

**KOYUN KARACİĞERİNDEN SORBİTOL
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI
İLAÇLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Zuhal ALIM

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2010

Her hakkı saklıdır.

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOYUN KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Zuhal ALIM

KİMYA ANABİLİMDALI

ERZURUM

2010

Her hakkı saklıdır

Doç.Dr. Ő.Œr. BEYDEMİR danışmanlığında, Zuhall ALİM tarafından hazırlanan bu çalışma 18/05/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

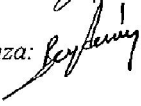
Başkan : Prof. Dr. Ő. İrfan KÜFREVLÖĞLU

İmza: 

Üye : Prof. Dr. MÜnir OKTAY

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ő.Œr. BEYDEMİR

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

Prof. Dr. Őmer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek lisans Tezi

KOYUN KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Zuhal ALIM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Sorbitol dehidrogenaz [L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14] enzimi, koyun karaciğerinden saflaştırıldı. Saflaştırma; homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi yöntemleri ile yapıldı. Saflaştırılan enzimin verimi ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %1,38 ve 101,8 kat olarak bulundu. Enzimin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütleini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve enzimin alt birim molekül kütlesi 39,8 kDa olarak belirlendi. Koyun karaciğer dokusundaki SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesi ise Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu kullanılarak 151,2 kDa olarak belirlendi. Ayrıca, koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan dakarbazin, tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, epirubisin HCl, midazolam, dekspantenol, menadion, kalsiyum folinat, gemitabin HCl, okzaliplatin, lidokain HCl, teofilin etilendiamin için IC₅₀ değerleri ve tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, menadion ilaçları için K_i sabitleri hesaplandı.

2010, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sorbitol dehidrogenaz, koyun karaciğeri, ilaç, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF SORBITOL DEHYDROGENASE FROM SHEEP LIVER, INVESTIGATION EFFECTS OF SOME DRUGS ON THE ENZYME

Zuhal ALIM

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

Supervisor: Assoc. Prof. Şükrü BEYDEMİR

Sorbitol dehydrogenase [L-Iditol: NAD⁺ oksidoreductase, EC 1.1.1.14] enzyme was purified from sheep liver. The purification was performed by preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography and CM-Sephadex C-50 ion-exchange chromatography. For purified enzyme; yield and purification fold were obtained as 1,38% and 101,8 respectively. To check the purity and determine subunit molecular weights of enzyme, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed which showed a single band and MW of approximately 39,8 kDa for sheep liver SDH. The molecular weight of native enzyme in sheep liver was estimated to be approximately 151,2 kDa by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. In addition, effects of some drugs on sheep liver sorbitol dehydrogenase enzyme activity were investigated. IC₅₀ values were calculated for the drugs dacarbazine, thiocolchicoside, methotrexate, furosemide, epirubicin hydrochloride, midazolam, dekspanthenol, menadion, calcium folinat, gemsitabine hydrochloride, oxaliplatin, lidokain hydrochloride, teofilin ethylenediamine which show inhibition effects and K_i values were calculated for the drugs thiocolchicoside, methotrexate, furosemid, menadion.

2010, 120 pages

Keywords: Sorbitol dehydrogenase, sheep liver, drug, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bütün çalışmalarım süresince anlayışını, sabrını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz şükran duygularımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve değerli arkadaşım Ebru AKKEMİK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zuhal ALIM

Mayıs, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi	14
1.2. Diabetes Mellitus	18
1.3. Poliol Yolu (Sorbitol yolu) ve Metabolik Önemi	21
1.4. Deneysel Çalışmada Kullanılan ilaçlar	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ	37
3. MATERYAL ve YÖNTEM	46
3.1. Materyal	46
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	46
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	46
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	47
3.2. Yöntemler	51
3.2.1. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü	51
3.2.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması	52
3.2.2.a. Koyun karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması	52
3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	53
3.2.2.c. Diyaliz	54
3.2.2.d. Ultrasantrifüj	54
3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	54
3.2.2.f. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi	55
3.2.3. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini	56
3.2.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğeri SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini ...	57

3.2.5. Kalitatif protein tayini.....	58
3.2.6. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	59
3.2.7. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini	60
3.2.8. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi	61
3.2.9. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait ait çalışmalar	61
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	73
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	73
4.2. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	73
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	73
4.2.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	74
4.2.3. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	75
4.3. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü	76
4.4. Koyun Karaciğeri SDH Enziminin Aktif Formunun Molekül Kütlesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar.....	77
4.5. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	78
4.6. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	91
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	94
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	121

SİMGELER DİZİNİ

3DG	3-deoksiglukoz
6PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
AGE	İleri glikasyon ürünleri
AR	Aldoz redüktaz
BSA	Bovine serum albumin
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
F3P	Fruktoz-3-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GABA	Gama-aminobütirik asit
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
HCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
HCA-IX	İnsan karbonik anhidraz IX izoenzimi
HCA-XII	İnsan karbonik anhidraz XII izoenzimi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IUB	Uluslararası biyokimya birliği
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

NAD ⁺	Nikotinamidadenindinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamidadenindinükleotit (indirgenmiş form)
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (indirgenmiş form)
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nox	NADH-oksidaz
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
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri ...	12
Şekil 1.2.	SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko atomunun koordinasyonu	16
Şekil 1.3.	SDH enziminin kuarterner yapısı ve enzimin bir alt biriminin yapısı	17
Şekil 1.4.	Hipergliseminin etkilediği metabolik yollar	20
Şekil 1.5.	Sorbitol (poliol) yolunun şematik gösterimi	22
Şekil 1.6.	Glikoliz ve poliol yoluna giren glukozun akibeti.....	23
Şekil 1.7.	Poliol yolu ve deneysel diabetik nöropatinin patogenetik mekanizmaları arasındaki ilişkinin şematik gösterimi	25
Şekil 1.8.	Aldoz redüktaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin NADPH kullanım yarışı.....	27
Şekil 1.9.	Dakarbazin molekülünün yapısal formülü	30
Şekil 1.10.	Tiyokolşikosid molekülünün yapısal formülü	30
Şekil 1.11.	Metotreksat molekülünün yapısal formülü	31
Şekil 1.12.	Furosemid molekülünün yapısal formülü	31
Şekil 1.13.	Epirubisin HCl molekülünün yapısal formula	32
Şekil 1.14.	Midazolam molekülünün yapısal formülü	32
Şekil 1.15.	Dekspantenol molekülünün yapısal formula	33
Şekil 1.16.	Menadion Sodyumbisülfid molekülünün yapısal formula	34
Şekil 1.17.	Kalsiyum Folinat molekülünün yapısal formula.....	34
Şekil 1.18.	Gemsitabin HCl molekülünün yapısal formula.....	35
Şekil 1.19.	Okzaliplatin molekülünün yapısal formula.....	35
Şekil 1.20.	Lidokain HCl molekülünün yapısal formula	36
Şekil 1.21.	Teofilin Etilendiamin molekülünün yapısal formula	36
Şekil 2.1.	Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü SDI 158'in kimyasal yapısı	42
Şekil 2.2.	SDI 158 (CP- 166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko atomuyla ve NADH ile etkileşimi	43
Şekil 4.1.	Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	73

Şekil 4.2.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği.....	74
Şekil 4.3.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflığının SDS-PAGE’de elde edilen sonucu	76
Şekil 4.4.	SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun karaciğeri SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	77
Şekil 4.5.	Koyun karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	78
Şekil 4.6.	Koyun karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik.....	78
Şekil 4.7.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Dakarbazin ilacının etkisi	83
Şekil 4.8.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Tiyokolşikosid ilacının etkisi	84
Şekil 4.9.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Metotreksat ilacının etkisi.....	84
Şekil 4.10.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Furosemid ilacının etkisi	85
Şekil 4.11.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Epirubisin HCl ilacının etkisi.....	85
Şekil 4.12.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Midazolam ilacının etkisi	86
Şekil 4.13.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Dekspantenol ilacının etkisi.....	86
Şekil 4.14.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Mendion sodyumbisülfid ilacının etkisi	87
Şekil 4.15.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Kalsiyum folinat ilacının etkisi	87
Şekil 4.16.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Gemsitabin HCl ilacının etkisi.....	88
Şekil 4.17.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Okzaliptatin ilacının etkisi.....	88
Şekil 4.18.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Lidokain HCl ilacının etkisi.....	89
Şekil 4.19.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Teofilin etilendiamin ilacının etkisi.....	89
Şekil 4.20.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Tiyokolşikosid ilacının etkisi [I ₁] = 0,035 mM, [I ₂] = 0,106 mM, [I ₃] = 0,177 mM	91
Şekil 4.21.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Metotreksat ilacının etkisi [I ₁] = 0,066 mM, [I ₂] = 0,11 mM, [I ₃] = 0,154 mM	92
Şekil 4.22.	Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Furosemid ilacının etkisi [I ₁] = 0,0303 mM, [I ₂] = 0,152 mM, [I ₃] = 0,303 mM	92

Şekil 4.23. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Mendion ilacının etkisi [I ₁] = 0,0724 mM, [I ₂] = 0,362 mM, [I ₃] = 0,724 mM	93
Şekil 5.1. Hiperglisemi ve endotelial fonksiyon bozukluğu.....	94
Şekil 5.2. Poliöl yolunun diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi	95
Şekil 5.3. SDS-PAGE fotoğrafı	102
Şekil 5.4. SDH enziminin alt birim molekül kütesini gösteren SDS-PAGE fotoğrafı ve enzimin aktif formunun molekül kütesinin belirlendiği log MK-K _{av} standart grafiğı	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	SDH enziminin saflaştırıldığı memeli dokuları	38
Çizelge 3.1.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Dakarbazin'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	62
Çizelge 3.2.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Tiyokolşikosid'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	62
Çizelge 3.3.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Metotreksat'ın IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	63
Çizelge 3.4.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Furosemid'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	63
Çizelge 3.5.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Epirubisin HCl'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	64
Çizelge 3.6.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Midazolam'ın IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	64
Çizelge 3.7.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Dekspantenol'ün IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	65
Çizelge 3.8.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Menadion Sodyumbisülfid'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	65
Çizelge 3.9.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kalsiyum Folinat'ın IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	66

Çizelge 3.10.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Gemsitabin HCl'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	66
Çizelge 3.11.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Okzaliplatin'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	67
Çizelge 3.12.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Lidokain HCl'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	67
Çizelge 3.13.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Teofilin Etilendiamin'in IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	68
Çizelge 3.14.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Tiyyokolşikosid'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	69
Çizelge 3.15.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Menadion sodyumbisülfid'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	70
Çizelge 3.16.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Furosemid'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	71
Çizelge 3.17.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Metotreksat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	72
Çizelge.4.1.	Koyun karaciğeri SDH enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi	74
Çizelge 4.2.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması basamakları	75
Çizelge 4.3.	Dakarbazin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	79
Çizelge 4.4.	Tiyyokolşikosid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	79

Çizelge 4.5.	Metotreksat ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	79
Çizelge 4.6.	Furosemid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	80
Çizelge 4.7.	Epirubisin HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	80
Çizelge 4.8.	Midazolam ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	80
Çizelge 4.9.	Dekspantenol ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi ..	81
Çizelge 4.10.	Menadion sodyumbisülfid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	81
Çizelge 4.11.	Kalsiyum folinat ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	81
Çizelge 4.12.	Gemsitabin HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	82
Çizelge 4.13.	Okzaliptatin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	82
Çizelge 4.14.	Lidokain HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi...	82
Çizelge 4.15.	Teofilin Etilendiamin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi	83
Çizelge 4.16.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri.....	90
Çizelge 4.17.	Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K _i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	93
Çizelge 5.1.	Koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonları ve bu ilaçların tıpta kullanılan konsantrasyonlarının karşılaştırılması	108
Çizelge 5.2.	Koyun karaciğer dokusu SDH enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları	110

1. GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmalarında kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 lük ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimlerin katalitik aktivite gösterebilmeleri üç boyutlu yapılarını kazanmalarına bağlıdır. Denatürasyona uğramış enzimlerin katalitik aktivite göstermeleri olanaksızdır. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, 40.000.000 s⁻¹ ile katalazdır (Fersht 1999).

Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12000' den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptirler. Bazı enzimler aminoasit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe⁺², Mg⁺², Mn⁺² veya Se gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler ise aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyaç duyarlar.

Protein yapısına çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehytler, koenzim A, açıl grupları gibi özgül işlevsel gruplar için geçici taşıyıcı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005). Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır.
2. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler *in vivo* ortamda olduğu gibi *in vitro* ortamda da görev yaparlar.

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimler genelde ya substrat adının sonuna “- az ” eki getirilerek ya da ilk bulucularının ortaya attıkları isimlerle tanınmaktadırlar. Örneğin, fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Fakat bu isimler çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğinden Uluslararası Biyokimya birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981; Keha ve Küfrelioğlu 2005). Bundan dolayı enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmışlardır;

Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup enzimler dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarak da anılan enzimlerdir.

Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen

enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

Ligazlar: Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine son derece spesifiktirler. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir, hatta bazı enzimlerin substrat özgüllükleri mutlaklıdır. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lizin veya arginin rezidülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını parçalar. Kanın pıhtılaşmasında görev alan trombin ise karboksil bileşeni arginine ve amino bileşeni glisin aminoasitine ait peptit bağını parçalamaktadır. Buradan anlaşılacağı gibi trombinin substrat özgüllüğü yine bir proteolitik enzim olan tripsine göre daha fazladır.

Birçok enzimin stereospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu ürüne çevirirken, bir kısmı da L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğin, glutamat dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi de L-laktat üzerinde etkilidirler (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. izoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayısı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda

lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midede pH'ın 2,0 olduğu asidik ortamda maksimum çalışır; bunun aksine pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH 8,5 da optimum olarak çalışabilir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Genelde bir kimyasal reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Sıcaklık enzimli reaksiyonlarında hızlarının artışına sebep olan önemli bir faktördür, yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Bununla birlikte belli bir noktaya gelindiğinde enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzimin üç boyutlu yapısının etkilendiğini yani enzimin denatüre olduğunu göstermektedir. Bir enzim için 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q_{10} değeriyle ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler. İkinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara 1989).

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük mol kütlelerine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de

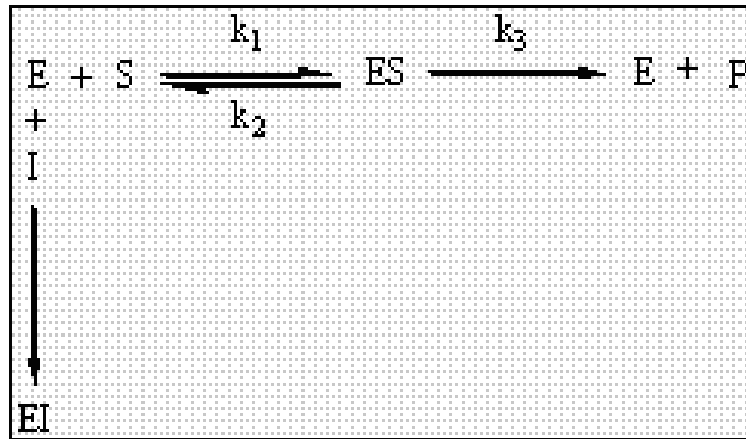
metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemlidir.(Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

a) Dönüşümsüz inhibisyon

b) Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyon'da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna güzel bir örnektir. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata olan ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması;



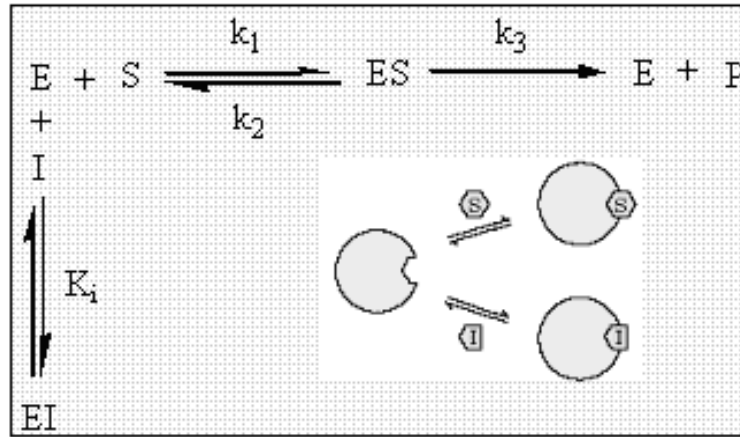
şeklinde yazılabilir (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

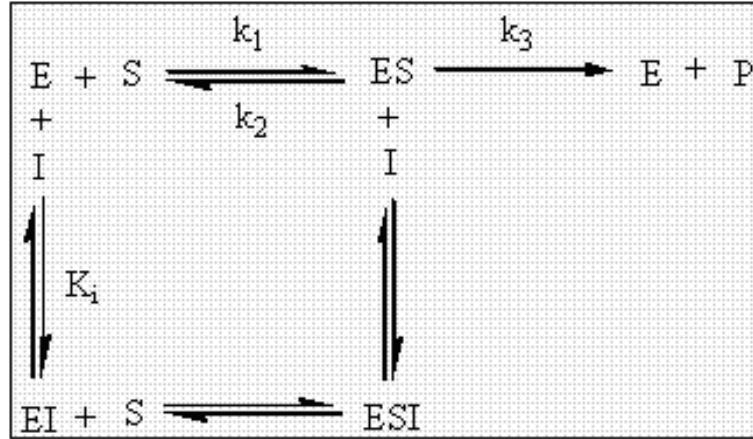
- a) Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- b) Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- c) Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar. Yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması;



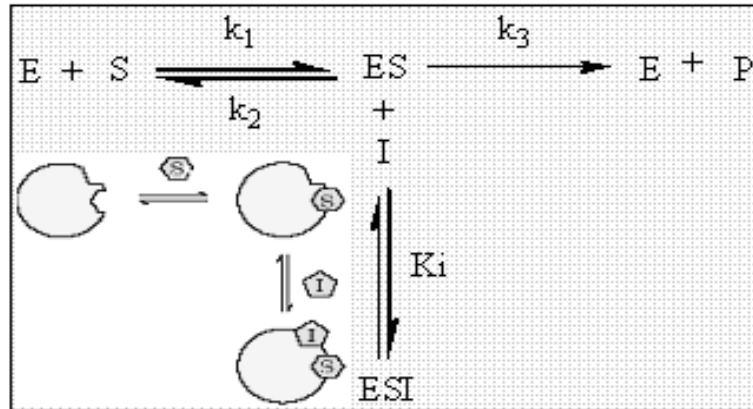
şeklinde yazılabilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir: Enzim-İnhibitör kompleksi (EI) ve Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi (ESI). Yarışmasız inhibitör varlığında reaksiyon şeması;



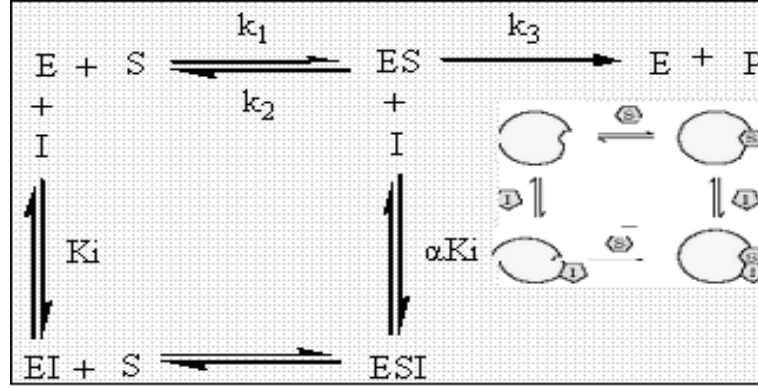
şeklinde yazılabilir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşitinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Reaksiyon şeması;



şeklinde yazılabilir. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla; ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir; (Segel 1975; Gilbert 1992).



Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimini inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde; substrat, bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise; enzim, substratlardan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı, diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir (Stryer 1988).

Inhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V$ ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek K_i sabiti hesaplanır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit

substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek K_i sabitleri bulunur (Telefoncu 1986).

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de birçok değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
2. Çözünürlükleri farklılıkları,
3. Elektriksel yük,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Proteinlerin en çok göze çarpan özellikleri büyüklükleridir. Bu durum, bir proteini diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmayı mümkün kılar. Bu esasa dayalı proteinleri ayırma metodları diyaliz, ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel filtrasyon kromatografisidir.

Genel adıyla dışarılama kromatografisi adıyla bilinen jel filtrasyon kromatografisinde kolon materyali olarak Sepharose, Biogel gibi polimerler yanında yaygın olarak kullanılan ve bir karbonhidrat türevi olan Sephadex polimeridir. Sephadex yapısında

fazla miktarda hidroksil grubu ihtiva etmesi dolayısıyla suya ve elektrolit çözeltilerine ilgisi fazladır. Bu teknikte küçük molekül kütleli proteinler ve diğer safsızlıklar Sephadex'in porlarına takılırlar. Büyük molekül kütleli proteinler ise Sephadex'in porlarına takılmazlar ve molekül kütlelerinin büyüklük sırasına göre kolondan elüe edilirler. Bu da proteinlerin ayırımları için oldukça avantajlı bir durumdur.

Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel terim "su kazanım değeri" dir. Bir gram kuru jelin emebildiği su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Bu değer 10 ile çarpılarak jelin ticari adının sonuna yazılır. Örneğin Sephadex G-15 jelinin su kazanım değeri 1,5' tur (1 g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar.

Daha büyük moleküllerin, mesela bazı proteinler ve virüslerin ayrılmasında agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli kullanılır. Jel filtrasyon kromatografisinde karışımların ayrılmasında karışımda bulunan maddelerin molekül büyüklükleri rol oynar. Moleküller büyüdükçe ayrılma molekül büyüklüğünden ziyade molekül kütlesine göre olur. Örneğin; G-100 ve G-200 tipi jellerde elüe etme hacmi yaklaşık olarak molekül kütlesinin logaritması ile doğru orantılıdır. Bunlardan yararlanılarak büyük moleküllü bileşiklerin mesela proteinlerin molekül kütleleri tayin edilebilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan diğer bir özellik de çözünürlük farklılığıdır. Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu esaslara dayalı proteinleri ayırma metotları izoelektrik çökelme, nötral tuzlarla çöktürme, çözücülerle fraksiyonlama ve sıcaklıkla çöktürmedir.

Çoğu globuler proteinlerin çözünürlüğü, sistemin pH değerinden etkilenir. Değişik proteinlerin iyonlaşabilir R grupları taşıyan aminoasitlerinin sayısı farklı olduğundan, izoelektrik pH'ları da farklıdır ve bu yüzden çok defa birbirinden izoelektrik çökelme ile ayrılabilirler. Her protein için izoelektrik pH ortamın iyon muhtevasına göre kolayca değişebilir; çünkü proteinler belirli anyon ve katyonları bağlayabilirler. Eğer bir protein

çözültisi, H^+ ve OH^- dışındaki küçük iyonları uzaklaştırmak için saf suya karşı diyaliz edilirse, izoelektrik pH, izoionik pH' da gerçekleşir ve bu da proteine göre sabittir.

Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır. Bu olaya salting-in denir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli tuzlar, $NaCl$, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerliklilerden daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, onların iyon şiddetlerine bağlıdır. Bu iyonlar protein molekülünde yan grupların ayrışmasını modifiye ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda bir protein bir çözeltiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltilir; yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir.

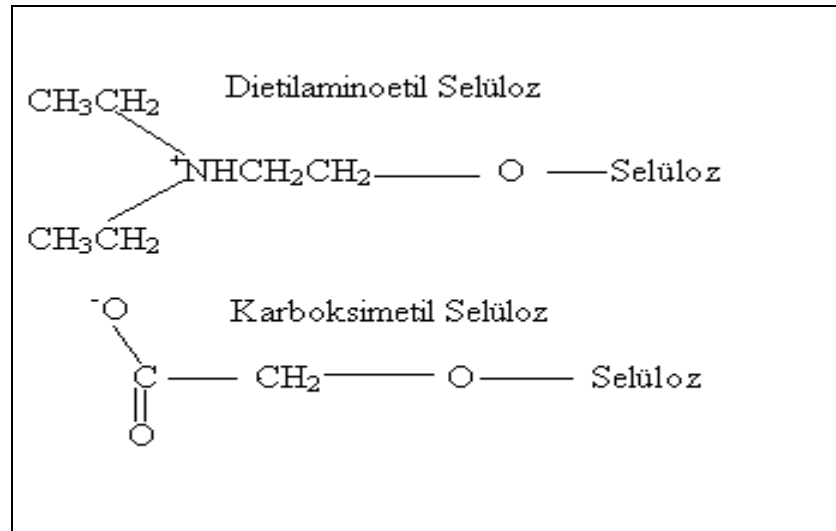
Suda çözünebilir nötral organik çözücülerin, özellikle etanol ve asetonun ilavesi, çoğu globuler proteinlerin sudaki çözünürlüğünü çökeltme derecesine kadar azaltabilir. Bu etkinin kantitatif araştırmaları, sabit pH ve sabit iyonik şiddette çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan sulu protein çözeltisine etanolun ilavesiyle zıt yüklerin çekimi artar ve proteinler kümelenerek çökerler.

Globuler proteinlerin çözünürlüğüne etki eden bir başka faktör de sıcaklıktır. Genelde çözünürlükleri $0-40^{\circ}C$ üzerinde azalır ve birçoğu denatüre olur. Bu nedenle proteinlerin ayrılması işlemleri daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerindeki iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ile belirlenen asit baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler, aminoasit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit baz davranışına sahiptir. Elektriksel yük farkına dayanan ayırma metotlarından biri olan iyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki iyonlar ile yer değiştirir. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişim olmaz. İyon değişim kromatografisi ile basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabilceği gibi

enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir.

İyon değişim kromatografisinde kullanılan materyaller, çoğunlukla selülozun sentetik olarak hazırlanmış türevleridir. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz), pH 7,0'da pozitif yüklü grupları ihtiva eder ve bu yüzden bir anyon değiştiricidir. Karboksimetil selüloz (CM-selüloz) ise, nötral pH'da negatif yüklü gruplar ihtiva eder ve bir katyon değiştiricidir.



Şekil 1.1. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri

Proteinlerin DEAE-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Elüatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır. Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine

edebilmesidir. Örneğin, DEAE-Sephadex kullanılarak proteinleri yüklerine ve moleköl büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

İyon değışim kromatografisi yöntemiyle proteinlerin saflaştırılması sırasında kolonun hazırlanması, dengelenmesi, numune tatbiki ve elüsyon işlemleri jel filtrasyon kromatografisindeki çok benzer. En önemli fark elüsyon işlemindedir. Genelde iki farklı elüsyon uygulanır: basamaklı elüsyonda, kolondan proteinlerin elüsyonu sırasında değışik pH'lı ve değışik iyonik şiddetli çözeltiler sırasıyla geçirilir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır. Gradientli elüsyonda ise bir gradient mikser kullanılır. Elüsyon tamponunda bir pH gradienti oluşturulur. Her protein izoelektrik pH'sına geldiğinde yüksüzleşir ve duran faza tutunamayarak elüe edilir. Benzer durum iyonik şiddet gradienti olarak da uygulanabilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan bir başka yöntem spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekölün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşigine spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimoloji alanında en önemli gelişme 1926 yılında Summer'ın üreaz enzimini "Jack Bean" bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Northrop 1930 yılında pepsin'i saflaştırarak karakterize etmeyi başarmıştır. Bu araştırma sonucunda enzimlerin

protein yapısında olduğu herkes tarafından kabul edilmeye başlanmıştır (Gözükara 1989).

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için “Ferment” terimi kullanılmıştır. Buchner kardeşler 1897’li yıllarda maya hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başarmışlardır. Bu buluş enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığını ortaya koymuştur. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar.

1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi

Sorbitol Dehidrogenaz (L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) sorbitol yolunun (poliol yolu) iki enziminden biridir ve koenzim olarak NAD⁺’i kullanarak sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalizler (Lindstad *et al.* 1994).



Sorbitol dehidrogenaz, memeli alkol dehidrogenazlarını da içine alan dehidrogenaz/redüktaz protein ailesine dahil olan bir metalo enzimdir (Jeffery *et al.* 1984; Jörnvall *et al.* 1984). Sorbitol dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz yapısal ve mekanistik yakınlıklarına rağmen çinko içeriği bakımından farklıdırlar. Sorbitol

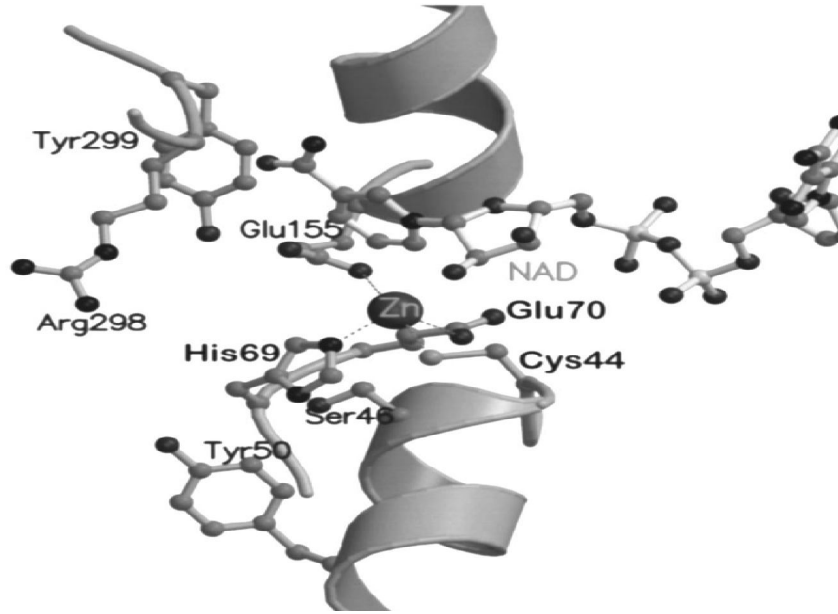
dehidrogenazın her bir alt ünitesindeki aktif bölgesinde bir çinko atomu bulunurken alkol dehidrogenazın her bir alt ünitesinde iki çinko atomu vardır. Aynı zamanda bu enzimler kuartern yapıları bakımından da birbirlerinden farklıdır. Sorbitol dehidrogenaz tetramerik bir enzimken alkol dehidrogenaz dimerik bir enzimdir. Sorbitol dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz'ın substratları da farklıdır. SDH, sorbitol , xylitol, O-mannitol ve L-idoitol gibi poliollerin oksidasyonunu katalizlerken primer alkoller için aktiviteye sahip değildir (Luque *et al.* 1998).

Polioller ($C_nH_2(H_2O)_n$), karbonil grubunun indirgenmesi ile aldoz ve ketozlardan türetilmiş asiklik polifonksiyonel alkollerdir. Polioller, tetritoller, pentitoller, hekzitoller gibi sınıflandırılırlar ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı basit karbonhidratlar olarak kabul edilebilirler. Birçok poliol bitki ve hayvan familyasında geniş bir şekilde dağılmıştır, özellikle alg, mantar ve bitkilerde bol miktardadır ve bakterilerden yüksek hayvanlara kadar uzanan organizmalarda görülür. Buna rağmen doğada $n > 6$ olan birkaç poliol görülür ve bu zamana kadar sentezlenen uzun zincirli polioller de sınırlı sayıdadır. Birçok poliol ve türevlerinin kullanıldığı yaygın uygulamalar vardır. Örneğin sorbitol ve xylitol, diş sağlığı ve diyabetik kontrol sağlamak amacıyla besinlerde yaygın olarak şeker yerine kullanılır (Lindstad *et al.* 1998).

Poliollerin biyokimyasal oksidasyonu ile ilgili araştırmalar 19. yüzyılın ortalarında başlamıştır. Ancak sorbitol dehidrogenaz enziminin memeli dokusunda aktif olduğu ilk kez 1942 yılında ortaya çıkarılmıştır (Breusch 1942). Bundan sonra çeşitli memeli dokularında değişken derecelerde sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir.

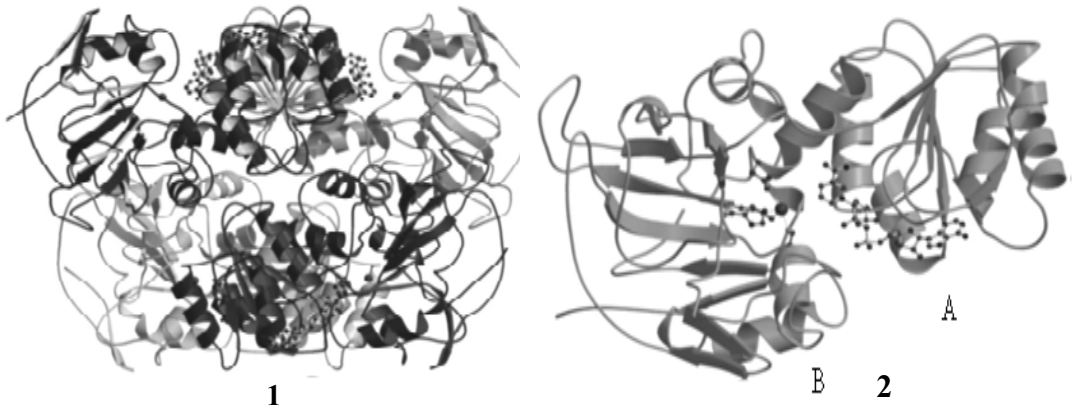
Memeli sorbitol dehidrogenaz enzimi homotetramerik bir enzimdir. Enzimin her bir alt biriminde bir su molekülü ve üç protein ligandına (Cys44, His69, Glu155) bağlı olan katalitik bir çinko atomu bulunmaktadır. Aktif bölgedeki bu çinko atomunun görevi, sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunun katalizi süresince sorbitol hidroksilinin veya fruktoz karbonilinin oksijenini bağlamaktır (Jeffery *et al.* 1984; Eklund *et al.* 1985; Karlsson *et al.* 1989, 1995). Aktif bölgedeki çinko

atomu koordinasyonunun geometrisi, ligandlar arasında $90^\circ/180^\circ$ açının olduğu oktahedraldir (Johansson *et al.* 2001). Enzimin dört alt biriminden herbiri 355 rezidüden oluşur (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989). Omurgalılarının çoğunda, bazı türlerde allelik formlar sergileyen, yalnız bir SDH gen lokusu vardır (Op't Hof *et al.* 1969; Jeffery and Jörnvall 1988; Frankel 1994). Sorbitol dehidrogenaz izoenzimlerine bugüne kadar rastlanmamıştır. Enzim üzerindeki kristalografik çalışmalar devam etmektedir.



Şekil 1.2. SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko atomunun koordinasyonu (Johansson *et al.* 2001)

Sorbitol dehidrogenaz enziminin her bir alt birimi iki farklı bölgeye sahiptir. Bu bölgelerden biri NAD^+ 'ın bağlandığı koenzim bağlama bölgesi, diğeri ise Zn atomunun bulunduğu katalitik bölgedir (Johansson *et al.* 2001).



Şekil 1.3. SDH enziminin kuarterner yapısı (1) ve enzimin bir alt biriminin yapısı (2)
 * (A: koenzim bağlama bölgesi, B: katalitik bölge) (Johansson *et al.*2001)

Sorbitol dehidrogenaz enzimi (SDH) memeli dokularının çoğunda bulunmaktadır (Jeffery and Jörnvall 1984). Enzim özellikle karaciğer ve testis dokusunda bol miktardadır ve birçok yıldan beri karaciğer ve testis hastalıklarında önemli bir tanı işaretçisi olarak kullanılmaktadır (Asada and Galambos 1963; Hodgen and Sherins 1973).

Karaciğer, anatomik ve fonksiyonel olarak gastrointestinal kanal ve dolaşım sistemi arasında yer alan, sindirim sisteminin çok değişik fonksiyonlarına sahip olan kompleks bir organdır. Bu nedenle organizmaya etki eden faktörlerden karaciğerin az veya çok etkilenmesi olasıdır. Sorbitol dehidrogenaz enzimi hepatosit sitoplazmasında bulunmakta olup karaciğer için kısmen spesifik olan bir enzimdir. Karaciğer hastalıklarında aminotransferaz düzeylerine paralel bir seyir göstermektedir ve serumda stabil değildir (Anderson 1992; Turgut 1997). Normalde serumda bulunmayan sorbitol dehidrogenaz enzimi karaciğer harabiyeti halinde seruma geçerek yüksek aktivite göstermektedir. Bu nedenle serum SDH enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklikler, karaciğer hastalıklarının klinik teşhisinde faydalı olmaktadır (Dixon *et al.* 1987).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi hiperglisemi durumunda aktif olan ve retinopati, nefropati, nöropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynayan poliol yolunun ikinci enzimidir. Bu enzimin diyabetik komplikasyonların ortaya

ıkmasında ve ilerlemesindeki rolünü açıklamak amacıyla çalışmalar yapılmıştır (Obrosova *et al.* 1999; Nishikawa *et al.* 2000; Amano *et al.* 2003; Chu-Moyer *et al.* 2002). SDH enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, önemli bir sağlık sorunu olan ve dünyada ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı alan diyabetin komplikasyonlarının azaltılmasında kullanılabilecek koruyucu ilaçların geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir.

1.2. Diabetes Mellitus

Diyabet, pankreastan insülin hormonu sekresyonunun ve/veya insülin hormonu etkilerinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu anormal karbohidrat ve yağ metabolizması bozukluklarına yol açan, çoğunlukla hiperglisemi ile karakterize bir kronik metabolizma hastalığıdır (Report of the Expert Commitee on the Diagnosis and Classification of the Diabetes Mellitus 2001; American Diabetes Association 2004). Kan şekerinin normal değerler üzerine çıkması şeklinde tanımlanan hiperglisemi multisistemik tutulumla birçok organ sistemini etkileyebilmektedir. Diyabetikler iki gruba ayrılabilir: insüline-bağımlı diabetes mellitus (Tip I) ve insülinden-bağımsız diabetes mellitus (Tip II).

Tip 1 diyabette, insülin salgılayan pankreasın adacık beta hücrelerinin, genetik faktörler, insan lökosit antijeni ve çevresel nedenlerle, T-lenfosit ve makrofajların otoimmün saldırısı sonucu harabiyeti meydana gelmektedir. Pankreastaki bu harabiyet sonucu, tip 1 diyabetli bireylerde insülin sekresyonu yetersiz ya da tamamen yoktur. Buna bağlı olarak serum glukoz düzeyleri normalden yüksektir.

Tip 1 diyabetin etiyolojisinde genetik, çevresel ve otoimmün faktörler rol oynar. Genetik yatkınlık, virüsler, fiziksel uyarıcılar ve stres gibi dış etkenler hastalığı tetikleyerek insülin salgılayan pankreasın beta adacık hücrelerine otoimmün saldırı başlatmaktadır. Bu harabiyetin patalojik görünümüne ‘insülitis’ denir. Tip 1 diyabet, 5-10 yıllık bir sürecin sonucunda ortaya çıkar (Haller *et al.* 2005). Tip 1 diyabetli bireyler

yaşamlarını sürdürebilmek için insüline bağımlı olduklarından ‘İnsüline Bağımlı Diyabet’ olarak da bilinmektedir.

İnsülin yetersizliği ve/veya insüline bağımlı olan kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda, insüline yanıt verme yeteneğinin azalması (insülin direnci) tip 2 diyabet gelişimine neden olur (Patricia *et al.* 2003). Diyabetik hastaların % 90’ı tip 2 diyabetlidir. İnsülin direnci, tip 2 diyabette meydana gelen komplikasyonların en önemli nedenidir (Gilligan and Spector 1984).

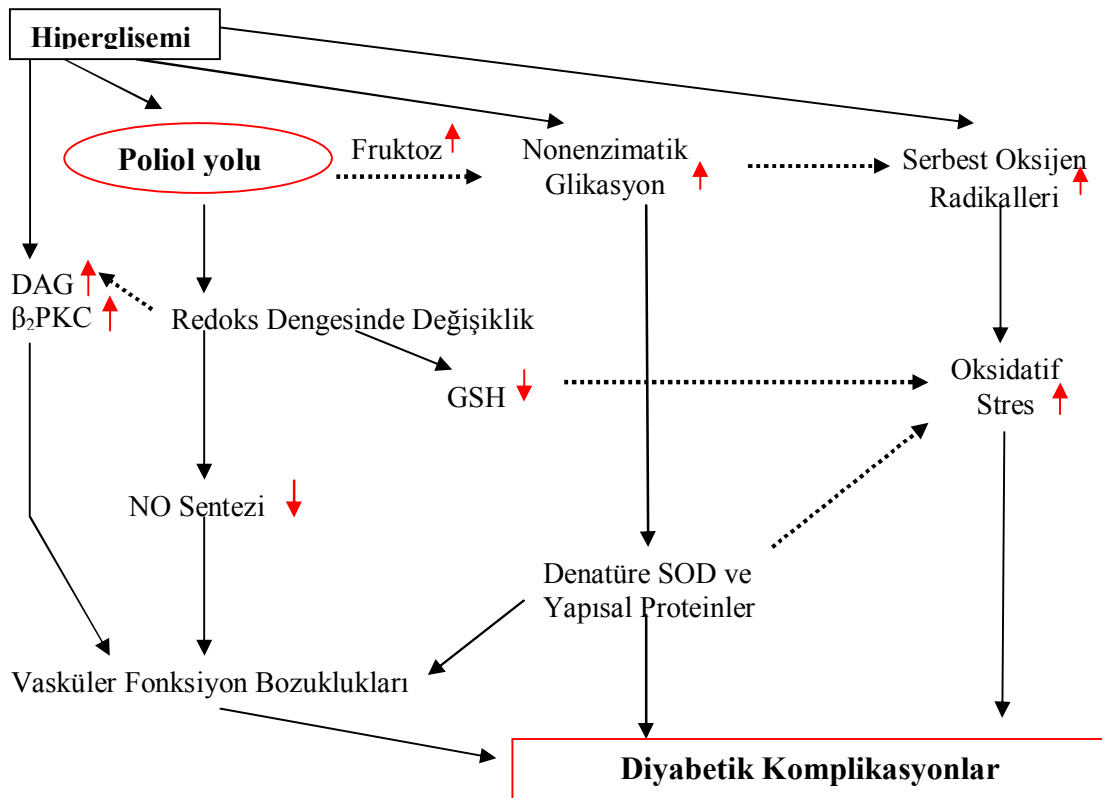
Normal şartlarda insülin, plazmadaki glukozun, okside olarak enerji üretiminde kullanmak veya glikojen şeklinde depolanmak üzere kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşınmasını sağlar. Aynı zamanda, insülin karaciğerdeki glikojenoliz (glikojen yıkımı) ve glukoneogenezi (glukoz yapımı) baskılayarak hepatik glukoz üretimini engeller (Donkin *et al.* 1997).

İnsülin direncinin gelişmesi durumunda, periferik dokularda direnç oluşarak kas ve yağ dokusundaki insülin aracılı glukoz kullanımı azalmakta, karaciğerdeki glukoz supresyonu bozulmaktadır. İnsülin direncine karşı, plazma glukoz düzeyinin yükselmemesi için pankreas beta hücrelerinde normalden 1,5-2 kat daha fazla insülin üretilmektedir. İnsülin direncinde, pankreasın daha fazla çalışarak normal glukoz düzeyini sağlanması, zamanla beta hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olmakta ve buna bağlı olarak insülin sentezi azalarak tip 2 diyabet ortaya çıkmaktadır (Ferrannini *et al.* 1987; Hollenbeck and Reaven 1987).

Tip 2 diyabette plazma glukoz düzeyinin yükselmesi, hepatik glukoz supresyonunun bozulmasından kaynaklanır. Karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenez ile glukoz üretimi artar. Glukoneogenezdeki artışın hepatik insülin direnci ve laktat gibi prekürsörlerin artışı ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Mithieux *et al.* 1996). Buna bağlı olarak gelişen hiperglisemi endotelial fonksiyon kayıplarından sorumlu tutulmaktadır (Hsueh and Law 1998; Jiang *et al.* 1999).

Diyabet sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemi özellikle göz, böbrekler, sinir sistemi, kalp ve damar sisteminde hasar ve fonksiyon bozukluğu meydana getirmektedir. Hiperglisemi bazı metabolik yolların aktivitesini arttırarak ve bu metabolik yolların birbiriyle olan etkileşimlerini değiştirerek bu diyabetik komplikasyonlara neden olmaktadır (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).

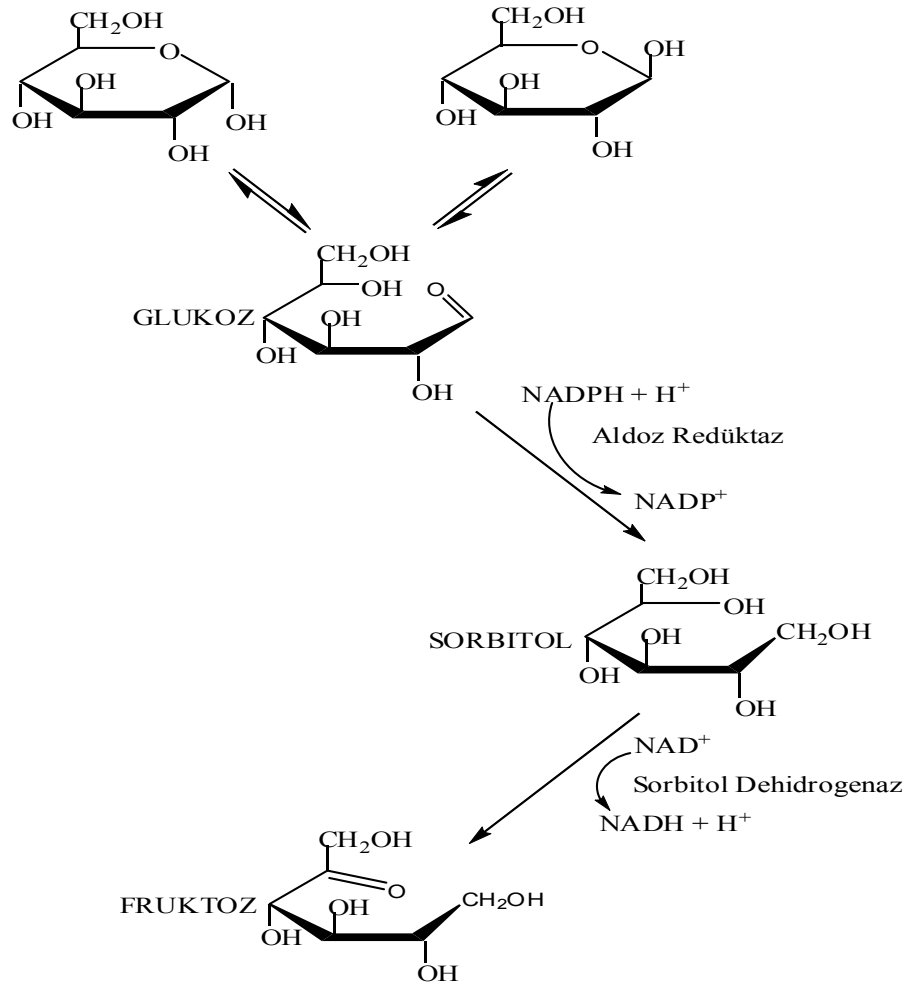
Bu metabolik yollar; poliol yolu (Zimmet and Alberti 2001; Oates 2008), glukoz oksidasyonu (Lipinski 2001; Ostenson 2001; Jakus and Rietbrock 2004), protein kinaz C (PKC) aktivasyonu (Brownlee 2001), nonenzimatik glikasyon ve ileri glikasyon ürünleri (AGE) oluşumudur (Chappey *et al.* 1997; Yamagishi and Takeuchi 2004). (Şekil 1.4)



Şekil 1.4. Hipergliseminin etkilediği metabolik yollar (Yabe-Nishimura 1998)

1.3. Poliöl Yolu (Sorbitol Yolu) ve Metabolik Önemi

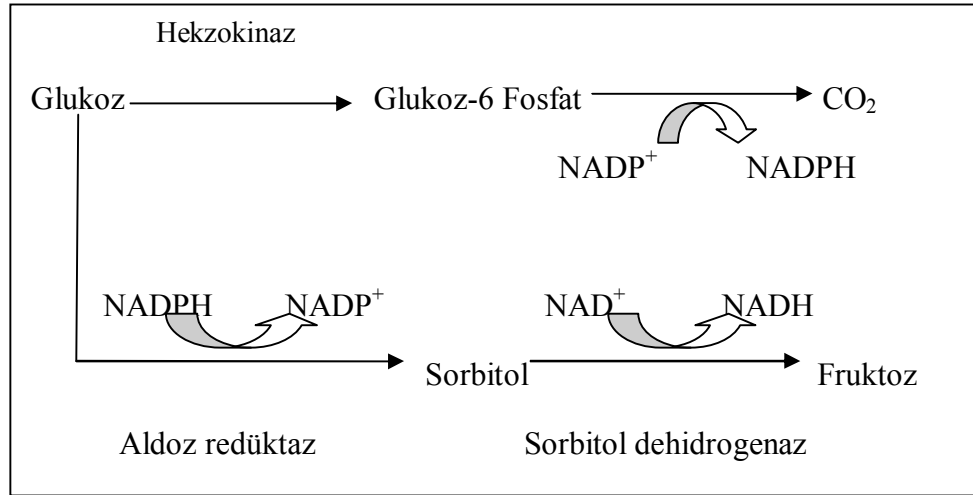
Poliöl yolu yada sorbitol yolu, hiperglisemi gibi belli şartlar altında büyük rol oynadığı varsayılan glikoliz metabolizmasının küçük bir yoludur. Bu metabolik yol aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içermektedir. Lens, retina, eritrosit, böbrek, plesanta, periferik sinirlerin schwann hücreleri, vesica seminalis ve yumurtalık hücrelerinde bulunan aldoz redüktaz, glukozu redükleyerek sorbitol oluşturur. Oluşan sorbitol, karaciğer, yumurtalık, sperm, vesica seminalis hücrelerinde bulunan sorbitol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla fruktoza oksitlenir. Vesica seminalislerde glukozun fruktoza dönüşümünü sağlayan bu yol enerji kaynağı olarak fruktozu tercih eden sperm hücreleri içindir. Karaciğerde ise sorbitolü fruktoza oksitleyen bu yol besinsel sorbitolün glikoliz veya glukoneogenez yollarına girebilen bir maddeye (fruktoza) çevrilmesini sağlar (Champe and Harvey 1997). Sorbitol yolu aktivitesi hiperglisemi durumunda artar (Gabbay *et al.* 1966; O'brien 1982).



Şekil 1.5. Sorbitol (poliol) yolunun şematik gösterimi

Normal dokuda glukoz hücreye girer girmez glukoz-6-fosfat oluşturmak üzere heksokinaz ile fosforillenir ve glikoliz yoluna girer. Aerobik koşullarda glikoliz ürünleri, elektron transport zinciri yoluyla enerji üretmek üzere Krebs çevrimine dahil olurlar. Anaerobik metabolizma ise laktat oluşumu ile sonuçlanır. Lens, retina, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aort, kapiller damarlar hücreye glukoz girişi yönünden ortak özelliğe sahiptirler; glukoz bu dokulardaki hücrelere insülininden bağımsız olarak girebilmekte, hücre içi glukoz konsantrasyonu doğrudan doğruya kan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bu yüzden hiperglisemi durumlarında intrasellüler glukoz yükseldiğinden, heksokinaz satüre olur ve glukozu ilgisi daha düşük olan aldoz redüktaz devreye girerek “poliol” yoluna yönelir (Cameron and Cotter 1997). (Şekil 1.6). Sorbitol yolu etkinliğinin fizyolojik

öneminin henüz bilinmediği bu dokular, diabetes mellitusun uzun sürede gelişen retinopati, katarakt, nöropati, nefropati ve ateroskleroz gibi komplikasyonlarının görüldüğü dokulardır (Yenigün ve Altuntaş 2001).



Şekil 1.6. Glikoliz ve poliöl yoluna giren glukozun akibeti (Gonza'lez *et al.* 1984)

Sorbitol yolunun hız kısıtlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz (AR), sitozolik bir oksidoredüktazdır. Glukoz da dahil olmak üzere çeşitli karbonil bileşiklerini indirgeyen NAD(P)^+ bağımlı bir enzimdir. Substratlarından olan glukozla ilgisi az olduğundan, kan glukoz seviyesi fizyolojik düzeylerde kaldığı sürece AR etkin olamamaktadır. Hiperglisemi durumunda hücre içi glukoz miktarı fizyolojik seviyelerin üzerine çıkınca AR aktif hale geçmektedir. Hiperglisemide AR enzim aktivitesi artarken SDH enzim aktivitesi azalır. Bu durumda dokularda sorbitolün fruktoza dönüşümü yavaşlar. Sorbitol metabolik olarak kullanılmadığı ve difüzyonu çok yavaş olduğu için hücre membranı dışına kolayca çıkamaz dokularda birikir ve osmotik etki göstererek hücre içine daha fazla miktarda suyun çekilmesine böylece hücre ödemine neden olur. Sorbitolün kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinin sorumlu tutulmaktadır (Karasu vd 1990; Bukan vd 2004).

Diyabetik retinopati, gözyaşı yapımında ve kornea hassasiyetinde azalma, kornea endotelinde değişiklikler, yara iyileşmelerinde gecikme ve katarakt gibi komplikasyonlarla kendini göstermektedir (Davidson 1991).

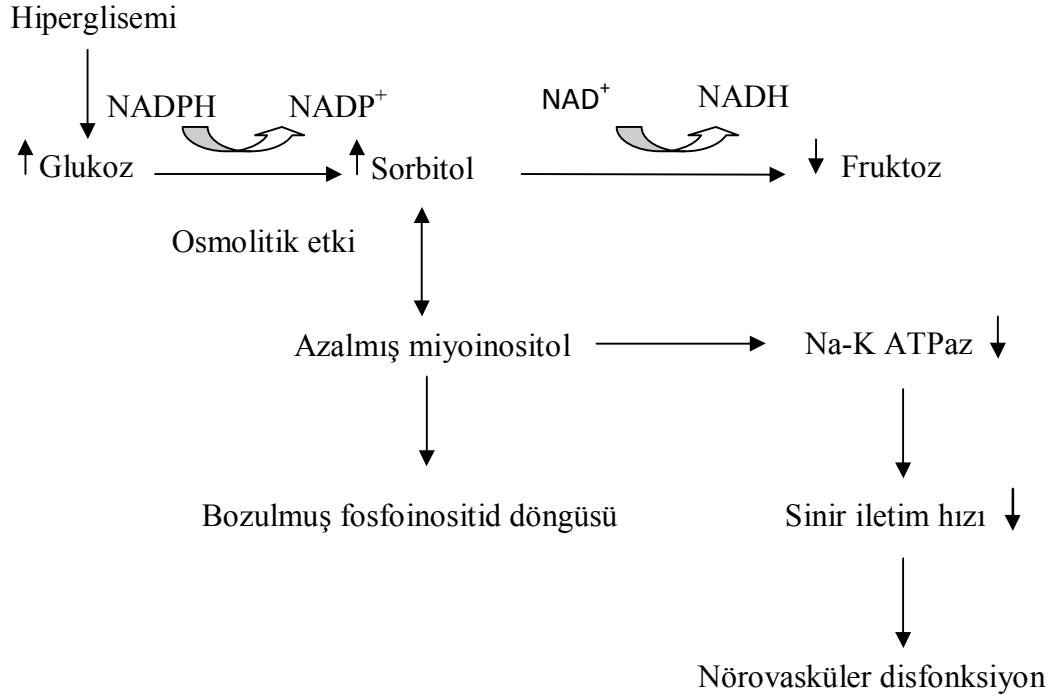
Van Heyningen, hipergliseminin indüklediği poliol yolu ile yüksek miktarda sorbitol ve galaktitol oluşumunun katarakt gelişimini stümüle ettiğini göstermiştir. Glukozun redüksiyonu ile biriken sorbitol ozmotik artışa, membran permeabilitesinde değişikliklere ve ardından katarakt oluşumuna neden olmaktadır (Van Heyningen 1959).

Diyabetik bireylerde körlüğün primer sebebi retinopatidir. Diyabetik retinopatide ise major risk faktörü hiperglisemidir (DDCT Research Group 1993,1995; UKPDS Research Group 1998). Lensde sorbitol birikimine bağlı gelişen ozmotik stres nedeniyle lentiküler opasite oluşur ve katarakt gelişir (Wynngaarden and Smith 1988).

Hipergliseminin sorbitol birikimine yol açması hücreden hücreye farklılık gösterir. En büyük etki sinir vazo nervorumlarında ve böbrek bazal membranlarında görülür (Yenigün ve Altuntaş 2001).

Diyabetik nöropati, diyabetin periferik ve otonom sinir sistemi üzerindeki komplikasyonudur (Apfel 1999). Nöropati prevalansı diyabetin süre ve şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Diyabetik nöropatinin patogeneğinde, hiperglisemiye bağlı olarak ortaya çıkan poliol yolu aktivasyonu önemli rol oynar. Hiperglisemi sonucu oluşan sorbitol birikimi, ozmotik etkilerle piridin nükleotitlerinin redoks durumunu değiştirerek ((NADH/NAD⁺) oranında ve protein kinaz C'de artış) hücre içi miyoinositol seviyesini azaltır. Bu durum doku hasarına neden olur. Miyoinositol hem hayvansal hem de bitkisel gıdalarda bulunan 6 karbonlu polioldür. Glukoz, miyoinositol taşıyıcılarının kompetatif bir inhibitörüdür. Bu nedenle hücre içi miyoinositol seviyesindeki azalma hücre içindeki insülin etki azlığı ile paralel seyredir. Miyoinositol eksikliği Na-K ATPaz aktivitesinde azalmaya yol açar. Miyoinositol transportu bu enzim üzerinden olduğundan, azalmış miyoinositol geri alımı ve azalmış Na-K ATPaz aktivitesi,

intraaksonal Na^+ birikimine neden olur. Bu durum periferik sinirlerde sinir iletim hızını yavaşlatır (Greene *et al.* 1987,1990; Kilo *et al.* 2000; Bozdemir 2001).



Şekil 1.7. Poliol yolu ve deneysel diabetik nöropatinin patogenetik mekanizmaları arasındaki ilişkinin şematik gösterimi

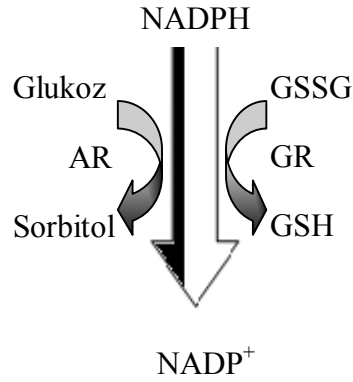
Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri de diyabete bağlı nefropati nedeniyle gelişen böbrek yetmezliğidir (Kimmelstiel and Wilson 1936). Nefropati sıklığı diyabet süresi uzadıkça artış gösterir. Diyabetin neden olduğu ölümlerin %10'u böbrek yetmezliğinden kaynaklanmaktadır (Humphrey *et al.* 1989; Forsblomet *et al.* 1998). Diyabetik nefropatinin patogenezinde poliol yolu aktivasyonu önemli rol oynar.

Yapılan çalışmalarda, miyokardiyumda oluşan iskemi sırasında, poliol yolunun miyokardiyal glukoz metabolizmasına etkileri incelenmiş ve kardiyak AR aktivitesinin iskemi sırasında arttığı gösterilmiştir (Ramasamy *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2002). Buna bağlı olarak miyokardiyumdaki NADH/NAD⁺ oranı artmakta, glikoliz ve ATP üretimi de azalmaktadır. Bu tablo iskemik hasara neden olmaktadır (Williamson *et al.* 1993). İskemi bilindiği gibi, organa yeterli miktarda kan temin edilememesidir. Bu da oksijen

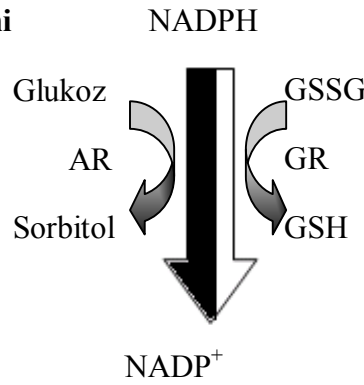
yetmezliğine neden olmaktadır. AR'ın inhibisyonu kalbi korumaktadır. AR miyokardiyal iskemik hasarda anahtar rol oynamaktadır.

Sorbitol dehidrogenaz enziminin (SDH) aktifleşmesi sonucu oluşan NADH, NADH-oksidadaz (Nox) enziminin etkisi ile serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşumuna neden olur (Tesfamariam 1994; Morre *et al.* 2000). ROS, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim (GAPDH) inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliol yolağına yönelmesine ve AR aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Stevens *et al.* 2000). Aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullandığından hücre içi NADPH tüketimi artar. Glutasyon redüktaz enzimi (GR), NADPH bağımlı olarak, yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) redüksiyonunu sağlayan enzimdir. AR'ın NADPH için K_m değeri, glutasyon redüktaz enziminin NADPH için K_m değerinden 10 kat daha düşüktür. Poliol yolağında artan AR aktivitesiyle NADPH'nin fazlaca tüketilmesi, GSH'nun üretiminin azalmasına neden olur (Yeh and Ashton 1990). Hücre içi majör antioksidan olan GSH'nun azalması hücrenin antioksidan kapasitesini sınırlar yani hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü azaltır ve bu durum oksidatif strese neden olur (Lee and Chung 1999; Maritim *et al.* 2003). Poliol yolağının antioksidan savunma sistemine zararlı etkileri bu mekanizma ile açıklanmaktadır (Giugliano *et al.* 1996; Nishimura 1998; Nishikawa *et al.* 2000).

Normal glukoz düzeyi



Hiperglisemi



Şekil 1.8. Aldoz redüktaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin NADPH kullanım yarıışı (Tomlinson *et al.* 1994)

Hiperglisemi durumunda sorbitol yolu aktivitesinin artmasından dolayı oluşan hücre içi NADPH tüketimi, GSH'nun üretiminin azalması dışında NO sentezini de etkiler. Nitrik oksit sentaz enzimi (NOS), NADPH kullanarak arjininden nitrik oksit oluşumunu katalizlemektedir. Artan AR aktivitesiyle NADPH rezervlerinin tükenmesine bağlı olarak endotelial NO sentezi azalır (Tesfamariam 1994). Artan oksidatif strese bağlı olarak, NO' in azalması sonucu ateroskleroz gelişimi artmaktadır (Kurowska 2002).

Hiperglisemi durumunda, poliol yolağı aktivitesinin artması sonucu glukoz fruktoza dönüşür. Sorbitolün, SDH enzimi ile NAD⁺ bağımlı oksidasyonu sonucunda meydana gelen fruktoz, fruktoz-3-fosfat (F3P) ve 3-deoksigluktoza (3DG) metabolize olur (Grandhee and Monnier 1991; Lal. *et al.* 1995; Hamada *et al.* 2000). F3P ve 3DG' un her ikisi de glukozdan daha güçlü, non-enzimatik glikasyon prekürsörleridir (Szwergold

et al. 1990; Brownlee 1992; Hamada *et al.* 1996). Hiperglisemide, eritrosit, beyin, böbrek, sinir ve lens gibi insüline bağımlı olmayan dokularda (Mueckler 1994) glukoz, proteinlere non-enzimatik reaksiyonla bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyon reaksiyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin glikooksidasyonu ile imidazol ve pirol yapısında ileri glikasyon ürünleri (AGE) meydana gelir. AGE, proteinlerin amino grupları ile geri dönüşümsüz çapraz bağ yaparak, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. AGE bileşikleri, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynar (Jakus and Rietbrock 2004).

Hiperglisemide artan poliol yolağı aktivasyonu sonucunda, sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile sitozolik NADH/NAD⁺ oranı yükselmektedir. Artan NADH miktarı, gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz enzimini (GAPDH) inhibe ederek trioz-fosfat konsantrasyonunun artmasına neden olur (Baynes and Thorpe 1999; Dunlop 2000; Garcia *et al.* 2001). Hücre içi konsantrasyonu artan gliseraldehit-3-fosfat, trioz-fosfat izomeraz enzimi ile dihidroksiaseton-fosfata (DHAP) dönüşür. DHAP'ın gliserol-3-fosfata redüksiyonu NADH bağımlıdır. NADH/NAD⁺ oranının yüksek olması, DHAP'ın redüksiyonu yoluyla protein kinaz C (PKC)'nin aktivatörü olan diaçil gliserol (DAG) oluşumuna ve bunun sonucunda PKC yolağının aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Williamson *et al.* 1993; Garcia *et al.* 2001). PKC aktivasyonu, diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Xia *et al.* 1994).

Özetlemek gerekirse; Hiperglisemide artan poliol aktivitesi sonucu oluşan sorbitol birikimi, intraaksonal proteinlerin transport ve sentez hızında azalmaya, sinir Na-K ATPaz aktivitesinde azalmaya, proteinkinaz-C değişikliğine, serbest oksijen radikal oluşumunun artışına, glikolipitlerin ve aminoasitlerin miyelin oluşturma hızında azalmaya, anormal inositol lipid metabolizmasına, aşırı glikojen birikimine ve periferik sinir glikolizasyonunun artmasına neden olur.

Diabetik sorbitol birikimi erken dönemde aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılarak önlenabilir (Yenigün ve Altuntaş 2001). Aldoz redüktaz enzim inhibitörleri özellikle

böbrek, periferik sinirler ve göz merceği gibi dokularda sorbitol birikimini baskılamak için geliştirilmiştir (Constantino *et al.* 1999,2000).

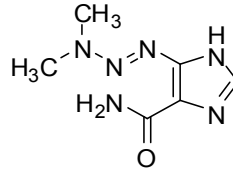
On yıldan fazla bir süredir gelecek vadede AR inhibitörlerinin birçoğu *in vitro* ve hayvan modellerinde etkili sonuçlar vermiş olmasına karşın sadece biri (Epalrestat) marketlerde yerini almıştır. Ayrıca son yıllarda SDH inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, SDH'nin inhibisyonunun poliol metabolizması ile ilgili redoks bozuklukları düzelterek diabetik komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirmede faydalı olabileceğini ileri sürmektedir (Kador *et al.* 1998).

Bu tez çalışmasında, koyun karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enzimi izole edilerek, dakarbazin, tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, epirubisin HCl, midazolam, dekspantenol, menadion sodyumbisülfid, kalsiyum folinat, gemitabin HCl, okzalipatin, lidokain HCl, teofilin etilendiamin ilaçlarının sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

1.4. Deneysel Çalışmada kullanılan İlaçlar

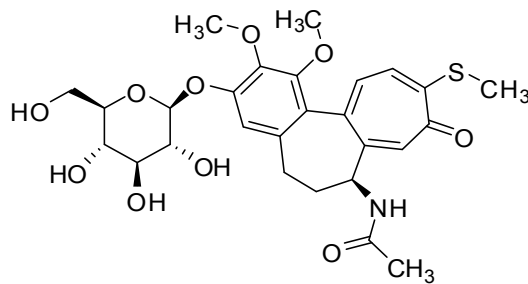
Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçlarının özellikleri şöyledir:

Dakarbazin: Antineoplastik ilaçlar sınıfına girer. Antineoplastik ilaçlar ise genel etki mekanizmaları veya kaynakları göz önünde bulundurarak 6 sınıfa ayrılırlar. Bir triazen türevi olan dakarbazin antineoplastiklerin alkilleyici ilaçlar sınıfına girmektedir. Bu ilacın ikili bir etki mekanizması vardır: antimetabolit ilaçlar gibi DNA sentezini inhibe eder ve alkilleyici ajanlar gibi daha önce sentezlenmiş DNA'lar ile reaksiyona girer. Vücutta esas olarak serbest metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek suretiyle etkinlik kazandığına ve DNA moleküllerini metillemek suretiyle sitotoksik etki yaptıklarına inanılmaktadır. Ayrıca, RNA ve dolayısıyla protein sentezini de bozarlar. Dakarbazin hodkin hastalığı (AGVD) kombinasyonu içinde malign melanoma, yumuşak doku sarkomlarında kullanılmaktadır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.9. Dakarbazin molekülünün yapısal formülü

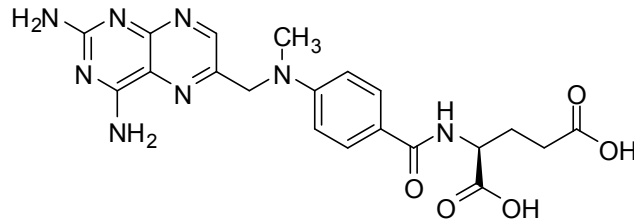
Tiyokolşikosid: Tiyokolşikosid, doğal bir glikozit olan kolşikosidin kükürt eklenerek sentezlenmiş türevidir. Farmakolojik olarak kas gevşetici etkiye sahip bir üründür. Spastik hipertonus durumunda olduğu gibi, merkezi sinir sisteminden kaynaklanan kasılmaları azaltır veya ortadan kaldırır. Tiyokolşikosid, kaslarda pasif direnci azaltarak rezidüel spazmı önler. Tiyokolşikosidin kas gevşetici etkisi, viseral kaslarda da görülür. Tiyokolşikosidin etkisi merkezi sinir sistemi üzerinden gerçekleşmektedir ve motor plak paralizi yapmaz. Tiyokolşikosidin kürar benzeri etkisi bulunmamaktadır. Tiyokolşikosid, spesifik bir gama-aminobütirik asit (GABA) reseptörü agonistidir. Aynı zamanda glisinerjik agonist etkisi de söz konusudur. Bu nedenle tiyokolşikosid istemli kas hareketini engellememektedir ve herhangi bir solunum paralizi riski taşımamaktadır. Tiyokolşikosidin kardiyovasküler sistem üzerine herhangi bir olumsuz etkisi bulunmamaktadır. (http://www.zentiva.com.tr/urun_dokuman/20080121160907-1.pdf).



Şekil 1.10. Tiyokolşikosid molekülünün yapısal formülü

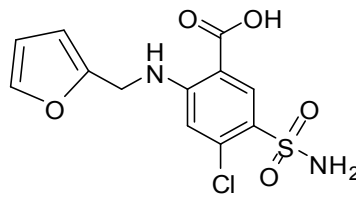
Metotreksat: Antineoplastik etkilidir. Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve psöriazisin kemoterapisinde kullanılır. Ağız yoluyla, kas içine, damar içine veya intratekal (beyni çevreleyen zar

bölgesinin içine) uygulanabilmektedir. Folik asidi tetrahidrofolik aside redükleyen dihidrofolat redüktazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Genellikle malignant hücreleri, kemik iliği, fetal hücreler, yanak ve barsak mukozası ve mesane hücreleri gibi çoğalan dokular methotrexate'a daha duyarlıdır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.11. Metotreksat molekülünün yapısal formülü

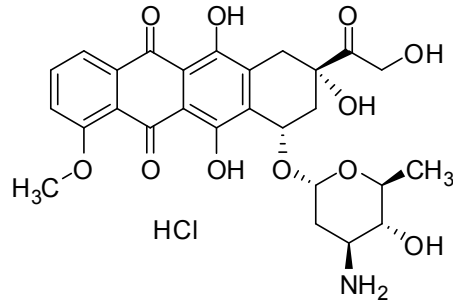
Furosemid: Antiranilik türevi bir diüretiktir. Furosemid temelde yakınsal ve uzaksal kanallarda değil aynı zamanda damar içindeki sodyum ve klorit geri emilimini inhibe eder. Pediatrik ve yetişkinlerde kan ve stoplazmasına bağlı kalbin eşlik ettiği ödemlerde karaciğer sirozunda lenfolit sendromu içeren böbrek hastalarının tedavisinde kullanılır. Başlıca yan etkileri sarılık, iştahsızlık, gastrik rahatsızlıklar, ishal, kabızlık, mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, baş ağrısı, hemolitik anemidir (Anonim 2009).



Şekil 1.12. Furosemid molekülünün yapısal formülü

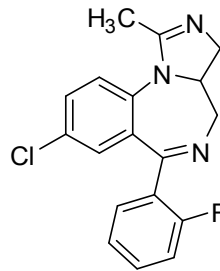
Epirubisin Hidroklorür (Farmorubisin): Antineoplastik etkilidir. Meme karsinomu, malign lenfoma, yumuşak doku sarkomu, mide, karaciğer, pankreas ve akciğer karsinomu ve over karsinomunda etkilidir ve antrasiklin sınıfından bir antibiyotiktir. Etki mekanizması maddenin DNA'ya bağlanabilmesinden kaynaklanmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları, farmorubisin'in süratle hücreye geçtiğini, nükleusta lokalize olduğunu, nükleik asit sentezini ve mitozu inhibe ettiğini göstermiştir. Maddenin timüsü

Çıkarılmış tüysüz farelere transplantasyonu yapılan bir çok insan tümörüne karşı da (melanoma, meme, akciğer, prostat ve over karsinomları) aktif olduğunu göstermiştir (http://www.kanser.org/toplum/kemo_ilac.php).



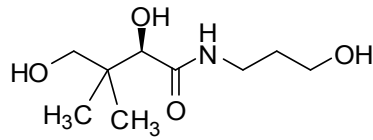
şekil 1.13. Epirubisin HCl molekülünün yapısal formülü.

Midazolam: Midazolam; premedikasyon, genel anestezi indüksiyonu ve devamı için kullanılan kısa etkili bir benzodiazepindir. Midazolamın metabolizması çoğunlukla sitokrom P4503A4 (CYP3A4) izozimi tarafından ayarlanır. Bu izozimin inhibitör ve uyarıcıları midazolam ile ilaç etkileşimine önderlik edebilir (<http://www.ilacrehberi.com>). Belli karaciğer enzimlerini (zellikle sitokrom P 450 III A) inhibe eden bileşikler ile midazolam arasında potansiyel bir etkileşim vardır. Bu bileşikler midazolamın farmakokinetik özelliklerini etkiler ve sedasyon derecesini ve/veya süresini değiştirir. Alkol midazolamın sedatif etkisini artırabilir. Antipsikotiklerle, hipnotiklerle, anksiyolitik/sedatiflerle, antidepresanlarla, narkotik analjeziklerle, antiepileptik ilaçlarla, anestetiklerle ve sedatif antihistaminiklerle beraber uygulandığında merkezi sinir sistemi üzerine etkiler artabilir (<http://www.ilacler.gen.tr/610/demizolam-imiv-ampul/>).



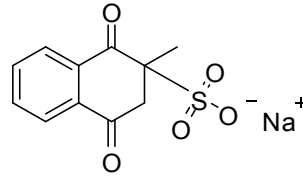
şekil 1.14. Midazolam molekülünün yapısal formülü

Dekspantenol: Dekstro-pantotenik asidin alkol şeklidir. Dekspantenol, karaciğerde D-pantotenik aside dönüşür. Pantotenik asit ise koenzim A'nın yapısına girer. Bu önemli metabolik fonksiyonuna rağmen insanda eksikliğine bağlı belirli bir patolojik bozukluk gösterilmemiştir. Cilt ve mukozaların ülser ve iltihap halleri ile güneş yanığına karşı kullanılmak üzere çıkarımlı pastil ve %2-5 ilaç içeren cilt merhemi ve solüsyonu şeklinde dekspantenol mustahzerleri varsa da bunların spesifik bir terapötik değerlerinin olduğu kanıtlanmamıştır. Lokal alerjik reaksiyonlara neden olabilir (Kayaalp 2002).



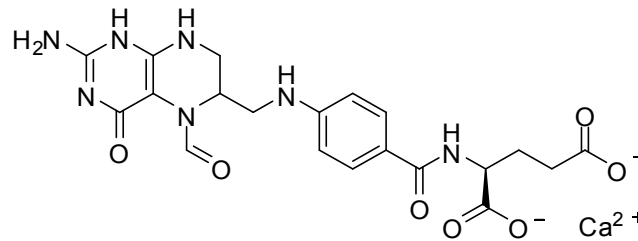
Şekil 1.15. Dekspantenol molekülünün yapısal formülü

Menadion Sodyumbisülfid: Hipoprotrombinemi profilaksi ve tedavisinde endikedir. Vitamin K, oral antikoagülanlar, salisilatlar ve bazı antibiyotiklerin neden olduğu hipoprotrombinemi dahil vitamin K eksikliği veya vitamin K aktivitesinin bozukluğu sonucu faktör II, VII, IX ve X yapımında bozukluğun işe karıştığı çeşitli pıhtılaşma bozukluklarının tedavi ve önlenmesinde endikedir. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) eksikliğinde menadion ve türevleri hemoliz oluşturabileceğinden, dikkatle kullanılmalıdır. Karaciğer fonksiyon bozukluğunda, yüksek miktarlarda kullanılması fonksiyon bozukluğunu ağırlaştırabileceği için, dikkatle kullanılmalıdır. Kumarin türevleri tarafından karaciğerde vitamin K aktivitesi inhibe edilebilir. Tedaviye verilen cevabın ve ek vitamin K tedavisine gereksinimin belirlenmesi için protrombin zamanının ölçülmesi önerilir. Kumarin ve indandion türevi antikoagülanların etkileri K vitamini tarafından antagonize edilir. Özellikle yüksek dozda K vitamini kullanıldığında oral antikoagülanlara geçici direnç oluşmaktadır. (<http://www.webarsiv.com/libavit-k-ampul.html>).



Şekil 1.16. Menadion Sodyumbisülfid molekülünün yapısal formülü

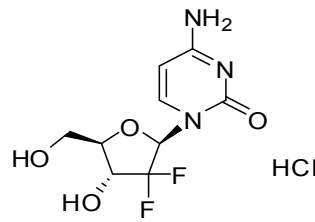
Kalsiyum Folinat: Metotreksat antidotu; sitostatik ilaçların folik asit antagonistliği etkisini ortadan kaldırmak için endikedir. Orta veya yüksek doz metotreksat tedavisi sırasında kurtarma tedavisi olarak, metotreksat serum seviyesinin sürekli yüksek olduğu durumlar ile metotreksat atılımının yavaşlamış olduğu vakalarda endikedir. İlacın içerdiği maddelerden herhangi birine karşı aşırı duyarlılık, pernisiyöz anemi (hematolojik remisyonlar olabilir) ve vitamin B12 eksikliği nedeniyle olan diğer anemilerde kontrendikedir. B12 vitamini eksikliği nedeniyle olan makrositik anemilerde (pernisiyöz anemi gibi) folik asit ve kalsiyum folinat kullanımı hematolojik remisyonlara ve aynı zamanda nörolojik bozuklukların ilerlemesine sebep olabilir. Bir folik asit antagonisti ile (trimetoprim, kotrimoksazol, metotreksat gibi) birlikte verildiğinde folik asit antagonistinin etkisi azalabilir veya tamamen nötralize olabilir. Fenobarbital, pirimidon ve fenitoin gibi antiepileptiklerin etkisini azaltabilir. (<http://www.ilaclar.gen.tr/1653/leucovorin-tevaimiv-flakon/>).



Şekil 1.17. Kalsiyum Folinat molekülünün yapısal formülü

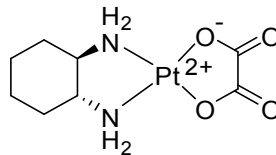
Gemsitabin HCl: Gemsitabin murin ve insan tümör hücrelerini içeren çeşitli kültürlerde anlamlı sitotoksikite gösterir. DNA sentez döneminde (S-fazı) olan hücreleri öldürerek ve belirli koşullarda hücrelerin G1/S fazı sınırına ulaşmasını önleyerek hücre fazı spesifitesi gösterir. Hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat ve

trifosfat nükleozidlere metabolize eder ve DNA sentezini inhibe eder. Gemcitabin DNA yapısına girdikten sonra uzayan DNA zincirlerine ek bir nükleotid eklenir. Bu eklenmeden sonra daha ileri düzeyde DNA sentezinin tam bir inhibisyonu gerçekleşir ve daha sonra apoptozis olarak bilinen programlı hücre ölüm sürecini indükler (http://www.kanser.org/toplum/kemo_ilac.php).



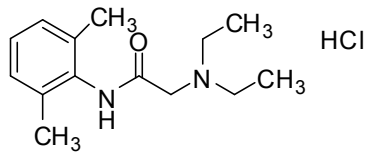
Şekil 1.18.Gemcitabin HCl molekülünün yapısal formülü

Okzaliplatin (Laktoz monohidrat): Damar yoluyla kısa süreli veya uzatılmış 120 saate kadar sürekli infüzyon şeklinde uygulanabilmektedir. Sinir hasarı (ellerde ve ayaklarda bazen dudaklarda hissizlik ve karıncalanma) olabilir fakat genelde ilaç kesildikten sonra düzelir. Kanda lökosit ve trombositlerde hafif düşüslere sebep olabilir. Okzaliplatin atomunun 1,2 diaminosikloheksan ve bir okzalat grubuyla kompleks oluşturduğu yeni platin esaslı bileşik sınıfının üyesi olup okzaliplatin tek bir enantiyomerdir ve etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte bu konuda yapılan çalışmalar biyotransformasyona uğramış sulu okzaliplatin ürünlerinin DNA ile etkileşerek inter ve intrastrand çapraz bağlar oluşturduğu ve bu şekilde DNA sentezini bozarak sitotoksik ve antitümör etkilere yol açtığını göstermiştir (http://www.kanser.org/toplum/kemo_ilac.php).



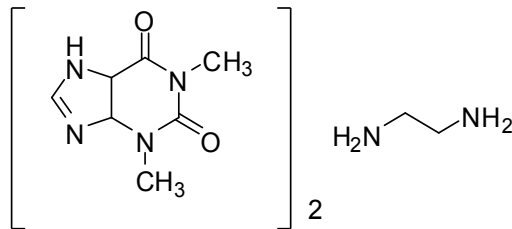
Şekil 1.19. Okzaliplatin molekülünün yapısal formülü

Lidokain HCl: Kalp cerrahisi, kalp kateterizasyonu ve akut miyokard infarktusu sırasında gelişen akut ventriküler aritmilerin önlenmesinde ve ortadan kaldırılmasında intravenöz yoldan verilmek suretiyle başarı ile ve sık kullanılan bir antiaritmiktir. Lidokain'in otomotisite ile ilgili önemli bir elektrofizyolojik bir etkisi kinidin ve prokainamid gibi spontan diyastatik depolarizasyonun hızını yavaşlatmasıdır. Bunun taban sodyum akımını azaltmasına ve potasyum akımını artırmasına bağlı olduğu sanılmaktadır. Yan etkileri; uyuşukluk, pareteziler, ataksi, dizartri, nistagmus, dezoriyanlasyon ve ajitasyondur (Kayaalp 2002).



Şekil 1.20. Lidokain HCl molekülünün yapısal formülü

Teofilin Etilendiamin: Aminocardol fosfodiesteraz inhibitörüdür. Bronşiyal hava yolunun ve kan damarlarının, özellikle pulmoner damarların düz kaslarını genişletir. Ayrıca merkezi sinir sistemi (özellikle respiratuvar), kalp ve iskelet kasları üzerinde stimulan etki yapar. Terapötik etkisinin sonucunda solunum iyileşirken, kalp atım hızı, kalp debisi ve diürez artar. Terapötik serum seviyeleri 10 ile 20 µg/ml'dir. Plazma yarılanma ömrü çocuklarda ve sigara içenlerde teofilin klirensinin artmasına bağlı olarak % 30-50 kısalmır. Prematüre bebeklerde ve kalp yetmezliği, karaciğer fonksiyon bozukluğu, azalmış renal fonksiyonu ve solunum enfeksiyonları olan hastalarda, plazma klirensi azalır (<http://www.saglikkutuphanesi.com/ilacilar/Aminocardol>).



Şekil 1.21. Teofilin Etilendiamin molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sorbitol dehidrogenaz (L-iditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) sorbitol yolunun iki enziminden biridir ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) ile beraber halkalı yapıda olmayan poliollerin oksidasyonunu katalizler (Rehg and Torack 1977).



Sorbitol dehidrogenaz enzimi her bir alt biriminde bir çinko metali içeren homotetramerik bir enzimdir. Her bir alt birimdeki bu çinko metali enzimin katalitik aktivite göstermesine yardım eder (Karlsson *et al.* 1995; Marini *et al.* 1997) ve aynı zamanda enzimin aktif bölgesi ile tiyol inhibitörlerin etkileşiminde rol oynar (Lindstad and McKinley-McKee 1996).

Sorbitol dehidrogenaz hayvanlarda, mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan bir enzimdir (Jeffery and Jörnvall 1988). Enzim bağırsak bölgesi hariç bütün memeli dokularında ekspresyon gösterir (Estonius *et al.* 1993). Sorbitolun metabolik kullanımında anahtar enzim olan sorbitol dehidrogenaz, meyvenin gelişimi boyunca karbon sağlamada da önemli rol oynar (Oura *et al.* 2000).

Enzim ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmış, sorbitol ve galaktitol'u içeren çeşitli asiklik poliollerin oksidasyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Brakley 1951). Daha sonraki yıllarda enzim çeşitli memeli dokularından ve bazı bitki kaynaklarından (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000) saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 2.1. 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)

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum pH'sının sorbitolün fruktoza dönüşümü reaksiyonu için 9,0-10,0 aralığında, fruktozun sorbitole dönüşümü reaksiyonu için 7,0-8,0 aralığında değiştiği belirtilmiştir (Smith 1962).

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin stabil pH aralığını belirlemek için yapılan çalışmalarda, enzimin pH 5,0'ın altında ve pH 8,5-9,0'un üzerinde aktivite kaybettiği bildirilmiştir. (Reiersen *et al.* 1993).

Poliol, diabetik hiperglisemi gibi belirli şartlar altında büyük rol oynadığı varsayılan, glikoliz metabolizmasının küçük bir yoludur. Sorbitol yolu için iki enzim gereklidir. Sorbitol dehidrogenaz ve aldoz reduktaz. Aldoz reduktaz glukoz ve galaktozun sorbitole dönüşümünü katalizlerken, Sorbitol dehidrogenaz sorbitolün fruktoza dönüşümünü sağlar. Glukoz normal miktarlarda iken aldoz reduktaz enzimi tarafından bir substrat olarak seçilmez. Hiperglisemi hallerinde ise aldoz reduktaz enzimi uyarılır; glukoz, aldoz reduktaz enzimi yoluyla sorbitole dönüşür. Sorbitol bir alkol şekeri olup, sorbitol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla fruktoza dönüştürülür. Oluşan fruktoz enerji kaynağı olarak kullanılır.

Normal şartlarda poliol yolağına giren glukoz, toplam glukozun % 0,1'inden azdır (Vander Jagt *et al.* 1988; Petrash *et al.* 1992). Glukozun büyük bölümü heksokinazlarla fosforillenerek glukoz-6-fosfata dönüşür ve glikoliz reaksiyonu ile metabolize olur (Beyer and Hutson 1986; Cardenas *et al.* 1998). Hiperglisemi durumunda ise glukoz poliol yolağına yönelerek bu yolağın aktivitesini arttırır. Hiperglisemide total glukozun 1/3'ü poliol yolağı ile metabolize olmaktadır (Gonzales *et al.* 1984). Sinir ve lens gibi bazı dokularda total glukozun %33'ü poliol yolağı ile metabolize olduğu gösterilmiştir (Cheng and Gonzalez 1986).

1956 yılında Hers, sperm hücrelerinin enerji kaynağı olarak, poliol yolağı ile glukozun fruktoza dönüşümünü seminal kesede göstermiştir (Hers 1956; Kador *et al.* 1986; Bhatnagar and Srivastava 1992). Fare testisinde yüksek miktarda AR mRNA'sı tesbit edilmiş olup, fazla miktarda AR enziminin testis metabolizmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gui *et al.* 1995). Poliol yolağının varlığı daha sonra diyabetik sıçan lensinde de gösterilmiştir (Van Heyningen 1959).

Hoshi ve arkadaşları poliol yolunun önemini açıklamak için çeşitli dokularda SDH mRNA'sının ekspresyonunu araştırmışlardır. Normal ve diyabetik sıçanlar üzerinde yaptıkları araştırmalar sonucunda SDH ekspresyonunun özellikle karaciğer, böbrek ve testis dokularında çok fazla seviyede, mide, beyin, akciğer ve dalak dokularında düşük seviyede, iskelet kasında ise çok düşük seviyede olduğunu gözlemlemişlerdir. Normal sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında hem SDH ekspresyonunun hem de SDH enzim aktivitesinin yüksek olduğunu ancak testis dokusunda SDH ekspresyonunun yüksek olmasına rağmen SDH enzim aktivitesinin yüksek olmadığını belirlemişlerdir. Diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda ise SDH enzim aktivitesinin düştüğünü ancak SDH ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Bu gözlemler sonucunda Diyabetik karaciğer ve testis dokularındaki mRNA seviyeleri ve enzim aktivitesinde gözlenen bu farklılıkların diyabetik şartlar altında aktivasyonu artan poliol yolu ile açıklanabileceğini belirtmişlerdir (Hoshi *et al.* 1992).

Çeşitli mekanizmalar, artan poliol aktivitesinin sinirsel fonksiyon bozukluklarına sebep olduğunu öngörmektedir. Varsayılan mekanizmalar hücrelerde anormal sorbitol veya fruktoz birikmesi veyahutta nöral serbest miyoinositoldeki düşüşten kaynaklanan durumların sebep olduğu osmotik stresi de içermektedir (Greene *et al.* 1992) Ayrıca redoks durumdaki değişimlerin özellikle NADH/NAD⁺ oranındaki bozulmaların hücrede oksidatif stresi artıran “*pseudohypoxia*” olarak adlandırılan duruma sebep olduğu düşünülmektedir. (Williamson *et al.* 1993) Aynı zamanda NADPH/NAD⁺ oranındaki azalmalardan kaynaklanan metabolik dengesizlikler de oksidatif strese karşı hassasiyeti artırır ve sinir iletim hızında azalmaya neden olur (Cameron and Cotter 1993).

Periferik nöropati, diyabette oluşan depresyonun nedenlerinden biridir (Viinamak *et al.* 1995). Yapılan çalışmalar, moral bozukluğu ve poliol yolağının aktivasyonu arasında ilişki olduğunu vurgulamaktadır. Depresyon sırasında serebrospinal sıvıda sorbitol düzeylerinin yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Regenold *et al.* 2000; Renegold *et al.* 2004).

Birçok çalışma, poliol yolunun ilk enzimi olan aldoz redüktaz inhibitörlerinin deneysel diabetik hayvanların periferik sinirlerindeki fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal bozuklukları düzelttiğini göstermiştir (Yagihashi *et al.* 1990; Cameron and Cotter 1992).

Darmanın ve arkadaşları insan sorbitol dehidrogenaz enzimi için ilk kristalizasyon çalışmasını yapmışlardır. Böylece onlar insan SDH enziminin kristal yapısının bilinmesinin, enzimin katalitik mekanizmasının ve enzimin substrat ve inhibitörleri ile olan etkileşiminin doğru bir şekilde aydınlatılmasında önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca insan SDH, sıçan SDH ve memeli alkol dehidrogenazın kristal yapıları arasındaki karşılaştırmalarla bu enzimlerin substrat ve inhibitör spesifikliklerinin farklı olmasından sorumlu aktif bölgeleri arasındaki farklı yapısal özellikler hakkında önemli bilgilerin açığa çıkarılmasında ve bu bilgilerin diabetik

komplikasyonların tedavisi için spesifik ilaçlar geliştirilmesinde faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (Darmanin *et al.* 2003).

Lindstad ve arkadaşları koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda çeşitli poliol substratlarının, substrat spesifiklik sabitlerini ve maksimum hızlarını belirlemişlerdir. Lindstad ve arkadaşları bu enzimin substrat spesifikliğinin ilaç tasarımı için bir dayanak olduğunu çünkü substrat yapılarının güçlü ve spesifik inhibitörlerin sentezlenmesinde faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (Lindstad *et al.* 1998).

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi ile yapılan kinetik çalışmalarda genellikle alifatik tiyolların sorbitol dehidrogenaz enziminin güçlü inhibitörleri olduğu ve aldoz redüktaz inhibitörlerinden sorbinil'in koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı görülmüştür. Diğer aldoz redüktaz inhibitörleri olan alrestatin, tolrestat ve quercetin'in ise koyun karaciğeri SDH enzimini inhibe ettiği ve sorbitolle karışık inhibisyon tipi sergiledikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda, özellikle halo-alkoller (Hekzanol, Oktanol) ve deterjanlar (Tween 80, Triton N-101) gibi bazı bileşiklerin SDH enzimini aktive ettiği gösterilmiştir (Lindstad *et al.* 1994).

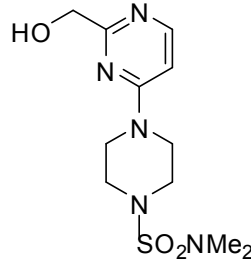
Benzer bir çalışmada, sülfanilamid, sülfatiazol, asetozolamid gibi çeşitli sülfonamidlerin, glutatyon ve dimetilsülfoksit'in koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi göstermediği belirlenmiştir (Lindstad and McKinley-McKee 1996).

Sığır beyni SDH enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda spesifik bir aldoz redüktaz enzim inhibitörü olduğu düşünülen (Kador *et al.* 1985) quercetin'in sığır beyni SDH enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği (Wiesinger and Hamprecht 1989) ve benzer inhibisyonun insan beyni SDH enziminde de gözlemlendiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1983). Diğer güçlü bir aldoz redüktaz inhibitörü olan sorbinil'in ise sığır beyni SDH enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda araştırmacılar aldoz

redüktaz inhibitörlerinin herhangi bir *in vivo* işleminden önce SDH enzimi üzerinde test edilmesinin iyi olabileceğini vurgulamışlardır (Wiesinger and Hamprecht 1989).

In vivo şartlar altında aktif olan sadece bir sınıf (piperazin pirimidinler) sorbitol dehidrogenaz enzim inhibitörleri tespit edilmiştir (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).

İlk sorbitol dehidrogenaz inhibitörü 2-hidroksimetil- 4- 4(4- N,N, dimetilaminsülfonil- 1- piperazin) pirimidin (Bu inhibitör çeşitli kaynaklarda SDI 158, CP-166,572, WAY 135,706 olarak adlandırılmaktadır), Geisen ve arkadaşları tarafından 1994 yılında saptandı (Geisen *et al.* 1994) ve bu çalışma daha güçlü SDH inhibitörlerinin sentezlenmesi çalışmalarını başlattı (Mylari *et al.* 2001, 2002; Chu-Moyer *et al.* 2002).



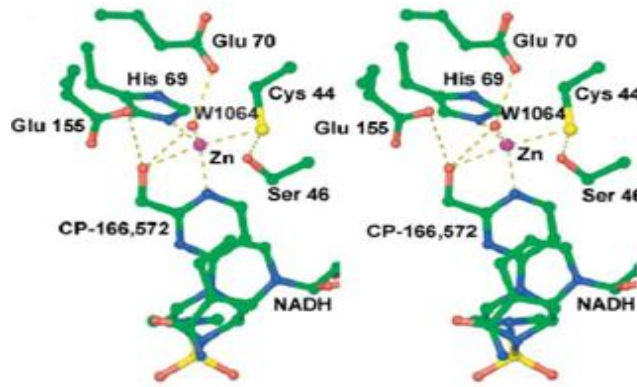
Şekil 2.1. Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü SDI 158'in kimyasal yapısı

Diabetik sıçan dokularında yapılan çalışmalarda sorbitol dehidrogenaz inhibitörü 2-hidroksimetil-4-4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1-piperazin) pirimidin (SDI 158)'in klinikte faydalı etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Geisen *et al.* 1994; Tilton *et al.* 1995).

Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü 2-hidroksimetil-4-4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1-piperazin) pirimidin (SDI 158)'in, aldoz redüktaz enzimini zayıf bir şekilde inhibe ettiği buna rağmen hekzokinaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz ve alkol dehidrogenazı içeren diğer birçok enzim aktivitesi üzerinde hiçbir

etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Geisen *et al.* 1994; Tilton *et al.* 1995). Bundan dolayı SDI 158, spesifik bir SDH inhibitörüdür.

İnsan sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda SDI 158'in (CP-166,572), enzimin katalitik çinko atomuyla ve NADH'nin nikotinamid halkasıyla eşzamanlı etkileştiği belirtilmiştir (Şekil 2.2.). Ayrıca bu çalışmalarda SDI 158'in NAD^+ , sorbitol ve NADH ile yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği gözlenmiştir (Pauly *et al.* 2003).



Şekil 2.2. SDI 158 (CP- 166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko atomuyla ve NADH ile etkileşimi (Pauly *et al.* 2003)

Yapılan çalışmalarda, sorbitol dehidrogenaz inhibisyonunun sorbitol birikimini artırmasına rağmen aynı zamanda yan etkileri olmaksızın bozulmuş sinir iletimi ve sinirlerde, aortta, gözle ilgili dokulardaki vasküler disfonksiyonları içeren çeşitli komplikasyonları azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, bu dokulardaki patogenezlerin glukozun sorbitole indirgenmesinden çok SDH tarafından katalizlenen sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile daha yakından ilişkili olduğunu belirtmiştir. Bundan dolayı yüksek NADH/NAD^+ oranı çeşitli diabetik dokulardaki patogenezlerin en önemli belirleyicisi olarak görülür (Tilton *et al.* 1995).

Diyabetik şartlar altında SDH miktarındaki değişim sitoplazmik NAD^+/NADH oranında bir dengesizlik meydana getirir. Williamson ve arkadaşları sitoplazmik redoks durumundaki değişimleri tanımlamak için “*pseudohypoxia*” terimini bulmuşlardır. Bu

araştırmacılar aynı zamanda SDH'nin inhibisyonunun, sitoplazmik redoks durumdaki değişimleri düzeltebileceğini ve deneysel diabetlerde görülen erken fonksiyonel değişimleri etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Bu fonksiyonel değişimler damardaki albumin dağılımında, dokulardaki kan akış hızında ve sinir iletim hızındaki değişimlerdir (Williamson *et al.* 1993). Ayrıca Geisen ve arkadaşları SDH inhibisyonunun, diabetik sıçanlarda böbrek hiperfiltrasyon üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (Geisen *et al.* 1994). Deneysel diabetlerde görülen erken fonksiyonel değişimlerin diabetik dokularda patolojik durumlara katkı yapabilecek olmasından dolayı bu çalışma diabetik komplikasyonlar alanında SDH'nin rolüne yönelik yapılan çalışmaları teşvik etmiştir (Cameron *et al.* 1997; Oates 2002).

Poliol yolunun ürünü olan sorbitol ozmotik açıdan aktif bir bileşiktir. Sorbitol hücre membranından difüze olamadığı için hücrelerde birikerek (Lewis *et al.* 2001) ozmotik strese neden olur. Ozmotik stres özellikle retina, lens ve periferik sinirlerde ozmotik hasara neden olmaktadır (Gabbay 1975). Ozmotik stres, sorbitol birikimi ile hücrenin su içeriğinin artması sonucu meydana gelir. Redoks dengesindeki bozulma, proteinlerin çözünürlüklerini değiştirerek membran direncine zarar verir (Tornlinson 1989). Lensde sorbitol birikimine bağlı ozmotik stres sonucu membran yapısı bozulmaktadır (Kinoshita 1974; Brownlee *et al.* 1984). Katarakt gelişiminin en önemli nedeni de budur (Kinoshita 1965; Varma *et al.* 1977; Lee and Chung 1999).

Kador ve arkadaşları, diabetik ve galaktosemik farelerde şeker katarakt oluşumunda aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz inhibisyonunun etkilerini karşılaştırmak amacıyla sorbitol dehidrogenaz inhibitörlerinin varlığında ve yokluğunda, aldoz redüktaz inhibitörlerinin varlığında ve yokluğunda galaktosemik ve diabetik farelerde katarakt oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda sorbitol dehidrogenaz inhibitörlerinin diabetik farelerde katarakt oluşumunu hızlandırdığı ancak galaktosemik farelerde katarakt oluşumunda herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca aldoz redüktaz inhibitörlerinin hem diabetik hem de galaktosemik farelerde katarakt oluşumunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu gözlem sonuçları aldoz redüktaz enzimi tarafından katalizlenen hücre içi sorbitol birikiminin şeker katarakt oluşumunu başlattığı

ve aldoz redüktaz inhibisyonu ile şeker katarakt oluşumunun engellenebileceği görüşünü desteklemektedir (Kador *et al.* 1998).

Szaflık ve arkadaşları tip II diyabetik retinopati ve sorbitol dehidrogenaz gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu araştırmalar sonucunda SDH gen polimorfizmi ile diyabetik retinopatinin ortaya çıkışı arasında bir ilişki olduğunu ancak SDH gen polimorfizminin tip II diyabetik retinopatideki rolünü belirlemek için farklı etnik popülasyonlar ve daha geniş gruplar üzerinde çalışmak gerektiğini vurgulamışlardır (Szaflık *et al.* 2008).

Maekawa ve arkadaşları, yetişkin sıçan siyatik sinirlerinden izole ettikleri schwann hücrelerinde aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin ekspresyonunu ve mRNA seviyelerini belirlemek için yarışmalı RT-PCR sistemini geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar hem AR hemde SDH mRNA'sının schwann hücrelerinde ekspresyon gösterdiğini buna rağmen SDH cDNA seviyesinin AR cDNA seviyesinden çok düşük olduğunu belirlemişlerdir. Maekawa ve arkadaşları, bu çalışmada geliştirdikleri RT-PCR sisteminin diabetik komplikasyonların görüldüğü organlarda, sorbitol yolunun aktivitesinin artmasıyla meydana gelen metabolik bozukluklarda aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin rolünü belirlemede faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (Maekawa *et al.* 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür, potasyum fosfat, hidroklorik asit, glisin, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, etanol, metanol, asetik asit, izopropanol, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250,R-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), DEAE-Sephadex, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100, β -NAD⁺, sorbitol, β -merkapto etanol ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; çalışmada kullanılan ilaçlar ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: HeraEÜs Sepatech (Suprafuge 22)
Ultrasantrifüj	: Beackman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı(Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery (UK)

Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Manyetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar):	Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla saf ve deiyonize su kullanılmıştır. Ayrıca bazı çözeltilerde kullanılan su sterilize edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 71,5 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,9): 0,54 g Glisin 90 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=9,9'a getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. 4,7 mM β -NAD⁺ çözeltisi (Koenzim çözeltisi): 0,0155 g β -NAD⁺ alındı 5 ml 71,5 mM pH=9,9 olan Glisin/NaOH tampon çözeltisi içinde çözüldü.
3. 100 mM sorbitol çözeltisi (Substrat çözeltisi): 0,182 g sorbitol alındı 10 ml 71,5 mM pH=9,9 olan Glisin/NaOH tampon çözeltisi içinde çözüldü.

Homojenat hazırlanırken kullanılan çözeltiler:

1. % 0.9 luk NaCl çözeltisi: 0,9 gr NaCl alınıp hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

2. 5 mM KH_2PO_4 , pH=7,0: 0,068 g KH_2PO_4 yaklaşık 90 ml saf suda çözüldü 1M NaOH ile pH=7,0'ye getirildikten sonra son hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler:

1. (Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökeleği çözmek için) 5 mM KH_2PO_4 Tamponu pH=7,9: 0,068 g KH_2PO_4 yaklaşık 90 ml saf suda çözüldü 1M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. (Diyaliz için) 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (1 mM β -merkaptotanol içeren), (pH=7,9): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra içerisine 72 μl β -merkaptotanol katıldı. Son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler:

1. 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=7,9): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.
2. 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=6,2), (Diyalizde kullanılan tampon): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'e getirildikten sonra içerisine 72 μl β -merkaptotanol katıldı. Son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi için kullanılan tampon çözeltiler:

1. 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=6,2); 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'e getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi için kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=7,0), (Kolonun dengelenmesinde ve elüsyon işleminde kullanılan çözelti); 6,8 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=7,0'ye getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
2. Standart protein çözeltilerinin hazırlanışı:
 - a. Albumin; 20 mg albumin 1900 μl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 μl gliserol ilave edildi.
 - b. Alkol dehidrogenaz; 10 mg alkol dehidrogenaz 1900 μl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 μl gliserol ilave edildi.
 - c. β -Amilaz; 8 mg β -amilaz 1900 μl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 μl gliserol ilave edildi.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8,0)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 μl numune tamponundan 50 μl olacak şekilde β -merkapt etanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.
11. Coomassie brillant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1L'ye tamamlandı.
12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 ml 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim suyla 250 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 edildi. Çözeltinin 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 çözülmesiyle hazırlandı.

İlaç ve kimyasal maddelerin stok çözeltileri:

1. Dakarbazin: 200 mg dakarbazin'in 20 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (54,5 mM).
2. Tiyokolşikosid: 4 mg tiyokolşikosid'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (3,55 mM).
3. Metotreksat: 50 mg metotreksat'ın 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (22 mM)
4. Furosemid: 20 mg furosemid'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (30,3 mM).

5. Epirubicin Hidroklorür: 10 mg Epirubicin Hidroklorür'ün 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (3,46 mM).
6. Midazolam: 5 mg midazolam'ın 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (3,06 mM).
7. Dekspantenol: 500 mg dekspantenol'un 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (1,218 mM).
8. Menadion Sodyumbisülfid: 20 mg menadion sodyumbisülfid'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (36,2 mM).
9. Kalsiyum Folinat: 100 mg kalsiyum folinat'ın 10 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (19,6 mM).
10. Gemsitabin HCl: 200 mg gemsitabin'in 25 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (26,748 mM).
11. Okzaliptatin: 100 mg okzaliptatin'in 20 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (12,6 mM).
12. Lidokain HCl: 20 mg Lidokain HCl'in 1 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (74 mM).
- 1.1. Teofilin Etilendiamin: 240 mg teofilin etilendiamin'in 10 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (57 mM).

3.2. Yöntemler

3.2. 1. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü



Reaksiyonuyla NAD^+ 'nin indirgenmesi sonucu oluşan absorbans artışı 340 nm'de üç dakika süreyle ölçüldü. Bunun için 1 ml'lik kuvartz küvet içerisinde 50 mM Glisin/NaOH tamponu (pH=9,9), 10 mM sorbitol, 470 μM NAD^+ ve enzim olacak şekilde hazırlandı (Lindstad *et al.* 1992). 340 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. NADH'in milimolar ekstinksiyon katsayısı aktivitenin hesaplanması için kullanıldı. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), sorbitol dehidrogenaz tarafından

sorbitol varlığında indirgenir. NADH'ın oluşum oranı sorbitol dehidrogenaz aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin üniteleri dakika başına okside olan sorbitol'un mikro molünü verir.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

- E $\ddot{U}$ /ml : 1 ml'deki enzim ünitesi
 ΔOD : Bir dakikadaki 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

3.2.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

3.2.2.a. Koyun karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Deneyde kullanılan koyun karaciğer dokusu taze olarak temin edildi. Doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 5 mM KH_2PO_4 (pH=7,0) tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemten sonra süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.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.

Koyun karaciğerinden 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.

$$g(NH_4)SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

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 %30-70 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında ilk basamak olarak %30-70 amonyum sülfat kesitlemesi uygulandı.

Önce %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm’de 20 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 çözünbileceği minimum fosfat tamponunda (5 mM KH_2PO_4 , pH=7,9) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.2.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (1mM β -merkaptotanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH=7,9) karşı 2 defa diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, soğuk ortamda gerçekleştirildi.

3.2.2.d. Ultrasantrifüj

Diyaliz işleminden sonra numune içerisindeki çözünmeden kalan safsızlıkları uzaklaştırmak için numune, 100000 g de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Çökelek kısmı atıldı. Süpernatant kısmı alınarak bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

Çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılan DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 ml destile suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm²x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,9) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek ultrasantrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Sorbitol dehidrogenaz enzimi DEAE-Sephadex kolon materyaline tutunmadığından, kolonu dengeleme işleminde kullanılan 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,9) kullanılarak elüsyon

işlemi yapıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 ml/saat'e ayarlanarak yaklaşık 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı, aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle 1mM β -merkaptoetanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH=6,2 olan tampona karşı diyaliz edildi. Böylece birleştirilen elüat çözeltisi CM-sephadex C-50 katyon değişim kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numuneler için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.2.f. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi

Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Sephadex C-50 iyon değişim reçinesinin öncelikle şişirilmesi gerekir. Bu amaçla 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 ml destile suya konularak 80-90 °C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3cm²x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=6,2) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek DEAE-Sephadex iyon değişim kolonundan toplanan ve diyaliz edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Daha sonra 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=6,2) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi.

Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml 5 mM KH_2PO_4 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. Elüatlar, kolon akış hızı 15 ml/saat'e ayarlanarak yaklaşık 2 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi.

Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.3. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Koyun karaciğeri numunesinden hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cerayan eder, iki dakikada tamamlanır. renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. kör olarak 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Tüplere koyun karaciğerinden elde edilen homojenattan ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er ml konularak üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir

numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değerin aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metodla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve homojenatta protein tayini yapıldı.

3.2.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğeri SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin doğal halinin molekül kütlesi Andrews ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi (Whitaker 1963; Andrews 1965; Marshall 1970).

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 36 ml yatak hacmi elde etmek için 5 g Sephadex G-100, 150 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM'lık ve pH'sı 7,0 olan KH₂PO₄ tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbands değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10-15 ml/saat olarak ayarlandı.

Molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2.000.000 Da, β-amilaz; 200.000 Da, alkol dehidrogenaz; 150.000 Da, albumin; 66.000 Da standart proteinler ayrı ayrı kolona uygulandı. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen enzim numunesi jel filtrasyon kolonuna uygulandı (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan

protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla (50 mM KH_2PO_4 pH=7,0) doldurularak, elüatlar 1'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütleini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MK değerleri hesaplandı. Log MK- K_{av} grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için K_{av} değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi belirlendi.

Aşağıdaki formül kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı ve Log MK- K_{av} grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_0 = Void hacim, V_e = Elüsyon hacmi, V_t = Kolon yatak hacmi

3.2.5. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi işleminden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu.

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

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

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

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

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

3.2.7. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa), sitokrom C (12,4 kDa) kullanıldı. elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK- R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen SDH enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak SDH enziminin log MK'sı belirlendi. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.8. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla kuvet 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 artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.9. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.

IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için $V_{max}=V_{max}^I(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Çizelge 3.1. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Dakarbazin'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
777	100	100	20	3	0,016	1
775	100	100	20	5	0,027	1
773	100	100	20	7	0,038	1
770	100	100	20	10	0,0545	1
760	100	100	20	20	0,109	1

Çizelge 3.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Tiyokolşikosid'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
775	100	100	20	5	0,017	1
770	100	100	20	10	0,035	1
760	100	100	20	20	0,071	1
750	100	100	20	30	0,106	1
730	100	100	20	50	0,177	1

Çizelge 3.3. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Metotreksat'ın IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
777	100	100	20	3	0,066	1
775	100	100	20	5	0,11	1
773	100	100	20	7	0,154	1
770	100	100	20	10	0,22	1
760	100	100	20	20	0,44	1

Çizelge 3.4. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Furosemid'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
779	100	100	20	1	0,0303	1
777	100	100	20	3	0,0909	1
775	100	100	20	5	0,152	1
773	100	100	20	7	0,212	1
770	100	100	20	10	0,303	1

Çizelge 3.5. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Epirubisin HCl'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	0,173	1
705	100	100	20	75	0,260	1
680	100	100	20	100	0,346	1
630	100	100	20	150	0,519	1
580	100	100	20	200	0,692	1

Çizelge 3.6. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Midazolam'ın IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	0,153	1
680	100	100	20	100	0,306	1
580	100	100	20	200	0,612	1
480	100	100	20	300	0,918	1
430	100	100	20	350	1,071	1

Çizelge 3.7. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Dekspantenol'ün IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	0,0609	1
580	100	100	20	200	0,243	1
280	100	100	20	500	0,609	1
130	100	100	20	650	0,792	1
30	100	100	20	750	0,913	1

Çizelge 3.8. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Menadion Sodyumbisülfid'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
770	100	100	20	10	0,362	1
760	100	100	20	20	0,724	1
750	100	100	20	30	1,086	1
740	100	100	20	40	1,448	1
730	100	100	20	50	1,810	1

Çizelge 3.9. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kalsiyum Folinat'ın IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	0,98	1
705	100	100	20	75	1,47	1
680	100	100	20	100	1,96	1
630	100	100	20	150	2,94	1
580	100	100	20	200	3,92	1

Çizelge 3.10. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Gemsitabin HCl'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	1,337	1
680	100	100	20	100	2,674	1
630	100	100	20	150	4,012	1
580	100	100	20	200	5,35	1
480	100	100	20	300	8,024	1

Çizelge 3.11. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Okzaliplatin'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	0,63	1
580	100	100	20	200	2,52	1
280	100	100	20	500	6,3	1
180	100	100	20	600	7,56	1
80	100	100	20	700	8,82	1

Çizelge 3.12. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Lidokain HCl'in IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	3,7	1
580	100	100	20	200	14,8	1
480	100	100	20	300	22,2	1
280	100	100	20	500	37	1
0	100	100	20	780	57,7	1

Çizelge 3.13. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Teofilin Etilendiamin'in IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (μl)	Sorbitol (μl)	NAD⁺ (μl)	Enzim (μl)	İnhibitör Hacmi (μl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
780	100	100	20	0	0	1
730	100	100	20	50	2,85	1
380	100	100	20	400	22,8	1
180	100	100	20	600	34,2	1
80	100	100	20	700	39,9	1
0	100	100	20	780	44,5	1

Çizelge 3.14. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Tiyokolşikosid'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (μ l)	Sorbitol (μ l)	NAD ⁺ (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
875	5	100	20	-	-	0,5	1
865	15	100	20	-	-	1,5	1
855	25	100	20	-	-	2,5	1
845	35	100	20	-	-	3,5	1
835	45	100	20	-	-	4,5	1
865	5	100	20	10	0,035	0,5	1
855	15	100	20	10	0,035	1,5	1
845	25	100	20	10	0,035	2,5	1
835	35	100	20	10	0,035	3,5	1
825	45	100	20	10	0,035	4,5	1
845	5	100	20	30	0,106	0,5	1
835	15	100	20	30	0,106	1,5	1
825	25	100	20	30	0,106	2,5	1
815	35	100	20	30	0,106	3,5	1
805	45	100	20	30	0,106	4,5	1
825	5	100	20	50	0,177	0,5	1
815	15	100	20	50	0,177	1,5	1
805	25	100	20	50	0,177	2,5	1
795	35	100	20	50	0,177	3,5	1
785	45	100	20	50	0,177	4,5	1

Çizelge 3.15. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Menadion sodyumbisülfid'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (μ l)	Sorbitol (μ l)	NAD ⁺ (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
875	5	100	20	-	-	0,5	1
865	15	100	20	-	-	1,5	1
855	25	100	20	-	-	2,5	1
845	35	100	20	-	-	3,5	1
835	45	100	20	-	-	4,5	1
873	5	100	20	2	0,0724	0,5	1
863	15	100	20	2	0,0724	1,5	1
853	25	100	20	2	0,0724	2,5	1
843	35	100	20	2	0,0724	3,5	1
833	45	100	20	2	0,0724	4,5	1
865	5	100	20	10	0,362	0,5	1
855	15	100	20	10	0,362	1,5	1
845	25	100	20	10	0,362	2,5	1
835	35	100	20	10	0,362	3,5	1
825	45	100	20	10	0,362	4,5	1
855	5	100	20	20	0,724	0,5	1
845	15	100	20	20	0,724	1,5	1
835	25	100	20	20	0,724	2,5	1
825	35	100	20	20	0,724	3,5	1
815	45	100	20	20	0,724	4,5	1

Çizelge 3.16. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Furosemid'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (μ l)	Sorbitol (μ l)	NAD ⁺ (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
875	5	100	20	-	-	0,5	1
865	15	100	20	-	-	1,5	1
855	25	100	20	-	-	2,5	1
845	35	100	20	-	-	3,5	1
835	45	100	20	-	-	4,5	1
874	5	100	20	1	0,0303	0,5	1
864	15	100	20	1	0,0303	1,5	1
854	25	100	20	1	0,0303	2,5	1
844	35	100	20	1	0,0303	3,5	1
834	45	100	20	1	0,0303	4,5	1
870	5	100	20	5	0,152	0,5	1
860	15	100	20	5	0,152	1,5	1
850	25	100	20	5	0,152	2,5	1
840	35	100	20	5	0,152	3,5	1
830	45	100	20	5	0,152	4,5	1
865	5	100	20	10	0,303	0,5	1
855	15	100	20	10	0,303	1,5	1
845	25	100	20	10	0,303	2,5	1
835	35	100	20	10	0,303	3,5	1
825	45	100	20	10	0,303	4,5	1

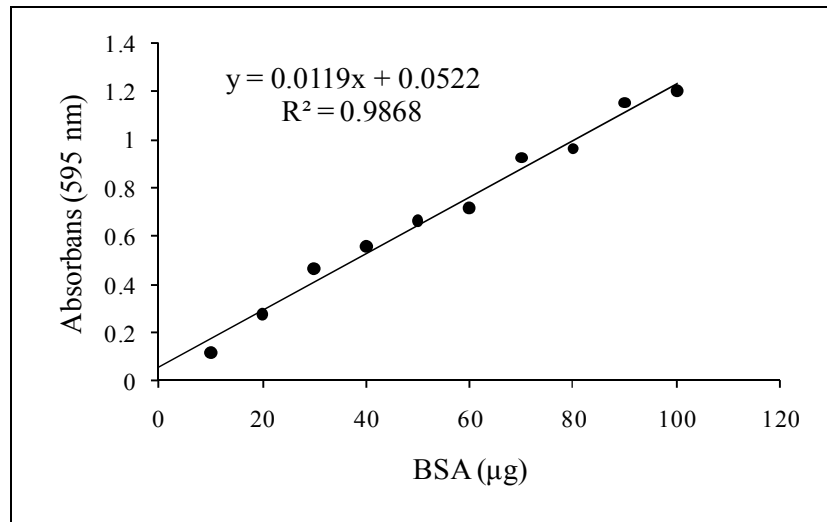
Çizelge 3.17. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Metotreksat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (μ l)	Sorbitol (μ l)	NAD ⁺ (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
875	5	100	20	-	-	0,5	1
865	15	100	20	-	-	1,5	1
855	25	100	20	-	-	2,5	1
845	35	100	20	-	-	3,5	1
835	45	100	20	-	-	4,5	1
872	5	100	20	3	0,066	0,5	1
862	15	100	20	3	0,066	1,5	1
852	25	100	20	3	0,066	2,5	1
842	35	100	20	3	0,066	3,5	1
832	45	100	20	3	0,066	4,5	1
870	5	100	20	5	0,11	0,5	1
860	15	100	20	5	0,11	1,5	1
850	25	100	20	5	0,11	2,5	1
840	35	100	20	5	0,11	3,5	1
830	45	100	20	5	0,11	4,5	1
868	5	100	20	7	0,154	0,5	1
858	15	100	20	7	0,154	1,5	1
848	25	100	20	7	0,154	2,5	1
838	35	100	20	7	0,154	3,5	1
828	45	100	20	7	0,154	4,5	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

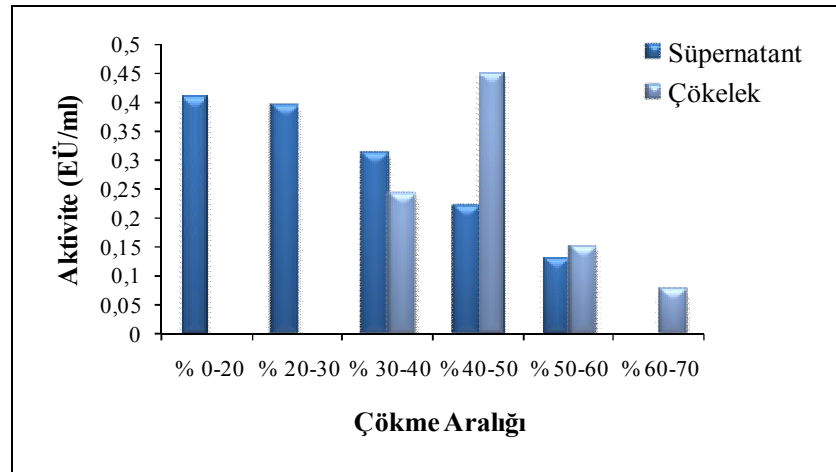
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Koyun karaciğerinden elde edilen homojenat, ardışık olarak %0 ile %70 arasındaki amonyum sülfat çöktürmesi işlemine (her seferinde doygunluk %10 artırılarak) tabi

tutuldu. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesi içeren proteinlerin %30 amonyum sülfat doygunluğundan itibaren çökmeye başladığı ve %70 doygunluğunda aktivitenin tamamının çöktüğü görüldü. Bundan sonraki saflaştırma çalışmalarında, saflaştırma işleminde ilk basamak olarak %30-%70 amonyum sülfat kesitlemesi uygulandı. Elde edilen çökelek 13000 rpm de 20 dakika santrifüjlenerek ve 5 mM KH_2PO_4 pH:7,9 tamponunda tekrar çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi.

Çizelge 4.1. Koyun karaciğeri SDH enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,409	0,396	0,313	0,222	0,131	0
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0	0	0,241	0,452	0,150	0,078



Şekil 4.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

4.2.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Amonyut sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası enzim, anyon değiştirici DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesi ile elüe edildi. Elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune

için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi ve bu oranlar Çizelge 4.2.'de verildi.

4.2.3. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen numune CM-Sephadex C-50 iyon değişim kolonuna tatbik edildi. Kolona adsorbe olan protein artan iyonik şiddetle lineer gradient ile elüe edildi. Elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi ve bu oranlar Çizelge 4.2'de verildi.

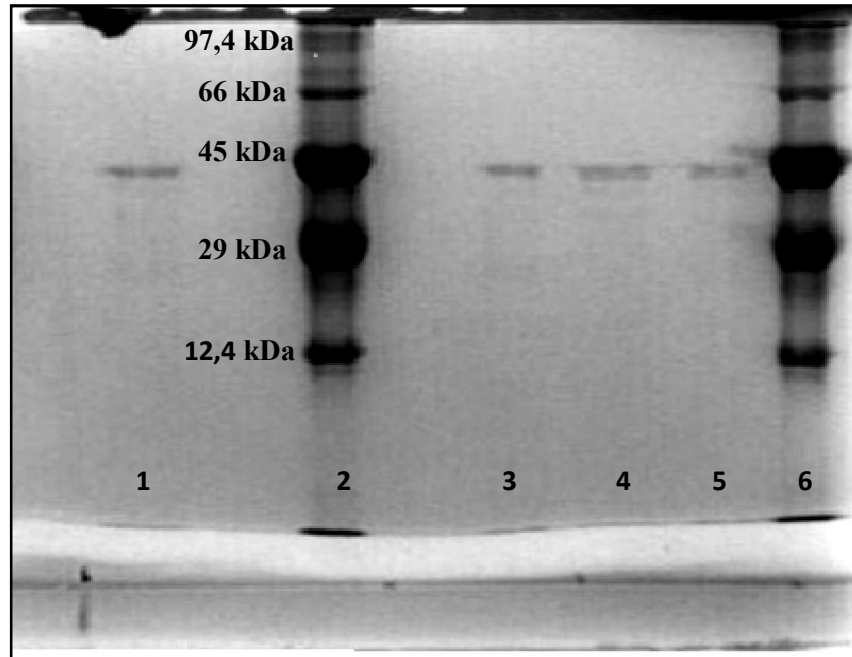
Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması çalışmalarında uygulanan her bir yöntem sonunda elde edilen örneklerde protein ve aktivite değerleri belirlenerek saflaştırma tablosu oluşturuldu (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması basamakları

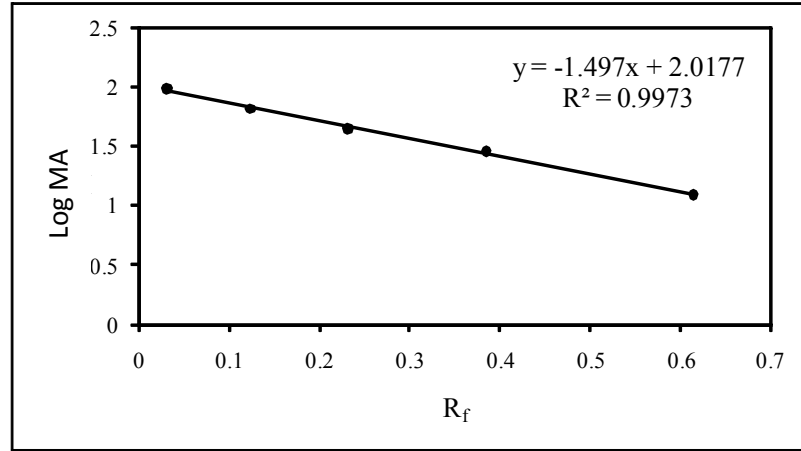
Saflaştırma basamağı	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,305	42	35,27	1481,34	12,81	0,00864	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi ve diyaliz	0,565	12	32,8	393,6	6,78	0,0172	52,9	1,9
DEAE-Sephadex anyon değişim kromatografisi	0,354	17,5	9,39	164,3	6,195	0,0377	48,4	4,36
CM-Sephadex C-50 katyon değişim kromatografisi	0,0589	3	0,067	0,201	0,177	0,88	1,38	101,8

4.3. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

Koyun karaciğerinden elde edilen sorbitol dehidrogenaz enzimi numunelerinin, homojenat, amonyum sülfat çökeleği, DEAE-Sephadex iyon değişim ve CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3'de gösterildi. Koyun karaciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enziminin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek bu grafikten hesaplandı (Şekil 4.4).



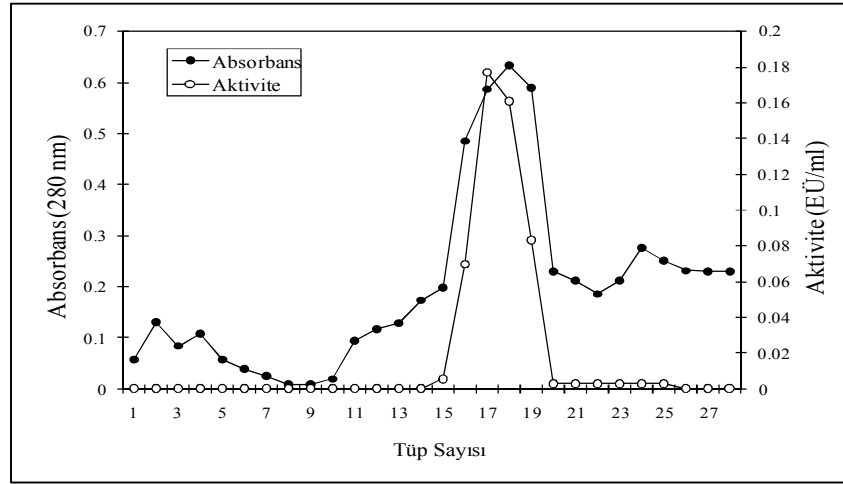
Şekil 4.3 Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflığının SDS-PAGE’de elde edilen sonucu. *(2 ve 6: standart proteinler: Fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa), sitokrom C (12,4 kDa). 1,3,4,5: CM Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen saf SDH enzimi)



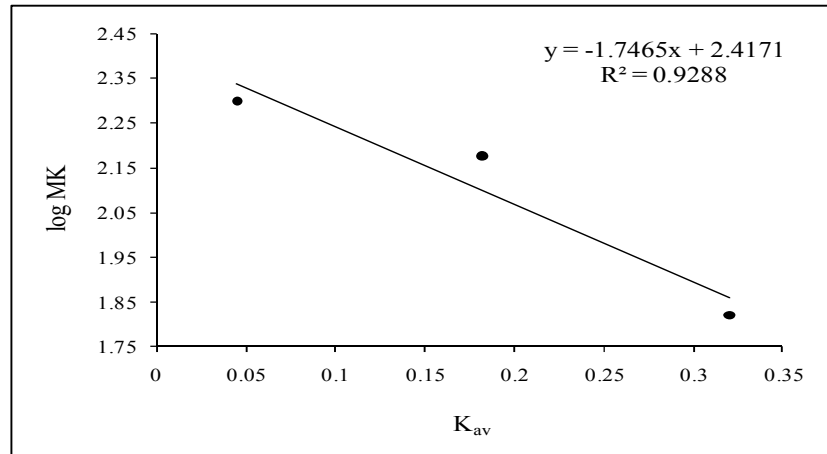
Şekil 4.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun karaciğeri SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (SDH için $R_f=0,277$)

4.4. Koyun Karaciğeri SDH Enziminin Aktif Formunun Molekül Kütlesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Koyun karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi, Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde jel filtrasyon kromatografisi işlemi ile belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.5-4.6’da verildi. Bu işlem esnasında; Blue dextran (2000 kDa) kolona uygulandı. Daha sonra β -amilaz (200 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), albumin (66 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Daha sonra log MK-Kav grafiği çizilerek, SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.6. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik (SDH için Kav=0,136)

4.5. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.3-4.15'da verildi. Ayrıca konsantrasyona karşı % aktivite olarak

oluşturulan grafikler Şekil 4.7- 4.19’da ve bu grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.16’da verildi.

Çizelge 4.3. Dakarbazin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,016	84,4
0,027	61,6
0,038	38,9
0,055	16,9
0,109	5,02

Çizelge 4.4. Tiyokolşikosid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,017	90,9
0,035	66,14
0,071	44,7
0,106	30,2
0,177	10,16

Çizelge 4.5. Metotreksat ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,066	89,8
0,11	55,1
0,154	29,8
0,22	5,06
0,44	3,17

Çizelge 4.6. Furosemid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,0303	80,9
0,0909	65,4
0,152	49,8
0,212	41,8
0,303	17,6

Çizelge 4.7. Epirubisin HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,173	71,34
0,26	59,6
0,346	52,4
0,519	27
0,692	17,11

Çizelge 4.8. Midazolam ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,153	63,87
0,306	55,5
0,612	41,4
0,918	26,76
1,071	25,2

Çizelge 4.9. Dekspantenol ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,0609	96,6
0,243	81,8
0,609	49,4
0,792	36,6
0,913	28,6

Çizelge 4.10. Menadion sodyumbisülfid ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,362	90,6
0,724	57,3
1,086	46,3
1,448	29,5
1,81	20,1

Çizelge 4.11. Kalsiyum folinat ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,98	87,5
1,47	61,9
1,96	50,6
2,94	28,99
3,92	15,23

Çizelge 4.12. Gemsitabin HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
1,3374	89
2,6748	78
4,0122	61
5,35	45
8,0244	28,9

Çizelge 4.13. Okzaliplatin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

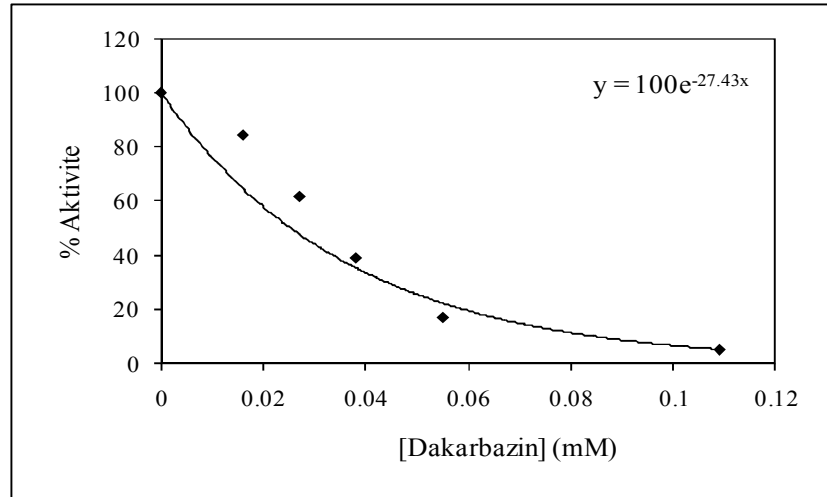
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
0,63	90,23
2,52	75,84
6,3	55
7,56	42,7
8,82	38,56

Çizelge 4.14. Lidokain HCl ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

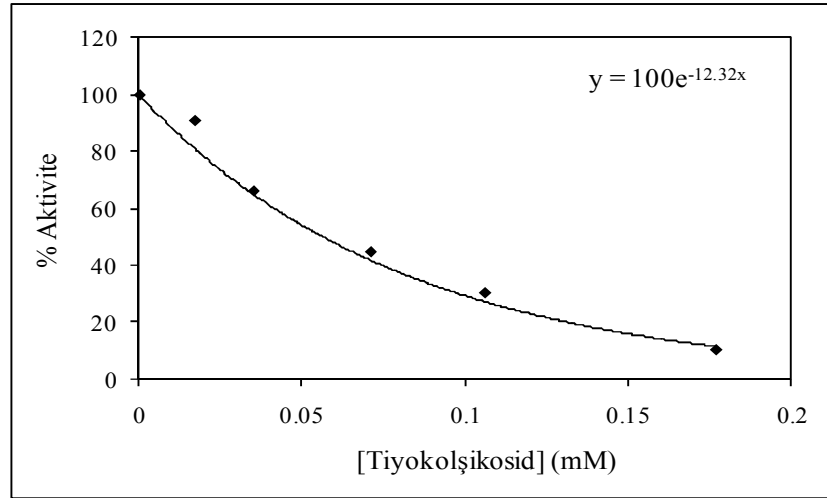
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
3,7	85,66
14,8	75,92
22,2	61,33
37	46,4
57,72	39

Çizelge 4.15. Teofilin Etilendiamin ilacının koyun karaciğeri SDH aktivitesi üzerine etkisi

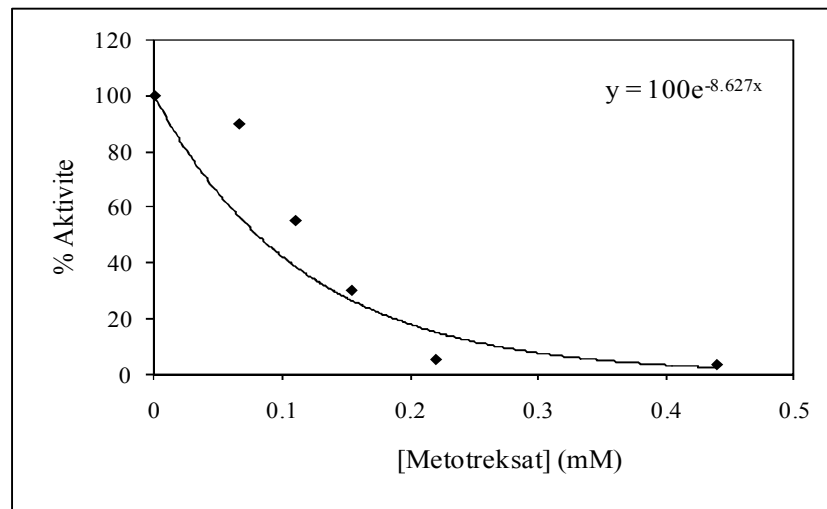
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,000	100,0
2,85	98,4
22,8	61,5
34,2	57,4
39,9	51,6
44,46	45,3



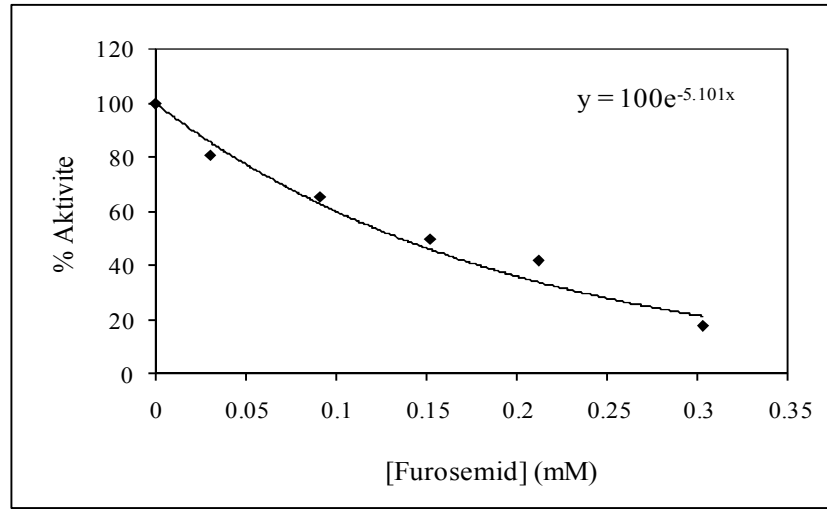
Şekil 4.7. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Dakarbazin ilacının etkisi



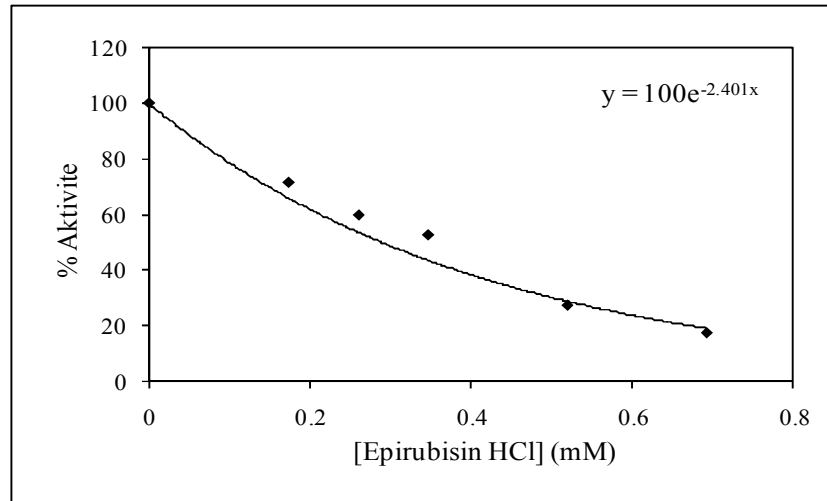
Şekil 4.8. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Tiyokolşikosid ilacının etkisi



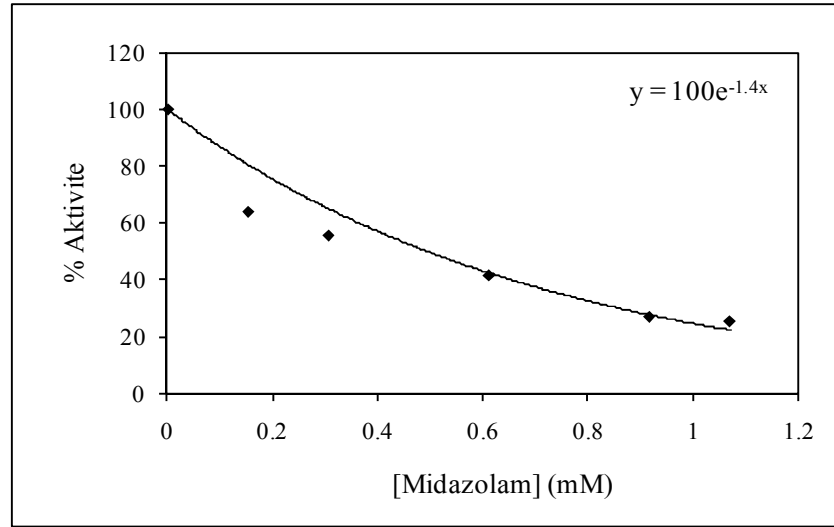
Şekil 4.9. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Metotreksat ilacının etkisi



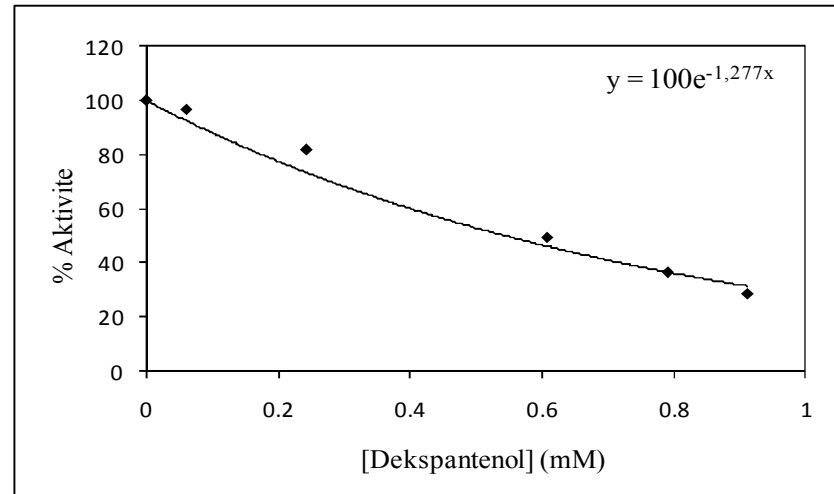
Şekil 4.10. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Furosemid ilacının etkisi



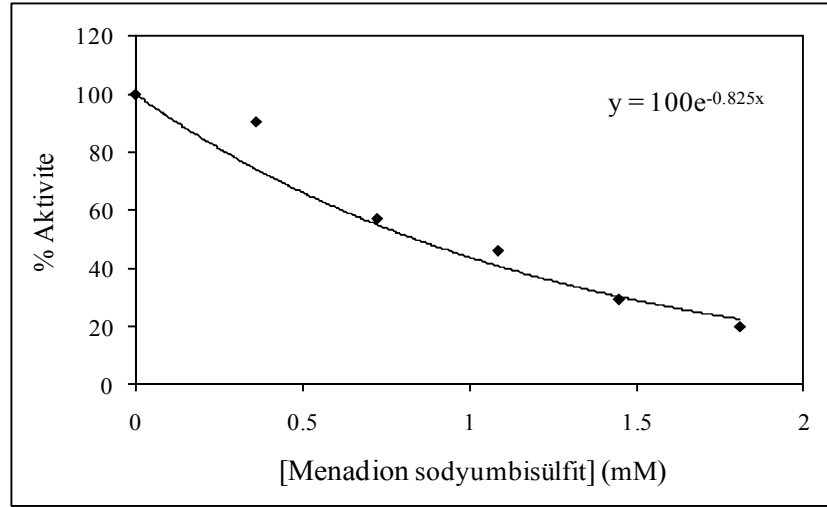
Şekil 4.11. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Epirubisin HCl ilacının etkisi



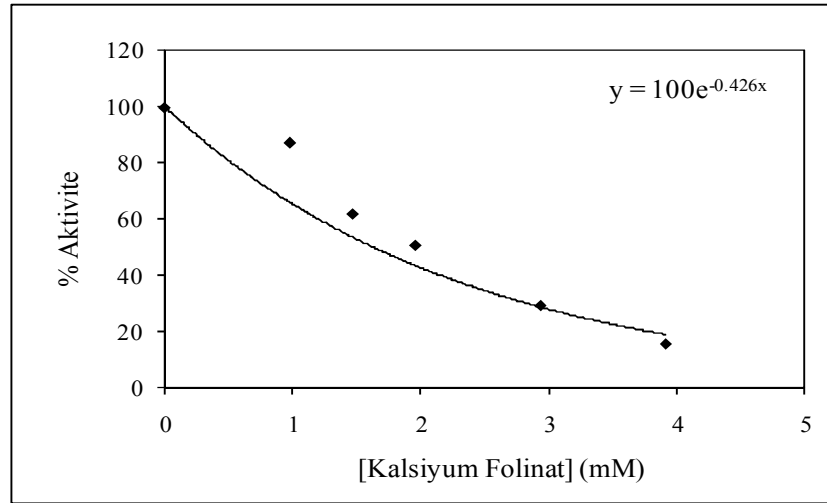
Şekil 4.12. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Midazolam ilacının etkisi



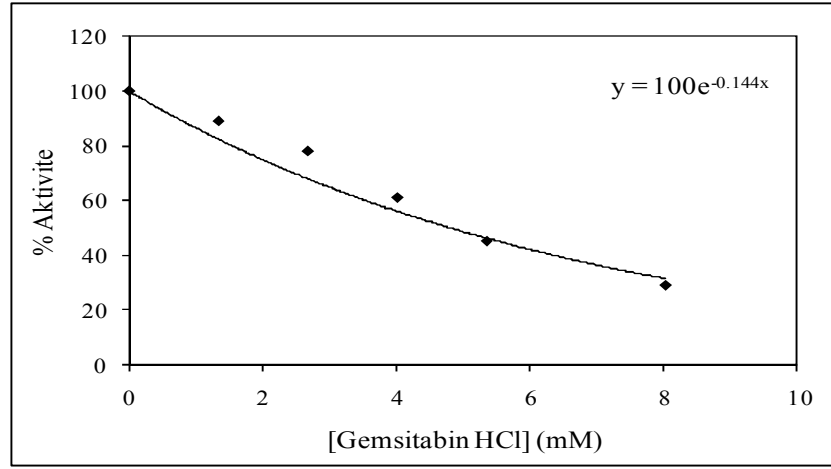
Şekil 4.13. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Dekspantenol ilacının etkisi



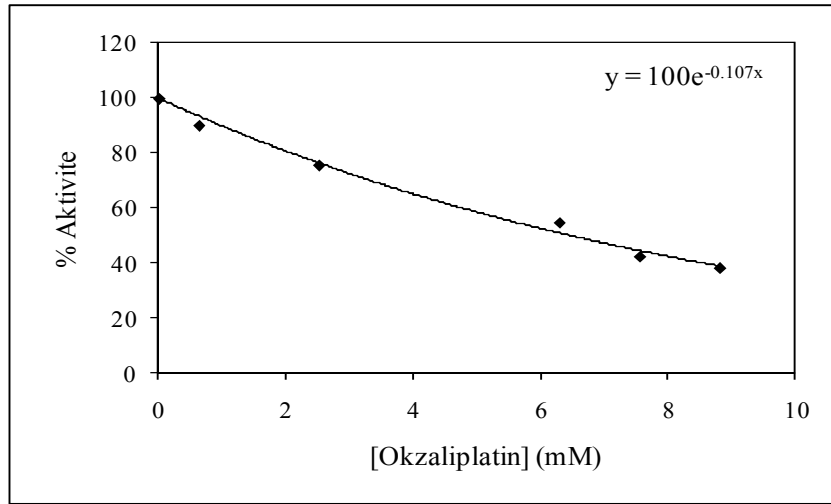
Şekil 4.14. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Menadion Sodyumbisülfid ilacının etkisi



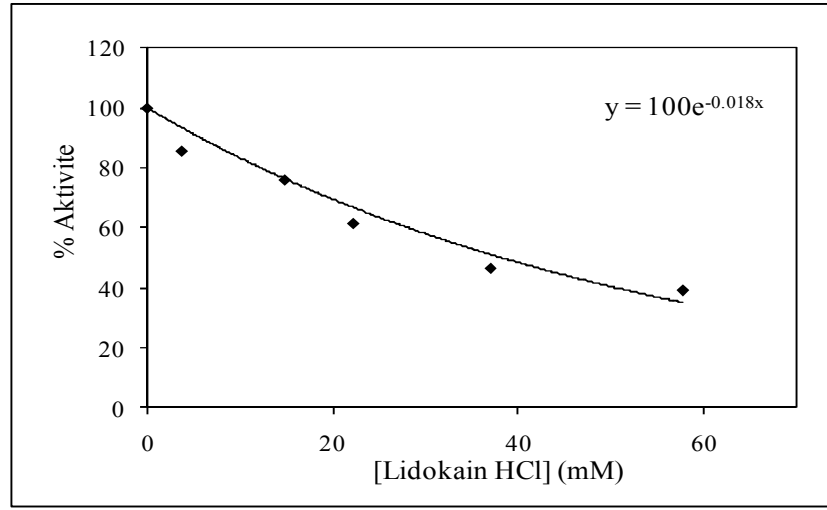
Şekil 4.15. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Kalsiyum Folinat ilacının etkisi



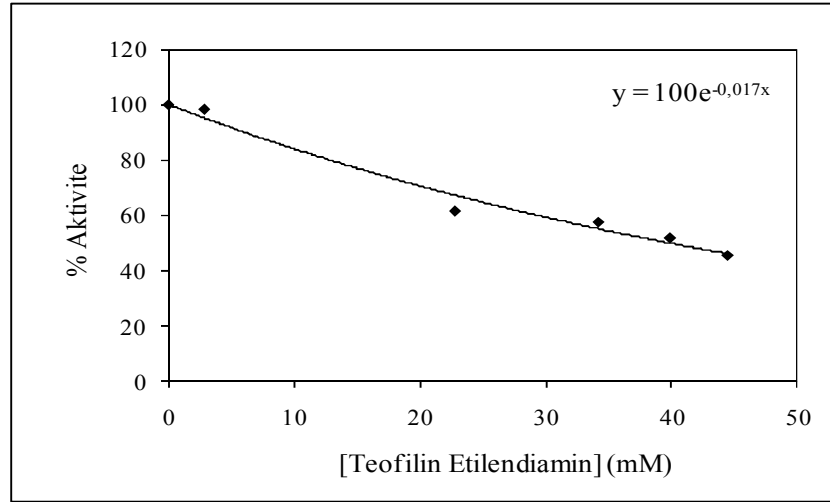
Şekil 4.16. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Gemsitabin HCl ilacının etkisi



Şekil 4.17. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Okzaliplatin ilacının etkisi



Şekil 4.18. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Lidokain HCl ilacının etkisi



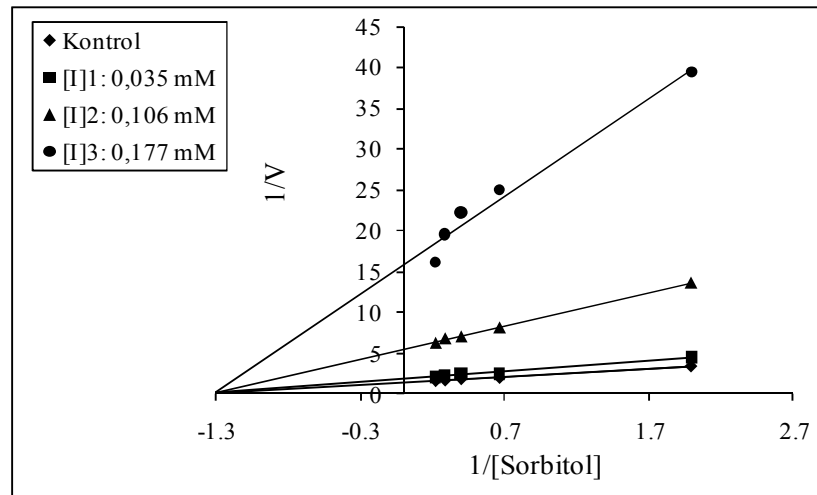
Şekil 4.19. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Teofilin Etilendiamin ilacının etkisi

Çizelge 4.16. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri

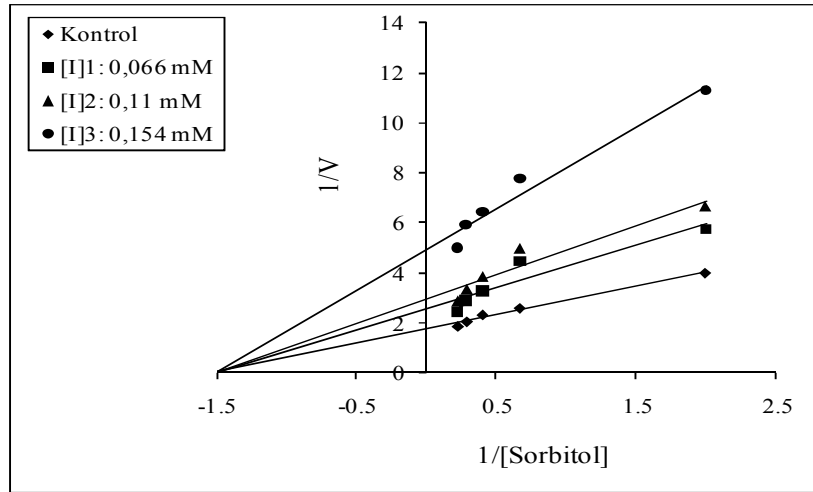
İlaçlar	IC ₅₀ (mM)
Dakarbazin	0,025
Tiyokolşikosid	0,056
Metotreksat	0,081
Furosemid	0,137
Epirubisin HCl	0,291
Midazolam	0,492
Dekspantenol	0,548
Menadion Sodyumbisülfid	0,848
Kalsiyum Folinat	1,62
Gemsitabin HCl	4,86
Okzaliptatin	6,54
Lidokain HCl	38,33
Teofilin Etilendiamin	41,17

4.6. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

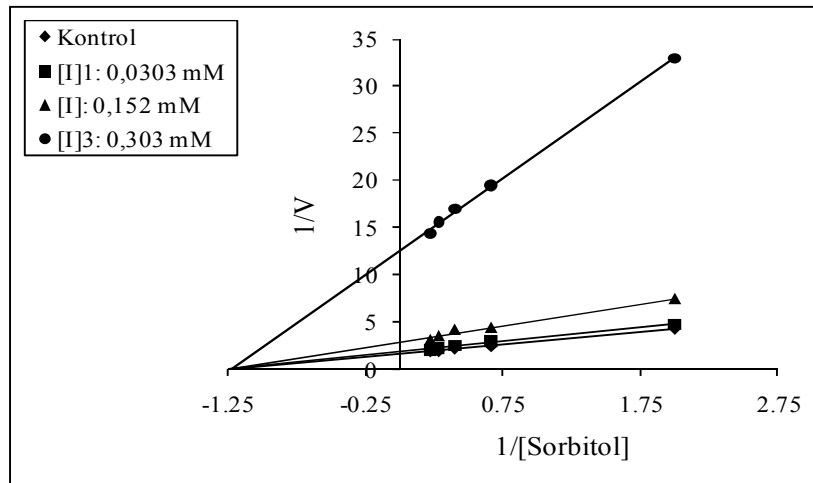
Koyun karaciğeri SDH enzimi aktivitesi üzerine güçlü inhibisyon etkisi gösteren ve elimizde mevcut olan Tiyokolşikosid, Metotreksat, Furosemid, Menadion Sodyumbisülfid ilaçları için K_i değerlerini belirlemek amacıyla sabit 3 uygun ilaç konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi, y ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör yarışmalı, x ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör ise yarışmasız olduğu için, elde edilen grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminde K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.20 -4.23 ile Çizelge 4.17’de verildi.



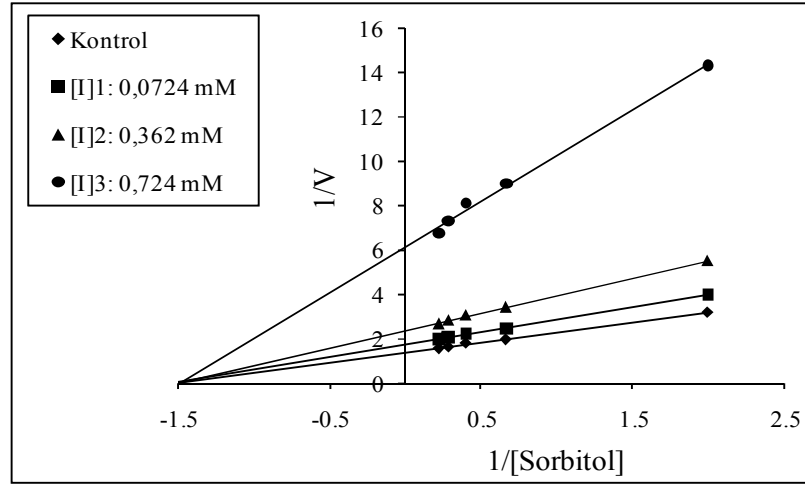
Şekil 4.20. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Tiyokolşikosid ilacının etkisi



Şekil 4.21. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Metotreksat ilacının etkisi



Şekil 4.22. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Furosemid ilacının etkisi



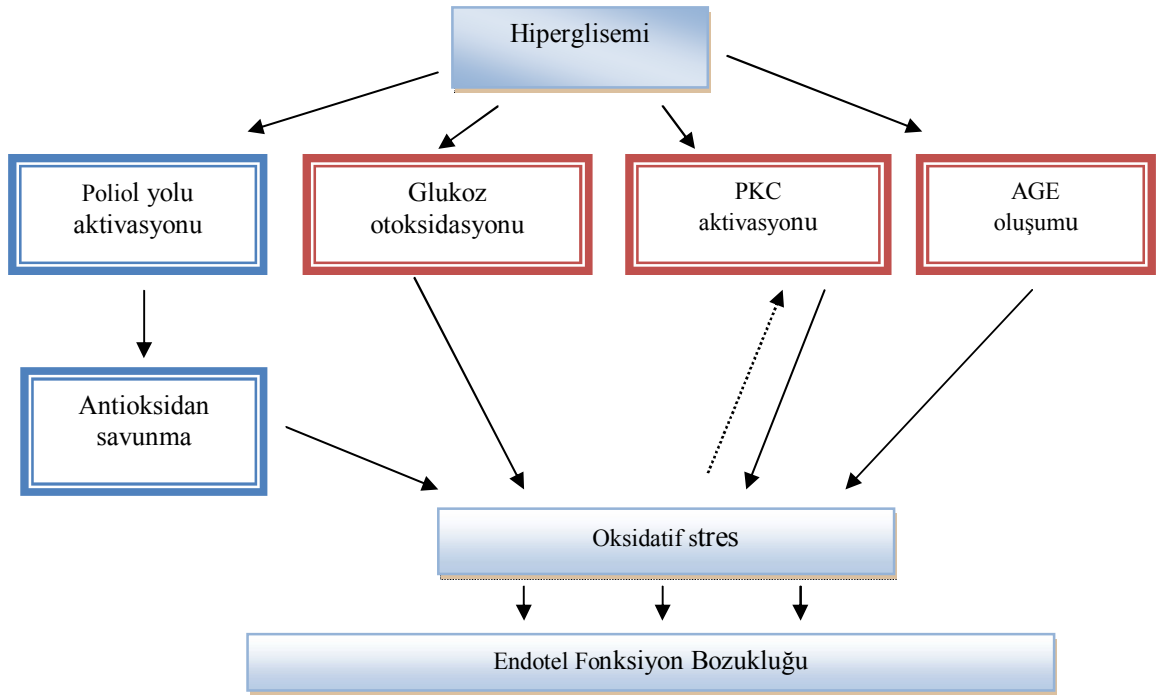
Şekil 4.23. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine Menadion Sodyumbisülfid ilacının etkisi

Çizelge 4.17. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaçlar	IC_{50} (mM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Tiyokolşikosid	0,056	0,035	0,0493	0,0336±0,0162	Yarışmasız
		0,106	0,0346		
		0,177	0,0169		
Metotreksat	0,081	0,066	0,147	0,1310±0,04139	Yarışmasız
		0,11	0,162		
		0,154	0,0843		
Furosemid	0,137	0,0303	0,242	0,2333±0,03482	Yarışmasız
		0,152	0,195		
		0,303	0,263		
Menadion Sodyumbisülfid	0,848	0,0724	0,279	0,3277±0,15196	Yarışmasız
		0,362	0,498		
		0,724	0,206		

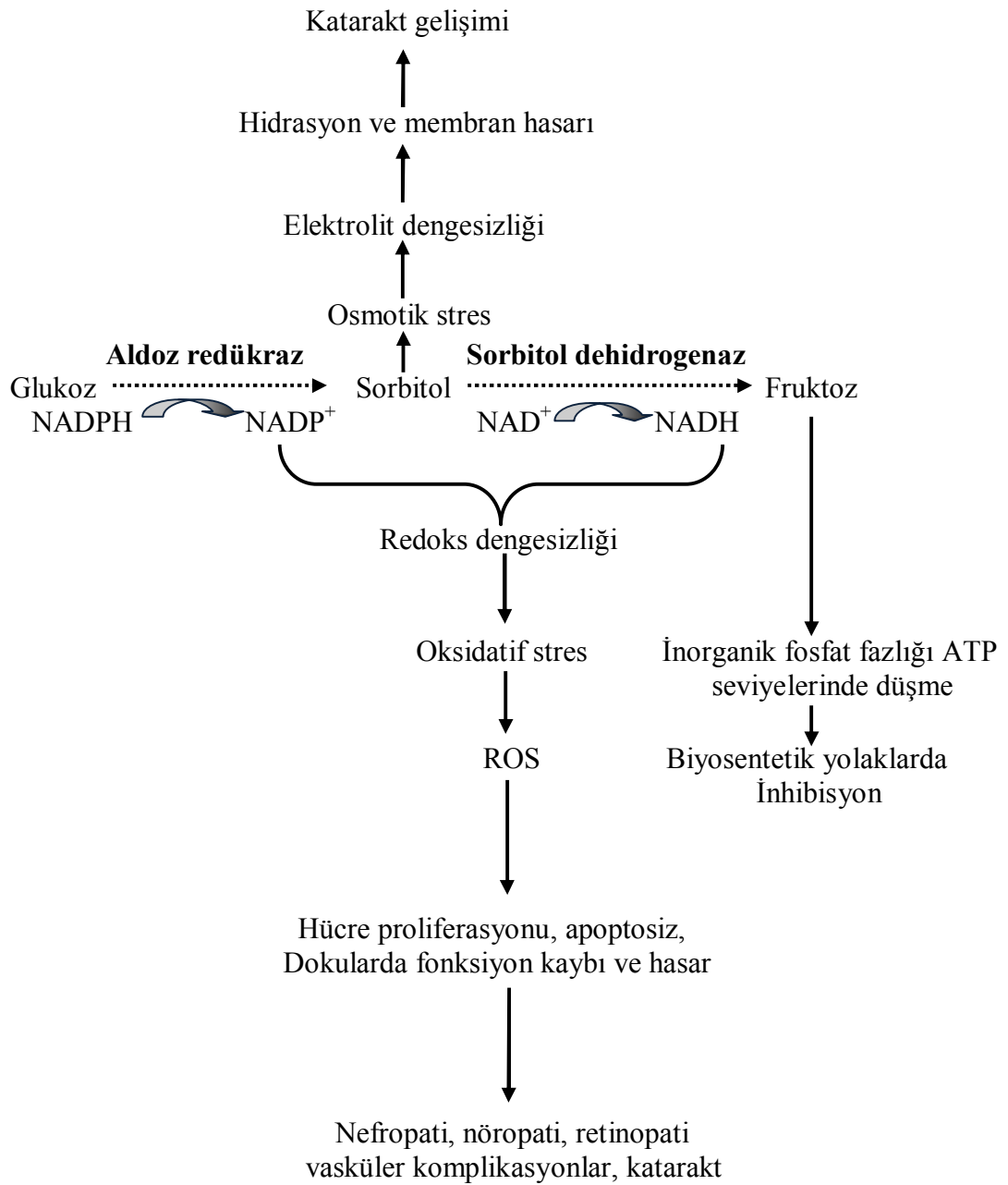
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabet, günümüzde çok sık görülen bir metabolik hastalıktır. Dünyada 180 milyondan fazla insanı etkileyen diyabet, Türkiye’de ve dünyada ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı alan önemli bir sağlık sorunudur. 2025 yılında diyabet görülme sıklığının hızla artarak ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir (Sicree *et al.* 2003). Diyabette vasküler komplikasyonların gelişiminde majör risk faktörü hiperglisemidir. Hiperglisemi bazı metabolik yolların aktivitesini artırır. Bu metabolik yolların aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluklarına yol açmakta ve bunun sonucunda pek çok vasküler komplikasyon oluşmaktadır. (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).



Şekil 5.1. Hiperglisemi ve endotelial fonksiyon bozukluğu (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000)

Poliol yolu, glukozu sorbitole dönüştüren aldoz redüktaz ve sorbitolu fruktoza dönüştüren sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içeren ve hiperglisemi durumunda aktifleşerek retinopati, nöropati, nefropati, ateroskleroz gibi diabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynayan önemli bir metabolik yoldur (Kinoshita and Nishimura 1988; The Diabetes Control and Complication Trials Group 1993).



Şekil 5.2. Poliöl yolunun diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi (Srivastava *et al.* 2005)

Sorbitol dehidrogenaz enzimi (SDH), hiperglisemi durumunda aktif olan poliol yolunun ikinci enzimidir ve NAD^+ 'yı koenzim olarak kullanarak sorbitolün fruktoza dönüşümünü katalizler (Mylari *et al.* 2003).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi beyin, lens, eritrosit, karaciğer gibi bütün memeli dokularında bulunur (Jedziniak *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983) ve özellikle karaciğer hastalıkları için önemli bir tanı işaretçisidir. Normalde serum SDH düzeyi tespit edilemeyecek düzeylerde dir. SDH düzeyinin yükselmesi karaciğerde parankimal hücre hasarı olduğunu gösterir. Akut enfeksiyöz hepatitler, toksik hepatitler, hipoksik karaciğer hasarı, siroz, primer ve sekonder karaciğer malignitelerinde serum SDH düzeyi artar (<http://www.spitall.com/hastalik-belirtileri/sorbitol-dehidrogenaz-sdh-iditol-dehidrogenaz-tahlili>).

Lens, retina, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aort, kapiller damarlarda hücelere glukoz girişı için insüline gerek olmadığından, kontrol edilmemiş diabet gibi hiperglisemi durumlarında büyük miktarlarda glukoz bu hücelerin içine girebilir. Artmış glukoz konsantrasyonu ve yeterli NADPH varlığında, aldoz redüktaz fazla miktarda sorbitol sentezlenmesine neden olur. Sorbitol glukoz gibi membranları kolayca geçemez ve hücre içinde hapsolur. Sorbitol dehidrogenaz enziminin yok olduğu veya az olduğu retina, böbrek ve sinir hücelerinde bu artış çoktur. Sonuçta sorbitol bu hücelerde birikir, su çekerek hücre şişmesine neden olur. Diabette görülen katarakt oluşumu, nöropati, nefropati ve retinopatiye yol açan damarsal sorunlar bu duruma bağlanabilir (Champe and Harvey 1997).

Görüldüğü gibi poliol yolu canlılar için hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle bu yolun enzimlerinden biri olan sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, enzimin metabolizmadaki ve diyabetik komplikasyonların etiyolojisindeki rolünü belirlemek ayrıca diyabetik komplikasyonların azaltılmasında etkili olabilecek koruyucu ilaçların geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemi gayet açıktır.

Hiperglisemi durumunda aktivitesi artan poliol yolu ile kornea, böbrek, kalp gibi çeşitli dokularda ortaya çıkan diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklamak için araştırmacılar, bu yolun enzimleri olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerinde çok sayıda çalışma yapmışlar ve bazı araştırmacılar bu enzimlerin gen polimorfizmleri ile diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (Maekawa et al. 2001; Szaflık et al. 2008).

Bu çalışmaların yanı sıra çeşitli kaynaklardan SDH enzimini saflaştırma çalışmaları da yapılmıştır. Sorbitol dehidrogenaz enzimi ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmış (Brakley 1951), daha sonraki yıllarda enzim çeşitli 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 bazı bitki kaynaklarından (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000) saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller olduklarından şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar, bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar ve bazen amino asitler, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir.

Sorbitol dehidrogenaz enzimini memeli dokularından saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Bunun sebebi sorbitol dehidrogenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmamasıdır. Enzimin bu özelliği saflaştırma işleminin yapıldığı pek çok çalışmada gözlemlenmiştir (Smith 1962; Rehğ and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1982; Karacaoğlan and Özer 2005).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında bugüne kadar çok değişik kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Örneğin sığır lensinden sorbitol dehidrogenaz enzimi, DE-52, amonyum sülfat çöktürmesi, Affi Blue, 2.DE-52, S-200, Bio Sil Sec 250 yöntemleri kullanılarak altı basamaklı bir prosesle %16 verimle, 3×10^4 kat saflaştırılabilmektedir ve sığır lensi SDH enziminin her bir alt biriminin molekül kütlesi 39 kDa, enzimin aktif formunun molekül kütlesi ise 156 kDa olarak bulunmuştur. (Marini *et al.* 1997).

Sıçan beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz, CM-selüloz kromatografisi yöntemleri kullanılarak %13,6 verimle 700 kat kısmen saflaştırılmıştır (Rehg and Torack 1977).

O'Brien ve arkadaşları insan beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimini, protamin sülfat çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz, CM-Selüloz, Matrex Red A-gel, ultrafiltrasyon teknikleri ile toplam 6 basamakta %5,5 verimle 690 kat kısmen saflaştırabilmişlerdir. Bu çalışmada insan beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin özellikle sulu solüsyonda (1 ml'de 1 mg'dan daha az protein olduğunda) stabilitesinin olmadığı bu nedenle saflaştırma işlemlerinin mümkün olduğunca hızlı tamamlanması gerektiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1982).

Sığır beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DE-52, CM-52, Blue sepharose CL-6B, Green Sepharose 4B, Sephadex G-200 kromatografisi yöntemleri kullanılarak altı basamakta %6 verimle 3008 kat saflaştırılmıştır. Sığır beyni SDH enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE'de 39 kDa olarak belirlenirken, jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin doğal halinin molekül kütlesi 155 kDa olarak bulunmuştur (Wiesinger and Hamprecht 1989).

Darmanin ve arkadaşları insan SDH enzimini kodlayan gen bölgesini karaciğer cDNA kütüphanesinden izole edip prokaryotik ekspresyon vektörüne takmışlar ve Escherichia coli BL21'e transfer etmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri bakteriden insan sorbitol dehidrogenaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi (Q-

Sepharose kolon) ve boya afinitesi (Green-18 kolon) yöntemlerini kullanarak 23 kat saflaştırabilmişlerdir. Saflaştırılan homotetramerik SDH enziminin bir alt ünitesinin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 37 kDa olarak tespit edilmiştir (Darmanin *et al.* 2003).

Karacaoğlu ve Özer, tavuk karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enzimini saflaştırırken amonyum sülfat çöktürmesi ve Polybuffer Exchanger 94 kromatografisi yöntemini kullanmış ancak kromatografik işlemler sırasında enzim aktivitesinde önemli bir kayıp gözlemlendiğinden saflaştırma işlemlerinden vazgeçmiştir (Karacaoğlu and Özer 2005).

Bu çalışmada koyun karaciğeri SDH enziminin farklı kromatografik metotlar denenerek saflaştırılması ve bazı ilaçların bu enzim üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, koyun karaciğeri SDH enzimi sadece üç basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (30-70%), DEAE Sephadex anyon değişim kromatografisi ve CM Sephadex C-50 katyon değişim kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak SDH enzimi koyun karaciğerinden 0,88 EÜ/mg spesifik aktivite, %1,38 verimle 101,8 kat saflaştırılmıştır. Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4°C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir. Çalışmamızda SDH enziminin saflaştırılması, yukarıda belirtilen çalışmalarla kıyaslandığında daha az basamakta ve daha kısa sürede gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi özellikle spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için uzun zamandan beri bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Bu yöntem yardımıyla numune içerisindeki birçok safsızlık uzaklaştırılmış olur ve proteinler daha derişik halde elde edilirler. Bu nedenle kromatografik işlemler öncesi amonyum sülfat çöktürmesi uygulanması enzimin derişikleştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir (Ninfali *et al.* 1990). Bundan dolayı çalışmamızda koyun karaciğeri SDH enzimi için amonyum sülfat çöktürme aralığı belirlendi (%30-70). Böylece

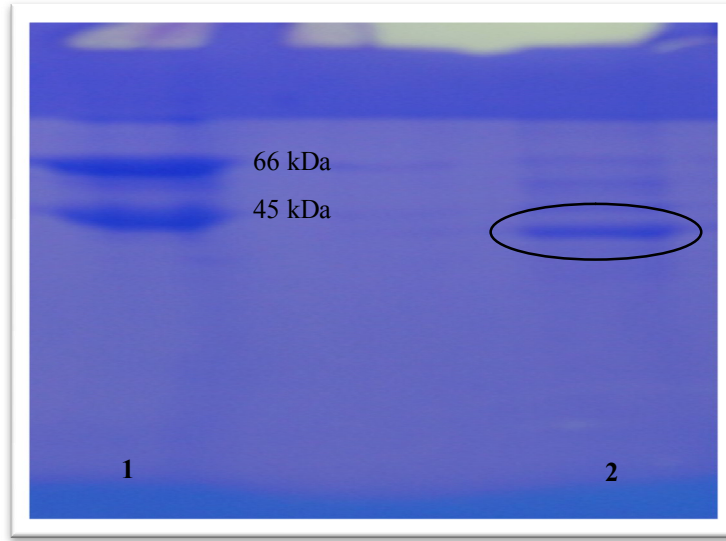
homojenattaki birçok safsızlık uzaklaştırılarak enzimin derişik hale getirilmesi sağlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Ultrasantrifüj, bir solüsyon içindeki protein, nükleik asit gibi makromoleküllerin ayrılmasında hatta plazmit, DNA, mitokondrial DNA veya kromozomal DNA'nın ayrılmasında kullanılan yüksek devirli santrifüjdür. Çalışmamızda ultrasantrifüj, diyaliz işlemi sonrasında enzim çözeltisi içindeki çözünmeden kalan safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı ve böylece enzim çözeltisi berraklaştırılarak kromatografik işlemler için hazır hale getirildi. Yapılan bu işlem saflaştırma işleminin ileriki safhalarında kullanılan matriksin tıkanmasını önlemek ve matriksten maksimum performans sağlamak açısından oldukça önemlidir.

Çalışmamızda, Rehg and Torack (1977) tarafından sıçan beyninden SDH enziminin saflaştırılmasında kullanılan yöntem modifiye edilerek koyun karaciğer dokusundan SDH enzimi kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemlerinde DEAE Sephadex ve CM Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi yöntemleri birlikte kullanılmıştır. İyon değişim kromatografisi, proteinleri üzerlerinde taşıdıkları net yüklere göre ayıran kromatografi yöntemidir. Kolon pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurulur. Protein karışımı düşük iyonik şiddetli bir tamponla kolon boyunca taşınır. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını teşvik edecek değere sahip olmalıdır. Eğer tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü pozitif olur ve bir katyon değiştirici ile bağlanır. Bunun tersine tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değiştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Bağlanmayan proteinler, kolondan ilk olarak çıkarlar. İyonik gücü yada pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilerek bağlı proteinlerin yükü değiştirilir ve kolondan ayrılması sağlanır. İyon değişim kromatografisinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonu içerikli tamponlarda olması arzu edilmez. Bu nedenle çalışmamızda kromatografik işlemler sırasında oldukça düşük tuz konsantrasyon içerikli tampon çözeltiler kullanıldı.

Çalışmamızda, SDH enziminin literatürde belirtilen 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 kolonunda pH=7,9'da ve CM Sephadex C-50 kolonunda pH=6,2'de çalışıldı. pH 7,9'da SDH enzimi DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve kolonu dengelemekte kullanılan tampon ile elüe edildi. SDH enziminin pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna bağlanmamasına sebep olarak, ortamda pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna SDH proteininden daha kuvvetle bağlanan proteinlerin varlığı görüldü. Böylece sorbitol dehidrogenaz enzimi kolona bağlanan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. Bu basamakta SDH enzimi %48,4 verimle 4,36 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.2.). pH 6,2'de SDH enzimi CM Sephadex C-50 kolonuna bağlandı ve enzim artan tuz gradienti kullanılarak kolondan elüe edildi. Bu basamakta sorbitol dehidrogenaz enzimi % 1,38 verimle yaklaşık 102 kat saflaştırıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. Jelde tek bandın gözlenmesi ile koyun karaciğerinden elde edilen SDH enziminin saf olduğu ispatlandı (Şekil 4.3.) Enzimin düşük verimle saflaştırılmasının sebebi kolon kromatografisi çalışmalarımız sırasında enzimin çok hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesidir. Bu sonuç sistein rezidülerine sahip olan SDH enziminin oksidasyona karşı hassas olması ve enzimin kuarterner yapısının hassas olması ile açıklanabilir.

Deneyssel çalışmalarımız sırasında ayrıca, koyun karaciğerinden SDH enzimini saflaştırmak amacıyla DEAE Sephadex adımıdan sonra elde edilen enzim çözeltisi % 40-80 amonyum sülfat işlemi ile derişikleştirildikten sonra jel filtrasyon kromatografisi yöntemi de denendi. Bu yöntemle koyun karaciğerinden SDH enzimi %2,08 verimle 36,7 kat kısmen saflaştırıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildiğinde jelde SDH proteinine ait belirgin bir bantla birlikte bazı safsızlıkların olduğu gözlemlendi (Şekil 5.3).

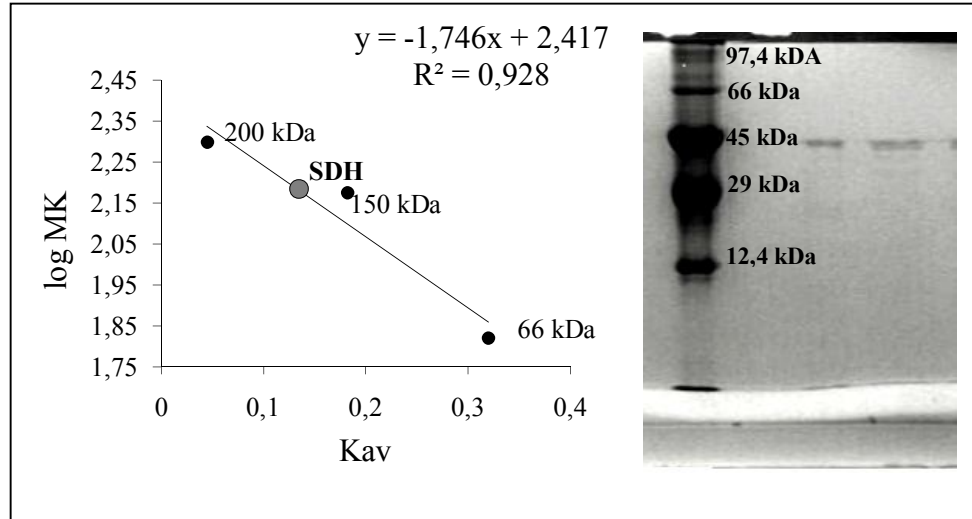


Şekil 5.3. SDS-PAGE fotoğrafı *(1: Standart proteinler: (sığır serum albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) , 2: Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen SDH enzim numunesi)

Koyun karaciğer dokusundan elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi ve her kromatografik işlem sonrası elde edilen enzim numunelerindeki protein miktarları Bradford yöntemiyle Şekil 4.1’de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiğinden, yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 µg) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir (Bradford 1976).

Çalışmamızda koyun karaciğerinden elde edilen SDH enziminin alt birim molekül kütlelerinin belirlenmesinde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.3’de verildiği gibi koyun karaciğerinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE’de aynı zamanda yürütüldü. Log MK- R_f standart grafiği çizildi ve Şekil 4.4’de verildi. Daha sonra koyun karaciğer dokusundan elde edilen enzim numunesinin R_f değeri hesaplanarak standart grafikten koyun karaciğeri SDH enziminin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. SDH enziminin aktif formunun molekül kütlelerinin belirlenmesi amacıyla da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler birer birer geçirildikten sonra log MK- K_{av} standart grafiği çizildi ve Şekil 4.6’da verildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen enzim numunesi kolondan geçirilerek K_{av} değeri belirlendi ve standart grafikten SDH

enziminin aktif formunun molekül kütlesi belirlendi. Litaratürde koyun karaciğeri SDH enziminin homotetramerik bir enzim olduğu, enzimin her bir alt biriminin molekül kütlesinin 38 kDa, toplam molekül kütlesinin ise 152 kDa olduğu rapor edilmiştir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996). Çalışmamızda SDH enziminin alt birim molekül kütlesini 39,8 kDa, aktif formunun molekül kütlesini ise 151,2 kDa olarak belirledik. (Şekil 5.3). Bu sonuçlardan görüldüğü gibi çalışmamızda koyun karaciğer SDH enzimi için hesapladığımız alt birim ve tabii molekül kütleleri ile litaratürde SDH enzimi için verilen mol kütleleri uygunluk göstermektedir. Buradan anlaşılaacağı gibi koyun karaciğer SDH enzimi tetramerik bir yapıya sahiptir.



Şekil 5.4. SDH enziminin alt birim molekül kütlesini gösteren SDS-PAGE fotoğrafı ve enzimin aktif formunun molekül kütlesinin belirlendiği log MK-K_{av} standart grafiği (SDH için K_{av}: 0,136)

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur (Keha ve Küfrevioglu 2004). Örneğin nükleotit sentezinin inhibitörleri (örn, antikanser ajanlar) ve çinko ihtiva eden anjiyotensin dönüştürücü enzimin inhibitörleri (örn, tiyol kaptopril) kan basıncının azaltılması ve hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (Ondenti and Cushman

1982). Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesi çalışmalarında da inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Birçok kimyasal madde, canlı metabolizmasında düşük dozlarda da olsa enzim aktivitesini etkileyerek veya spesifik aktivitesinde inhibisyona yol açarak enzimleri etkilerler. Laboratuvarlarda birçok farklı enzimin ilaçlarla etkileşimi ile ilgili günümüze dek pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin karbonik anhidraz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz gibi birçok enzim çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış, üzerinde tıbbi uygulamalarda çok yaygın kullanılan ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri incelenmiştir (Beydemir *et al.* 2000,2002; Çiftçi *et al.* 2002; Ekinçi *et al.* 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalar SDH inhibitörlerinin hiperglisemi durumunda aktifleşen poliol metabolizması ile ilgili redoks bozuklukları düzelterek diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirmede faydalı olabileceğini ileri sürmektedir (Kador *et al.* 1998). Bu da daha güçlü SDH inhibitörlerinin sentezlenmesi çalışmalarını teşvik etmiştir (Mylari *et al.* 2001,2002; Chu-Moyer *et al.* 2002). Bu nedenle bugün birçok araştırmacı güçlü ve spesifik SDH inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır (Lindstad and McKinley-McKee 1997)

SDH inhibitörlerine olan ilginin çeşitli sebepleri vardır. Bu sebeplerden ilki, SDH-NAD⁺ kompleksine bağlanan substrat benzeri inhibitörler enzimin aktif bölgesi ile bu bölgeye bağlanan substrat molekülü arasındaki etkileşimi tanımlamayı amaçlayan yapısal çalışmalarda faydalı olabilir. İkincisi, güçlü ve spesifik SDH inhibitörleri bu enzimin fizyolojik rolünün belirlenmesinde faydalı olabilir. Son olarak SDH inhibitörleri diyabetik komplikasyonların azaltılmasında koruyucu ilaç geliştirmek bakımından önemli olabilir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996).

SDH inhibitörlerinin önemi ve yapılan literatür araştırmaları sonucunda koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda, enzimin tıbbi ilaçlarla etkileşimi üzerine gerçekleştirilmiş çok az sayıda çalışma olması göz önünde bulundurularak çalışmamızda koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde tıbbi uygulamada yaygın olarak kullanılan ilaçların *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmada seçilen ilaçların koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatürde rastlanmamıştır.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalarımız sırasında enzim aktivitesini inhibe eden ilaçların IC_{50} değerleri de belirtilmiştir. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullanılan ilaçların koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması; dakarbazin > tiyokalşikosit>metotreksat> furosemid> epirubisin HCl> midazolam> dekspantenol> menadion sodyumbisülfid> kalsiyum folinat> gemitabin HCl > okzaliptatin> lidokain HCl> teofilin etilendiamin şeklindedir. Bu sonuçlara göre koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde en güçlü inhibisyon etkisine sahip olan ilaç dakarbazindir (IC_{50} :0,025 mM).

Dakarbazin pürin bazlarının sentezinde öncü molekül olan 5-aminoimidazol-4-karbokzamid yapısında bir sitostatik antineoplastik ilaçtır. (http://www.sanofi-aventis.com.tr/urunler/Deticene_200_MG_RR.pdf) Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisinde kullanılan metotreksat (IC_{50} :0,081 mM) ve ovaryum, baş, beyin, akciğer, testis kanserleri tedavisinde kullanılan epirubisin HCl (IC_{50} :0,291 mM) koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösteren diğer antineoplastik ilaçlardır. Çalışmamızda kullanılan diğer antineoplastik etkiye sahip olan kalsiyum folinat (IC_{50} : 1,62 mM), gemitabin (IC_{50} : 4,86 mM) ve okzaliptatin (IC_{50} : 6,54 mM) ilaçlarının

koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde dakarbazin, metotreksat ve epirubisin HCl'den daha zayıf inhibisyon etkisi gösterdikleri saptanmıştır.

Kinetik çalışmalarda kullandığımız dakarbazin, kalsiyum folinat, metotreksat, epirubisin HCl, gempitabin HCl, ve okzaliptatin kemoterapi tedavisinde kullanılan antikanser etkili ilaçlardır. Yapılan bir çalışmada bu ilaçlardan metotreksat, farmorubisin, gempitabin ve okzaliptatinin tümör ilişkili HCA-IX, HCA-XII izoenzimleri ve sitozolik karbonik anhidraz HCA I ve HCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* şartlarda incelenmiştir (Özensoy 2006). Bu çalışmada metotreksat, farmorubisin, gempitabin ve okzaliptatinin ilaçlarının dört karbonik anhidraz izoenzimi için belirlenen IC₅₀ değerleri ile kendi çalışmamızda bu ilaçların SDH için belirlenen IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında metotreksat (IC₅₀; SDH:0,081, CA-I: 6,15, CA-II: 2,72, CA-IX: 1,26, CA-XII: 5,36 mM) ve epirubisin HCl'in (IC₅₀; SDH:0,291, CA-I: 10,74, CA-II: 2,87, CA-IX: 1,56, CA-XII: 3,62 mM) HCA-IX, HCA-XII, HCA I ve HCA II izoenzimlerine göre SDH enzimi için daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği, gempitabinin en kuvvetli inhibisyonu HCA-IX ve HCA II (IC₅₀; SDH:4,86, CA-I: 7,24, CA-II: 3,25, CA-IX: 3,09, CA-XII: 5,10 mM) üzerinde gösterdiği ve okzaliptatin (IC₅₀; SDH:6,54, CA-I: 2,92, CA-II: 2,65, CA-IX: 2,35, CA-XII: 3,04 mM) ilacının koyun karaciğeri SDH enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

Lindstad ve Mckinley-Mckee tarafından koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmalarda, enzim-NAD⁺-inhibitör ve enzim-NADH-inhibitör komplekslerinin oluşumuna bağlı olarak sorbitol ile karışık inhibisyon tipi gösteren 6-tiyoinozin ve 6-tiyoguanozin gibi tiyonükleosid türevi antikanser ilaçlarının SDH enziminin güçlü inhibitörleri olduğu gözlenmiştir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996).

Yapılan bir çalışmada, dakarbazin, tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid ve dekspantenol ilaçlarının insan eritrosit G6PD enzimi üzerine etkileri *in vitro* şartlarda incelenmiştir (Akkemik 2009). Bu çalışmada elde edilen sonuçlarla bizim sonuçlarımız karşılaştırıldığında, dakarbazin (IC₅₀: SDH:0,025, G6PD: 0,021 mM) ve tiyokolşikosid

(IC₅₀: SDH:0,056, G6PD:0,056 mM) ilaçlarının G6PD ve SDH enzimleri üzerinde benzer inhibisyon etkisi gösterdikleri, metotreksat (IC₅₀:SDH:0,081, G6PD:0,114 mM) ve furosemid (IC₅₀: SDH:0,137, G6PD:0,315 mM) ilaçlarının ise koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren dekspantenol ilacının G6PD enzim aktivitesi üzerine hiç etki yapmadığı gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada dakarbazin, furosemid, metotreksat, dekspantenol, teofilin etilendiamin ve lidokain HCl ilaçlarının insan eritrosit 6PGD enzimi üzerine etkileri *in vitro* şartlarda incelenmiştir. (Akkemik 2009). Bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, dakarbazin ilacının koyun karaciğeri SDH enzimine göre 6PGD enzimi (IC₅₀: 0,012 mM) üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu, metotreksat (IC₅₀:SDH 0,081, 6PGD:0,142 mM) ilacının koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği, furosemid (IC₅₀:SDH:0,137, 6PGD:0,125 mM) ilacının 6PGD ve SDH enzimlerini benzer oranda inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde zayıf inhibisyon etkisine sahip olan dekspantenol, teofilin etilendiamin, lidokain HCl ilaçlarının 6PGD enzimi üzerine etki etmediği saptanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız ilaçlar için belirlediğimiz IC₅₀ değerleri ile bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonları karşılaştırıldığında, bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonlardan çok daha düşük konsantrasyonlarda SDH enzimi üzerinde inhibitör etkisi gösterebilme özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 5.1). Elde edilen bulguların, özellikle bu ilaçları kullanan hastalar için önemli sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 5.1. Koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonları ve bu ilaçların tıpta kullanılan konsantrasyonlarının karşılaştırılması

İlaçlar	IC ₅₀ (mM)	Tıbbi uygulamada kullanılan ilaç konsantrasyonları (mM)
Dakarbazin	0,025	54,5
Tiyokolşikosid	0,056	3,55
Metotreksat	0,081	22
Furosemid	0,137	30,3
Epirubisin HCl	0,291	3,46
Midazolam	0,492	3,06
Dekspantenol	0,548	1,218
Menadion sodyumbisülfid	0,848	36,2
Kalsiyum Folinat	1,62	19,6
Gemsitabin HCl	4,86	26,748
Okzalipatin	6,54	12,6
Lidokain HCl	38,33	74
Teofilin Etilendiamin	41,17	57

Çalışmamızda koyun karaciğeri SDH enzimi üzerinde yüksek inhibisyon etkisi gösteren tiyokolşikosit, menadion sodyumbisülfid, furosemid ve metotreksat ilaçları için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975, Telefoncu 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.20-4.23). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC₅₀ değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Tiyokolşikosit ilacı için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması $0,0336 \pm 0,0162$ mM, metotreksat için $0,1310 \pm 0,04139$ mM, furosemid için $0,2333 \pm 0,03482$ mM, menadion için $0,3277 \pm 0,15196$ mM olarak bulundu. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Buna göre tiyokolşikosit, metotreksat, furosemid ve menadion ilaçlarının SDH enzimini yarışmasız olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. Bu inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanır ve enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibitör etkisi gösterirler.

Yukarıda da sayılan birçok literatürde diyabetik komplikasyonların oluşumunda ve ilerlemesinde SDH enziminin rolünü belirlemek ayrıca diyabetik komplikasyonlara karşı koruyucu ilaç geliştirmek için daha kapsamlı inhibisyon çalışmaları yapılarak spesifik ve güçlü SDH inhibitörlerinin belirlenmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Koyun karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda koyun karaciğeri SDH enzimi % 1,38 verimle yaklaşık 102 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
3. Koyun karaciğeri SDH enzimi üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla dakarbazin, tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, epirubisin HCl, midazolam, dekspantenol, menadion sodyumbisülfid, kalsiyum folinat, gempitabin HCl, okzaliptatin, lidokain HCl, teofilin etilendiamin ihtiva eden ilaçların enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.
4. SDH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren dakarbazin, tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, farmorubisin, midazolam, dekspantenol, menadion sodyumbisülfid, kalsiyum folinat, gempitabin HCl, okzaliptatin, lidokain HCl, teofilin etilendiamin etken maddeleri için IC_{50} ve tiyokolşikosid, metotreksat, furosemid, menadion sodyumbisülfid etken maddeleri için K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.
5. Elde edilen bütün sonuçlar aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Koyun karaciğer dokusu SDH enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar		
Spesifik Aktivite EÜ/ml		0,88
Saflaştırma Katsayısı		101,8
Verim		%1,38
Molekül kütlesi tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile		39,8
Jel filtrasyon kromatografisi ile		151,2
Kinetik çalışmalar		
İlaçlar		IC ₅₀ (mM)
Dakarbazin		0,025
Tiyokolşikosid		0,056
Metotreksat		0,081
Furosemid		0,137
Epirubisin HCl		0,291
Midazolam		0,492
Dekspantenol		0,548
Menadion sodyumbisülfıt		0,848
Kalsiyum folinat		1,62
Gemsitabin HCl		4,86
Okzaliplatin		6,54
Lidokain HCl		38,33
Teofilin etilendiamin		41,17
İlaçlar	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
Tiyokolşikosid	0,0336±0,0162	Yarışmasız
Metotreksat	0,1310±0,04139	Yarışmasız
Furosemid	0,2333±0,03482	Yarışmasız
Menadion sodyumbisülfıt	0,3277±0,15196	Yarışmasız

KAYNAKLAR

- Akkemik, E., 2009. İnsan eritrositinden G6PD ve 6PGD enzimlerinin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Amano, S., Yamagishi S., Koda Y., Tsuneoka M., Soejima M., Okamoto T., Inagaki Y., Yamada K., Kimura H., 2003. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med. Hypotheses*, 60, 550–551.
- American Diabetes Association, 2004. "Screening for Type 2 Diabetes" *Diabetes Care*, 27 Suppl, S11-S14.
- Anderson, N.V., 1992. *Veterinary Gastroenterology*. Second Edition. Lea Febiger, Pensilvania.
- Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96, 595-606.
- Apfel, S.C., 1999. Nerve regeneration in diabetic neuropathy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1, 3-11.
- Asada, M., Galambos J.T., 1963. Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. *Gastroenterology*, 44, 578-587
- Bailey, J.P., Renz, C., McGuinness E.T., 1981. Sorbitol dehydrogenase from horse liver: purification, characterization and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69, 909-914.
- Baynes, J.W., Thorpe S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.
- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Küfrelioğlu Ö.İ., 2002. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes, and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 17, 271-277.
- Beyer, T.A., Hutson N.J., 1986. Introduction: evidence for the role of the polyol pathway in the pathophysiology of diabetic complications. *Metabolism*, 35, 1–31.
- Bhatnagar, A., Srivastava S.K., 1992. Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 48, 91–121.
- Bozdemir H., 2001 *Diyabetik Otonomik Nöropati Kliniği*. 1. Ulusal Diyabetik Nöropati Sempozyumu. Mersin, 143-153.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brakley, R.L., 1951. The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. *Sorbitol dehydrogenase*. *Biochem. J.*, 49, 257-271.
- Brownlee M., Viassara H., Cerami A., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.*, 101, 527-37.
- Brownlee M., 1992. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 15, 1835–1843.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Vol, 414, 813-820.

- Bukan, N., Sancak B., Bilgihan A., Kosova F., Buğdaycı G., 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 and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26(7), 519-22.
- Cameron, N.E., Cotter M.A., 1992. Dissociation between biochemical and functional effects of the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, on peripheral nerve in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 939-944
- Cameron, N.E., Cotter M.A., 1997. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes*, 46,31-37.
- Cameron, N.E., Cotter M.A., Basso M., Hohman T.C., 1997. Comparison of the effects of the inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 40, 271-281.
- Cameron, N.E., Cotter M.A., Dines K.C., Maxfield E.K., 1993. Pharmacological manipulation of vascular endothelium function in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats: effects on nerve conduction, hypoxic resistance and endoneurial capillarization. *Diabetologia*, 36, 516-522.
- Cardenas, M.L., Cornish-Bowden A., Ureta T., 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1401, 242-264.
- Champe, P.C., Harvey R.A., 1997. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya, Nobel tıp kitapçevleri,130, 131 s, İstanbul.
- Chappey, O., Dosquet C., Wautier M.P., Wautier J.L., 1997. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.*, 27, 97-108.
- Cheng, H.M., Gonzalez R.G., 1986. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase and senile cataractogenesis. *Metabolism*, 35, 10-14.
- Chu-Moyer, M.Y., Ballinger W.E., Beebe D.A., Berger R., Couthier J.B., Day W.W., Li J., Mylari B.L., Oates P.J., Weekly R.M., 2002. Orally-effective, long-acting sorbitol dehydrogenase inhibitors:synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of novel heterocycle-substituted piperazine-pyrimidines. *J. Med. Chem.*, 45, 511-528
- Costantino, L., Rastelli G., Gamberoni M.C., Barlocco D., 2000. Pharmacological approaches to the treatment of diabetic complications. *Exp. Opin. Ther. Pat.*, 10, 1245-1262.
- Costantino, L., Rastelli G., Vianello P., Cignarella G., Barlocco D., 1999. Diabetes complications and their potential prevention: aldose reductase inhibition and other approaches. *Med. Res. Rev.*, 19(1), 3.
- Çiftçi, M., Beydemir Ş., Yılmaz H., Bakan E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study. *Polish J. Pharmacol.*, 54, 275-280.
- Darmanin, C., Iwata T., Carper D.A., Sparrow L.G., Chung R.P.T., El-Kabbani O., 2003. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59, 558-560.
- Davidson, J.K. 1991. *Clinical Diabetes Mellitus, Diabetic Eye Disease*, Thime Medical Puplichers, 427-444.

- DCCT Research Group., 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med.*, 329, 977-986.
- DCCT Research Group., 1995. The relationship of glycemic exposure to the risk of development and progression of retinopathy in the DCCT. *Diabetes*, 44, 968-83.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Canada.
- Dixon, D.G., Hodson P.V., 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., 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.
- Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 58(77), 3-12.
- Ekinci, D., Beydemir Ş., Alım Z., 2007. Some drugs inhibit *in vitro* hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacological Reports*, 59, 580-587.
- Eklund, H., Horjales E., Jorvall H., Branden C.I., Jeffery J., 1985. Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry*, 24, 8005-8012.
- Estonius, M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jorvall H., Höög J.O., 1993. Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues, *Eur. J. Biochem.*, 215, 497-503.
- Ferrannini, E., Buzzigoli G., Bonadonna R., Giorikco M.A., Oleggini M., Graziadei L., Pedrinelli R., Brandi L., Bevilacqua S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med.*, 317(6), 350-7.
- Forsblom, C.M., Groop P.H., Ekstrand A., Totterman K.J., Sane T., Saloranta C., 1998. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care*, 21, 1932-8.
- Frankel, J.S., 1994. Patterns of lactate and sorbitol dehydrogenase gene expression during the development of interspecific *Rasbora* hybrids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108, 437-442.
- Fresht, A., 1999. *Structure and mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, 166 p, New York.
- Gabbay, K.H., 1975. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med.*, 26, 521-36.
- Gabbay, K.H., Merola L.O., Field R.H., 1966. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*, 151 (707), 209.
- 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., Szabo C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.*, 7, 108-113.
- Geissen, K., Utz R., Grotzsch H., Lang H.J., Nimmesgern H., 1994. Sorbitol accumulating pyrimidine derivatives. *Arzneimittelforschung*, 44, 1032-1043.

- Geissen, K., Utz R., Nimmesgern H., Lang, H.J., 1992. Substituirte Prymidin-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Reagenzien. In European Patent Application No. 0 470 616 A2.
- Gilbert, H.F., 1992. Basic Concepts in Biochemistry. Mc Graw-Hill Inc, 81 p, Germany.
- Gilligan, J.P., Spector S., 1984. Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*, 6 (3), 11144-9.
- Giugliano, D., Paolisso G., Ceriello A., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19(3), 257-267 64.
- Gonzales, R.G., Barnett P., Aguayo J., Cheng H.M., Chylack L.T.J., 1984. Direct measurement of poliol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, 33,196.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler. *Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti*, 572-576 s, Ankara.
- Grandhee, S.K., 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., Sima A.A., 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.*, 5, 316(10), 599-606.
- Greene, D.A., Sima A.A.F., Stevens M.J., Feldman E.L., Lattimer S.A., 1992. Complications:neuropathy, parhogenetic considerations. *Diabetes Care*, 15, 1902-1925.
- Gui T., Tanimoto T, Kokaiy, Nishimura C., 1995. Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.*, 227, 448-453.
- Haller, M.J., Atkinson M.A., Schatz D., 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr Clin North Am.*, 52, 1553-78.
- Hamada, Y., Araki N., Horiuchi S., Hotta N., 1996. Role of poliol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrol. Dial. Transplant*, 11, 5-95.
- Hamada, Y., Nakamura J., Naruse K., Komori T., Kato K., Kasuya Y., Nagai R., Horiuchis, Hotta N., 2000. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care*, 23, 1539-1544.
- Hers, H.G., 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 22(1), 202-3.
- Hodgen, G.D. and Sherins R.J., 1973. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat, *Endocrinology*, 93, 985-989.
- Hollenbeck, C., Reaven G.M., 1987. Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.*, 64, 1169-73.
- Hoshi, A., Takahashi M., Fujii J., Myint T., Kaneto H., Suzuki K., Yamasaki Y., Kamada T., Taniguchi N., 1996. Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats. *Biochem. J.*, 318, 119-123.
- Hsueh, W.A., Law R.E., 1998. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am. J. Med.*, 105, 4-14.
- <http://www.ilacilar.gen.tr/1653/leucovorin-tevaimiv-flakon> (20.04.10)
- <http://www.ilacilar.gen.tr/610/demizolam-imiv-ampul> (20.04.10)
- http://www.kanser.org/toplum/kemo_ilac.php (20.04.10)
- <http://www.saglikkutuphanesi.com/ilacilar/Aminocardol> (20.04.10)

- <http://www.spitall.com/hastalik-belirtileri/sorbitol-dehidrogenaz-sdh-itol-dehidrogenaz-tahlili> (20.04.10)
- <http://www.webarsiv.com/libavit-k-ampul.html> (20.04.10)
- http://www.zentiva.com.tr/urun_dokuman/20080121160907-1.pdf (20.04.10)
- Humphrey, L.L., Ballard D.J., Frohnert P.P., Chu C.P., O'fallon W.M., 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.
- Hwang, Y C., Sato S., Tsai J Y., Yan S., Bakr S., Zhan H., Oates P J., Ramasamy R., 2002. Aldose reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *Faseb J.*, 16, 243-245.
- İşbilen, A.S., 2009. Bazı yeni tiyazolidindion türevlerinin aldoz redüktaz enzim aktivitesine etkileri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Jakuš, V., Rietbrock N., 2004. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.*, 53, 131-142.
- Jedziniak, J.A., Chylack L.T., Jr., Cheng H.M., Gillis M.K., Kalustian A.A., Tung W.H., 1981. The sorbitol pathway in the human lens: Aldose reductase and poliol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20, 314-326.
- Jeffery, J., Chesters J., Mills C., Sadler P.J., Jornvall H., 1984. Sorbitol dehydrogenase is a zinc enzyme. *EMBO J.*, 3, 357-360.
- Jeffery, J., Jornvall H., 1988. Sorbitol dehydrogenase. *Adv. Enzymol.*, 61, 47-106.
- Jiang, Z.Y., Lin Y.W., Clemont A., Feener E.P., Hein D.K., Igarashi M., Yamauchi T., White F.M., King, G.L., 1999. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest.*, 104, 447-457.
- Johansson, K., El-Ahmad M., Kaiser C., Jornvall H., Eklund H., Hoog j.O., 2001. Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, 130, 351-358.
- Jörnvall, H., Von Bahr-Lindström H., Jeffery J., 1984. Extensive variations and basic features in the alcohol dehydrogenase-sorbitol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, 140, 17-23.
- Kador, P.F., Inoue J., Secchi E.F., Lizak M.J., Rodriguez I., Mori K., Greentree W., blessing K., Lackner P.A., Sato S., 1998. Effect of sorbitol dehydrogenase inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. *Exp. Eye Res.*, 67, 203-208.
- Kador, P.F., Kinoshita J.H., Brittain D.R., Mirrlees D.J., Sennitt C.M, Stribling D., 1986. Purified rat lens aldose reductase. Poliol production *in vitro* and its inhibition by aldose reductase inhibitors. *Biochem J.*, 240(1), 233-7.
- Kador, P.F., Kinoshita J.H., Stribling D., Brittain D.R., Mirrless D.J., Sennitt C.M., 1987. Rat lens aldose reductase and poliol production. *Biochem. J.*, 247, 495-496.
- Karacaoğlu, V., 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., Altan V.M., 1990. Thyroid Hormones Mediated Effect Of Insulin On Alloxan Diabetic Rat Atria. *General Pharmacology*, 21(5), 735-740.

- Karlsson, C., Jornvall H., Höög J.O., 1995. Zinc binding of alcohol and sorbitol dehydrogenase. *Enzymology and Molecular biology of Carbonyl Metabolism*, vol. 5. Plenum Press, New York, 397-406.
- Karlsson, C., Maret W., Auld D.S., Höög J.O., Jörnvall H., 1989. Variability within mammalian sorbitol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 186, 543-550.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 91-95, 118 s, İstanbul.
- Kilo, S., Berghoff M., Hilz M., 2000. Endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. *Neurology*, 54, 1246-48.
- Kimmelstiel, P., Wilson C., 1936. Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. *American Journal of Pathology*, 12, 83-97.
- Kinoshita J.H., Nishimura, C., 1988. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metabo. Reu.*, 4, 323-337.
- Kinoshita, J.H., 1965. Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol*, 4, 786-790.
- Kinoshita, J.H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation. *Proctor Lecture. Invest Ophthalmol*, 13, 713-724.
- Kurowska, E.M., 2002. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des.*, 8, 155-66.
- Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftci M, 2008. Kromatografiye giriş ders notları, Erzurum
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227,680.
- Lal S., Szwergold B.S., Taylor A.H, Randall W.C., Kappler F., 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., Chung S.S, 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J.*, 13, 23-30.
- Lewis E.J., Hunsicker L.G., Clarke W.R., Berl T., Pohl M.A., Lewis J.B., Ritz E., Atkins R.C., Rohde R., Raz I., Collaborative Study Group., 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 345, 851-6.
- Lindstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-Mckee J.S., 1994. Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 221, 847-854.
- Lindstad, R.I., Koll P., Mckinley-Mckee J.S., 1998. Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 330, 479-487.
- Lindstad, R.I., McKinley-McKee J.S., 1996. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by thiol compounds. *Eur. J. Biochem.*, 241, 142-148.
- 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.
- Linstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-McKee J.S., 1992. The kinetic mechanism of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 210,641-647.
- Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15, 203-210.

- Luque, T., Hjelmqvist L., Marfany G., Danielsson O., El-Ahmad M., Persson B., Jörnvall H., Gonzales-Duarte R., 1998. Sorbitol Dehydrogenase of *Drosophila*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 273, 34293-34301.
- Maekawa, K., Tanimato T., Okada S., Suzuki T., Yabe-Nishimura C., 2001. Expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase genes in Schwann cells isolated from rat: Effects of high glucose and osmotic stress, *Mol. Brain Res.*, 87, 251-256.
- Maret, W., 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., Mura U., 1997. Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys*, 340, 383-391.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants, *Review.Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 4-38.
- Marshall, J.J., 1970. *Chromatog.*, 53, 379.
- Mithieux, G., Vidal H., Zitoun C., Bruni N., Daniele N., Minassian C., 1996. Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats, *Diabetes*, 45(7), 891-6.
- Morre DM., Lenaz G., Morre D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation imaging, *J. Exp. Biol.*, 203, 1513-1521.
- Mueckler, M., 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem.*, 219(3), 713-25.
- Mylari, B.L., Oates P.J., Beebe D.A., Brackett N.S., Couter J.B., Dina M.S., Zembrowski W.J., 2001. Sorbitol dehydrogenase inhibitors (SDIs): a new potent, enantiomeric SDI, 4-[2-1R-hydroxyl-ethyl]-pyrimidin-4-yl]-piperazine-1-sulfonic acid dimethylamide. *J. Med.Chem.*, 44, 2695-2700.
- Mylari, B.L., Oates P.J., Zembrowski W.J., Beebe D.A., Conn E.L., Couter J.B., O'Gorman M.T., Linhares M.C., Withbroe G.J., 2002. A sorbitol dehydrogenase inhibitor of exceptional *in vivo* potency with a long duration of action: 1-(R)-4-{4-(4,6-dimethyl-[1,3,5]triazin-2-yl)-2R,6S-dimethylpiperazin-1-yl}-pyrimidin-2-yl}-ethanol. *J. Med. Chem.*, 45, 4398-4401.
- Mylari, B.L., Withbroe G.J., Beebe D.A., Brackett N.S., Conn E.L., Couter J.B., Oates P.J., Zembrowski W.J., 2003. Design and synthesis of a novel family of triazine-based inhibitors of sorbitol dehydrogenase with oral activity: 1-{4-[3R,5S-Dimethyl-4-(4-methyl-[1,3,5] triazin-2-yl)-piperazin-1-yl]-[1,3,5] triazin-2-yl}-(R) Ethanol. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 11, 4179-4188.
- Negm, F.B., Loescher W.H., 1979. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiol.*, 64, 69-73.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. *Lehninger Biokimyanın İlkeleri*. (Çeviren: N.KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M., 2000. The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.*, 58(77), 26-30.
- Nishimura, C., 1998. Aldose Reductase in Glucose Toxicity, A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacol. Rev.*, 50, 21.
- Oates, P., 2002. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *J. Int Rev. Neurobiol*, 50, 325

- O'Brien, M.M., Schofield P.J., 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., Fathallah L., Lang H.J., 1999. Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1945-1954.
- Ondenti, M.A., Cushman D.W., 1982. Enzymes of the reninangiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev. Biochem.*, 51, 283-308.
- Op't Hof, J., Wolf U., Krone W., 1969. Studies on isozymes of sorbitol dehydrogenase in some vertebrate species. *Humangenetic*, 8, 178-182.
- Ostenson, C.G., 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171, 241-247.
- Oura, Y., Yamada K., Shiratake K., Yamaki S., 2000. Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 54, 567-572.
- Özensoy, Ö., 2006. Kanser ilişkili karbonik anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı ilgisinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Patricia, I., Kirsti H., Vesa O., Kirsi A.V., Jukka K., Olof S., Ele F., Juhani K., 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 and 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., Rath V.L., 2003. X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11, 1071-1085.
- Petrash, J.M., Harter T.M., Devine C.S., Olins P.O., Bhatnagar A., Liu S.Q., 1992. Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase-site-directed mutagenesis of cys-80, cys-298 and cys-303. *J. Biol. Chem.*, 267, 24833-24840.
- Ramasamy, R., Liu P.J., Oates S.S., 1999. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. *Cardiovasc. Res.*, 42, 130-139.
- Regenold, W.T., Kling M.A., Hauser P., 2000. Elevated sorbitol concentration in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 593-606.
- Rehg, J.E., 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.
- Regenold, W.T., Phatak P., Kling M.A., Hauser P., 2004. Post-mortem evidence from human brain tissue of distributed glucose metabolism in mood and psychotic disorders. *Mol. Psych.*, 9, 731-733.

- Report of the expert committee on the diagnosis and classification of the diabetes mellitus., 2001. Diabetes Care, 24 supplement 1 American Diabetes Association Recommendations.
- Segel, I.H., 1975. Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience, New York, 564-567.
- Sicree, R., Shaw J., Zimmet P., Tapp R., 2003. The global burden of diabetes. In D. Gan(Ed.), Diabetes atlas. (2nd edR). Brussels, Belgium' International Diabetes Federation.
- Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. Biochem. J., 83, 135-144.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı Alabalık dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Srivastava, S.K., Ramana K.V., Bhatnagar A., 2005. Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. Endocrine Reviews, 26(3), 380-392.
- Stevens, M.J., Obrosova I., Cao X., Van Husyen C., 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.
- Stryer, L., 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company Third edition, 233-260 p, New York.
- Szaflik, J.P., Majsterek I., Kowaski M., Rusin P., Sobczuk A., Borucka A.I., Szaflik J., Blasiak J., 2008. Association between sorbitol dehydrogenase gene polymorphisms and type 2 diabetic retinopathy. Experimental Eye Research, 86, 647-652.
- Szwergold, B.S., Kappler F., Brown T.R., 1990. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. Science, 247, 451.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59, İzmir.
- Temelkova-Kurktschiev, T.S., Koehler C., Henkel E., Leonhardt W., Fuecker K., 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.
- Tesfamariam, B., 1994. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. Free Radic Biol Med., 16, 383-391.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. New Engl. J. Med., 329, 977-986.
- Tilton, R.G., Chang K., Nyengaard J.R., van den Enden M., Ido Y., Williamson J.R., 1995. Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin induced diabetic rats. Diabetes, 44, 234-242.
- Tomlinson, D.R., Stevens E.J., Diemel L.T., 1994. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. Trends Pharmacol Sci., 15(8), 293-7.
- Tornlinson, D.R., 1989. Polyols and myoinositol in diabetic neuropathy of mice and men. Mayo Clin Proc., 64, 1030.

- Turgut, K. Ok M., 1997. Veteriner Gastroenteroloji-Semptomdan Teşhisi. Bahçıvanlar Basım San. A.Ş., Konya.
- UKPDS Research Group. 1998. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS). *Lancet*, 352, 837-853.
- Van Heyningen., 1959. Metabolism of xylose by the lens, 2. Rat lens *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.*, 73, 197-207.
- Vander Jagt, D.L., Stangebye L.A., Hunsaker L.A., Eaton R.P., Sibbitt W.J., 1988. Purification of aldose reductase from human placenta and stabilization of the inhibitor binding site. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1051-1056.
- Varma, S.D., Mizuno A., Kinoshita J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, 195(4274), 205-6.
- Viinamaki, H., Niskanen L., Uusitupa M., 1995. Mental well-being in people with noninsulin-dependent diabetes. *Acta. Psychiatr. Scand.*, 92, 392-397.
- Whitaker, J.R., 1963. *Anal. Chem.*, 35, 1950.
- Wiesinger, H., Hamprecht B., 1987. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. *J. Neurochem.*, 48, 147.
- Williamson, J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., Van Den E.M., Kilo C., Tilton R.G., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, 801.
- Wyngaarden J.B., Smith J.R., 1988. *Cecil Textbook of Medicine*, 1-2, Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1360-1381.
- Xia, P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerolprotein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), 1122-29.
- Yabe-Nishimura, C., 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential target for the prevention of diabetic complications, *Pharmacol. Rev.*, 50, 21-33.
- Yagihashi, S., Kamijo M., Ido Y., 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., Takeuchi M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses*, 63, 135-137.
- Yamaguchi, H., Kanayama Y., Yamaki S., 1994. Purification and properties of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.*, 35, 887-892.
- Yeh, L.A., Ashton M.A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. *Metabolism*, 39, 619-622.
- Yenigün, M., Altuntaş Y., 2001. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati, Sayfa 315-375.
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim kinetikleri. *Temel Biyokimya 1.Cilt.*, Kemal Matbaası, 148-167 s, Adana
- Zimmet, P., Alberti K.G.M.M., Shaw J., 2001. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *J. Nature*, 414, 782.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2002 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2006 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı ve 2010 yılında yüksek lisansını tamamladı.