal halinin molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 155 kDa olarak belirlenmiştir (Wiesinger and Hamprecht 1989).

Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi saflaştırma çalışmalarında amonyum sülfat çöktürmesi ve Polybuffer Exchanger 94 kromatografisi yöntemleri kullanmış olup yapılan çalışma sırasında enzim aktivitesinde önemli bir kayıp gözleendiği için saflaştırma işlemlerinden vazgeçilmiştir (Karacaoğlan and Özer 2005).

İnsan SDH enzimini kodlayan gen bölgesini Darmanin ve arkadaşları tarafından karaciğer cDNA kütüphanesinden izole edilip prokaryotik ekspresyon vektörüne takılarak *Escherichia coli* BL21'e transfer edilmiştir. Yapılan işlemler sonrası elde edilen bakteriden insan sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi (Q99 Sepharose kolon) ve boya afinitesi (Green-18 kolon) teknikleri ile 23 kat saflaştırmışlar ve saflaştırılan homotetramerik SDH enziminin bir alt biriminin molekül kütlesi SDS-PAGE kullanılarak 37 kDa olduğu bildirilmiştir (Darmanin *et al.* 2003).

Tez çalışmamızda, keçi böbrek AR enzimi beş basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (%20-70), DEAE Sephadex iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Bu tekniklerle AR enzimi keçi böbreğinden 2,73 EÜ/mg spesifik aktivite, %0,14 verimle yaklaşık 35 kat saflaştırılmıştır. Yapılan bütün işlemler sırasında sıcaklık +4°C'de olması gerektiğinden işlemler soğuk bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece sıcaklık değişimlerinin sebep olacağı enzimin aktivite kaybının önüne geçilmiştir.

Spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için amonyum sülfat çöktürmesi kısmi bir saflaştırma yöntemidir. Amonyum sülfat çöktürmesi numune içerisindeki safsızlıklar giderilerek proteinlerin daha derişik halde elde edilmesini sağlar. Bu nedenle kromatografik işlemler öncesinde bu işlemin yapılması enzimin daha derişik hale getirilmesi açısından önemlidir. Bu sebeple yaptığımız çalışmada keçi böbrek AR

enzimi için %20-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında ise diyaliz işlemi yapıldı. Böylece düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar ortamdan uzaklaştırılmış oldu.

Keçi böbrek AR enziminin saflaştırılması işlemlerinde DEAE Sephadex, Jel filtrasyon ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Bu iyon değişim kromatografisi, proteinleri taşıdıkları net yüklere göre ayırmaktadır. İyon değişim reçinesinin çalışmada pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar paketlenir. Protein karışımı kolon boyunca düşük iyonik şiddetli tamponla yürütülür. Kullanılan bu tamponun pH'sı, hedef proteinin reçineye tutunmasını sağlayacak bir değere sahip olmalıdır. Tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından küçük olursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değiştirici ile bağlanarak kolona tutunur. Bunun tersine tamponun pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha büyük olursa proteinin yükü pozitif olur ve bir katyon değiştiriciyle bağlanır. Kolona bağlanmayan proteinler, tampon çözelti vasıtası ile kolondan öncelikli olarak akarlar. Kolona bağlanan proteinlerin, pH'sı veya iyonik gücü farklı bir tampon aracılığı ile yükü değiştirilerek kolondan ayrılması sağlanır. Bu kromatografi çeşitinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonuna sahip tamponlarda olması istenmemektedir. Bu sebeple çalışmamızda kromatografik çalışmalar süresince düşük tuz konsantrasyonunda tampon çözeltiler kullanıldı (Alım 2010).

Yaptığımız bu çalışmada, AR enzimi, Bohren ve arkadaşları tarafından rapor edildiği şekliyle izoelektrik pH'sı (pH=6,2) (Bohren *et al.* 1991) göz önünde alınarak DEAE Sephadex kolonunda pH=7,4'de çalışıldı. AR enzimi pH=7,4'de DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve enzim kolonu dengelemek için kullanılan tampon çözelti ile birlikte elüe edildi. Bunun sebebi ise, pH=7,4'de DEAE Sephadex kolonuna AR proteininden daha kuvvetli bağlanan proteinlerin varlığı olarak tahmin edilmektedir. Böylelikle enzim kolona bağlanan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. DEAE-Sephadex iyon değişim kolonundan elüe edilen ve AR enzim aktivitesi bulunan elüatlar protein büyüklüğü esasına göre ayırım yapan jel filtrasyon kolonuna yüklendi ve ayırım sağlandı. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen ve AR aktivitesi gösteren

elüatlar birleştirilerek 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Afinite kolonuna tutunan enzimler elüe edildi ve enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Keçi böbreğinden elde edilen AR enziminin saflığı SDS-PAGE'de tek bant gözlenmesi ile ispatlanmış oldu (Şekil 4.7).

Yaptığımız bu çalışmada SDS-PAGE metodu ile keçi böbreğinden elde edilen AR enziminin alt birim molekül kütesinin belirlenmesi için kullanıldı. Şekil 4.7'de verildiği gibi standart protein numuneleri ile beraber keçi böbreğinden elde edilen enzim numunesi SDS-PAGE'de yürütüldü ve Log MA-R_f standart grafiği çizilerek Şekil 4.8'de verildi. Keçi böbrek dokusundan elde edilen AR enziminin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikten enzimin alt birim molekül kütesi hesaplandı. Yaptığımız çalışmada keçi böbreği AR enziminin alt birim molekül kütesi 47 kDa olarak belirlendi.

Her bir enzimin birim zamanda substratını en fazla ürüne dönüştüren belirli sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir. Keçi böbreğinden saflaştırılan AR enziminin optimum aktiviteye sahip olduğu sıcaklığının belirlenmesi için dijital su banyosu kullanıldı. Ölçümler 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve keçi böbrek AR enzimi için optimum sıcaklık 30°C olarak belirlendi. Keçi böbrek AR enzimi için optimum pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanıldı ve optimum pH 200 mM Na-fosfat pH=5,5 tamponu olarak belirlendi. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi için, farklı konsantrasyonlarda Na-fosfat tampon çözeltileri kullanıldı ve optimum iyonik şiddet 900 mM olarak tespit edildi. Keçi böbrek AR enziminin stabil pH'sı ise, farklı pH'larda Glisin/NaOH, Na-fosfat ve Tris/HCl tamponları kullanılarak pH=7,5 (Na-fosfat) olarak belirlendi.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar; SDH'in inhibe olmasının hiperglisemi durumunda aktif hale gelen polioll mekanizması ile ilgili redoks bozuklukları düzelterek diyabetin sebebiyet verdiği komplikasyonların ortaya çıkışını geciktirmede etkili olabileceğini göstermektedir (Kador *et al.* 1998). Bu nedenden dolayı birçok araştırmacı güçlü ve

etkili SDH inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır (Lindstad and McKinley-McKee 1997).

Yukarıda da belirtildiği üzere poliöl yolu canlılar için çok önemli bir yer işgal etmektedir. Bu nedenle AR ve SDH enzimleri için yapılan çalışmalar bu enzimlerin sebep oldukları diyabetik komplikasyonların geciktirilmesi ve/veya önlenmesi açısından hayati önem arz etmektedir. Bu durum, yaptığımız çalışmanın önemini ciddi bir şekilde ortaya koymaktadır. Özellikle poliöl yolunun hız-sınırlayıcı enzimi olan AR için yapılan inhibisyon çalışmaları oldukça önemlidir.

Sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırma çalışmaları pek çok kaynaktan yapılmıştır. Enzim ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmış olup (Brakley 1951), sonraki yıllarda faklı memeli dokularından (Williams-Ashman *et al.* 1957; Smith 1962; Reng and Torack 1977; Bailey *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983; Wiesinger and Hamprecht 1987; Maret and Auld 1988; Marini *et al.* 1997) ve çeşitli bitki kaynaklarından (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000) saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

Memeli dokularından sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması oldukça zor bir işlemdir. Bunun en büyük sebebi ise enzimin kararsız olması ve stabil olmamasından kaynaklanmaktadır. Saflaştırma işlemi yapılan bir çok çalışmada enzimin bu özelliği gözlenmiştir (Smith 1962; Rehg and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1983; Karacaoğlan and Özer 2005).

Bugüne kadar sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında birçok kromatografik teknik kullanılmıştır. Örneğin Sorbitol dehidrogenaz enzimi sıçan beyninden, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz, CM-selüloz kromatografisi yöntemleri kullanılarak Rehg ve Torack tarafından 1977 yılında %13,6 verimle 700 kat kısmen saflaştırılmıştır (Rehg and Torack 1977).

O'Brien ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi, protamin sülfat çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz, CM-Selüloz, Matrex Red A-gel, ultrafiltrasyon teknikleri kullanılarak 6 basamakta %5,5 verimle 690 kat kısmi olarak saflaştırılmıştır (O'Brien *et al.* 1983).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması işlemlerinde pek çok kromatografik yöntem kullanılmıştır. Sığır lensi sorbitol dehidrogenaz enzimi, %16 verimle, 3×10^4 kat saflaştırılmış olup saflaştırma işlemlerinde DE-52, amonyum sülfat çöktürmesi, Affi Blue, 2.DE-52, S-200, Bio Sil Sec 250 teknikleri kullanılarak altı basamakta saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzimin her bir alt birimi 39 kDa, enzimin aktif formunun molekül kütlesi ise 156 kDa olarak belirlenmiştir (Marini *et al.* 1997).

Yaptığımız çalışmada keçi böbrek dokusundan SDH enzimi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.12'te gösterildiği şekilde saflaştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, keçi böbrek SDH enzimi dört basamakta saflaştırılmış olup saflaştırma işlemlerinde amonyum sülfat çöktürmesi (%40-60) (Karacaoğlan ve Özer), DEAE Sephadex iyon değişim kromatografisi CM-selüloz iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerle SDH enzimi keçi böbreğinden 19,6 EÜ/mg spesifik aktivite, %0,05 verimle yaklaşık 124,05 kat saflaştırılmıştır.

Bu çalışmada keçi böbrek SDH enzimi için %40-60 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış olup bu işlem sonrasında diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar ortamdan uzaklaştırılmış oldu.

Keçi böbrek SDH enziminin saflaştırılması işlemlerinde DEAE Sephadex, CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi, sabit fazda proteinlerin molekül büyüklüklerine göre yürüme hızlarına göre ayırımı sağlayan kromatografik bir yöntemdir.

Yaptığımız çalışmada, SDH enzimi, önceden rapor edilen şekilde izoelektrik pH'sı (pI=7,3) (Lindstad and McKinley-Mckee 1996) ve stabil pH aralığı (pH 5,0-9,0) (Reiersen *et al.* 1992) göz önünde bulundurularak DEAE Sephadex kromatografisinde pH=7,9'da çalışıldı. SDH enzimi pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve bunun sonucunda dengeleme tampon ile beraber elüe oldu. pH=7,9'da SDH enziminin DEAE Sephadex kolonuna bağlanmamasının nedeni, ortamda DEAE Sephadex kolonuna SDH enziminden daha kuvvetli bağlanan proteinlerin varlığından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu yöntemle enzim kolona tutunan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. SDH enzim aktivitesi olan ve DEAE-Sephadex iyon değişim kolonundan elde edilen elüatlar CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklendi. Kolona tutunan enzimler elüe edildikten sonra aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Jel filtrasyon sonucu elde edilen enzimin saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. Keçi böbreğinden elde edilen SDH enziminin saflığı SDS-PAGE'de tek bant gözlenmesi ile kanıtlanmış oldu (Şekil 4.12). SDH enzimin düşük verimle saflaştırılmasının nedeni, kromatografi işlemleri sırasında enzimin hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesidir.

Yaptığımız bu çalışmada SDS-PAGE metodu keçi böbreğinden elde edilen SDH enziminin alt birim molekül kütlesinin belirlenmesi için kullanıldı. Şekil 4.11'de verildiği gibi standart protein numuneleri ile beraber keçi böbreğinden elde edilen enzim numunesi SDS-PAGE'de yürütüldü ve log M_A-R_f standart grafiği çizilerek Şekil 4.13'de verildi. Keçi böbrek dokusundan elde edilen SDH enziminin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikten enzimin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. Yaptığımız çalışmada keçi böbreği SDH enziminin alt birim molekül kütlesini 48,11 kDa olarak belirlendi.

Keçi böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum aktiviteye sahip olduğu sıcaklığının belirlenmesi için dijital su banyosu kullanıldı. 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve keçi böbrek SDH enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Keçi böbrek SDH enzimi için optimum pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanıldı ve optimum pH 25 mM

Glisin/NaOH pH=9,5 tamponu olarak belirlendi. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi için, farklı konsantrasyonlarda Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanıldı ve optimum iyonik şiddet 700 mM olarak belirlendi. Keçi böbrek SDH enziminin stabil pH'sı ise, farklı pH'larda Glisin/NaOH, Na-fosfat ve Tris/HCl tamponları kullanılarak pH=10,5 (Glisin/NaOH) olarak belirlendi.

Bilindiği üzere enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ değeridir. Çalışmamızda AR enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri hesaplanarak belirlendi. Çalışmamızda en yüksek inhibisyonu IC₅₀ değeri 0,0274 mM olan seftriakson antibiyotiği göstermiştir. Seftriakson bileşiğinden yola çıkılarak daha güçlü AR inhibitörleri sentezlenebilir. Bu bileşiği IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,061 ve 0,25 mM olan amikasin sülfat ve siproflaksasin bileşikler izlemektedir. AR enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin inhibisyon büyüklükleri büyükten küçüğe doğru sıralaması; seftriakson> amikasin sülfat> siprofloksasin> vankomisin > sefoperazon > sefazolin > meropenem > sefuroksim > ampisilin şeklindedir. Metallerde ise en yüksek inhibisyonu IC₅₀ değeri 0,000445 mM olan Co⁺² iyonu göstermiştir. Bu metali IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,0286 olan FeSO₄ izlemektedir.

AR enzimi aktivitesi üzerine kullanılan bütün inhibitörler SDH enzimi üzerine de çalışıldı. Çalışmamızda en yüksek inhibisyonu IC₅₀ değeri 0,016 mM olan rifamisin sodyum antibiyotiği göstermiştir. Bu bileşiği IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,025 ve 0,15 mM olan seftriakson ve sefuroksim sodyum bileşikler izlemektedir. Poliol yolunun iki enzimi üzerine de inhibisyon etkisi gösteren bileşikler arasında en iyi inhibisyon etkisini seftriakson bileşiği göstermiştir (AR için IC₅₀ değeri 0,0274 mM ve SDH için IC₅₀ değeri 0,025 mM). Seftriakson bileşiği referans alınarak ve bu bileşik üzerinde bazı modifikasyonlar denenerek poliol yolunun tamamını inhibe eden inhibitörler sentezlenebilir. SDH enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin inhibisyon büyüklükleri büyükten küçüğe; rifamisin sodyum > seftriakson > sefuroksim > sefoperazon sodyum > siproflaksasin > amikasin sülfat > meropenem > sefazolin şeklinde sıralanmaktadır. Buradan rifamisin sodyum bileşiğinin güçlü bir SDH inhibitörü olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çizelge 5.2. Keçi böbreğinden AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

AR enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar	
Spesifik Aktivite (EÜ/ml)	2,73
Saflaştırma Katsayısı	35
Verim	%0,14
Molekül kütlesi tayini (SDS-PAGE metodu ile) (kDa)	47
K_M (mM)	0,18
V_{max} (EU/ml)	0,106
Optimum pH	5,5
Optimum iyonik şiddet (mM)	900
Optimum sıcaklık (°C)	30
Stabil pH	7,5

Çizelge 5.3. Keçi böbreğinden SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar	
Spesifik Aktivite (EÜ/ml)	19,6
Saflaştırma Katsayısı	124,05
Verim	%0,05
Molekül kütlesi tayini (SDS-PAGE metodu ile) (kDa)	48,11
K_M (mM)	2,8
V_{max} (EU/ml)	0,49
Optimum pH	9,5
Optimum iyonik şiddet (mM)	700
Optimum sıcaklık (°C)	40
Stabil pH	10,5

Çizelge 5.4. Keçi böbrek AR enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefuroksim	6,54	7,52± 1,41	Yarışmasız
Seftriakson	0,0274	0,018±0,009	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,061	0,017±0,002	Yarışmasız
Sefzolin	2,5	1,73±0,18	Yarışmasız
Gentamisin Sülfat	3,483	0,84±0,13	Yarışmalı
Vankomisin	0,706	0,19±0,054	Yarışmalı
Ampisilin	24,755	16,06±7,59	Yarışmasız
Siproflaksasin	0,25	0,103±0,03	Yarışmalı
Meropenem	4,814	1,66±0,066	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,858	0,46±0,24	Yarışmalı
Linkomisin	Yeterli inhibison yok	-	-
Metal Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,000445	0,00019±0,0004	Yarışmasız
FeSO ₄	0,0286	0,00264±0,00081	Yarışmalı
MgCl ₂	1,007	-	-
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,084	0,017±0,002	Yarışmalı
CaCl ₂	Yeterli inhibison yok	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	Yeterli inhibison yok	-	-
KCl	Yeterli inhibison yok	-	-

Çizelge 5.5. Keçi böbrek SDH enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefuroksim	0,15	7,52± 1,41	Yarışmasız
Seftriakson	0,025	0,075±0,038	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,7	0,62±0,25	Yarışmasız
Sefazolin	13,86	0,013±0,0075	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,016	0,031±0,027	Yarışmasız
Siproflaksasin	0,27	0,54±0,39	Yarışmasız
Meropenem	4,88	3,5±4,2	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,16	0,067±0,074	Yarışmalı
Gentamisin	Yeterli inhibison yok	-	-
Vankomisin	Aktivasyon	-	-
Ampisilin	Aktivasyon	-	-
Metal Türü	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,00044	0,00018±0,0003	Yarışmalı
FeSO ₄	0,009	-	-
MgCl ₂	1,43	-	-
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,16	0,14±0,13	Yarışmalı
CaCl ₂	Yeterli inhibison yok	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	Yeterli inhibison yok	-	-
KCl	Yeterli inhibison yok	-	-

KAYNAKLAR

- Abaci, K., Uyaroglu, Y., Yalcin, M.A. and Yildiz, M., 2007. Observing chaotic oscillations induced by under load tap changer in power systems. *J. Applied Sci.*, 7, 66-71.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I. and Demopoulos, V.J., (2009). Aldose Reductase Enzyme and its Implication to Major Health Problems of the 21st Century. *Current Medicinal Chem.*, 16, 734-752.
- Alım, Z. and Beydemir, Ş., 2012. Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol Dehydrogenase. *Archives of Physiology and Biochemistry*. Early Online, 1-9.
- Alım, Z., 2010. Koyun karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması ve enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Anonim, 2009. [Www.Aof.Anadolu.Edu.Tr/Kitap/Ehsm/1209/Unite14.Pdf](http://www.Aof.Anadolu.Edu.Tr/Kitap/Ehsm/1209/Unite14.Pdf), [Ziyaret Tarihi: 30 Haziran 2009].
- Anonim, 2011. TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014) Ankara.
- Anonymous, 1988. American Diabetes Association, American Academy of Neurology. Report and Recommendations of the San Antonia Conference on Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*, 592-597.
- Anonymous, 1997, Expert Committee On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* July 1997; 20:1183-1197; Doi:10.2337/Diacare.20.7.1183
- Anonymous, 2003. The Expert Committe On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus: Report Of The Expert Committe On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26, 5-20.
- Anonymous. 1999. World Health Organization. Department Of Noncommunicable Disease Surveillance: Definition, Diagnosis Anc Classification Of Diabetes Mellitus And Its Complications. Part 1: Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. Who Publication, Geneva,1-59.
- Anonymous. 2003. Expert Committee On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. Follow-Up Report On The Diagnosis Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26, 3160-3167.
- Anonymous. 2004a. American Diabetes Association. Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 27 (1), 5-10.
- Anonymous. 2005. American Diabetes Association. Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 28, 37-42.
- Arslan, M., Ayvaz, C., Gedik O., Başkal, N. ve Sözen, T., 2003. Endokrinoloji. (ed.) İliçin, G., Biberoglu, K., Süleyman, G. ve Ünal, S., İç Hastalıkları, 2. Baskı, Güneş Kitabevi, s. 2279-2232, Ankara.
- Asano, T., Saito, Y., Kawakami, M. and Yamada, N., 2002. Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 16, 133-138.

- Atkinson, M.A. and Maclaren, N.K., 1994. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 331, 1428–1436.
- Bailey, J.P., Renz, C. and McGuinness, E.T., 1981. Sorbitol dehydrogenase from horse liver: purification, characterization and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69, 909-914.
- Bailey, R.R., Simpson, I.J. and Lynn, K.L., 1981. Goodpasture's syndrome with normal renal function. *Clin Nephrol.* 15: 211-215.
- Balasubramanyam, M., Rema, M. and Premanand, C., 2002. Biochemical and molecular mechanisms of diabetic retinopath. *Current Science*, 83 (12), 1506-1514.
- Baretto, O.C.O and Bcutler E., 1975. *j. Lab.Clin.Med.* 85, 645-649.
- Barisani, D., Meneveri, R., Ginelli, E., Cassani, C. and Conte, D., 2000. Iron overload and gene expression in HepG2 cells: analysis by differential display. *FEBS Lett.*, 10, 208-212.
- Başkal, N., 2005. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması. Erdoğan, G. (Editör). *Endokrinoloji Temel ve Klinik. Nobel Tıp Kitabevi*, s. 342-348, İstanbul.
- BertiMattera, L.N., Wilkins, P.L., Madhun, Z. and Suchovsky, D., 1996. P2-purinergic receptors regulate phospholipase C and adenylate cyclase activities in immortalized Schwann cells. *Biochemical Journal*, 314:555–561.
- Bery, G.T., 1995. The rol of polyols in the pathophysiology of hypergalactosemia. *European Journal of Pediatrics*, 154,53-64.
- Bianco, R.L., Reiger, M. and Sung, S.S., 1998. A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. *Yournal of the American Society for Horticultural Science*, 123, 2065-1068.
- Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B. and Gabbay, K.H., 1989. The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J. Biol. Chem.*, 264, 9547-9551.
- Bohren, K.M., Grimshawg, C.E. and Gabbaya, K.H. 1992. Catalytic effectiveness of human aldose reductase critical role of c-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 20965-20970.
- Bohren, K.M., Page, J.L., Shankar, R., Henry, S.P. and Gabbay, K.H., 1991. Expression of human aldose and aldehyde reductases. Site-directed mutagenesis of a critical lysine 262. *J. Biol. Chem.*, 266, 24031-24037.
- Borch-Johnsen, K., Andersen, P.K. and Deckert, T., The Effect Of Proteinuria On Relative Mortality İn Type 1 (İnsulin-Dependent) Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 1985;28:590–596.
- Boulton, A.J., 1997. Foot Problems in Patients with Diabetes Mellitus. In: *Textbook Of Diabetes*. Edited By; Pickup, J. and Williams, G., Blackwell Science, London.
- Boulton, A.J., Vinik, A.L., Arezzo, J.C., Bril, V., Feldman, E.L., Freeman, R., Malik, R.A., Maser, R.E., Sosenko, J.M. and Ziegler, D., 2005. Diabetic neuropathies: a statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*, 28, 956-962.
- Bozdag, S., Close, T., and Lonardi, S. 2007. A compartmentalized approach to the assembly of physical maps. In *Proceedings of IEEE International Symposium on Bioinformatics & Bioengineering (BIBE'07)*. 218–225.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*, 72, 248.

- Brakley, R.L., 1951. The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 49, 257-271.
- Bravi, C.M., Sans, M., Bailliet, G., Martínez Marignac, V.L., Portas, M., Barreto, I. and Bonilla, C., 1997. Characterization of mitochondrial DNA and Y-chromosome haplotypes in a Uruguayan population of African ancestry. *Hum. Biol.*, 69, 641–652
- Breusch F.L., 1942. Die zwei hauptwegw der atmung im warmblütergewebe *Enzymologia*, V10, P165-191.
- Brownlec, M., Viassara, H. and Ccrami, A., 1984. Non-enzymatic glycosyhiton and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, 101, 527-37.
- Brownlee, M., 1992. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. 15 (12), 1835-43.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813-820.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Bukan, N., Sancak, B., Bilgihan, A., Kosova, F., Buğdayci, G. and Altan, N., 2004. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 26, 519-522.
- Cameron, N.E., Cotter, M.A., 1992. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*, Nov;35(11):1011–1019.
- Carper, D., Nishimura, C., Shinohara, T., Dietzchold, B., Wistow, G., Raft, C., Kador, P. and Kinoshita, J.H., 1987. Aldose reductase and e-crystallin belong to the same protein superfamily as aldehyde reductase. *FEBS Lett.*, 220, 209-213.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A., 1997. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: *Biyokimya*, Nobel tip kitapevleri, s.130-131, İstanbul.
- Chase, H.P., Jackson, W.E., Hoops, S.I. and Cocherman, R.S., 1989. Glucose control and the renal and retinal complications of insülin dependent. *Diabetes*, 261, 6967-77
- Cheung, N., Wang, J.J., Klein, R., Couper, D.J., Sharrett, A.R. and Wong, T.Y., 2007. Diabetic retinopathy and the risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care*, 30, 1742-1746.
- Choi, H.K., Choi, B.C., Lee, S.H., Kim, J.W., Cha, K.Y. and Baek, K.H., 2003. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy patients. *Mol. Reprod. Dev.*, 66, 24–31.
- Chung, S.S. and Chung, S.K., 2005. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*, 6:475–486.
- Clee, M.S. and Attie, A.D., 2007. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrine Reviews*, 28 (1), 48–83.
- Costantino, R. F., Desharnais, R. A., Cushing, J. M. and Brian D.,1997 Chaotic Dynamics in an Insect Population. *Science*, 17 January: Vol. 275 no. 5298 pp. 389-391
- Darmanin, C., Chevreux, G., Potier, N., Dorsselaer, A.V., Hazemann, I., Podjarnyc, A. and El-Kabbani, O., 2004. Probing the ultra-high resolution structure of aldose

- reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 3797-3806.
- Darmanin, C., Iwata, T., Carper, D.A., Sparrow, L.G., Chung, R.P.T. and El-Kabbani, O., 2003. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59, 558-560.
- Da-Settimo, F., Primofiore, G. and Da Settimo, A., 2001. [1,2,4]Triazino[4,3-a]benzimidazole acetic acid derivatives: a new class of selective aldose reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4359-4369.
- DCCT, 1988. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Factors in Development of Diabetic Neuropathy. Baseline Analysis of Neuropathy in Feasibility Phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), 37, 476.
- Demir, H., Beydemir, S. and Ciftci, M., 2009. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Polygonum cognatum* Meissn Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 21, 517-527.
- Demopoulos, V.J., Zaher, N., Zika, C., Anagnostou, C., Mamadou, E., Alexiou, P. and Nicolaou, I., 2005. Compounds that combine aldose reductase inhibitory activity and ability to prevent the glycation (glucation and/or fructation) of proteins as putative pharmacotherapeutic agents. *Drug Design Reviews*, 2, 293-304.
- Dixon, D.G., Hodson P.V. and Kaiser K.L.E., 1987. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 685-696.
- Doehlert, D.C., 1987. Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 84, 830-834.
- Donkin, S.S., Bertics, S.J. and Armentano, L.E., 1997. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. *J Anim. Sci.*, 75 (11), 3082-3087.
- Du, Y., Parks, B.A., Sohn, S., Kwast, K.E. and Kelleher, N.L., 2006. Top-down approaches for measuring expression ratios of intact yeast proteins using Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem.*, 78(3):686-94.
- Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58 (77), 3-12.
- Eklund, H., Samama, J.P. and Jones, T.A., 1981. Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 146 (4), 561-87.
- El-Kabbani, O., Ruiz, F., Darmanin, C. and Chung, R.P.T., 2004. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 7-8.
- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, M. and Quioco, F.A. 1998. Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Molecular Vision*, 4; 19.
- Engelgau, M.M., 2004. Diabetes diagnostic criteria and impaired glycemic states: evolving evidence base. *Clinical Diabetes*, 22 (2), 69-70.
- Erdoğan, G., 1993. Diabetes Mellitus'un Tedavisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
- Ertekin, C., 2006. Diyabetik Nöropatiler. Santral ve Periferik Emg Anatomi-Fizyoloji-Klinik Türkiye. pp. 211-228.

- Estonius, M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jörnvall H., Höög J.O., 1993. Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues, *Eur. J. Biochem.*, 215, 497-503.
- Fabre, S., Manin, M., Pailhoux, E., Veysièrè, G. and Jean, C., 1994. Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase like protein specific to the mouse vas deferens. *J. Biol. Chem.*, 269, 5857- 5864.
- Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M.A., Oleggini, M., Graziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L. and Bevilacqua S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 317 (6), 350-357.
- Fishbein, H. and Palumbo, P.J., 1995. Acute metabolic complications in diabetes. In: *Diabetes in America*. DIANE Publishing, pp. 283-291, Chapter 13, USA.
- Flynn, T.G., Shires, J. and Walton, D.J., 1975. Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent aldehyde reductase from pig kidney: amino acid composition, reactivity of cysteinyl residues, and stereochemistry of Dglyceraldehyde reduction. *J. Biol. Chem.* 250, 2933 – 2940.
- Fong, D.S., Aiello, L., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., Ferris, F.L. and Klein, R., 2003. American Diabetes Association. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*, 26, 99-102.
- Forsblom, C.M., Groop, P.H., Ekstrand, A., Totterman, K.J., Sane, T. and Saloranta, C., 1998. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in Niddm. *Diabetes Care*, 21, 1932-1938.
- Frenette, G., Lessard, C. and Sullivan R., 2004. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol Reprod Dev.*;69: 448–456.
- Frystyk, J., Tarnow, L., Hansen, T.K., Parving, H.H. and Flyvbjerg, A., 2005. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia*, 48, 1911–1918.
- Gabbay, K.H., 1975. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.*, 26, 521-36.
- Gabbay, K.H., Merola, L.O. and Field, R.H., 1966. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*, 151 (707), 209.
- Gabray, K.J.I., 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes, *N. Eng. J. Med.* 288, 831-836.
- Galloway, J.A. and Chance, R.E., 1994. Improving insulin therapy: Achievements and challenges. *Horm. Metb. Res.*, 26, 591-598.
- Galloway, S.M., 1994. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ. Molec. Mutagen.* 23, 44–53.
- Garcia, S.F., Virag, L., Jagtap, P., Szabo, E., Mabley, J.G., Liaudet, L., Marton, A., Hoyt, D.G., Murthy, K.G., Salzman, A.L., Southan, G.J. and Szabo, C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.*, 7, 108-113.
- Garcia-Perez, A., Burg, M.B., 1991. Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolarity. *J Membr Biol.*;119:1–13.
- Geisen, R., Lucke, F.K. and Krockel, L., 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*, 72, 894–898.
- Gilligan, J.P. and Spector, S., 1984. Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*, 6 (suppl III), 11144-11149.

- Giugliano, D., Paolisso, G. and Ceriello, A., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19 (3), 257-267.
- Gleissner, C.A., Galkina, E., Nadler, J.L. and Ley, K., 2007. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4 (3), 131-140.
- González, J., Díaz, C.P., Domínguez, P.L., Ly, J. and Torres, Y. 1984. Evaluación de los desperdicios procesados como sustituto del pienso comercial para cerdos en ceba. *Cienc. Tec. Agric. Ganado Porcino* 7(4):57-74.
- Gonzalez, R.G., Barnett, P., Aguayo, J., Cheng, H.M. and Chylack, L.T.J., 1984. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, 33, 196–199.
- Grandhee, S.K. and Monnier, V.M., 1991. Mechanism of formation of the Maillard protein crosslink pentosidine. Glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* 266, 11649-11653.
- Greene, D.A., Lattimer, S.A. and Sima, A.A., 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.*, 316, 599-606.
- Greene, G.W., Rossi, S.R., Rossi, J.S., Velicer, W.F., Fava, J.L., Prochaska, J.O., 1999 Dietary applications of the stages of change model. *Journal of the American Dietetic Association*, 99:673–678.
- Gugliucci, A., 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc.*;100 (10):621–634.
- Gui, T, Tanimoto, T. and Nishimura, C., 1995. Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.*, 227, 448-453.
- Güler, E., Göncü, N. Ve Korkmaz, A., 1997. Diyabetin kronik komplikasyonlarının etiopatogenezi; retinopati, nöropati. *Katkı Pediatri Dergisi*, 18, 92-107
- Güner, A., 2005. Diyabetik Hastaların Diyabetik Ayak ile İlgili Bilgi ve Tutumlarının İrdelenmesi ve HBA1C'nin Diyabetik Ayak ile İlişkisi. *Uzmanlık Tezi*, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, İstanbul.
- Haller, M.J., Atkinson, M.A. and Schatz, D., 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr. Clin. North Am.*, 52, 1553-1578.
- Hamada, S., Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S. and Ogawa, T., 1994. Molecular and immunological characterization of minor fimbriae from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 17 (3), 197-200.
- Hamada, Y., Araki, N., Horiuchi, S. and Hotta, N., 1996. Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 11 (Suppl 5), 95.
- Hamada, Y., Nakamura, J., Naruse, K., Komori, T., Kato, K., Kasuya, Y., Nagai, R., Horiuchi, S., Hotta, N., 2000. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care*, 23, 1539-1544.
- Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W. and Siciliano, S. D., 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4901–4909.
- Hanefeld, M., Fischer, S., Julius, U., Schulze, J., Schwanebeck, U., Schmechel, H., Ziegelasch, H.J., Lindner, J., 1996. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia*, 39: 1577– 1583.

- Harrison, D.H., Bohren, K.M., Ringe, D., Petsko, G.A. and Gabbay, K.H. 1994. An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6- phosphate. *Biochemistry*, 33, 2011–2020.
- Harvey, R.A., Champe, P.C. and Ferrier, D.R., 2007. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, Bursa.
- Hasuike, Y., Nakanishi, T., Otaki, Y., Nanami, M., Tanimoto, T., Taniguchi, N. and Takamitsu, Y., 2002. Plasma 3-deoxyglucosone elevation in chronic renal failure is associated with increased aldose reductase in erythrocytes. *Am. J. Kidney Dis.*, 40, 464-471.
- Hatemi, H., 1996. Diabetes Mellitusun Tarihçesi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 7, 497-499.
- Hayman, S. and Kinoshita, J.H. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase *J Biol Chem.*, Vol 240 (877-882).
- Hers, H.G., 1956. Le mechanism de la transformation de glucose en fructose par les vesicules seminales. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22, 202-203.
- Hollenbeck, C., Reaven, G.M., 1987. Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64, 1169-1173.
- Hoshi, A., Takahashi, M., Fujii, J., Myint, T., Kaneto, H., Suzuki, K., Yamasaki, Y., Kamada, T. and Taniguchi, N., 1996. Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats. *Biochem. J.*, 318, 119-123.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., Shinjoh, M., Tomiyama, N. and Miyazaki, T., 2003. Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255-enzymatic and genetic characterization. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1647, 278-88.
- Humphrey, L.L., Ballard, D.J., Frohnert, P.P., Chu, C.P., O'Fallon, W.M. and Palumbo, P.J. 1989. Chronic renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. a population-based study in Rochester, Minnesota. *Ann. Intern. Med.*, 111, 788-796.
- IDF, 2003. International Diabetes Federation, World Diabetes Foundation. *Diabetes Atlas. 2nd Edition*, International Diabetes Federation, Brussels.
- İliçin, G., Biberoğlu, K., Süleymanlar, G. ve Ünal, S., 2003. İç Hastalıkları, Güneş Kitap Evi, Cilt 2, s. 2279-2331, Sıhhiye, Ankara.
- Jakuš, V. And Rietbrock, N., 2004. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res.*, 53, 131-142.
- James, C.A., Flynn, T.G., 1982. Purification and characterization of two aldose reductase isoenzymes from rabbit muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 3416-3424.
- Jedziniak J.A., Yates, E.M. and Kinoshita, J.H., 1973. Lens polyol dehydrogenase. *Exp. Eye Res.*, 16, 95–104.
- Jedziniak, J.A. and Kinoshita, J.H., 1971. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 10, 357-366.
- Jedziniak, J.A., Chylack L.T., Jr., Cheng H.M., Gillis M.K., Kalustian A.A. and Tung W.H., 1981. The sorbitol pathway in the human lens: Aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20, 314-326.
- Jeffery, J., Chesters J., Mills C., Sadler P.J., Jörnvall H., 1984. Sorbitol dehydrogenase is a zinc enzyme. *EMBO J.*, 3, 357-360.

- Jez, J.M. and Penning, T.M. 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*, 130, 499–525.
- Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M. and Penning, T.M. 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical Journal*, 326, 625–636.
- Jiang, H.E., Li, X., Zhao, Y.X., Ferguson, D.K., Hueber, F., Bera, S., Wang, Y.F., Zhao, L.C., Liu, C.J. and Li, C.S., 2006. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 108:414-422.
- Jin, J., Krishack, P. and Cao, D., 2006. Role of aldo-keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2767-2773.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jornvall, H., Eklund, H. and Hoog, J.O., 2001. Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, 130, 351-358.
- Jörnvall, H., von Bahr-Lindström, H., Jany, K.D., Ulmer, W. and Fröschle, M., 1984. Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: Structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases, *FEBS Lett.*, 165, 190–196.
- Jung, J., Ahn, Y.J., Kang, L.W., 2008. A Novel Approach to Investigating Protein/Protein Interactions and Their Functions by TAP-tagged Yeast Strains and its Application to Examine Yeast Transcription Machinery. *J Microbiol Biotechnol*, 18(4):631-8.
- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Jeon, S. M. 2006. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318, 476–483.
- Juutilainen, A., Lehto, S., Ronnema, T., Pyörala, K. and Laakso, M., 2007. Retinopathy predicts cardiovascular mortality in type 2 diabetic men and women. *Diabetes Care*, 30, 292-299.
- Kador, P. F., Robison, W. G. J. and Kinoshita, J. H., 1985. The pharmacology of aldose Reductase inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 25; 691–714.
- Kador, P.F., Inoue, J., Secchi, E.F., Lizak, M.J., Rodriguez, L., Mori, K., Greentree, W., Blessing, K., Lackner, P.A. and Sato, S., 1998. Effect of sorbitol dehydrogenase inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. *Exp. Eye Res.*, 67, 203-208.
- Kang, E.S., Kim, H.J., Paek, K.S., Jang, H.S., Chang, K.C., Lee, J.H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. and Seo, H.G., 2005. Phorbol ester up-regulates aldose reductase expression in A549 cells: A potential role for aldose reductase in cell cycle modulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1146-1155.
- Kao, Y.L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J. and Silink, M. 1999. An aldose reductase intragenic polymorphism associated with diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 46, 155-160.
- Karacaoğlan, V. and Özer, I., 2005. Steady-state kinetic properties of sorbitol dehydrogenase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, 309-312.

- Karasu, Ç., Öztürk, Y., Altan, N., Yıldızoğlu, N., İkizler, C. and Altan, V.M., 1990. Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen. Pharmacol.*, 21, 735.
- Karlsson, J., Rydgren, B., Eriksson, B., Järvholm, U., Lundin, O., Swärd, L. and Hedner, T., 1995. Postoperative analgesic effects of intra-articular bupivacaine and morphine after arthroscopic cruciate ligament surgery. *Knee Surg Sport Traumatol Arthroscopy*, 3, 55-9.
- Karlsson, M.G., Heins, R.D., Erwin, J.E., Berghage, R.D., Carlson, W.H. and Biambaum J.A., 1989. Irradiance and temperature effects on time of development and flower size in chrysanthemum. *Scientia Hort.*, 39, 257-267.
- Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Takagi, Y., Nishio, Y., Kikkawa, R. and Shigeta, Y., 1994. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia* 37: 264–269.
- Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Takagi, Y., Nishio, Y., Kikkawa, R. and Shigeta, Y., 1994. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia*, 37, 264–269.
- Kayaalp, S.O., 2002. *Tıbbı Farmakoloji*. Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, s. 645. Erzurum.
- Kempen, J.H., O'Colmain, B.J., Leske, M.C., Haffner, S.M., Klein, R., Moss, S.E., Taylor, H.R. and Hamman, R.F. 2004. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* Apr;122(4):552-63.
- Khalifah, R.G., Baynes, J.W. and Hudson, E.G., 1999. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257, 251-258.
- Kılınç, N., 2015. Sığır böbreğinden aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kim, D., Hong, S. and Lee, D., 2006. Binding of fidarestat stereoisomers with aldose reductase. *International Journal of Molecular Sciences*, 519-536.
- Kim, Y.S., Kim, N.H., Jung, D.H., Jang, D.S., Lee, Y.M., Jong, M.K. and Kim, J.S., 2008. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF- α expression in human lens epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 594, 18–25.
- Kinoshita, J.H., 1965. Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol.*, 4, 786-790.
- Kinoshita, J.H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation proctor lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 13 (10), 713-724.
- Kinoshita, J.H., Futterman, S., Satoh, K. and Merola, L.O., 1963. Factors affecting the formation of sugar alcohols in ocular lens. *Biochim. Biophys. Acta*, 74, 340–350.
- Kinoshita, J.H., Kador, P.F., Datiles, M.B., Fukui, H.N. and Hu, T.S., 1983. Corneal re-epithelialization in galactosemic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24, 563-569.
- Klein, R., 1984. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis less than 30 years. *Archives Of Ophthalmology*, 102, 520-526

- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A., 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, 416, 194-199.
- Kumar, P.A. and Reddy, G.B., 2007. Focus on molecules: Aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 739-740.
- Kurono, M., Fujiwara, I. and Yoshida, K., 2001. Stereospecific interaction of a novel spirosuccinimide type aldose reductase inhibitor, AS-3201, with aldose reductase. *Biochemistry*, 40, 8216-8226.
- Kvernmo, S. and Heyerdahl, S., 1996. Ethnic identity in aboriginal Sami adolescents: the impact of the family and the ethnic community context. *J Adolesc.*, 19, 453-463.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lal, S., Szwergold, B.S., Taylor, A.H, Randall, W.C., Kappler, F. and Brown, T.R., 1995. Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36, 969-973.
- Lee, A.Y. and Chung, S.S., 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb. J.*, 13, 23-30.
- Lee, K.W., Ko, B.C., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S.S., 2001. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs*, 12, 129-132.
- Lin, D., Boyle, M.P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E.S., Perona, P. and Anderson, D.J., 2011. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470:221-226.
- Lindstad, R. I., Teigen, K., Skjeldal, L., 1992. Inhibition of sorbitol dehydrogenase by nucleosides and nucleotides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, 202-208.
- Lindstad, R.I. and McKinley-McKee, J.S., 1996. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by thiol compounds. *Eur. J. Biochem.*, 241, 142-148.
- Lindstad, R.I. and McKinley-McKee, J.S., 1996. Stereo-selective affinity labelling of sheep liver sorbitol dehydrogenase by chloro-substituted analogues of 2-bromo-3-(5-imidazolyl) propionic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1293, 267-271.
- Lindstad, R.I., Hermansen, L.F. and McKinley-McKee, J.S., 1994. Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 15, 847-54.
- Lindstad, R.I., McKinley-McKee, J.S., 1997. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by the antidiabetogenic drug 2-hydroxymethyl-4-(4-N,N-dimethylaminosulfonyl-1-piperazino) pyrimidine. *FEBS Letters*, 408, 57-61.
- Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15, 203-210.
- Little, J.W., Falace, D.A., Miller, C.S. and Rhodus, N.L., 2002. *Dental Management Of The Medically Compromised Patient*, pp. 248-270, St. Louis, Mosby, USA.
- Liu, G., Hale, G.E. and Hughes, C. 2000. Galactose metabolism and ovarian toxicity. *Reproductive Toxicology*, 14, 377-384.
- Lorenzi, M., 2007. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research*, 1-10.

- Lou, M.F. and Kinoshita, J.H., 1967. Control of lens glycolysis. *Biochim Biophys Acta.*, 141 (3) 547–559
- Maret, W. and Auld D.S., 1988. Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. *Biochemistry*, 27, 1622-1628.
- Marini, I., Bucchioni, L., Borella, P., Del Corsa, A. and Mura, U., 1997. Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys*, 340, 383-391.
- Martin, D.W. Jr., Mayes, P.A. and Radwel, V.W., 1968. Harper'ın Biyokimyaya Bakışı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Meyer, W.R., Doyle, M.B., Grifo, J.A., Lipetz, K.J., Oates, P.J., DeCherney, A.H. and Diamond, M.P., 1992. Aldose reductase inhibition prevents galactose-induced ovarian dysfunction in the Sprague-Dawley rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167, 1837-1843.
- Miller, S.I., Ernst, R.K. and Bader, M.W., 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 36-46.
- Miyamoto, S. 2002. Molecular modeling and structure-based drug discovery studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2(3), 74-85.
- Mogensen, C.E., 1998. Preventing end-stage renal disease. *Diabet Med.*, 15, 551-556.
- Mogensen, C.E., Christensen, C.K. and Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32, 64-78.
- Morre, D.M., Lenaz, G. and Morre, D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation imaging, *J. Exp. Biol.*, 203, 1513-1521.
- Morrisey, K., Steadman, R., Williams, J.D. and Phillips, A.O., 1999. Renal proximal tubular cell fibronectin accumulation in response to glucose is polyol pathway dependent. *Kidney International*, 55, 160-167.
- Murray, R.K., 1988. *Harper's Biochemistry*, Twenty-First Edition, San Mateo, California, Appleton and Lange, 180-197.
- Murray R.K. and Mayes P.A., 1993. Pentoz Fosfat Yolu ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları. *Harper'ın Biyokimyası*, Barış Kitapevi, s:246–247.
- Negm, F.B., Loescher, W.H., 1979. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiol.*, 64, 69-73.
- Nelson and Cox., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Ng, K., Ye, R., Wu, X.C. and Wong, S.L., 1992. Sorbitol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Purification, characterization, and gene cloning. *J. Biol. Chem.*, 267, 24989-94.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I. and Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787–790.
- Nishimura, C., Matsuura, Y., Kokai, Y., Akera, T., Carper, D., Morjana, N., 1990. Cloning and expression of human aldose reductase. *J. Biol. Chem.*, 265, 9788-9792.

- O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., Thompson, M. R. and Formal, S. B., 1982 Production of *Shigella dysenteriae* type 1 -like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 146 :763-769.
- O'Brien, M.M., Schofield P.J. and Edwards M.R., 1983. Poliol pathway enzymes of human brain. Partial purification and properties of sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 211, 81-90.
- Oates, P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr. Drug Targets*, 9, 14.
- Obrosova, I.G. and Kador, P.F., 2011. Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12, 373-385.
- Oka, M. and Kato, N. 2001. Aldose reductase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition*, 16, 465-473.
- Oka, M., Matsumoto, Y., Sugiyama, S., Tsuruta, N. and Matsushima, M., 2000. A potent aldose reductase inhibitor, (2S,4S)-6-fluoro-2',5'-dioxyspiro [chroman-4,4'-imidazoline]-2-carboxamide (Fidarestat): its absolute configuration and interaction with aldose reductase by X-ray crystallography. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2479-2483.
- Olefsky, J.M., Kolterman, O.G. and Scarlett, J.A., 1982. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *The American Journal of Physiology*, 243, 15-30.
- Oura, Y., Yamada K., Shiratake K. and Yamaki S., 2000. Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 54, 567-572.
- Parving, H.H., 2001. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int.*, 60, 2041-2055.
- Patricia, I., Kirsti, H., Vesa, O., Kirsi, A.V., Jukka, K., Olof, S., Ele, F., Juhani, K. and Pirjo, N., 2003. Insulin-mediated hepatic glucose uptake is impaired in type 2 diabetes: evidence for a relationship with glycemic control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88 (5), 2055-2060.
- Pauly, T.A., Ekstrom, J.L., Beebe, D.A., Chrnyk, B., Cunningham, D., Griffor, M., Kamath, A., Lee, S.E., Madura, R., McGuire, D., Subashi, T., Wasilko, D., Watts, P., Mylari, B.L., Oates, P.J., Adams, P.D. and Rath, V.L., 2003. X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11, 1071-1085.
- Petrash J.M., 2004. All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (7-8), 737-749.
- Petrash, J.M., Harter, T.M., Devine, C.S, Olins, P.O., Bhatnagar, A., Liu, S. and Srivastava, S.K., 1992. Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *J. Biol. Chem.*, 267, 24833-24840.
- Podjarny, E., Losonczy, G. and Baylis, C., 2004. Animal models of preeclampsia. *Semin. Nephrol.* 24, 596-606
- Powers, A.C., 2005. Diabetes Mellitus. In: Kasper, D.I., Fauci, A.S., Braunwald, E., Hauser, S.I., Longo, D.I. and Jameson, J.I. (Ed) *S. Harrison's Principles Of Internal Medicine* 16th Edition. Mcgraw Hill, pp. 2152-2179, New York.

- Ramana, K.V. and Srivastava, S.K., 2006. Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine*. Nov;36(3-4):115-22. Epub 2006 Dec 15.
- Ramana, K.V., Chandra, D., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Aggarwal, B.B. and Srivastava, S. K., 2002. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 32063-32070.
- Ramasamy, R., Liu, H., Oates, P.J. and Schaefer, S., 1999. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor zopolrestat. *Cardiovascular research*, 2:130–139.
- Ramuzzi, G., Schieppati, A. and Ruggenti, P., 2002. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N. Eng. Med.*, 346, 1145-1151.
- Reaven, G.M., Bernstein, R., Davis, B. and Olefsky, J. M., 1976. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance?. *The American Journal of Medicine*, 60, 80–88.
- Regenold, W.T., Regenold, M.A., Kling, P. and Hauser, E., 2000. Elevated sorbitol concentration in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25, pp. 593–606.
- Rehg, J.E. and Torack, R.M., 1977. Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.*, 28, 655-660.
- Reiersen, H., Lindstad, R.I., Mckinley-Mckee, J.S., 1994. The inactivation of sheep liver sorbitol dehydrogenase by pyrophosphate and some analogous metal chelators. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311, 450-456.
- Reng and Torack 1977. Partial Purification and Characterization Of Sorbitol Dehydrogenase From Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 28 (3), 655–660.
- Resnikoff, S., 2004. Global data on vision impairment in the year 2002. *Bulletin of The World Health Organization*, 82, 844-851
- Riihimaa, P.T.N., 2002. Markers of microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. Department of Paediatrics, Department of Clinical Neurophysiology University of Oulu, Finland, 1-72.
- Rittner, H.L., Hafner, V., Klimiuk, P.A., Szweda, L.I., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M., 1999. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 1007-1013.
- Rogniaux, H, *et al.* 1999. Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *J Am Soc Mass Spectrom*, 10(7):635-47.
- Rondeau, J.M., Tete-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J.M., Barth, P., Biellman, J.F. and Moras, D., 1992. Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature*, 355, 469–472.
- Ropper, A.H. and Brown, R.H., 2006. *Diabetic Neuropathy*, Adams and Victor's Principles of
- Rother, K.I., 2007. Diabetes treatment bridging the divide. *New England Journal of Medicine*, 356, 1499–1501.
- Roubicek, T., Bartlova, M., Krajickova, J., Haluzikova, D., Mraz, M., Lacinova, Z., Kudla, M., Teplan, V. and Haluzik, M., 2009. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. *Nutrition*, 25, 762-768.

- Roy, R., Meier, B., McAinsh, A.D., Feldmann, H.M. and Jackson, S.P., 2004. Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J Biol Chem.*, 279(1):86-94.
- Ruef, J., Liu, S.Q., Bode, C., Tocchi, M., Srivastava, S., Runge, M. S. and Bhatnagar, A., 2000. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20, 1745-1752.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P. U., Suneetha, A., Rao Rao, T. S.; Srinivasulu, M. and Reddy, B., 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Med. Sci. Monit.*, 12, CR525-529.
- Sato, S. and Kador, P.F., 1990. NADPH-dependent reductases of the dog lens. *Exp Eye Res.* Jun, 50(6):629-34.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.
- Setter, S.M., Campbell, R.K. and Cahoon, C.J., 2003. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, 37, 1858-1866.
- Shinmura, K., Tang, X.L., Wang, Y., Xuan, Y.T., Liu, S.Q., Takano, H., Bhatnagar, A. and Bolli, R., 2000. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 10197-10202.
- Sicree, R., Shaw, J.E. and Zimmet, P.Z., 2003. The global burden of diabetes. In: Gan, D.(Ed.), *Diabetes Atlas*, 2nd ed. International Diabetes Federation, pp.15–71, Brussels.
- Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. *Biochem. J.*, 83, 135-144.
- Soulis-Liparota, T., Cooper, M.E., Dunlop, M. and Jerums, G., 1995. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*, 38, 387-394.
- Soyut, H., Beydemir, S., Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biol. Trace Elem. Res.*, 123, 179-190.
- Söyüt, H. and Beydemir, Ş., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition. *Protein and Peptide Letters*, 15-55, (8), 528-535.
- Sperling, M.A., 2008. *Diabetes Mellitus*. In: Sperling, M.A., Editor. *Pediatric Endocrinology*. pp. 374-421, Philadelphia, Saunders.
- Srivastava, S., Watowich, S. J., Petrash, J. M., Srivastava, S. K., and Bhatnagar, A., 1999. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry*, 38, 42–54.
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V. and Bhatnagar, A. 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.*, 26, 380-392.
- Steuber, H., Heine, A., Podjarny, A. and Klebe, G., 2008. Merging the binding sites of aldose and aldehyde reductase for detection of inhibitor selectivity determining features. *Journal of Molecular Biology*, 379, 991–1016.

- Stevens, J.D., Bonfil, R., Dulvy, N.K. and Walker, P.A., 2000. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57 (3), 476–494.
- Stevens, M.J., Obrosova, I., Cao, X., Van Husyen, C. and Grene, D.A., 2000. Effects of DL- α -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 49, 1006.
- Suryanarayana, P., Kumar, P.A., Saraswat, M., Petrash, J.M., Reddy, G.B., 2004. Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Emblica officinalis*: implications for the prevention of sugar cataract. *Mol Vis.*, 10:148–154.
- Szwergold, B.S., Howell, S.K. and Beisswenger, P.J. 2002. Nonenzymatic glycation/enzymatic deglycation: a novel hypothesis on the etiology of diabetic complications. *International Congress Series*, 1245, 143–152.
- Szwergold, B.S., Kappler, F. and Brown, T.R., 1990. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science*, 247, 451–454.
- Szwergold, B.S., Kappler, F. and Brown, T.R., 1990. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science*, 247, 451
- Tammali, R., Ramana, K.V. and Srivastava, K., 2007. Aldose reductase regulates TNF- α - induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 252, 299–306.
- Tammali, R., Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S. and Srivastava, S.K. 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 66 (19); 9705-13.
- Tammali, R., Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S. and Srivastava, S.K. 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 66 (19), 9705-9713.
- Tanimoto, T., Maekawaa, K., Okadaa, S. and Yabe-Nishimurab, C. 1998. Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta*, 365, 285-292.
- Telefoncu ,A.,1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notu, 1-16, 193-249, İzmir.
- Temelkova-Kurktschiev, T.S., Koehler, C., Henkel, E., Leonhardt, W., Fuecker, K. and Hanefeld, M. (2000). Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. *Diabetes Care*, 12, 1830-1834.
- Terubayashi, H., Sato, S. Nishimura, C., Kador, P. and Kiioshita, F., 1989. Localization of aldose and aldehyde reductase in the kidney, *J.H. Kidney Int.*, 36, 843.
- Tesfamariam, B., 1994. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 383-391.
- Tilton, R.G., Chang K., Nyengaard J.R., Van den Enden M., Ido Y. and Williamson J.R., 1995. Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin induced diabetic rats. *Diabetes*, 44, 234-242.
- Tornlinson, D.R., 1989. Polyols and myoinositol in diabetic neuropathy of mice and men. *Mayo. Clin. Proc.*, 64, 1030.

- Tsukushi, S., Katsuzaki, T., Aoyama, I., Takayama, F., Miyazaki, T., Shimokata, K. and Niwa, T., 1999. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: Role of the polyol pathway. *Kidney International*, 55, 1970-1976.
- Turgut, K. ve Ok, M., 1997. Veteriner Gastroenteroloji-Semptomdan Teşhisi. Bahçivanlar Basım San. A.Ş., s. 27, Konya.
- Ueda, Y., Yang, K., Foster, S.J., Kondo, M. and Kelsoe, G., 2004 Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.*, 199:47–58.
- Uk Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998). Tight blood pressure control, and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ*, 317, 703-713.
- Urzhumtsev, A., Tete-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A. D. and Moras, D., 1997. A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure*, 5, 601–612.
- Van Heyningen, H., 1959. Metabolism of xylose by the lens, 2. Rat lens *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.*, 73, 197-207.
- Vander Jagt, D.L., Kolb, N.S., Vander Jagt, T.J., Chino, J., Martinez, F.J., Hunsaker, L.A., 1995. Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1249, 117-126.
- Varma, S.D., Mizuno A. and Kinoshita J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, 195 (4274), 205-206.
- Viberti, G., 2005. Thiazolidinediones - Benefits on microvascular complications of type 2 diabetes. In *Journal of Diabetes and Its Complications*. May;19, 3, p. 168 – 177.
- Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman & Co, pp 978, San Francisco, USA.
- Wang, S.J., Yan, J.F., Hao, D., Niu, X.W. and Cheng, M.S., 2007. Synthesis and activity of a new series of (Z)-3-Phenyl-2-benzoylpropenoic acid derivatives as aldose reductase inhibitors. *Molecules*, 12, 885-895.
- Warren, J.C., Murdock, G.L., Ma, Y., Goodman, S.R. and Zimmer, W.E., 1993. Molecular cloning of testicular 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase: identity with aldose reductase. *Biochemistry*, 32, 1401–1406.
- Wermuth, B., Burgisser, H., Bohren, K. And Wartburg, J.P.V., 1982 Purification and Characterization of Human-Brain Aldose Reductase. *Eur. J. Biochem*, 127, 279-284.
- Wermuth, B., Bürgisser, H., Bohren, K. and Von Wartburg, J.P., 1982. Purification and characterization of human-brain aldose reductase. *Eur J Biochem*, 127(2):279-84.
- Wermuth, B., Munch, J.D. and Von Wartburg, J.P., 1977. Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *J. Biol. Chem.*, 252, 3821 – 3828.
- Wessels, A.M., Rombouts, S.A., Simsek, S., Kuijper, J.P., Kostense, P.J., Barkhof, F., Scheltens, P., Snoek, F.J. and Heine, R.J. 2006. Microvascular disease in type 1 diabetes alters brain activation: a functional magnetic resonance imaging study. *Diabetes*, 55, 334-340.

- WHO, 1999. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Report of A Who Consultation, Who Publ., Geneva.
- WHO, 2006. World Health Organization Europe. European Charter On Counteracting Obesity. Who European Ministerial Conference On Counteracting Obesity. Diet And Physical Activity For Health. Istanbul, Turkey, 15-17 November 2006.
- Wiernsperger, N.F. and Bouskela, E., 2003. Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication. *Diabetes Metab.*, 29, 77-87.
- Wiesinger, H. and Hamprecht B., 1987. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. *J. Neurochem.*, 48, 147.
- Wiesinger, H. and Hamprecht, B., 1989. Purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. *Journal of neurochemistry*, 52 (2): 342-8.
- Williams-Ashman *et al.* 1957. The effects of Type-1 and Type-2 diabetes on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 33, 519-22.
- Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. and Quiocho, F.A., 1992. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science*, 257, 81-84.
- Wilson, D.K., Nakano, T., Petrash, J.M. and Quiocho, F.A., 1995. 1.7 Å structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the aldo-keto reductase family, complexed with coenzyme and inhibitor. *Biochemistry*, 34, 14323-14330.
- Wyngaarden, J.B. and Smith, L., 1988. Cecil Textbook of Medicine, W.B. Saunders Company, pp. 1360-1381, Philadelphia.
- Yabe-Nishimura, C., 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews*, 50, 21-34.
- Yagihashi, S., Kamijo, M., Ido, Y. and Mirrlees, D.J., 1990. Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy. Ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 39:690-696.
- Yamagishi, S. and Takeuchi, M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med. Hypotheses*, 63, 135-137.
- Yamaguchi, H., Kanayama, Y. and Yamaki, S., 1994. Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 54, 567-72.
- Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Nishio, O. and Ushijima, U., 2003. Detection of norovirus (GI, GII) Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods*, 114, 37-44.
- Yang, J., Moravec, C.S., Sussman, M.A., Dipaola, N.R., Fu, D., Hawthorn, L., Mitchell, C.A., Young, J.B., Francis, G.S., McCarthy, P.M. and Bond, M. 2000. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*, 102, 3046-3052.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A.L. and Godowski, P.J., 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 395, 284-288.

- Yasuda, H., Terada, M., Maeda, K., Kogawa, S., Sanada, M., Haneda, M., Kashiwagi, A. and Kikkawa, R., 2003. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*, 69, 229-285.
- Yılmaz, T., 2006. Tip 1 Diabetes Mellitus. In: İmamoğlu, Ş., (Editör). *Diabetes Mellitus*. 1. Baskı. Deomed Yayıncılık, s. 55-56, İstanbul.
- Yılmaz, Y., Genç, Ş.C., Gürer Ö.F., 2000. Tectonics and Magmatism in Turkey and the Surrounding Area, When did the western Anatolian grabens begin to develop? *Geological Society, London, Special Publications*, eds. Bozkurt, E., Winchester J.A. and Piper J.D.A., 173, pp 353–384
- Zandt, V.M.C., Doan, B., Sawicki, D.R., Sredy, J. and Podjarny, A.D., 2009. Discovery of [3- (4,5,7-trifluoro-benzothiazol-2-ylmethyl)-pyrrolo[2,3-b] pyridin-1-yl]acetic acids as highly potent and selective inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 2006-2008.
- Zhang, L., Zhang, H., Zhao, Y., Li, Z., Chen, S., Zhai, J., Chen, Y., Xie, W., Wang, Z., Li, Q., Zheng, X. and Hu, X., 2013. Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: role of Trp112 (Trp111). *FEBS Lett.*, 15, 3681-3686.
- Zimmet, P., Alberti, K.G. and Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414 (6865), 782-787.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kahramanmaraş'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kahramanmaraş'da tamamladı. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2008 yılında tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve 2011 eğitimini tamamladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora eğitime başladı. Halen Bingöl Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksek Okulu İş Sağlığı ve Güvenliği Programında Öğretim Görevlisidir.