

**SIÇAN KALP VE AKCİĞER DOKULARINDAN GLUKOZ-6-FOSFAT  
DEHİDROGENAZ, 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ, GLUTATYON  
REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU,  
KOTİNİN VE BAZI İLAÇLARIN ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Şevki ADEM**

**Doktora Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**

**2011**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SIÇAN KALP VE AKCİĞER DOKULARINDAN GLUKOZ-6-  
FOSFAT DEHİDROGENAZ, 6-FOSFOGLUKONAT  
DEHİDROGENAZ, GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, KOTİNİN VE BAZI  
İLAÇLARIN ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şevki ADEM

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**Sıçan Kalp ve Akciğer Dokularından Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Glutasyon Redüktaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Kotinin Ve Bazı İlaçların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Şevki ADEM tarafından hazırlanan bu çalışma ..10../01../2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (5./0) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza

Üye : Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

Üye : Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza

Üye : Doç. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Enstitü Müdürü**

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

## ÖZET

Doktora Tezi

SIÇAN KALP VE AKCİĞER DOKULARINDAN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ, 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ, GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, KOTİNİN VE BAZI İLAÇLARIN ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Şevki ADEM

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Bu çalışmada, sıçan kalp ve akciğer dokularından glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri tek kromatoğrafik adımda, ortalama %92 verimle saflaştırıldı. Saflaştırma prosedürü homojenat hazırlama ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden oluşmaktadır. Enzimlerin saflık dereceleri ve alt birimlerinin molekül kütleleri SDS-PAGE ile, doğal hallerinin molekül kütleleri de Jel Filtrasyon kromatografisi ile belirlendi. Kinetik çalışmalar çerçevesinde, enzimler için optimum pH, iyonik şiddet, stabil pH, optimum sıcaklık ve substratlar için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri, ürünler için de  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. Bunlara ilaveten, kotinin ve bazı ilaçların sözkonusu enzim aktiviteleri üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı.  $IC_{50}$  değerleri ve  $K_i$  sabitleri en küçük olan levofloksasin ve furosemid için *in vivo* çalışma yapıldı.

**2010, 162 sayfa**

**Anahtar Kelime:** G6PD, 6PGD, GR, ilaç, kotinin, inhibisyon

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE  
DEHYDROGENASE, 6-PHOSPHO GLUCONATE DEHYDROGENASE AND  
GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYMES FROM RAT LUNG AND HEART  
TISSUES AND INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECTS OF  
SOME DRUGS ON THE ENZYMES ACTIVITIES

Şevki ADEM

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

In this study, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and glutathione reductase (GR) enzymes from heart and lung tissues of rat were purified in a single chromatographic step on the average yield of 92%. Purification procedure consists of preparing homogenates and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. Purity degree of enzymes and molecular weights of subunits were determined by SDS-PAGE, and molecular weights of natural states were determined by gel filtration chromatography. Within the framework of kinetic studies optimum pH, ionic strength, optimum temperature and stable pH, for enzymes; the  $K_M$  and  $V_{max}$  values for substrates; the types of inhibition and  $K_i$  constant for the products were determined. In addition, *in vitro* effects of cotinin and some drugs on activities of enzyme in question were investigated. *In vivo* study was performed for levofloxacin and furosemide whose  $IC_{50}$  and  $K_i$  are the smallest.

**2010, 162 pages**

**Keyword:** G6PD, 6PGD, GR, drug, cotinin, inhibition

## TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarım boyunca değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Doç. Dr. Ahmet MAVİ, Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN ve bölüm elemanlarına teşekkürü borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Ebru AKKEMİK, Sayın Zuhal ALIM, Sayın Ayşegül TARANCI ve Sayın Pınar TAŞER'e teşekkür ederim.

*İn vitro* çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Veterinerlik Fakültesi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut Bünyamin HALICI'ya, Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN'a, Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Elif ÇADIRCI ve Arş. Gör. Beyzagül POLAT'a teşekkürlerimi sunarım. *İn vivo* çalışmalarda yardımlarından dolayı ATEDEM müdürü Sayın Doç. Dr. Derviş ÖZDEMİR ve müdür yardımcısı Sayın Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ beylere teşekkür ederim. İstatistikî değerleri yorumlamada yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Memiş ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen eşime ve oğlum Yusuf ADEM'e teşekkür ederim.

Şevki ADEM

Ocak 2011

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                           | i         |
| ABSTRACT.....                                                                       | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                       | iii       |
| SİMGELER DİZİNİ.....                                                                | vii       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                | viii      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                             | xvii      |
| 1. GİRİŞ .....                                                                      | 1         |
| 1.1. Enzimler .....                                                                 | 1         |
| 1.2. Pentoz Posfat Yolu .....                                                       | 3         |
| 1.2.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri.....                                          | 4         |
| 1.2.2. Pentoz fosfat yolunun metabolik önemi.....                                   | 4         |
| 1.2.3. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz .....           | 5         |
| 1.2.4. Glutasyon redüktaz .....                                                     | 7         |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                                                     | <b>11</b> |
| 2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz .....                                             | 11        |
| 2.2. 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz .....                                             | 14        |
| 2.3. Glutasyon Redüktaz .....                                                       | 18        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>                                                   | <b>35</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                  | 35        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....                                            | 35        |
| 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....                                           | 35        |
| 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....                                  | 35        |
| 3.2. Yöntem .....                                                                   | 41        |
| 3.2.1. Sıçan dokularından enzimlerin saflaştırılması çalışmaları.....               | 41        |
| 3.2.1.a. Homojenat hazırlanması .....                                               | 41        |
| 3.2.1.b. 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi.....                        | 42        |
| 3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi ..... | 42        |

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması ve enzimlerin molekül                                   |           |
| kütlelerinin belirlenmesi .....                                                                      | 44        |
| 3.2.4. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi.....                                                          | 45        |
| 3.2.5. Kantitatif protein tayini .....                                                               | 47        |
| 3.2.6. Sıçan dokularından saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon ve kinetik                        |           |
| çalışmaları .....                                                                                    | 48        |
| 3.2.6.a. Enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi.....                                             | 48        |
| 3.2.6.b. Enzimlerin optimum iyonik şiddetlerinin belirlenmesi.....                                   | 48        |
| 3.2.6.c. MgCl <sub>2</sub> ve EDTA'nın enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkilerinin                |           |
| belirlenmesi .....                                                                                   | 48        |
| 3.2.6.d. Enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi .....                                       | 49        |
| 3.2.6.e. Stabil pH'nın belirlenmesi.....                                                             | 49        |
| 3.2.6.f. Enzimlerin K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesi.....                | 49        |
| 3.2.6.g. Ürünlerin enzimler üzerinde inhibisyon etkisinin belirlenmesi .....                         | 49        |
| 3.2.7. Sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR                               |           |
| enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı ilaçların <i>in vitro</i> etkilerinin belirlenmesi..            | 50        |
| 3.2.8. Sıçan dokularında G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktivitesi üzerine                              |           |
| bazı ilaçların <i>in vivo</i> etkilerinin belirlenmesi .....                                         | 51        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                  | <b>53</b> |
| 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....                                  | 53        |
| 4.2. 2', 5' ADP Sepharose 4B Afinite Kromatografisi Saflaştırma Sonuçları .....                      | 53        |
| 4.2.1. Sıçan akciğerinden G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5' ADP Sepharose 4B                      |           |
| afinite karomatografisi sonuçları .....                                                              | 54        |
| 4.2.2. Sıçan kalbinden G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5' ADP Sepharose                            |           |
| 4B afinite karomatografisi sonuçları .....                                                           | 56        |
| 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....                                              | 57        |
| 4.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları.....                                                    | 60        |
| 4.5. Enzimlerin Optimum Şartlarının, K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerinin Belirlenmesi ve |           |
| Ürün İnhibisyon Çalışmalarının sonuçları.....                                                        | 63        |
| 4.5.1. Sıçan akciğerinden saflaştırılan enzimler.....                                                | 63        |
| 4.5.1.a. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enzimi için elde edilen kinetik                       |           |
| çalışmaların sonuçları .....                                                                         | 63        |



|                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5.1.b. Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları .....                                    | 69         |
| 4.5.1.c. Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları .....                                      | 74         |
| 4.5.2. Sıçan kalbinden saflaştırılan enzimler .....                                                                                            | 80         |
| 4.5.2.a. Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları .....                                       | 80         |
| 4.5.2.b. Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları .....                                       | 85         |
| 4.5.2.c. Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları .....                                         | 90         |
| 4.6. İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları .....                                                                     | 96         |
| 4.6.1. Sıçan akciğerden dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine bazı ilaçların <i>in vitro</i> etkilerinin sonuçları ..... | 97         |
| 4.6.1. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine bazı ilaçların <i>in vitro</i> etkilerinin sonuçları .....       | 121        |
| 4.7. İlaçların <i>in vivo</i> etkilerinin sonuçları .....                                                                                      | 137        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                                                                                                              | <b>139</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                         | <b>152</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                                |            |

## SİMGELER DİZİNİ

|                   |                                                                      |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 6PGA              | 6-Fosfoglukonat                                                      |
| 6PGD              | 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz                                         |
| BSA               | Bovin serum albümin                                                  |
| DTT               | Dityotretiol                                                         |
| EDTA              | Etilendiamin tetra asetik asit                                       |
| ES                | Enzim substrat kompleksi                                             |
| G6PD              | Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz                                         |
| GR                | Glutasyon Redüktaz                                                   |
| GSH               | İndirgenmiş glutasyon                                                |
| GSSG              | Okside glutasyon                                                     |
| IC <sub>50</sub>  | Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu                |
| i.m               | Adele içine                                                          |
| i.v.              | Damar içine                                                          |
| K <sub>i</sub>    | İnhibisyon katsayısı                                                 |
| K <sub>m</sub>    | Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonu |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)                  |
| NADPH             | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)                 |
| nm                | Nanometre                                                            |
| NRP               | Nikotini Yerine Koyma                                                |
| PAGE              | Poliakrilamid jel elektroforezi                                      |
| PEEP              | Positive End Expiratory Pressure (Yapay solununla ilgili)            |
| PER               | Amonyum per sülfat                                                   |
| Phi               | Fosfanat                                                             |
| PPi               | İnorganik pirofosfat                                                 |
| SDS               | Sodyum dodesil sülfat                                                |
| TEMED             | N,N,N',N'-tetrametilendiamin                                         |
| Tris              | Trihidroksimetil amino metan                                         |
| V <sub>max</sub>  | Maksimum hız                                                         |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Pentoz fosfat yolu rekasiyonları ve diğer sentez yolları ile ilişkisi .....                                                                                           | 4  |
| Şekil 1.2. G6PD VE 6PGD enzimlerinin katalizlediği reaksiyon .....                                                                                                               | 6  |
| Şekil 1.3. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin).....                                                                                             | 7  |
| Şekil 1.4. Okside glutatyonun yapısı, GSSG, 2(L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin) .....                                                                                             | 8  |
| Şekil 1.5. GSH'nın biyokimyasal yolu .....                                                                                                                                       | 9  |
| Şekil 2.1. İnsanda kotinin oluşumu.....                                                                                                                                          | 29 |
| Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik.....                                                                                                          | 53 |
| Şekil 4.2. Sıçan akciğer G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5'-ADP Sepharose<br>4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği.....                                        | 54 |
| Şekil 4.3. Sıçan kalp G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5'-ADP Sepharose 4B<br>afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği. ....                                          | 56 |
| Şekil 4.4. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD VE GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE fotoğrafı .....                                                                            | 58 |
| Şekil 4.5. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE sonucu molekül kütlelerini bulmak için çizilen logMA-R <sub>f</sub><br>değeri grafiği..... | 59 |
| Şekil 4.6. Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE sonucu molekül kütlelerini bulmak için çizilen logMA -R <sub>f</sub><br>değeri grafiği.....   | 59 |
| Şekil 4.7. Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD VE GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE fotoğrafı. ....                                                                               | 60 |
| Şekil 4.8. Jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile enzimlerin molekül kütlelerini<br>tespit etmek amacıyla kullanılan standartların kolondan elüsyon grafiği. ....             | 61 |
| Şekil 4.9. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini yapmak<br>için oluşturulan logMA-K <sub>av</sub> grafiği. ....                                               | 61 |
| Şekil 4.10. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum pH'sının<br>belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                       | 63 |
| Şekil 4.11. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD için iyonik şiddetin<br>belirlenmesi amacıyla çizilen grafik.....                                                              | 64 |

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.12.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik.....      | 64 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik ..... | 65 |
| <b>Şekil 4.14.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                  | 65 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                       | 66 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik. ....                              | 67 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini bulmak için 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak çizilen grafik .....                         | 67 |
| <b>Şekil 4.18.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminde NADPH için $K_i$ sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....                         | 68 |
| <b>Şekil 4.19.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                  | 69 |
| <b>Şekil 4.20.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD için iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik .....                                                        | 69 |
| <b>Şekil 4.21.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik .....     | 70 |
| <b>Şekil 4.22.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik ..... | 70 |
| <b>Şekil 4.23.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                  | 71 |
| <b>Şekil 4.24.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                       | 71 |
| <b>Şekil 4.25.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini bulmak için 5 farklı 6PGA derişimi kullanılarak çizilen grafik .....                             | 72 |

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.26.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini bulmak için 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak çizilen grafik.....                       | 73 |
| <b>Şekil 4.27.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminde $NADPH$ için $K_i$ sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı .....                    | 73 |
| <b>Şekil 4.28.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                 | 74 |
| <b>Şekil 4.29.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR için iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik.....                                                        | 74 |
| <b>Şekil 4.30.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik .....    | 75 |
| <b>Şekil 4.31.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik..... | 75 |
| <b>Şekil 4.32.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                 | 76 |
| <b>Şekil 4.33.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik .....                                                      | 76 |
| <b>Şekil 4.34.</b> 5 farklı $NADPH$ derişimi kullanılarak sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik.....                                                | 77 |
| <b>Şekil 4.35.</b> 5 farklı $GSSG$ derişimi kullanılarak sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik. ....                                                | 78 |
| <b>Şekil 4.36.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminde $NADP^+$ için $K_i$ sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı .....                     | 78 |
| <b>Şekil 4.37.</b> Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminde $GSH$ için $K_i$ sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı .....                        | 79 |
| <b>Şekil 4.38.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan $G6PD$ enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                | 80 |
| <b>Şekil 4.39.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan $G6PD$ enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....         | 80 |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.40.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....      | 81 |
| <b>Şekil 4.41.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....  | 81 |
| <b>Şekil 4.42.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                | 82 |
| <b>Şekil 4.43.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                     | 82 |
| <b>Şekil 4.44.</b> 5 farklı G6PA derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için çizilen grafik. ....                                                     | 83 |
| <b>Şekil 4.45.</b> 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için çizilen grafik. ....                                                 | 84 |
| <b>Şekil 4.46.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminde NADPH için $K_i$ sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....                           | 84 |
| <b>Şekil 4.47.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                    | 85 |
| <b>Şekil 4.48.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....             | 85 |
| <b>Şekil 4.49.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik .....     | 86 |
| <b>Şekil 4.50.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik ..... | 86 |
| <b>Şekil 4.51.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                | 87 |
| <b>Şekil 4.52.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                     | 87 |
| <b>Şekil 4.53.</b> 5 farklı 6PGA derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için çizilen grafik. ....                                                     | 88 |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.54.</b> 5 farklı NADP <sup>+</sup> derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için çizilen grafik. ....                                              | 89 |
| <b>Şekil 4.55.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminde NADPH için K <sub>i</sub> sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı ....                         | 89 |
| <b>Şekil 4.56.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                            | 90 |
| <b>Şekil 4.57.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                     | 91 |
| <b>Şekil 4.58.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....              | 91 |
| <b>Şekil 4.59.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik..... | 92 |
| <b>Şekil 4.60.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....                        | 92 |
| <b>Şekil 4.61.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik .....                            | 93 |
| <b>Şekil 4.62.</b> 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik .....                                                            | 94 |
| <b>Şekil 4.63.</b> 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik. ....                                                             | 94 |
| <b>Şekil 4.64.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminde NADP <sup>+</sup> için K <sub>i</sub> sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı .....              | 95 |
| <b>Şekil 4.65.</b> Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminde GSH için K <sub>i</sub> sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı .....                            | 95 |
| <b>Şekil 4.66.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiğı .....                                                                             | 97 |
| <b>Şekil 4.67.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiğı .....                                                                             | 97 |
| <b>Şekil 4.68.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiğı .....                                                                               | 98 |

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.69.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 98  |
| <b>Şekil 4.70.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 99  |
| <b>Şekil 4.71.</b> Sıçan akciğer GR enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 99  |
| <b>Şekil 4.72.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 100 |
| <b>Şekil 4.73.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 100 |
| <b>Şekil 4.74.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I101 ] grafiği .....                                      | 101 |
| <b>Şekil 4.75.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....     | 101 |
| <b>Şekil 4.76.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....     | 102 |
| <b>Şekil 4.77.</b> Sıçan akciğer GR enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....       | 102 |
| <b>Şekil 4.78.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine seftazidim ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                       | 103 |
| <b>Şekil 4.79.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine seftazidim ilacının% aktivite-[I] grafiği .....                                        | 103 |
| <b>Şekil 4.80.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine seftazidim ilacının% aktivite-[I] grafiği .....                                          | 104 |
| <b>Şekil 4.81.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....    | 104 |
| <b>Şekil 4.82.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....    | 105 |
| <b>Şekil 4.83.</b> Sıçan akciğer GR enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....     | 105 |
| <b>Şekil 4.84.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine sefuroksim ilacının% aktivite-[I] grafiği .....                                        | 106 |



|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.85.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                    | 106 |
| <b>Şekil 4.86.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                      | 107 |
| <b>Şekil 4.87.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 107 |
| <b>Şekil 4.88.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 108 |
| <b>Şekil 4.89.</b> Sıçan akciğer GR enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 108 |
| <b>Şekil 4.90.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                    | 109 |
| <b>Şekil 4.91.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                    | 109 |
| <b>Şekil 4.92.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                      | 110 |
| <b>Şekil 4.93.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde gentamisin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 110 |
| <b>Şekil 4.94.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde gentamisin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 111 |
| <b>Şekil 4.95.</b> Sıçan akciğer GR enziminde gentamisin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 111 |
| <b>Şekil 4.96.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                     | 112 |
| <b>Şekil 4.97.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                     | 112 |
| <b>Şekil 4.98.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                                | 113 |
| <b>Şekil 4.99.</b> Sıçan akciğer G6PD enziminde sefazolin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....  | 113 |
| <b>Şekil 4.100.</b> Sıçan akciğer 6PGD enziminde sefazolin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 114 |

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.101.</b> Sıçan akciğer GR enziminde sefazolin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 114 |
| <b>Şekil 4.102.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği.....                              | 115 |
| <b>Şekil 4.103.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği.....                              | 115 |
| <b>Şekil 4.104.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                               | 116 |
| <b>Şekil 4.105.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                | 116 |
| <b>Şekil 4.106.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                | 117 |
| <b>Şekil 4.107.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                  | 117 |
| <b>Şekil 4.108.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                   | 118 |
| <b>Şekil 4.109.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                   | 118 |
| <b>Şekil 4.110.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği .....                                     | 119 |
| <b>Şekil 4.111.</b> Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği .....                                           | 119 |
| <b>Şekil 4.112.</b> Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği .....                                           | 120 |
| <b>Şekil 4.113.</b> Sıçan akciğer GR enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği.....                                              | 120 |
| <b>Şekil 4.114.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                            | 121 |
| <b>Şekil 4.115.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                            | 121 |
| <b>Şekil 4.116.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği ....                                         | 122 |
| <b>Şekil 4.117.</b> Sıçan kalp G6PD enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 122 |
| <b>Şekil 4.118.</b> Sıçan kalp 6PGD enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 123 |
| <b>Şekil 4.119.</b> Sıçan kalp GR enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....     | 123 |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.120.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                    | 124 |
| <b>Şekil 4.121.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                                    | 124 |
| <b>Şekil 4.122.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği..                                             | 125 |
| <b>Şekil 4.123.</b> Sıçan kalp G6PD enziminde furosemid için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 125 |
| <b>Şekil 4.124.</b> Sıçan kalp 6PGD enziminde furosemid için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 126 |
| <b>Şekil 4.125.</b> Sıçan kalp GR enziminde furosemid için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 126 |
| <b>Şekil 4.126.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                               | 127 |
| <b>Şekil 4.127.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                               | 127 |
| <b>Şekil 4.128.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği ....                                            | 128 |
| <b>Şekil 4.129.</b> Sıçan kalp G6PD enziminde dopamin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 128 |
| <b>Şekil 4.130.</b> Sıçan kalp 6PGD enziminde dopamin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 129 |
| <b>Şekil 4.131.</b> Sıçan kalp GR enziminde dopamin için 5 farklı substrat<br>konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....     | 129 |
| <b>Şekil 4.132.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                             | 130 |
| <b>Şekil 4.133.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği                                             | 130 |
| <b>Şekil 4.134.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği ...                                           | 131 |
| <b>Şekil 4.135.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının<br>% aktivite-[I] grafiği.....                           | 131 |
| <b>Şekil 4.136.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının<br>% aktivite-[I] grafiği.....                           | 132 |
| <b>Şekil 4.137.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....                            | 132 |
| <b>Şekil 4.138.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine verapamil HCl ilacının<br>% aktivite-[I] grafiği.....                                 | 133 |

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.139.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine verapamil HCl ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği ..... | 133 |
| <b>Şekil 4.140.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine verapamil HCl ilacının % aktivite-[I]<br>grafiği .....   | 134 |
| <b>Şekil 4.141.</b> Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği               | 134 |
| <b>Şekil 4.142.</b> Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği               | 135 |
| <b>Şekil 4.143.</b> Sıçan kalp GR enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği.....            | 135 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Farklı türlere ait G6PD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı ....                                           | 11 |
| Çizelge 2.1. G6PD enziminin bazı kinetik özellikler .....                                                                           | 13 |
| Çizelge 2.3. Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı ....                                           | 15 |
| Çizelge 2.4. Farklı türlere ait 6PGD enziminin bazı kinetik özellikleri .....                                                       | 16 |
| Çizelge 2.5. Farklı türlere ait GR enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı .....                                            | 18 |
| Çizelge 2.6. Farklı türlere ait GR enziminin bazı kinetik özellikleri.....                                                          | 19 |
| Çizelge 2.7. Nikotin idrarda bulunan temel metabolitleri ve bulunma yüzdeleri .....                                                 | 31 |
| Çizelge 3.1. G6PD enziminin aktivite ölçüm kuvveti içeriği .....                                                                    | 45 |
| Çizelge 3.2. 6PGD enziminin aktivite ölçüm kuvveti içeriği .....                                                                    | 46 |
| Çizelge 3.3. GR enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....                                                                        | 46 |
| Çizelge 4.1. Sıçan akciğeri G6PD enziminin saflaştırılması basamakları.....                                                         | 55 |
| Çizelge 4.2. Sıçan akciğeri 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları.....                                                         | 55 |
| Çizelge 4.3. Sıçan akciğeri GR enziminin saflaştırılması basamakları .....                                                          | 55 |
| Çizelge 4.4. Sıçan kalbi G6PD enziminin saflaştırılması basamakları.....                                                            | 57 |
| Çizelge 4.5. Sıçan kalbi 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları.....                                                            | 57 |
| Çizelge 4.6. Sıçan kalbi GR enziminin saflaştırılması basamakları .....                                                             | 57 |
| Çizelge 4.7. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE sonucu elde edilen molekül kütleleri .....  | 58 |
| Çizelge 4.8. Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin<br>SDS-PAGE sonucu elde edilen molekül kütleleri .....     | 60 |
| Çizelge 4.9. Sıçan kalp ve akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR<br>enzimlerinin jel filtrasyon sonucu molekül kütleleri..... | 62 |
| Çizelge 4.10. Sıçan akciğeri G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine<br>yönelik çalışmaların sonuçları.....               | 66 |
| Çizelge 4.11. Sıçan akciğeri G6PD enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$<br>değerleri.....                          | 66 |
| Çizelge 4.12. Sıçan akciğeri 6PGD enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon<br>türü .....                                 | 68 |

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.13.</b> Sıçan akciğeri 6PGD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları..... | 72  |
| <b>Çizelge 4.14.</b> Sıçan akciğeri 6PGD enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$ değerleri.....            | 72  |
| <b>Çizelge 4.15.</b> Sıçan akciğeri 6PGD enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon türü.....                    | 73  |
| <b>Çizelge 4.16.</b> Sıçan akciğeri GR enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....   | 77  |
| <b>Çizelge 4.17.</b> Sıçan akciğeri GR enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$ değerleri.....              | 77  |
| <b>Çizelge 4.18.</b> Sıçan akciğeri GR enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon türü .....                     | 79  |
| <b>Çizelge 4.20.</b> Sıçan kalbi G6PD enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri.....               | 83  |
| <b>Çizelge 4.19.</b> Sıçan kalbi G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....    | 83  |
| <b>Çizelge 4.21.</b> Sıçan kalbi G6PD enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon türü .....                      | 84  |
| <b>Çizelge 4.22.</b> Sıçan kalbi 6PGD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....    | 88  |
| <b>Çizelge 4.23.</b> Sıçan kalbi 6PGD enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri.....               | 88  |
| <b>Çizelge 4.24.</b> Sıçan kalbi 6PGD enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon türü .....                      | 90  |
| <b>Çizelge 4.25.</b> Sıçan kalbi GR enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....      | 93  |
| <b>Çizelge 4.26.</b> Sıçan kalbi GR enziminin substratları için bulunan $K_M$ ve $V_{max}$ değerleri.....                 | 93  |
| <b>Çizelge 4.27.</b> Sıçan kalbi GR enziminin ürünleri için bulunan $K_i$ ve inhibisyon türü .....                        | 95  |
| <b>Çizelge 4.28.</b> İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları G6PD enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları.....           | 136 |

|                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.29.</b> İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları 6PGD enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları.....                                                                      | 136 |
| <b>Çizelge 4.30.</b> İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları GR enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları. ....                                                                       | 136 |
| <b>Çizelge 4.31.</b> Sıçan kalp ve akciğer dokularında furosemid ve levofloksasinin <i>in vivo</i> aktivite ölçümlerinin ortalaması, standart sapması ve p değerleri sonuçları ..... | 138 |

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Her bir canlının, hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere seçici ve etkili bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Enzimler hücre içindeki binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisini değişikliğe uğratmadan gerçekleştirir. Enzimin etki ettiği madde substrat olarak adlandırılır. Reaksiyon sonucu oluşan maddeye ürün denir. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir substrat molekülünü ürüne dönüştürmek suretiyle çalışmaya devam eder (Bhat 2000). Enzimler hücre içinde üretilmelerine karşın hücre dışında da aktivite gösterebilmektedir.

Biyolojik reaksiyonların katalizörü olan enzimlerin bazıları bu fonksiyonlarını protein yapıları ile gerçekleştirirken, bazıları ise yapılarında bulunmayan ve kofaktör denen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör metal iyonu ( $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  vb.) olabileceği gibi koenzim denen kompleks organik moleküller de ( $NAD^+$ , FAD, Koenzim A) olabilir. Bazı enzimler her ikisine de ihtiyaç duyar. Koenzimlerin çoğu vitaminlerden ve özellikle B grubu vitaminlerinden türetilmiştir. Koenzimler proteinin denatüre olması ile bozulmazlar ve defalarca kullanılabilirler. Kofaktörlü enzimlere holoenzim, enzimin protein kısmına ise apoenzim denir (Onat 1996).

Enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilir. Bu denklemdeki  $K_M$  sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken,  $V_{max}$  enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim



Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1  $\mu$ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Biyokimya tarihindeki bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu enzimler oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanıda ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun ve hastalığın tanısı konulmakta, hastalığın geleceği ile ilgili ipuçları elde edilmektedir (Onat 1996). Günümüzde yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

İnhibisyon, inhibitör denen maddeler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesidir. Bu maddeler, çoğunlukla küçük molekül yapısına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemlidir. Birçok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

İnhibisyon, dönüşümsüz ya da dönüşümlü olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana gelir.

Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşmeleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda,

inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışır. İnhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda  $K_M$  değeri artar  $V_{max}$  değişmez. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda  $V_{max}$  düşerken  $K_M$  değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda  $V_{max}$  ve  $K_M$  azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen ve allosterik enzimler olarak adlandırılan enzimlerde de allosterik inhibisyon adı verilen inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyonda, inhibitörler enzimin aktif bölgesinden başka bir kısma bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

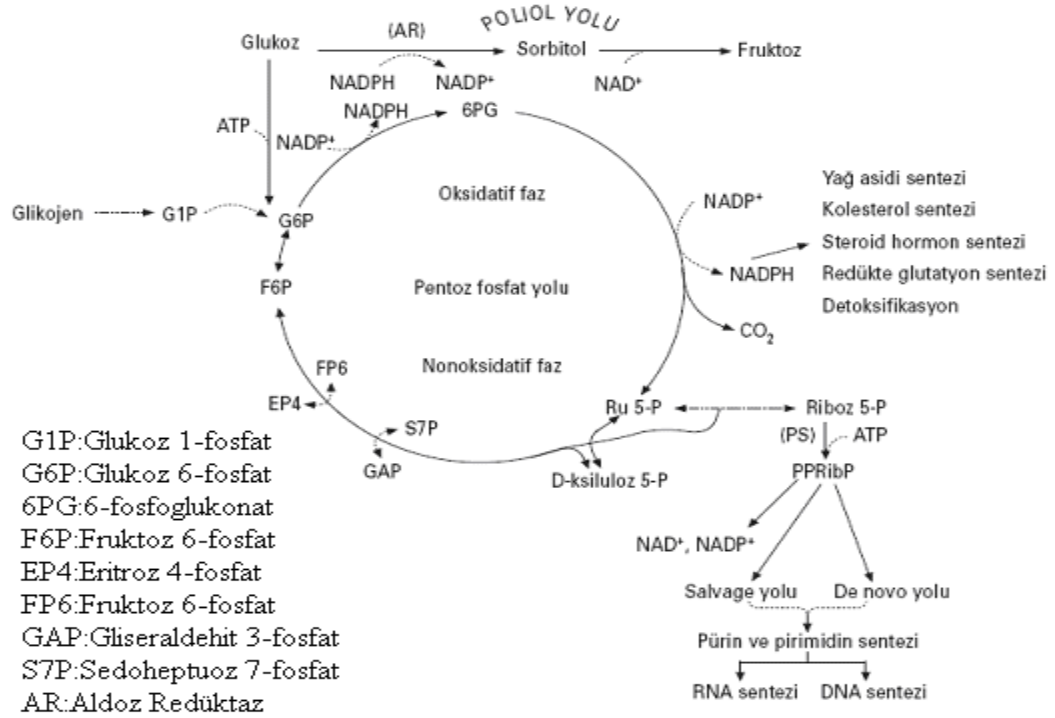
Enzimler, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktir. Bu biyolojik katalizörler tek bir kimyasal reaksiyonu ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalizler (Nelson and Cox 2004).

## 1.2. Pentoz Posfat Yolu

Pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu ya da fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da bilinmektedir. İlk kez 1931 yılında Otto Warburg tarafından ortaya atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dinckens, Bernard Horecker ve Efrahim Rocher isimli biyokimyacılar tarafından aydınlatılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

### 1.2.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri

Pentoz fosfat yolu oksidatif ve oksidatif olmayan olmak üzere iki aşamadan oluşur. Sitozolda oluşan bu metabolik yolun amacı indirgeyici biyosentez olayları için NADPH ve birçok bileşiğin yapısında bulunan riboz-5-fosfat üretmektir. Bu yolda; üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerler oksidatif olmayan reaksiyonlar serisi ile birbirlerine dönüştürülür (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



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

### 1.2.2. Pentoz fosfat yolunun metabolik önemi

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

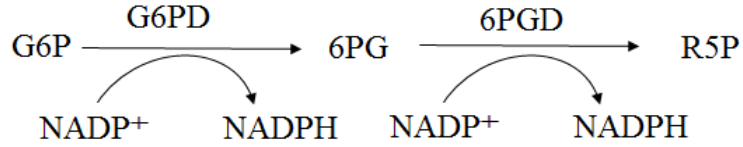
Pentoz fosfat yolunun; hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve indirgeyici biyosentez olayları için indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki işlevi vardır (Krebs and Eggleston 1978). Ayrıca, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat,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

NADPH hücrede yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksitlerin indirgenmesinde rol alır (Wood 1986; Nelson and Cox 2004). Eritrositlerde pentoz fosfat yolu okside glutatyonun indirgenmesinde kullanılan NADPH'yı sağlar. Redükte glutatyon (GSH) ve GSH-bağımlı enzimler hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden korur (Siems *et al.* 2000). Fagositlerde oksijen tüketimi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu fazla olduğundan pentoz fosfat yolunun aktivitesi de fazladır (Borregaard *et al.* 1984). Ksenobiyotikler, glutatyon peroksidaz ve sitokrom p450 detoksifikasyon sistemleri ile NADPH kullanılarak zararsız hale getirilir (Hollenberg 1992). NADPH'nın damar düz kas hücrelerinde iyon kanallarının aktivitesini kontrol ettiği öne sürülmüştür. NADPH'nın azalması özellikle V-tipi potasyum (K<sup>+</sup>) kanallarının açılmasına ve damar genişlemesine neden olur (Gupte *et al.* 2002). Sorbitol yolunun önemli enzimlerinden aldoz redüktaz da NADPH kullanır (Grunewald 1993). DNA sentezi için ribonükleotidlerin (ribonükleotid redüktaz ile) deoksiribonükleotidlere dönüşmesini sağlar. NADPH suda çözünmeyen birçok bileşik için de gereklidir. Diğer ürün riboz-5-fosfat; ATP, FAD, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, DNA, RNA, CoA yapısına girer (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

### 1.2.3. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz

Bu iki enzim birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur (Scott 1975). Şekil 1.2.'de belirtilen tepkimeleri katalizlerler. Çoğunlukla sitoplâzma, ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli

organellerde de bulunmaktadır (Antonenkov 1989; Bublitz and Steavenson 1988; Oeser *et al.* 1973; Zaheer *et al.* 1967).



**Şekil 1.2.** G6PD ve 6PGD enzimlerinin katalizlediği reaksiyon

Pentoz fosfat yolunun amaçlarından biri olan NADPH üretimi bu iki enzimin katalizlediği reaksiyonlarda gerçekleşir. Bu iki enzimin eksikliği oranında NADPH ve riboz-5-fosfat eksikliği oluşacaktır.

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği insanlarda en sık görülen enzim eksikliğidir. Dünya üzerinde yaşayan 400 milyon insanı etkilemektedir (Reclos *et al.* 1999). Eritrositlerde glukoz 6-fosfat dehidrogenazın ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz kalıtsal eksikliği ya da değişik varyantlarının bulunması yeni doğan sarılığı, ilaç hassasiyeti, enfeksiyonlar sırasında hemolitik anemi, favizm ve nonsferositik konjenital hemolitik anemi gibi hastalık bulguları ile yakından ilgilidir (Beutler 1973, Ajmar 1979). Eksiklik favizm olarak da tanımlanmaktadır. Bakla ile beslenmeyi takiben hemolitik anemi tablosu görülmektedir. Kalıtsal bir hastalık olan G6PD eksikliği X kromozoma bağlıdır. Bu nedenle erkekleri çok daha fazla etkilemektedir (Reclos *et al.* 2000). Tiamin eksikliğinde ortaya çıkan ve bellek kaybı ile kısmi paralizin birlikte görüldüğü Wernicke-Karsokoff sendromu; pentoz fosfat yolundaki transketolaz aktivitesindeki değişimlere de bağlanmaktadır (Kutay 2002).

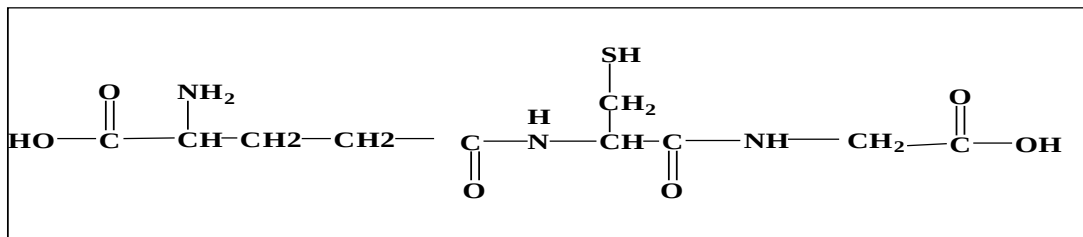
Bu enzimlerin eksikliği durumunda "uzamış yeni doğan sarılığı" problemi gözlenmektedir. Mukoza membranlarının ve diğer vücut dokularının doğum sonrası sararması yeni doğan sarılığı olarak tanımlanır ve yeni doğanlarda çok sık rastlanır. Sebebi 6PGD aktivitesinin karaciğerde düşük olmasıdır. Sarılık genelde erken başlar ve kısa sürede geçer. Devam etmesi durumunda 6PGD eksikliğinin de olabileceği

düşünülmelidir. Böyle durumlarda ciddi nörolojik komplikasyonlara sebebiyet verecek sonuçlar ortaya çıkabilir. Yeni doğan sarılığı yanı sıra G6PD eksikliği olanlar belirli kimyasallara maruz kaldıklarında hemolitik anemi gelişir. Nedeni kırmızı kan hücrelerinin vücut içinde oksijen taşıma kapasitelerindeki azalmadır. Sonuç olarak hemolitik krizde yorgunluk, sık nefes alma ve koyu renkli idrar çıkarma söz konudur. Bazı okside edici ilaçlar, enfeksiyonlar veya bakla ve bakla bitkisinin polenleri bu anemi tablosuna sebebiyet verir. Bu ajanlar kırmızı kan hücrelerinin içine girdiklerinde hemoglobin denatüre olur ve hemoglobinin oksijen taşıma fonksiyonu bozulur. Normal hücrelerde NADPH'ı koenzim olarak kullanan enzimlerce zararlı moleküller etkisiz hale getirilir.

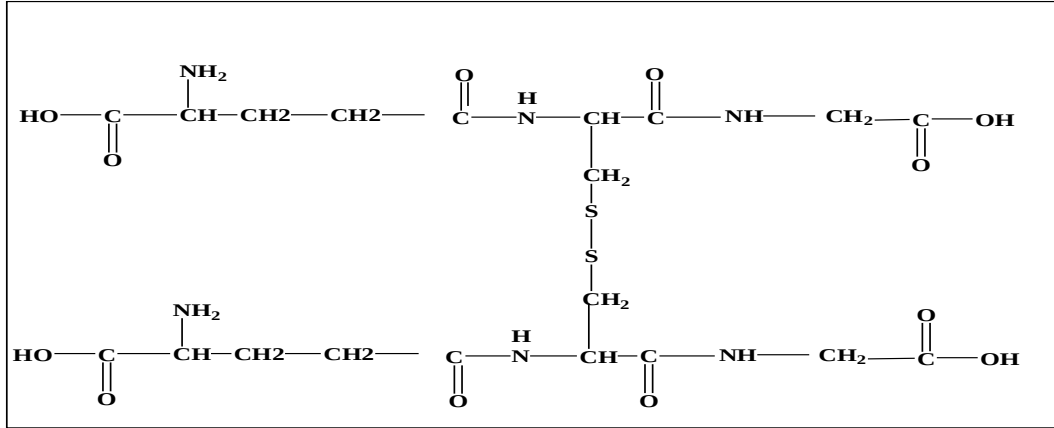
#### 1.2.4. Glutasyon redüktaz

Glutasyon birçok hayvan dokusunda, bitkide ve mikroorganizmada bolca bulunur ve yaklaşık olarak 125 yıldan beri bilinmektedir. Yapısı 1935 yılında aydınlatılmıştır (Meister 1988). GSH eritrositlerde ve diğer hücrelerde bulunan önemli atipik bir tripeptiddir. Çünkü sistein amino asidinin amino grubu ile peptid bağı oluşumunda L-glutamik asitin  $\gamma$ -karboksil grubu yer alır (Montgomery 1996).

Glutasyon okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 1.3 ve 1.4). İlk olarak 1888 yılında Ray-Pailhade tarafından maya hücresinde bulunarak "filothion" olarak adlandırılmıştır. 1921'de Hopkins tarafından saflaştırılarak kristallendirilmiş ve bugünkü ismi verilmiştir (Zubay 1988; Açan 1990).



**Şekil 1.3.** İndirgenmiş glutasyon yapısı, GSH, (L- $\gamma$ -glutamil-L-sisteinil-glisin)



**Şekil 1.4.** Okside glutatyonun yapısı, GSSG, 2(L- $\gamma$ -glutamil-L-sisteinil-glisin)

Glutatyon, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonları,  $\gamma$ -glutamil sistein sentetaz ( $\gamma$ -GSS) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri katalizler (Richman and Meister 1975; Toribio *et al.* 1996; Mistra and Griffith 1998).

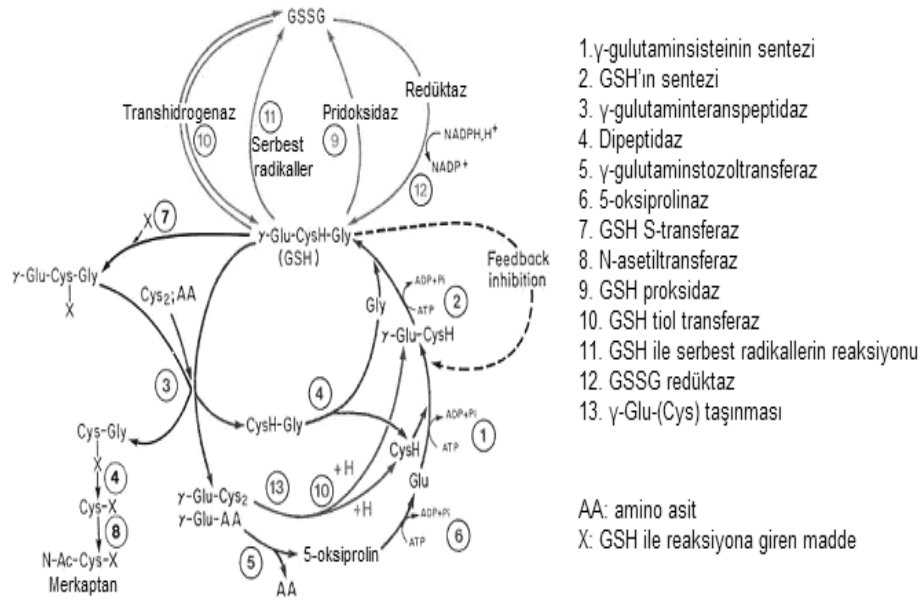
Normal şartlarda indirgenmiş glutatyon hücrelere göre değişmekle beraber 0,5–10 mM düzeyinde bulunur. Eritrositlerde glutatyonun çoğu indirgenmiş halde bulunur. Eritrositlerde GSH yaklaşık 2 mM gibi yüksek konsantrasyonda bulunur. GSSG konsantrasyonu ise 4  $\mu$ M civarındadır. İnsan eritrositlerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500/1 ve yarı ömrü 4 gündür (Kondo *et al.* 1980; Arrick and Nathan 1984; Shohet and Beütler 1986; Cooper 1997).

İndirgenmiş glutatyon enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Bu dönüşüm özellikle peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu gerçekleşmektedir.

Glutatyon redüktaz, glutatyon disülfiti (GSSG) indirgeyerek glutatyon (GSH) dönüştüren önemli bir antioksidan enzimdir (Meister 1988; Mannervik 1987).

Pentoz fosfat yoluyla NADPH'nin oluşumu, methemoglobinin indirgenmesini (oksijene bağlanmayan hemoglobinin  $\text{Fe}^{+3}$  formu devamlı olarak oluşur) ve redükte formda

glutasyon eldesini sağlar. Glutasyon, örneğin aktif yüzünde gerekli bir -SH grubu içeren enzimler gibi moleküllerin redükte şekilde olmalarını temin etmek için bir indirgeyici bileşik gibi fonksiyon görür. Sonuç olarak glutasyonun redükte formu GSH, NADPH tarafından rejenere edilerek GSSG'ye okside edilir. GSSG'nin NADPH kullanılarak GSH'a dönüştüğü reaksiyon glutasyon redüktaz tarafından katalizlenir (Montgomery 1996).



**Şekil 1.5.** GSH'ın biyokimyasal yolu

\*(Meister 1988)

Eritrositlerde glutasyonun yükseltgenmesi, ortamda oluşan  $H_2O_2$  ve diğer organik peroksitlerin indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu reaksiyonun enzimi, glutasyon peroksidazdır. Okside glutasyonu indirgenmiş forma ise glutasyon redüktaz dönüştürmekte ve yüksek GSH/GSSG oranı sağlamaktadır. Bu dönüşüm reaksiyonları glutasyon redoks çevrimi olarak adlandırılmaktadır (Fujiwara *et al.* 1989; Keha ve Küfrelioğlu 2009).

Glutasyon, yapısında bulunan -SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutasyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutasyonun belirlenen görevlerinden



bazıları şunlardır: Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonu, hemoglobin, spektrin gibi membran proteinlerini ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu, DNA ve protein sentezi, amino asit transportu, insülin gibi bazı proteinlerin disülfid bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin konformasyonunun değişmesi, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır (Demir 1994; Knapen *et al.* 1999).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzimler farklı kromatografik yöntemlerle birçok biyolojik kaynaktan saflaştırılmış, optimum pH, stabil pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, molekül kütlesi ve alt birimlerinin tespiti, amino asit bileşimi ve farklı genetik varyantlarının belirlenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır. Enzim substratlarının  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri ile ürünlerin  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Biyolojik moleküller, iyonlar ve ilaçların enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. Üç enzim de en verimli ve en hızlı bir şekilde 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. G6PD ve GR aynı kolondan ayrı ayrı saflaştırılmıştır (Erat 2004).

### 2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz

Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (EC 1.1.1.49; G6PD)  $NADP^+$  varlığında glukoz 6-fosfat bileşimini, 6-fosfoglukonata bileşimine dönüştürür. Reaksiyon sonucu birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Bu enzim hayvan dokularında, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (Levy 1979). Enzim yeşil bitkilerin sitozol ve kloroplastlarında, hayvan dokularının da sitozol ve mitokondrilerinde bulunur (Oeser *et al.* 1973; Ozols 1993)

Glukoz-6-fosfat (G6P) enzimin doğal substratıdır. Bununla beraber 2-deoksiglukoz 6-fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-fosfat, mannoz-6-fosfat, 3-deoksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarını da belli oranlarda kullanabildiği belirtilmiştir (Levy 1979).

Farklı kaynaklardan saflaştırılan enzimim alt birimleri 50–75 kDa arasında değişmektedir. Enzim yapısal olarak monomer, dimer, trimer, tetramer ve hegzomer şeklinde olabileceği belirtilmiştir. G6PD monomeri yaklaşık 515 aminoasitten oluşur.

Enzim aktifliğini genellikle dimerik yapıda gösterir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık,  $\text{NADP}^+$ , NADPH, enzim konsantrasyonu gibi faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur (Levy 1979).

**Çizelge 2.1.** Farklı türlere ait G6PD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı

| Enzim kaynağı       | Molekül kütlesi (kDa) | Alt birim molekül kütlesi (kDa) ve yapısı | Kaynak                      |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| Kaz eritrositi      | 143                   | 73, dimer                                 | Beydemir <i>et al.</i> 2003 |
| Buffalo eritrositi  | 64                    | 64, monomer                               | Çiftci <i>et al.</i> 2003   |
| Sığır lensi         | 69                    | 69, monomer                               | Ulus <i>et al.</i> 1999     |
| Alabalık eritrositi | 66                    | 66, monomer                               | Çiftci <i>et al.</i> 2004   |
| Köpek karaciğeri    | 52,5                  | 52,6, monomer                             | Özer <i>et al.</i> 2002     |

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı 7–9,5 arasında değişmektedir. Bazı optimum pH değerleri; sıçan karaciğer ve böbreğinde 9,4, köpek karaciğerinde 7,8, kaz eritrositinde 7,0, koyun karaciğerinde 8, koyun böbreğinde 7,4, olarak belirlenmiştir (Corpas *et al.* 1995; Özer *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Ulus 2005). Enzimin satabil pH'sı tavuk eritrositinde 8,0, kaz eritrositinde 9,0, buffalo eritrositinde 9,0, gökkuşağı alabalık eritrositinde 8,9, olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2004).

Sıcaklık enzim aktivitelerini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Hayvan kaynaklı G6PD enzimi genelde 60°C üzerinde aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Yapılan çalışmalarda kaynaklara göre enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıklardan bazıları; kaz eritrositlerinde 50°C, buffalo eritrositinde 60°C, koyun karaciğeri 45-50°C, buzağı böbreği 45°C olarak belirlenmiştir (Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Ulus 2005).

Enzim substratı olan  $\text{NADP}^+$  ve G6P için  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerleri belirlenmiştir. Katalizlenen reaksiyonun ürünü olan NADPH için  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Bazı örnekleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** G6PD enziminin bazı kinetik özellikler

| Enzim kaynağı                 | Substratlar            |                             |                        |                             | Ürün                   |                 | Kaynak                      |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
|                               | NADP <sup>+</sup>      |                             | G6P                    |                             | NADPH                  |                 |                             |
|                               | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |                             |
| Koyun karaciğeri              | 0,0194                 | 0,0223                      | 0,176                  | 0,0179                      | 4,707                  | Yarışmasız      | Türkoğlu <i>et al.</i> 2003 |
| Kaz eritrositi                | 0,0074                 | 0,286                       | 0,0243                 | 0,28                        | 0,144                  | Yarışmasız      | Beydemir <i>et al.</i> 2003 |
| Tavuk eritrositi              | 0,0496                 | 0,24                        | 0,171                  | 0,0643                      | -                      | Yarışmalı       | Yılmaz <i>et al.</i> 2002   |
| Gökkuşağı alabalık eritrositi | 0,166                  | 0,275                       | 0,50                   | 1,352                       | 0,703                  | Yarışmasız      | Çiftci <i>et al.</i> 2004   |
| Buffalo eritrositi            | 0,87                   | 7,96                        | 0,106                  | 1,13                        | -                      | Yarışmalı       | Çiftci <i>et al.</i> 2004   |

Enzim birçok kaynaktan farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. İlk olarak 1965 yılında Yoshida tarafından saflaştırılmıştır. DEAE selüloz, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, Sephadex G-200 ve hidroksiapatit kolonları enzim saflaştırmasında sıklıkla kullanılmıştır. (Scott and Tatum 1971; Kanji *et al.* 1976). Ayrıca Cibacron blue F3G-A Sephadex, Procion Red HE-3B-Sepharose, Procion Yellow HE-3G, Matrex gel Orange B, dye ligand afinite kolonu ve metal afinite kromatografisi olarak nikel-şelat kolonu kullanılarak da G6PD enzimini saflaştırılmıştır (Reuter *et al.* 1990; Johansson and Joelsson 1987; Hey and Dean 1983; Iyer *et al.* 2002). Bu gün enzimi en kısa zamanda ve en iyi verimle saflaştırmak için en çok kullanılan 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ilk kez De Flora ve arkadaşları tarafından kullanılmış (Levy 1979) ve daha sonraları modifiye edilerek birçok dokudan bu yöntemle enzim saflaştırılmıştır.

Tedavi ve diğer amaçlar için kullanılan birçok ilacın organizma üzerinde yan etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (Hochster *et al.* 1972). Hatta bunlar çok ciddi rahatsızlıklara sebebiyet verdiği belirtilmiştir (Çiftci *et al.* 2000). İlaçların enzim inhibisyonu ile ilgili birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmıştır. William ve arkadaşları, G6PD enzim eksikliği olan şahısların eritrositlerinin asetanilid, metilenblue, naliksüksinat, neptolan,

niridazol, nitrofurantion, pamaquin, pentaquin, fenilhidrazin, primaquin, sulfasitamid, sulfapridin, tolvidinblue, sulfometokzol, tiyozolsulfon, trinitro tolueen gibi ilaç ve kimyasallardan dolayı hemoliz olduğunu tespit etmişlerdir (Williams *et al.* 1986). Çiftçi ve arkadaşları (2000) yaptıkları *in vitro* çalışmada sodyum seftizoksim, sodyum ampisilin, sodyum sefuroksim, sodyum sefozolin, sodyum sulperazon, streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve netilmisin sülfat enzimi inhibe ettiği, *in vivo* çalışmada da sodyum sefuroksimin rat eritrositlerinde inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

*In vitro* olarak insan eritrositinde, *in vivo* olarak da sıçan eritrositlerinde metamizol ve magnezyum sülfatın inhibisyon etkisi belirtilmiştir (Çiftçi *et al.* 2001) Koyun karaciğeri üzerine yapılan *in vitro* çalışmada penisillin, sulbaktam, sefozilin, and amikasin inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Çiftçi *et al.* 2002). Bazı sülfanamid türevlerinin enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Bülbül ve Erat 2007). Gökkuşığı alabalık eritrositleri üzerine yapılan çalışmada tiamfenikol, amikasin, gentamisin ve netilmisin ilaçlarının inhibisyon etkisini belirtilmiştir (Erdoğan *et al.* 2004). Beydemir (2002) koyun eritrositlerinde yaptığı çalışmada gentamisin, amikasin ve penisilinin inhibisyon etkisini rapor etmiştir.

## 2.2. 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz

Pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44; 6PGD)  $\text{NADP}^+$  varlığında 6-fosfoglukonat bileşiğini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren bir enzimdir. Reaksiyon sonucu birçok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzim glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentoz fosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Del Mar *et al.* 1986).

6PGD'nin doğal substratı 6-fosfoglukonat koenzimi  $\text{NADP}^+$ 'dir. Enzimin koenzime olan ilgisi genelde substratı olan 6-fosfoglukonat'tan daha fazladır (Topham and Dalziel 1986). Ayrıca NADPH spesifik 6PGD'nin insan eritrositi, kuzu karaciğeri,

*Trypanosoma Brucei* ve *Candida utilis*' de substrat olarak 2-deoksi-6-fosfoglukonat ve 3-keto-6-fosfoglukonatı kullanabildiği de çalışmalarda rapor edilmiştir (Hanau *et al.* 1992; Rippa *et al.* 1998).

**Çizelge 2.3.** Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı

| Enzim kaynağı                    | Molekül kütlesi (kDa) | Alt birim molekül kütlesi (kDa) ve yapısı | Kaynak                    |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| Koyun karaciğeri                 | 94                    | 47, homodimer                             | Betts and Mayer 1975      |
| Sıçan karaciğeri                 | 102                   | 52, dimer                                 | Procsal and Holten 1972   |
| Sıçan incebağırsak               | -                     | 52, dimer                                 | Ceyhan <i>et al.</i> 2005 |
| Tavşan annelik bezleri           | 104                   | 52, dimer                                 | Betts and Mayer 1975      |
| <i>Leuconostoc lactis</i> SHO-54 | 140                   | 32,8, tetramer                            | Ohara <i>et al.</i> 2004  |

6-fosfoglukonat dehidrogenazın molekül kütlesi kaynağına göre 80-152 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 31-70 kDa arasında değişmektedir. Bazı canlılarda homodimer, bazılarında homotetramer bir yapıya sahiptir. Günümüzde birçok farklı kaynaktan elde edilen enzimin amino asit dizisi belirlenmiştir. Enzimlerin ortalama 400 civarında amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Hutchison *et al.* 1984).

Enzimin optimum pH aralığı 5,5–10 aralığında değişmekte olup aktivitesinin pH 7–9,2 aralığında arttığı, 9,3'ten sonra ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Barenghi *et al.* 1987). Enzimin doğal halinin optimum pH'sı; insan beyinde 8,6, sıçan böbrek korteksi ve karaciğerinde 8,0, sıçan eritrositlerinde 7,0, sıçan ince bağırsağında 7,3 olarak belirlenmiştir (Weisz *et al.* 1985; Corpas *et al.* 1995; Beydemir *et al.* 2003; Ceyhan *et al.* 2005). Enzimin stabil pH'sı sıçan eritrositlerinde 8,0, tavuk karaciğerinde 8,5 olduğu rapor edilmiştir (Beydemir *et al.* 2003; Erat 2005).

Enzim aktivitesi sıcaklıkla değişmektedir. Enzim aktivitesinin 20-30°C'de 30 dakikada kaybolmadığı, 50°C de 20 dakika bekleme ile %85 aktivite kaybettiği ifade edilmiştir. Bazı optimum sıcaklık değerleri; sıçan eritrositlerinde 45°C ve sıçan ince bağırsağında 49,2°C olarak belirlenmiştir (Beydemir *et al.* 2004; Ceyhan *et al.* 2005).

Enzim substratı olan  $\text{NADP}^+$  ve 6PGA için  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerleri belirlenmiştir. Katalizlenen reaksiyonun ürünü olan NADPH için  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır.

**Çizelge 2.4.** Farklı türlere ait 6PGD enziminin bazı kinetik özellikleri

| Enzim kaynağı      | Substratlar            |                             |                        |                             | Ürün                   |                 | Kaynak                      |
|--------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
|                    | NADP <sup>+</sup>      |                             | 6PGA                   |                             | NADPH                  |                 |                             |
|                    | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |                             |
| Tavuk karaciğeri   | 0,6211                 | 0,0273                      | 0,0343                 | 0,0317                      | 3,244 ± 1,094          | Yarışmalı       | Erat 2005                   |
| Sıçan eritrositi   | 0,059                  | 0,063                       | 0,194                  | 0,054                       | 0,052 ± 0,007          | Yarışmasız      | Beydemir <i>et al.</i> 2004 |
| Sıçan incebağırsak | 0,053                  | -                           | 0,595                  | -                           | 0,031 ±0,003           | Yarışmalı       | Ceyhan <i>et al.</i> 2005   |
| Sıçan böbrek       | 0,056                  | -                           | 0,049                  | -                           | 0,041                  | Yarışmalı       | Corpas <i>et al.</i> 1995   |
| Sıçan karaciğer    | 0,258                  | -                           | 0,157                  |                             | 0,021                  | Yarışmalı       | Corpas <i>et al.</i> 1995   |

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

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

Roark and Brown (1996) tarafından yapılan çalışmada bazı metal iyonlarının potansiyel inhibitör olduğu belirtilmiş ve  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  inhibisyonları tespit edilmiştir. Birçok anyon inhibisyon etkisi gösterir. Ancak asetat inhibisyon etkisi göstermediğinden diğer anyonların etkileri incelenirken sabit iyonik şiddet oluşturmakta kullanılabilir (Proscal and Holten 1972). Ayrıca enzim aktivitesi düşük  $\text{Mg}^{+2}$  konsantrasyonunda artarken,

yüksek  $Mg^{+2}$  konsantrasyonunda ise düştüğü belirtilmiştir (Veronese *et al.* 1974). Bazı türlerde okzalasetat, glukoz-6P, okzalat, fruktoz-6-P, fruktoz-1-P, glukoz-1,6 bisfosfat, P<sub>PPi</sub>, P<sub>i</sub>, P<sub>Hi</sub> (fosfanat), sitrat ve sülfatın inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Beitner and Nordenberg 1979).

İnsan eritrosit 6PGD'si üzerinde yapılan çalışmalarda; metiergobazin maleat, piroksikam, tenoksikam, tiyokolşikozid, menadion sodyum bisülfid, fuluorourasil, sisplatin, ketoprofenin enzimi inhibe ettiği, adranalin, midazolam, fentanil, deksametazomna bisülfid, pentoksifilin de enzim üzerinde etkisiz olduğu Özabacıgil (2005) tarafından belirtilmiştir. Akyüz (2004) insan eritrosit 6PGD enzim üzerinde amikasin, ampisilin, sefepim HCl, netilmisin, gentamisin sülfat, isepamisin, kloramfenikol, levofloksasin, ofloksasin, penisilin, seftazidim pentahidrat, siprofloksasin, sefotaksim sodyum teikoplanin enzimi inhibe ettiği, sefazolin sodyumun aktive ettiği, sefriakson, meropenem, streptomisin sülfatin etkisiz olduğu belirtmiştir. Diğer bir çalışmada vankomisin, sefuroksim sodyum, imipenem, ornidazol, klindamisin, amoksisilin, metronidazol, larnoksikam ve tenoksikam ilaçlarının inhibisyon etkisi gösterdiği, sülfanilasetamid, sülfanilamid, rifamisin ve linkomisin ilaçlarının inhibisyon etkisi göstermediğini rapor edilmiştir (Adem 2006). Çiftçi ve arkadaşları (2002) sıçan eritrositlerinde yaptıkları *in vitro* çalışmalarında amikacin, ampisilin ve netilmisin sülfat'ın enzimi inhibe ettiğini ve metamizol'un enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Başka bir *in vitro* çalışmada ketotifen, dacarbazine, meloxicam, furosemide, methotrexate, metochloropramide hydrochloride, ritodrine hydroklorid, ve gadopentetic acid enzim aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Akkemik *et al.* 2010). Bazı sülfanamid türevlerinin enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Bülbül ve Erat 2007). Netilmisin sülfat ve sefepimin rat eritrositlerinde *in vivo* inhibisyon etkisi rapor edilmiştir (Akyüz 2004). Yeni Zelanda albino türü tavşanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmada 6PGD enzim aktivitesi üzerine; 1. Saatte fluorourasil, ketoprofen ve piroksikam, 3. saatte fluorouracil, ketoprofen, piroksikam, menadion sodyum bisülfid, sisplatin ve 5. saatte fluorouracil, sisplatin ilaçlarının enzim aktivitesini önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Özabacıgil 2005).



### 2.3. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (Glutasyon;  $\text{NADP}^+$  oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7: GR) enzimi glutasyon disülfiti (GSSG) indirgenmiş glutatyon (NADPH ya da NADH'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak) indirgenmesini katalizler (Müller 1992; Gül *et al.* 2000). Glutasyon redüktaz birçok hayvan dokusunda, bitkide ve mikroorganizmada bulunmaktadır. Yapısı 1935 yılında aydınlatılmıştır (Meister 1988).

Enzim birçok kaynaktan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzimin molekül kütlesi 70–140 kDa arasında değişmektedir. Genelde özdeş iki alt birimden oluşmaktadır.

**Çizelge 2.5.** Farklı türlere ait GR enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı

| Enzim kaynağı       | Molekül kütlesi kDa | Alt birim molekül kütlesi ve yapısı kDa | Kaynak                         |
|---------------------|---------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| Sıçan karaciğeri    | 125                 | 60 homodimer                            | Carlberg and Mannever 1975     |
| Alabalık karaciğeri | 105                 | 53 homodimer                            | Tekman <i>et al.</i> 2008      |
| İnsan eritrositi    | 100                 | 50 homodimer                            | Worthington and Rosemeyer 1974 |
| Sığır eritrositi    | 118                 | 58 homodimer                            | Erat 2002                      |
| Sığır beyni         | 116                 | 64 homodimer                            | Acan and Tezcan 1989           |

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı kaynaktan kaynağa farklılık gösterdiği için 6,5-9 arasında bulunmuştur. Bu değer; domuz eritrositleri için 7,0, insan eritrositi için 8,0, *Cyanobacterium anabaena* sp. strain 7119 9,0, sığır eritrositleri için 7,3, koyun karaciğeri 8,0, alabalık karaciğeri için de 8,0 olarak belirlenmiştir. (Boggaram *et al.* 1979; Scott *et al.* 1963; Serrano *et al.* 1984; Erat *et al.* 2003; Uluşu *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008). Stabil pH ile ilgili yapılan çalışmalarda sığır eritrositi 7,3, koyun karaciğeri 5,5, alabalık karaciğeri 8,0 olarak rapor edilmiştir (Erat 2002; Uluşu *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008).

GR ısıya dayanıklı bir enzim olarak bilinmektedir. Fare karaciğerinde GSSG ile yapılan ölçümlerde 80°C'ye kadar aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Lopez and Lee 1979). Optimum aktivite gösterdiği bazı sıcaklık değerleri sığır eritrositi 55°C, koyun karaciğeri 60°C, sığır karaciğeri 55°C, alabalık karaciğeri 10°C'dir (Erat 2002; Ulusu *et al.* 2005; Ulusu and Tandogan 2007; Tekman *et al.* 2008)

Çeşitli kaynaklardan enzim substratı olan NADPH ve GSSG için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir.  $NADP^+$  ve GSH için  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Bazı sonuçlar çizelgede verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Farklı türlere ait GR enziminin bazı kinetik özellikleri

| Enzim kaynağı    | Substratlar            |                             |                        |                             | Ürünler                |                 |                        |                 | Kaynak                        |
|------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-------------------------------|
|                  | GSSG                   |                             | NADPH                  |                             | GSH                    |                 | NADP <sup>+</sup>      |                 |                               |
|                  | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub><br>(EU/ml) | K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü | K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |                               |
| Balık karaciğeri | 0,025                  | 0,098                       | 0,055                  | 0,143                       | 10,17                  | Yarışmalı       | 0,295                  | Yarışmalı       | Tekman <i>et al.</i> 2008     |
| Sığır eritrosit  | 0,149                  | 0,676                       | 0,0714                 | 0,0931                      | 7,841                  | Yarışmasız      | 0,248                  | Yarışmalı       | Erat 2002                     |
| Koyun karaciğer  | 0,0239                 | 0,255                       | 0,0258                 | 0,266                       | 0,4055                 | Yarışmasız      | 4,367                  | Yarışmalı       | Ulus <i>et al.</i> 2005       |
| Sığır karaciğer  | 0,154                  | -                           | 0,063                  | -                           | 7,985                  | Yarı yarışmalı  | 0,043                  | Yarışmalı       | Ulus <i>and</i> Tandoğan 2007 |

GR enziminin saflaştırılması için birçok kromatografik teknik kullanılmıştır. GR saflaştırılmasında CM-selüloz, Sephacryl S-200, DEAE-Sephadex, Sephadex G-100, hydroxyapatite, Sephadex G-75, and DEAE-Sepharose kolonları kullanılmıştır (Carlberg and Mannervik 1975; Carlberg and Mannervik 1981; Ulusu and Tandogan 2007). Enzim en hızlı ve en yüksek verimle 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılmaktadır. Ayrıca hızlı protein iyon kromatografisi (FPLC)-anyon değiştirici, and FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi, Reactive Red-120-Agarose, Sephacryl S-300 teknikleriyle de saflaştırılmıştır (Madamanchi *et al.* 1992; Garcia *et al.* 1993)

İlaçların ve bazı iyonların GR enzimi üzerinde inhibitör etkisi araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin ve ampisilin ilaçlarının insan GR enzimini az veya çok aktive ettiği belirlenmiştir. Metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum ilaçlarının da az veya çok inhibe ettiği belirlenmiştir (Erat 2002). Şentürk (2006) insan eritrositi üzerine yaptığı *in vitro* çalışmada sülfanilasetamid, sülfanilamid, seftriakson sodyum, rifamisin SV sülfat, vankomisin HCl, kloramfenikol sodyumsüksinat, sefuroksim sodyum, imipenem, seftazidim pentahidrat, ornidazol, asetilsalisilikasit, klaridromisin, lornoksikam, ketoprofen, diklofenak sodyum ve tenoksikam ilaçlarının inhibisyon etkisi gösterdiği linkomisin, klindamisin, amoksisilin, amikasin sülfat ve metamizol sodyum ilaçlarının aktivasyon etkisi gösterdiğini belirtmiştir. İnsan eritrositi GR enzimi üzerine  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  and  $Al^{3+}$  iyonlarının inhibisyon etkisi rapor edilmiştir (Çoban *et al.* 2007). Acan ve Tezcan (1995)  $Cd^{2+}$  iyonunun Sığır beyininden saflaştırdıkları GR enziminin aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Alabalık karaciğerinden saflaştırılan enzim aktivitesini  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Al^{+3}$  metal iyonlarının *in vitro* olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Tekman *et al.* 2008). Ofloksasin, levofloksasin, sefsazolin ve sefepim antibiyotiklerinin tavuk karaciğerinden saflaştırılan GR enzimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Demir *et al.* 2006). Erat ve Çiftci (2003) koyun karaciğerinde ofloksasin, levofloksasin, sefepim ve sefazolinin GR enzim aktivitesini inhibe ettiğini, thiamphenicol ve gentamisin ise enzim aktivitesini çok az inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bazı sülfanamid türevlerinin enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Bülbül ve Erat 2007). İnsan eritrosit GR'sinde *in vitro* olarak inhibisyon etkisi belirlenen cefotaxime ve cefodizime antibiyotiklerinin sıçan eritrositlerinde yapılan *in vivo* çalışmada herhangi bir inhibisyon etkisinin belirlenmediği rapor edilmiştir (Erat *et al.* 2005).

Bu çalışmada kalp ve akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi araştırılan ilaçlar ve özellikleri aşağıdaki gibidir.

**1. Furosemid:** Furosemid farmakolojik özellikleri ve kimyasal yapısı ile diğer diüretiklerden farklı, yeni ve kuvvetli bir diüretiktir. Bu ilacın diğerlerinden farklı tarafı idrar atılımını çok fazla artırması ve doz artırılması ile etkisinin artırılmasıdır. Ağız yoluyla alınan furosemid'in etkisi 1/2-1 saatte başlar, 1-2 saatte maksimuma erişir ve 6-8 saat sürer, İ.V. uygulamada 5 dakikada etkisini gösterir, i.m. uygulama sonrası etki biraz daha geç başlar. Oral biyoyararlılık %60-70 arasındadır. Furosemid'in %88'i böbrek, %12'si safra yoluyla atılır. İlacın çoğu değişmeden, pek azı da glukuronid şeklinde çıkar. Klirensi 2 ml dk-1 kg-1' olup yarılanma ömrü 2 saattir.

Furosemid, konjestif kalp yetmezliği, karaciğer sirozu, akut ve kronik böbrek yetmezliği ve nefrotik sendroma bağlı ödemler, akciğer ve beyin ödemi, hafif ve orta derecede hipertansiyon vakalarının tedavisinde yalnız başına veya diğer antihipertansif ilaçlarla kombine olarak, ağır hipertansiyon vakaları veya hipertansif krizlerin tedavisinde diğer ilaçlara yardımcı olarak, tedaviye cevap vermeyen ödem vakalarının tedavisinde yalnız başına veya tiazid veya aldosteron antagonistleriyle kombine olarak, hiperkalsemi hallerinde kalsiyum atılımını arttırmak için, akut böbrek yetmezliğinde oligüri tedavisi ve çıkan idrarı arttırmak için kullanılır (Kayaalp 2002).

**2. Levofloksasin:** Levofloksasin oral ve intravenöz uygulamaya mahsus, sentetik, florokinolon türevi, geniş spektrumlu bir antibakteriyeldir. Florokinolon antibakteriyel ilaç olan levofloksasin DNA-DNA giraz kompleksi ve topoizomera IV üzerinde etkilidir. Farmakokinetik açıdan levofloksasinin oral ve intravenöz yoldan uygulanmasının önemli bir fark bulunmamaktadır, bundan dolayı oral ve intravenöz yolla uygulamalarda birinden diğerine geçiş yapılabilir. Levofloksasin oral yoldan uygulandığında gastrointestinal sistem tarafından hızla ve tamamen emilir ve serum doruk konsantrasyonlarına ortalama 1 saat içinde ulaşılır. Biyoyararlanımı yaklaşık %100'dür. Serum yarılanma ömrü 6-8 saat arasında bulunmuştur. Çok az oranda metabolize olur ve atılımının yaklaşık %85'i böbrekler yoluyla gerçekleşir. Levofloksasin akciğer dokularında kolaylıkla geçer ve konsantrasyonu serum konsantrasyonundan fazladır.

Levofloksasin akut sinüzit, kronik bronşitin akut alevlenmesi, toplumda edinilmiş pnömoni, piyelonefrit dahil, komplikasyonlu üriner sistem enfeksiyonları, prostatit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları durumlarında kullanılır (Kayaalp 2002).

**3. Sefuroksim:** Sefuroksim, antibiyotiğe hassas mikroorganizmaların meydana getirdiği enfeksiyonlarda etkilidir. Etkisini bakteri hücre duvarını ihhabe ederek göstermektedir. Sefuroksim im. uygulandıktan sonra ortalama 45 dakikada serum konsantrasyonu en yüksek seviyeye ulaşır. İlaç 5,3 ve 8 saat kadar serumda varlığını devam ettirir. Uygulan dozun ortalama %89'u böbreklerden 8-6 saatlik bir sürede atılır. Sefuroksim serum proteinlerine %50 oranında bağlanmaktadır. Sefuroksimin kullanıldığı enfeksiyonların ise başlıcaları şunlardır: Alt ve üst solunum yolları enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, doğum ve jinekolojik enfeksiyonlarında kullanılabilir. Enfeksiyonlarla oluşabilecek risk durumlarında ameliyatlarda kullanılabilir. Dozaj ayarlaması hastalığın durumuna göre değişmektedir (Kayaalp 2002).

**4. Gentamisin:** Gentamisin, micromonospora purpurea'dan üretilen aminoglikozid grubundan bir antibiyotiktir. Gentamisin, bakteri hücre ribozomlarında 30S alt kısmına bağlanarak protein sentezini inhibe ederek bakterisid etki göstermektedir. Gentamisin sülfat sindirim kanalından absorbe edilmediğinden, parenteral yolla kullanılır. Kas içine verildiğinde, 30-60 dakikada serumda maksimum konsantrasyona ulaşır. Genellikle verilmesinden sonraki 24 saat içinde %70'i idrarla değişmeden atılır. Gentamisin yarılanma ömrü 1,5-4 saat arasında değişmektedir.

Gentamisin yeni doğan sepsisi, bakteriyel septisemi ve kalp kapakçıklarının iltihabı, idrar yolları enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları (menenjit), solunum sistemi enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar, deri, kemik, eklem ve yumuşak doku (yanıklar) enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (Kayaalp 2002).

**5. Sefazolin:** Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren bir sefalosporindir. Enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Yarılanma ömrü i.m. uygulamada yaklaşık olarak 2 saattir. Safra ile yüksek oranda atılır. Safra konsantrasyonları, serum konsantrasyonlarının 5 katına kadar çıkabilir. Sefazolin sodyum'un %90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır. İlk 6 saat %60, 24 saate %90 oranında idrarla atılır.

Sefazolin solunum yolu enfeksiyonları, safra yolları enfeksiyonları, peritonit, lenfanjit ve lenfadenit, sepsisemi ve subakut bakteriyel endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, jinekolojik enfeksiyonlar, kulak, burun, boğaz enfeksiyonlarında kullanılır (Kayaalp 2002).

**6. Seftazidim:** Seftazidim yarı sentetik, beta-laktam, geniş spektrumlu, parenteral uygulanan, üçüncü nesil sefalosporin grubunda bir antibiyotiktir. Antipsödomonal etki gücü en yüksek olan iki sefalosporinden biridir. Seftazidim bakterilerin hücre duvarı sentezinden sorumlu enzimleri inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Gram-negatif ve gram-pozitif organizmalar genellikle seftazidime duyarlıdır. Seftazidim klinik açıdan önemli olan  $\beta$ -laktamazlara karşı önemli ölçüde stabildir. Bu nedenle ampiciline ve diğer sefalosporinlere dirençli suşlar üzerinde de etkilidir (Kayaalp 2002). İlacın yarılanma ömrü yaklaşık olarak 2 saattir. Seftazidim i.v. ve i.m. uygulamadan sonraki 2 saate %50'si idrarla atılır ve devamında 24 saat içinde böbreklerden %80–90 oranında atılır.

Seftazidim, alt solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolları enfeksiyonları, bakteriyel sepsisemi, kemik ve eklem enfeksiyonları, jinekolojik enfeksiyonlar, intraabdominal enfeksiyonlar, santral sinir sistemi enfeksiyonlarında kullanılır.

Tedaviden önce enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları ve onların seftazidime

duyarlılığını tespit amacıyla bakteri kültürleri için örnekler alınması tavsiye edilir. Duyarlı çalışmalarının sonuçları alınmadan önce tedavi başlatılabilir. Ancak bu sonuçlar alındıktan sonra antibiyotik tedavisi bu sonuçlara göre ayarlanmalıdır (Kayaalp 2002).

**7. Metilprednisol:** Metilprednisolon sentetik ve flor içermeyen bir kortikosteroid olup tüm kortikosteroidler gibi belirli dokulardaki hücrelerin protein sentezini kontrol altında tutarak antienflamatuar ve antialerjik etki gösterir. Son senelerdeki çeşitli klinik çalışmalar şok gibi akut durumlarda yüksek dozda kortikosteroid uygulamasının yararını kanıtlamaktadır. Metilprednisolon sodyum süksinat uygulandıktan sonra süratle absorbe olur ve uzun süre etkisini gösterir. Plazma proteinlerine %95 oranında bağlanır. Plazma yarılanma ömrü 3,5 saat veya daha fazladır. Karaciğerde metabolize olan ilacın ana metaboliti; 2-beta-hydroxy-6-alfa-metilprednisolondur. Uygulanan doz 24 saat içinde aktif olmayan metabolitler halinde %85 'i idrarla ve %10'u dışkı ile atılır.

İlaç i.v. veya i.m. yolla kullanıldığında: Endokrin hastalıkları, romatizmal hastalıklar, kollajen doku hastalıkları, deri hastalıkları, alerjik reaksiyonlar, göz hastalıkları, sindirim sistemi hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları, hematolojik hastalıklar, tümörle ilgili hastalıklar, ödemli reaksiyonlar, sinir sistemi hastalıkları, kardiyojenik şok, septik şok, anafilaktik şok, hipovolemik şok, karışık şok durumlarında endikedir.

**8. Teikoplanin:** Teikoplanin, aerob ve anaerob gram-pozitif mikroorganizmalara karşı bakterisid etkinliğe sahip yeni bir parenteral glikopeptid antibiyotiktir. Etki mekanizması nedeniyle, teikoplanine dirençli suşların ortaya çıkma olasılığı düşüktür. İntravenöz ve intramüsküler yoldan uygulamayı takiben, teikoplanin vücut dokularına geniş ölçüde dağılır. Eliminasyon hızı yavaş olduğundan plazma yarılanma ömrü yaklaşık 150 saattir; atılımı böbrekler yoluyla gerçekleşir. Teikoplanin oral yoldan uygulandığı zaman absorbe edilmez. Günde bir kez intravenöz ya da intramüsküler yoldan uygulanabilir.

Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bunlar: Endokardit, sepsisemi, kemik ve eklem enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolları enfeksiyonları ve kronik ayaktan periton diyalizi ile ilişkili peritonit durumlarında kullanılabilir. Teikoplanin, penisilinler ya da sefalosporinlere karşı alerjisi bulunan hastalardaki enfeksiyonların tedavisinde de etkilidir. Ayrıca gram-pozitif bakterilere bağı enfeksiyonların risk oluşturacağı hastalarda profilaksi amacıyla kullanılabilir. *Clostridium difficile*'nin neden olduğu antibiyotikle ilişkili ishal tedavisinde ağız yoluyla kullanılabilir.

**9. Teofilin:** Teofilin güçlü bir bronkodilatör olup, bronş düz kaslarını ve pulmoner arter düz kaslarını gevşetir. Merkezi sinir sistemini, solunum merkezini ve miyokardı uyarır, daha az ölçüde sistemik rezistans azalması ve miyokard stimülasyonu sonucu organ perfüzyonu ve diürezis fazlalaşır. Mide sekresyonunu, asit, pepsin ve gastrin salgısını, kanda katekolamin, renin ve serbest yağ asitlerini artırır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %60, yeni doğanda ve sirozlu hastalarda %40'tır. Yarılanma süresi büyüklerde 9 saat, çocuklarda 3,5 saat, prematürelerde 20–36 saattir. Karaciğerde metabolize olan ilaç %20 oranında değişmeden idrarla atılır. Metabolitleri 3-metilksantin, 1-metilürikasid ve 1,3-dimetilürik asit olup prematüre bebeklerde önemli bir kısmı kafeine dönüştürülür. Bronşiyal astım, kronik bronşit ve amfizeme bağı bronkospazm, sol kalp yetmezliğinin neden olduğu akciğer ödemi ve gece ortaya çıkan solunum zorluğu durumlarında kullanılır.

**10. Digoksin:** Digoksin sodyum ve potasyumun hücre içine girişini kontrol eden sodyum-potasyum ATPazın bir inhibitörüdür. Kalp glikozidlerinden olup *digitalis lanata* bitkisinin yapraklarından elde edilir. Oral ve iv. yolla verilir. Oral yola kullanıldığında %60–70, iv. yolla kullanıldığında %100 oranında absorbe olur. Oral olarak alındığında Emilimi yavaş olduğundan, uygulandıktan 1–3 saat içinde serum konsantrasyonu en üst seviyeye çıkar. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık olarak %25'dir. Yaklaşık olarak %50–70 oranında metabolize olmadan böbreklerden atılır. %16'sı 3-β-digoksigenin, 3-keto-digoksigenin, diğer glukoronidlere ve sülfat



konjügasyonlarına dönüşür.

Etiyolojisi ve ciddiyet derecesi ne olursa olsun, kronik kalp yetmezliğinde, cerrahi vakalarda, potansiyel ve gizli kalp yetmezliği, taşikardik disritmi ile beraber olan belirgin veya latent kalp yetmezliği hallerinde, çocuklarda kalp dekompanseasyonunda kullanılır (Kayaalp 2002).

**11. Dopamin:** En basit yapılı katekolamin olan dopamin kısıtlı indikasyonlarda kullanılır. En belirgin etkiyi kardiyovasküler sistemde yapar ve etkisi dozaja göre değişmektedir. Sadece iv. yolla kullanılır. İntravenöz kullanım sonrasında dopaminin eliminasyon yarı-ömrü 5 dakikadan daha azdır. İlaç karaciğer, plazma ve böbrekte metabolitlerine dönüştürülerek etkisiz hale getirilir. %85'i 24 saat içinde idrarla atılır. Akut konjestif kalp yetmezliği ve şok olgularında, böbrek yetersizliği tehdidi, akut pankreatit, kronik kalp ve böbrek hastalıklarında akut yetersizlik tehdidi, diüretik tedavisinin etkisini artırmak ve desteklemek, PEEP uygulamalı yapay solunumda azalmış kalp ve böbrek fonksiyonlarını düzeltme, epidural anestezide kardiyovasküler fonksiyonu stabilize etmek için antiaritmik ilaçlar, barbitüratlar, karbromal ve böbrek yoluyla atılan diğer ilaçlarla akut zehirlenmelerde kullanılır (Kayaalp 2002).

**12. Adrenalin:** Adrenalin ağız yolunda kullanılmaz. Çünkü bağırsak çeperinde ve karaciğerde bulunan enzimlerce inaktif hale getirilir. Adrenalinin düz kaslar üzerine etkisi, belirgin olarak bronş kaslarında görülür. Bu kas adrenalinin etkisiyle gevşer bronkospazm durumunda bu etki daha belirgin biçimde gözlenebilir. Adrenalin, mide-barsak kaslarının motilitesi üzerine inhibitör bir etki yaparak tonusu azaltır. Yalnız ileokolik sfinkter ve dalak kapsülü kontrakte olurlar. Keza pilomotor kaslar, adrenalinin etkisiyle kasılır. Vezikanın boşalması üzerine adrenalinin inhibitör etkisi vardır. Adrenalin, splanknik sahanın, derinin ve mukozaların arteriollerini şiddetle daraltır. Deri kapilleri adrenalin etkisiyle daralır, fakat kas kapilleri genişler, venalar genellikle daralır. Adrenalin kalp atımını hızlandırır kalp kasının kontraktilesini artırır. Kalbin hem atım hacmi, hem atım sayısı arttığından dakika hacmi iki misline kadar, hatta daha fazla yükselir. Adrenalin etkisiyle koroner arterler genişler. Fakat taşikardi nedeniyle

diastol kısaldığından koroner akımı, bu damarların genişlemesi ölçüsünde yükselmez. Çünkü koronerler, kanı aortadan kasların gevşemesi esnasında alırlar (Kayaalp 2002).

**13. Lidokain:** Başlangıçta lokal anestezi olarak çıkarılmış ve sonradan antiaritmik olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Dar spektrumlu bir antiaritmik ilaçtır. Lidokain karaciğerden ilk geçişinde %70 oranında inaktif olur. İntravenöz bolus enjeksiyonundan sonra lidokainin eliminasyon yarılanma süresi ortalama 100 dakika olup uzun süreli iv. infüzyonlarda bu 3 saati bulabilir. İv. tek dozluk enjeksiyonundan sonra etkisi derhal görülür ve 10-20 dak sürer. Lidokain karaciğerde N-dealkilasyonla glisin ksilidid ve mono etil glisin ksilidide metabolize olur. Bu metabolitlerin toksikolojik ve farmakolojik etkileri lidokaine benzer ama daha azdır. İdrarla 4-hidroksi-2,6- dimetil anilin konjugesi şeklinde atılır. Karaciğer hastalıklarında lidokainin yarılanma süresi 2-3 kat uzayabilir. Lidokain kolayca plasentaya ve serebrospinal sıvıya geçer. Ventriküler aritmilerde, enfarktüste, kalp ameliyatları esnasında mekanik tahrişlerde, kalp kateterizasyonu ve angiokardiyografi gibi diagnostik müdahalelerde kullanılır (Kayaalp 2002).

**14. Metoprolol tartarat:** Başlıca bronşlarda ve periferik damarlarda bulunan  $\beta_2$ -reseptörlerini etkilemek için gereken dozdan daha düşük dozlarda, esas olarak kalpte bulunan  $\beta_1$ -reseptörlerini etkiler. Metoprololün hem membran stabilize edici etkisi hem de parsiyel agonist etkisi (intrinsik sempatomimetik aktivite) yoktur. Katekolaminlerin kalp üzerine olan uyarıcı etkilerini metoprolol azaltır veya inhibe eder. Bunun neticesinde kalp atım hızı, kardiyak kasılma yeteneği ve kalp debisi azalır. Metoprolol yükselmiş kan basıncını düşürür. Kan basıncında egzersize karşı cevap olarak oluşan artışları da azaltır. Karaciğerde sitokrom p450 sistemi enzimleriyle büyük oranda metabolize olup oksidatif metabolizması genetik kontrol altındadır. Metabolitleri metoprololün etkisine katkısı yoktur. Plazma konsantrasyonunun %10 proteinlere bağlanır. Yarılanma ömrü ve idrarla atılım oranı metabolizmanın faaliyetine bağlıdır. Hipertansiyon, angina pectoris, supraventriküler taşikardi dahil olmak üzere kalp ritim bozuklukları, miyokard enfarktüsünün idame tedavisi, palpasyonlu fonksiyonel kalp hastalıkları, migren profilaksisinde endikedir (Kayaalp 2002).

**15. Verapamil HCl:** Kalsiyum iyonu inhibitörüdür. İnhibisyon etkisini kalsiyum kanalları bloke ederek ya da direkt kalsiyum iyonları üzerine etkilidir. Oral yolla alınan verapamilin %90'ı absorbe edilir. Biyoyararlılığı, karaciğerden geçerken inaktif hale getirildiği için %20–35 arasındadır. Bu nedenle oral doz, parenteral dozun 10 katıdır. Yarılanma ömrü tek dozda 2,8–7,4 saat arasında iken tekrarlanan ardışık dozlarda 4,5–12,0 saat olarak belirlemiştir. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır.

İlacın oral formları: Kronik koroner yetmezliği ve koroner spazmlar, infarktüs sonrası tedavi, supraventriküler taşikardinin geçirilmesi ve rekurrent supraventriküler taşikardi olgularında profilaksi, atrium fibrilasyonu, hızlı iletimle birlikte atrium flutteri ve ekstrasistoli gibi aritmilerde kullanılır. Enjeksiyon formları: Kriz tarzında kan basıncı yükselmeleri, akut koroner yetmezlik, halotan narkozu ya da halotan narkozunda adrenalini uygulamasında ektopik ritm bozukluklarının tedavisi ve profilaksisi için kullanılır (Kayaalp 2002).

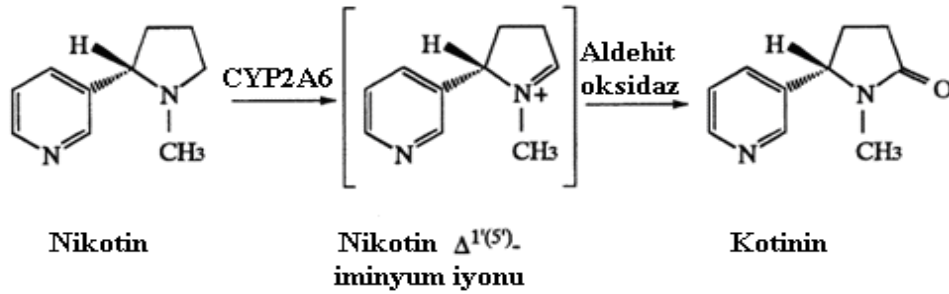
**16. Kotinin:** Sigara kullanımı, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından, günümüzde bir biyo-sosyo-psikolojik zehirlenme hali olarak tarif edilmektedir. Sigara alışkanlığı, bireylerin birbirlerini etkilemesiyle bir sosyal zehirlenme ve ortaya çıkardığı tolerans hali, fizik ve psikolojik bağımlılık yapma özellikleri bakımından da bir psikolojik zehirlenme durumudur (Kesim 2004).

Tütün ürünlerinin kullanımı çok ciddi halk sağlığı sorunlarına neden olabilir (Anonymous 2004). Sigara kullanımının serbest radikalleri, reaktif nitrojenleri ve reaktif oksijen türlerini arttırdığı bilinmektedir. Farmakolojik olarak da ilaçların etkisini azaltıcı ya da toksin etkileri olabilir. Sigarada 4000'den fazla kimyasal bileşiğin varlığı belirlenmiştir ve bunların en az 50 tanesi kanserojen özellik taşımaktadır (Hoffmann *et al.* 1997).

Sigaranın yaygın kullanımı nikotinin bağımlılık yapan etkisinden kaynaklanmaktadır. Nikotin; tütünün aktif alkaloididir. Yarılanma ömrü 1-4 saat arası değişmekte, ortalama

olarak 2 saat sürmektedir. Bu farklılık nikotinin birçok dokudan yavaş bırakılmasından kaynaklanmaktadır (Benowitz *et al.* 1982). Nikotin öncelikli olarak karaciğerde metabolize edilmekle beraber böbrekler ve akciğer de bu metabolik aktiviteye katkıda bulunur.

Nikotinin en önemli metaboliti ise kotinindir. Sigara ile alınan nikotinin %70-80'i nikotin-kotin metabolik yolu ile sitokrom P450 2A6 ve aldehit oksidaz enzimlerince karaciğerde, nikotinin bir metaboliti olan kotinine dönüştürülür (Brandange and Lindblom 1979a; Gorrod and Hibberd 1982). Nikotinin kotinine dönüşümü bir karbon oksidasyonudur (Benowitz *et al.* 1991). Bu dönüşüm NADPH'a bağımlıdır (Kyerematen and Vesell 1991). Reaksiyonun birinci aşaması ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve CYP2A6 enziminin katalizlendiği kabul görmüştür. 2. aşamada aldehit oksidaz sitozolik bir enzim olmasından, reaksiyonun ise mikrozomlarda oluşmasından dolayı tartışılmaktadır.



**Şekil 2.1.** İnsanda kotinin oluşumu

Nikotinin memelilerdeki temel metaboliti olan kotininin, sigara içenlerin kanlarındaki konsantrasyonu nikotine oranla on kat daha fazladır (Benowitz *et al.* 1987; Höfer *et al.* 1992). Tütün ürünleri ve sigara kullanıcılarının kanında ortalama 250-350 ug/L kotinin bulunmaktadır (Benowitz 1986; Benowitz and Jacob 1994; Hurt *et al.* 1993). Metabolizmada temizlenme oranı yüksektir.

Çoğu zaman kotinin, nikotin alımının bir belirleyicisi olarak da kullanılmaktadır (Zevin *et al.* 1997). Kotinin miktarı idrarda ve serumda yapılan testlerle belirlenmektedir. İdrardaki kotinin

miktarı serumdaki oranına nisbeten çok daha fazladır. Serum kotinin seviyesi 10 ng/mL'den düşük ise kişinin sigara içmediği, 10 ng/mL ile 100 ng/mL arasında ise sigarayı az tükettiği veya pasif içici, 300 ng/mL civarında ise ağır içici veya günde 20 den fazla sigara içtiğinin göstergesidir. İdrarda 11 ng/mL ile 30 ng/mL arası az içici veya pasif içici, 500 ng/mL ya da üstü aktif içiciliğin bir göstergesidir.

**Çizelge 2.7.** Nikotin idrarda bulunan temel metabolitleri ve bulunma yüzdeleri

|                    |                                     |                          |                                     |        |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------|
| NİKOTİN            | Nikotin ürede bulunan metabolitler  |                          | %orani                              |        |
|                    | Nikotin                             |                          | %8–10                               |        |
|                    | Nikotin glukuronid                  |                          | %3–5                                |        |
|                    | Nikotin N'-oksid                    |                          | %4–7                                |        |
|                    | Nornikotin                          |                          | % 4–8                               |        |
|                    | Nikotin izometonyum iyonu           |                          | %4–10                               |        |
|                    | 4-hidroksi-(3-pridil) butanoik asit |                          | %1–2                                |        |
|                    | 4-oksi-(3-pridil) butanoik asit     |                          | %1–2                                |        |
|                    | ~ %75<br>KOTİNİN                    | Kotinin                  |                                     | %10–15 |
|                    |                                     | Norkotini                |                                     | %1–2   |
|                    |                                     | Trans–3'-hidroksikotinin | Trans–3'-hidroksikotinin            | %33–40 |
|                    |                                     |                          | Trans–3'-hidroksikotinin glukuronid | %7–9   |
| Kotinin-N-oksid    |                                     | %2–5                     |                                     |        |
| Kotinin glukuronid |                                     | %12–17                   |                                     |        |
| 5'-hidroksikotinin |                                     | %1,2–1,6                 |                                     |        |

\*Neurath *et al.* 1987; Curvall *et al.* 1991; Byrd *et al.* 1992, 1995a,b; Benowitz *et al.* 1994; Neurath, 1994; Hecht *et al.* 1999b; Meğer *et al.* 2002 and Jacob *et al.* 2006

Çizelge 2.7.'de görüldüğü gibi nikotin birçok farklı metabolite dönüşür. Fakat en fazla %70-80 oranında kotinine dönüşür. Nikotin %70-80 oranında kotinine dönüşmesine karşılık aynı oranda idrarda tespit edilememektedir (Benowitz *et al.* 1994). Çünkü kotinin daha sonra 6 farklı metabolik ürüne daha dönüşür.

Kotininin en büyük metaboliti trans-3-hidroksikotinindir. Bu metabolitin oluşum reaksiyonu CYP2A6 tarafından katalizlenmektedir (Murphy *et al.* 1999). Kotinin ve trans-3-hidroksikotin konjugasyon reaksiyonuna uğrayarak glukuronidinin konjugasyonlarına dönüşmektedirler (Byrd *et al.* 1992; Caldwell *et al.* 1992). Trans-3-hidroksikotin idrarda en bol bulunan nikotin metabolitidir (Benowitz *et al.* 1994). Yarılanma ömrü türe göre değişmekte ve kotinine benzerlik göstermektedir. Kalp damarları üzerinde nikotin gibi etki göstermemektedir (Benowitz and Jacob 2001). 3-hidroksikotin ve onun o-glukuronide konjugasyon ürünü olan trans-3'-hidroksikotin glukuronid, idrarda nikotin % 40-60 oranında tespit edilmiştir (Byrd *et al.* 1992; Benowitz *et al.* 1994; Andersson *et al.* 1997; Hecht *et al.* 1999b). Plazma kotinin seviyesi ile trans-3-hidroksikotin seviyesi arasında önemli bir bağlantı yoktur (Benowitz *et al.* 1994).

Genel olarak kotinin plazma seviyesinin %25-28 oranındadır, fakat bu oran bireysel farklılıklarda önemli oranda değişmektedir. Trans-3-hidroksikotin nikotine maruz kalmanın bir ölçüsü olabileceği önerilmiş fakat nikotin idrardaki en yüksek metaboliti olmasından dolayı, öncelikli olarak idrarda yapılacak ölçümlerde kullanılabilir. Kotininin trans-3-hidroksikotinine dönüşümü insanda büyük oranda seçimli bir dönüşümdür. Çünkü idrarda cis-3-hidroksikotin %5'den daha az oranda tespit edilmiştir (Jacob *et al.* 1990; Voncken *et al.* 1990). İdrarda nikotin ve kotininin konjugasyon ürünleri arasında N- glukuronide olmasına karşılık, 3-hidroksikotin sadece O-glukuronidine rastlanmıştır (Byrd *et al.* 1994). 3-hidroksikotin N-glukuronidin insan karaciğerinde önemli oranda tespit edilmiş fakat idrarda tespit edilememiştir (Kuehl and Murphy, 2003b). Bunun sebebi 3-hidroksikotin N-glukuronide ya stabil değil ya da var olan yöntemlerle tespit edilemeyecek kadar az olmasındandır.

Kotininin insan vücudundaki yarılanma ömrü yaklaşık olarak 16–20 saat olduğundan, sigara kullanımından birkaç gün, hatta bir hafta içinde bile idrarda ve serumda tespit edilebilir. Bu özelliğinden dolayı sigara ile ilgili çalışmalarda, sigaraya maruz kalmanın bir ölçüsü olarak kullanılır. Kandaki nikotin oranı birkaç saatlik sigara kullanımını belirtirken; kotinin oranı bir haftalık sigara miktarını ifade eder (Benowitz 1983).

Kotinin plazma konsantrasyonu ile tükürük ve idrar konsantrasyonları arasında bir korelasyon bulunduğu için değerler birbirinin yerine kullanılabilir (Benowitz 1996; Zevin *et al.* 2000). Serum nikotini ve idrar/tükürük kotinin oranı NRP dozunun bir göstergesi olarak kullanılır. Ayrıca kotininin sigaranın sebep olduğu birçok hastalıkta da belirteç olarak kullanılması amacıyla çalışmalar yapılmıştır.

Mentollü sigara kotininin yarılanma ömrünü daha da uzatmaktadır. Çünkü mentol, kotininin enzimatik metabolizması ile yarışma halindedir (Ahijevych *et al.* 2002). Yapılan bazı çalışmalarda mentol ve onun ile ilgili bazı bileşiklerin nikotin metabolizmasını inhibe ettiği belirtilmiştir (MacDougall *et al.* 2003).

Kotinin nikotinden daha az polardır. Vücut sıvısı ile tüm bedene dağılır. Farelere kotinin verilmiş ve en yüksek konsantrasyon böbrekte, onu takiben karaciğer ve akciğerde bulunmuştur. Beyin kotinin seviyesi kandaki seviyesinden yüksek bulunmuştur (Gabrielsson and Bondesson 1987).

Kotininin farelerde (Dar *et al.* 1993, 1994; Erenmemisoglu and Tekol 1994), sıçanlarda (Risner *et al.* 1985; Goldberg *et al.* 1989), kedilerde (Yamamoto and Domino 1965), köpeklerde (Risner *et al.* 1985), sincap maymunlarında (Risner *et al.* 1985; Takada *et al.* 1989), insanlarda (Keenan *et al.* 1994) aktif olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda memelilerde nikotinden farklı davranışsal etkilere yol açtığı da belirtilmiştir. (Risner *et al.* 1985; Goldberg *et al.* 1989). Nikotin ve kotininin, prolaktin ve aldosteronun sıçan serumundaki konsantrasyonlarını farklı şekillerde etkiledikleri rapor edilmiştir. (Andersson *et al.* 1993).

Kotinin biyolojik açıdan inaktif olarak tanımlanmış ve farmakolojik olarak bazı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Benowitz 1996; Herzig *et al.* 1998). İnaktifliği daha çok üzerinde çalışılmamış olmasından ve aktifliğinin nikotin ile karşılaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin kotinin, nikotin reseptörü üzerinde etkisizdir; fakat steroid hormonlarının da bulunduğu bir grup enzim sistemi üzerinde etkilidir (Benowitz 1994).

Kotininin metabolizma üzerinde nikotine benzer ve farklı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Kotininin hücresel seviyede de bazı etkileri olduğu belirtilmiştir. Kotininin hafıza yapıcı ve sinir hücrelerinin ölmesini engelleyici etkisinin bulunduğu belirtilmiştir. Literatürde kotinin ve nikotinin Alzheimer, Şizofren ve Parkinson hastalıklarının etkilerini azaltıcı etkilere sahip olabilecekleri belirtilmiştir (McKie and Robin 2004). Kotininin merkezi sinir sistemi üzerinde nikotinin etkisini artırıcı yönde rol oynadığı belirtilmiştir (Keenan *et al.* 1994).

Kotinin ayrıca nikotine zıt etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Öncelikle fare ve tavşan bağırsak düz kaslarında rahatlatıcı etkisi gözlenmiştir (Kim *et al.* 1968). Kotininin sıçanlarda tirozin hidroksilasyonunu ikincil olarak azaltan katekalain etkisini azalttığı belirtilmiştir (Eneroth *et al.* 1977). Aynı grup sıçan beyninde hidroksitriptaminin turnover sayısının, kotinin tarafından nikotin gibi azaltıldığı rapor edilmiştir. Kotininin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisinin nikotinin asetil kolin reseptöründen bağımsız bir bölümünde olduğu tahmin edilmektedir. Kotinin farelerde antinosiseptif bir bileşik olarak nikotini taklit ettiği belirtilmiştir.

Sigara içen ve içmeyen insanların karaciğerinde biyopsi yoluyla sitokrom P-450 enzimlerinden olan ERDE (7-etoksiresorufin o-dietilaz), AHH (aril hidrokarbon hidroksilaz), CH (kumarin 7-hidroksilaz) ve ECDE (7-etoksikumarin o-dietilaz) plazma kotinin konsantrasyonu ölçülerek aktivitesine bakılmıştır. ERDE aktivitesi sigara içenlerde önemli ölçüde yüksek, AHH, CH ve ECDE aktivitelerinde bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca ERDE aktivitesi ile plazma kotinin konsantrasyonu arasında bir ilişki gözlenmediği belirtilmiştir (Pelkonen *et al.* 1986).

Hamilelik süresince sigara içen annelerin göbek bağı kanında kotinin seviyesi ile antioksidan enzim sistemindeki süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz enzim aktivitelerine bakılmış ve negatif bir etki gözlenmiştir (Chelchowska *et al.* 2006). Kotinin ve nikotinin farelerin adrenelin hücrelerinde aldosteron sentezini inhibe ettikleri belirtilmiştir (Skovvronski and Feldman 1994).



Günümüzde en çok karbonmonoksit, tiyosiyanat, nikotin ve kotinin gibi emilim belirteçleri üzerinde çalışılmaktadır. Kotinin belirteç olarak kullanılmasından dolayı onun saflaştırılması büyük önem kazanmış ve bu amaçla birçok çalışma yapılmıştır. Kotinin saflaştırma çalışmaları idrarda, kanda, tükürükte, terde, dışkıda, saçta, tırnakta vb. vücut kısımlarında farklı kıstaslar esas alınarak yapılmıştır (Kleina *et al.* 2004; Benovvitz *et al.* 2002,1997; Dimich *et al.* 1997). Kotinini saflaştırmak için, radioimmunoassay (Zuccaro *et al.* 1997), enzim immünoassay (Langone *et al.* 1988; Kuo *et al.* 2002), gaz kromatoğrafisi (GC) (Gorrod and Jacob 1999; Jacob *et al.* 2002), gaz kromatoğrafisi ile kütle spektroskopisi (GC-MS) (Gorrod and Jacob 1999; Man *et al.* 2006), HPLC (Gorrod and Jacob 1999), LC-MS-MS (Moyer *et al.* 2002; Gray *et al.* 2008), tüpde katı-fazlı mikroekstraksiyon (SPME) (Eisert and Pawliszyn 1997) ve SPME/LC-MS (Kataoka *et al.* 2009) gibi teknikler uygulanmıştır.

### 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,  $\beta$ -nikotinamidadenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form) (NADPH),  $\beta$ -nikotinamidadenin dinükleotid fosfat (Na tuzu) ( $\text{NADP}^+$ ), okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), glukoz 6-fosfat (mono Na tuzu) ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), potasyum klorür, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E. Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), sephadex-G150 ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| Soğutmalı santrifüj  | : Herrmle Z 323 K       |
| Spektrofotometre     | : Shimadzu UVmini 1240  |
| pH metre             | : Sehoff pH-Meter CG840 |
| Elektroforez tankı   | : BIO RAD (dikey)       |
| Peristaltik pompa    | : Ismatec               |
| Karıştırıcı (Shaker) | : GFL 3025              |

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

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

#### Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti

1. 20 mM Tris-HCl + 2 mM DDT + 1mM EDTA (pH= 7,5): 0,605 g Tris-HCl, 0,017 g DDT, 0,073 g EDTA alınarak bir miktar saf suda çözündü. pH'sı 0,1 M HCl ile ayarlandı. Hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

#### Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl + 5mM EDTA (pH= 8,0): 0,06057 g (5 mmol) Tris ve 0,0292 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 90 ml destile suda çözöldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH 8,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 0,1 M MgCl<sub>2</sub>: 0,475 g (5 mmol) alınıp bir miktar saf suda çözöndükten sonra hacim 50 ml'ye tamamlandı.
3. 6 mM 6PGA: 0,091 g (0,3 mmol) 6PGA alınıp bir miktar suda çözöldü. Hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 6 mM G6P: 0,091 g (0,3 mmol) G6P alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.
5. 2mM NADP<sup>+</sup> Çözeltisi: 0,0765 g NADP<sup>+</sup> (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 50 ml'ye tamamlandı.
6. 20 mM GSSG Çözeltisi: 61,88 mg okside glutatyon (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü, toplam hacim suyla 5 ml'ye tamamlandı.
7. 2mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH ( $9,9 \times 10^{-3}$  mmol) alınarak hacmi suyla 5 ml'ye tamamlandı.

**Diyaliz ve amonyum sülfat çökteltisinin çözünmesi için kullanılan tampon:**

1. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Amonyum sülfat çökteltisinin çözünmesi için): 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $5 \times 10^3$  mol) alınıp 80 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (Diyaliz çözeltisi): 1,211 g Tris, 0,29225 g EDTA alınarak 975 ml suda çözüldü, pH'sı 0,1 M HCl ile 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

**Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler:**

1. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun paketlenmesi, yıkanması ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,292 g EDTA ve 0,152 g DTT alınarak 950 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.
2. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 80 mM KCl + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun yıkanması için kullanılan tampon): 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,292 g EDTA, 0,298 KCl ve 0,152 g DTT alınarak 950 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.
3. 80 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10 mM EDTA + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,121g EDTA, 0,298 KCl ve 0,1913 g NADP<sup>+</sup> karışımı 40 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

4. 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA + 80 mM KCl + 5 mM NADP<sup>+</sup> (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g K-fosfat, 0,121g EDTA, 0,298 KCl ve 0,1913 g NADP<sup>+</sup> karışımı 40 ml suda çözüldü pH'sı 0,1 M KOH 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.
5. 50 mM K-fosfat + 1 mM EDTA + 1mM GSH + 0,5 mM NADPH (Afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,34 g K-fosfat, 0,0146 g EDTA, 0,0307 g GSH, 0,02075 g NADPH karışımı 45 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH ile 7,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.
6. 0,1 M Na-asetat + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat (50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.
7. 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için) 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı 0,1 M HCl ile 8,5'e ayarlandı. Daha sonra hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.
8. % 0,02'lik NaN<sub>3</sub> çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN<sub>3</sub> alınarak 50 ml suda çözüldü.

#### **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 0,1 M 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 0,1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrlamid %0,8 Bisakrlamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrlamid alınarak hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS'nin hacmi su ile 10 ml'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 0,1 M HCl ile 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (Jelde 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 Brilliant 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. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

#### **Ayırma jeli**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| 1M Tris-HCl (pH=8,8)            | 5 ml    |
| %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid | 4,4 ml  |
| %10'luk SDS                     | 0,2 ml  |
| %5'lik TEMED                    | 0,13 ml |
| Saf su                          | 3,13 ml |
| PER                             | katı    |

#### **Yığma jeli**

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| 1M Tris-HCl (pH=6,8)            | 0,41 ml  |
| %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid | 0,800 ml |
| %10'luk SDS                     | 0,03 ml  |
| %5'lik TEMED                    | 0,03 ml  |
| Saf su                          | 2,45 ml  |
| PER                             | katı     |

**Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon:**

1. 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (pH=7,5): 6,055 g Tris (50 mmol), 7,45 g KCl (100 mmol) alınarak 950 ml suda çözüldü. pH=7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

**Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti**

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

**İlaç ve kimyasal maddelerin stok çözeltileri**

Adrenalin: 0,5 mg adrenalin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı (0,002 M).

Digoksin: 0,5 mg digoksin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı. (0,0003 M)

Dopamin: 100 mg dopamin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 5 ml tamamlandı. (0,10 M).

Furosemid: 20 mg furosemid bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı (0,030 M).

Gentamisin: 40 mg metilprednisol bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı (0,053 M).

Kotinin: 248 mg kotinine 0,752 ml saf su ile 1 ml hacme ulaşıldı (1,4 M).

Levofloksasin: 500 mg levofloksasin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı (0,010 M).

Lidokain: 100 mg lidokain bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı (0,08 M).

Metilprednisol: 40 mg metilprednisol bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı (0,053 M).

Metoprolol tartarat: 5 mg metoprolol tartarat bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı (0,0014 M)

Sefazolin: 1 g Sefazolin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 4 ml'ye tamamlandı. (0,55 M).

Seftazidim: 1 g seftazidim bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 3 ml'ye tamamlandı. (0,60 M)

Sefuroksim: 750 mg sefuroksim bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 6 ml'ye tamamlandı (0,29 M)

Teikoplanin: 400 mg teikoplanin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 3 ml'ye tamamlandı (0,07 M).

Teofilin: 240 mg teofilin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı (0,13 M).

Verapamil HCl: 5 mg verapamil HCl bir miktar saf suda çözüp hacim saf su 2 ml'ye ile tamamlandı.(0,005 M).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Sıçan dokularından enzimlerin saflaştırılması çalışmaları**

#### **3.2.1.a. Homojenatın hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılan sıçanlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden (ATADEM) sağlandı. Eter ile anestezi edilen sıçanların boyunlarının arkasından bastırmak suretiyle hayatları sonlandırıldı. Karın boşluğu diklemesine kesilerek açıldı ve dokular alındı. Dokular kullanılıncaya kadar -80°C'de bekletildi.

Sıçan dokuları önce küçük parçalara bölünerek havan içine alındı ve üzerine sıvı azot dökülerek un haline gelinceye kadar öğütüldü. Elde edilen parçalanmış hücre peleti 2 hacim 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA içeren soğuk çözelti içinde süspanse edildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 rpm'de +4°C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildi ve alttaki çökelti atıldı.



### 3.2.1.b. 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartıldı ve 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındı ve paketleme tamponu ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

Hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçirildikten sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra dengeleme tamponu geçirildi ve bu tamponun geçmesi spektrofotometrede takip edilerek absorban değerlerinin köre eşit olmasıyla durduruldu. Kolon yıkandıktan sonra; sırayla G6PD, 6PGD ve GR elüsyon çözeltileri geçirilerek enzimler 1,5 ml'lik tüplere ayrı ayrı alındı. Her bir tüpdeki enzimlerin aktivitelerine bakılarak enzim ünitesi-tüp sayısı grafiği hazırlandı (Danner *et al.* 1977; Boggaram *et al.* 1979; Carlbeg and Mannervik 1981).

Afinite sonrası enzim örneklerinin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı.

### 3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Afinite kolonundan alınan numunelerin saf olup olmadığının kontrolü %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül kütlesi belirli olan karbonik anhidraz (29.000), yumurta albümin (45.000), ve BSA (66.000) proteinleri kullanıldı.

Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına pipetle bir tabaka oluşacak şekilde ilave edildi. Jel donduktan sonra üste yığma jel ilave edildi. Jel donmadan dikkatlice tarak yerleştirildi. Jel tamamen donunca tarak dikkatlice çıkarıldı. Oluşan jel plakalarla beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20  $\mu$ g protein (BSA eşdeğer) olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100  $\mu$ l olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu konuldu. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, jeldeki yerine ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak “anot” ve “katot” kabloları yerleştirildi. Önce 80 voltta 25 dakika, daha sonra 120 volta ayarlanarak 2,5 saat oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Plakalar arasından çıkarılan jel 30 dakika sabitleştirilmedi, 2 saat boyamada ve 30 dakikada yıkama çözeltilerinin içinde karıştırıcının üzerinde bekletildi. Daha sonra suyun içine alınan jelin, fotoğrafı çekildi.

Elektroforez sırasında kullanılan yürütme tamponu, boyama ve sabitleştirme çözeltileri tekrar kullanılmak üzere kaplarına alındı. Yıkama çözeltisi ise aktif karbondan geçirilerek kabına alındı.

Molekül kütlelerinin belirlenmesi; molekül kütleleri belli standartlar ile bilinmeyen proteinlerinin aynı jelde yürütülmesiyle belirlenir. Molekül kütlesi hesaplamada proteinin yürüdüğü uzaklığın boyanın yürüdüğü uzaklığa oranını ifade eden ve alıkoyma veya yavaşlatma faktörü (retardation factor) olarak adlandırılan  $R_f$  değeri esas alınır. Standartların  $R_f$  değerleri belirlenir. LogMA- $R_f$  değeri grafiği çizilerek bu grafikten  $R_f$  değeri belli enzimin veya proteinin molekül kütlesi hesaplanır.

### 3.2.3. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması ve enzimlerin molekül kütlelerinin belirlenmesi

Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimler molekül büyüklüğüne göre ayrılırlar. Ayırma işlemi proteinlerin kolon dolgu maddesi olan reçine porlarının içinden farklı hızlarla geçmesi esasına dayanır. Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimlerin elektroforezde yürütülmesi ile tek bantlar elde edildi. Bu enzimlerin doğal yapıları ve molekül büyüklüklerinin belirlenmesi için jel filtrasyon kromatografisi kolonu hazırlandı. Kolon materyali olarak Sephadex G-150'den 5 g'ı tartılarak 200 ml saf su içersine konuldu. 90 °C'de 4 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH'sı 7,5 olan 0,05 Tris-HCl ve 0,1 M KCl tamponuyla dolu kolona yavaşca paketlenildi ve kolonun dengelenmesi yine aynı tampon ile yapıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 15 ml/saat'e ayarlandı. Kolonun dengelenmesi üstten verilen tomponla alttan alınan tamponun 280 nm'de absorbandsı ile pH değerinin aynı olmasıyla anlaşıldı. Kolona numune tatbiki 1,9 ml protein çözeltisine 0,1 ml de gliserol eklenerek yapıldı. Tatbik edilen numune emildikten sonra üzerine pipetle dikkatli bir şekilde yürütme tamponu eklendi. Protein tatbik edilmesiyle 0,5 ml'lik hacimlerle kolondan elüsyonlar alındı. Her bir numune kolondan geçirildikten sonra kolon dengelenerek bir sonraki numune geçirildi. Enzimler kolondan elüe edilirken 280 nm'de  $\text{NADP}^+$  proteinlerin absorbandsını maskeleydiği için 340 mn'de aktivite ölçümleriyle elüsyon takip edildi.

Molekül kütlelerinin hesaplanmasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. Kolon dengelendikten sonra kolonun void hacminin ( $V_0$ ) belirlenmesi için blue dekstran geçirildi.
2. Devamında molekül kütleleri belli standartlar molekül kütleleri birbirine uzak olanlar ikiyeşerli olarak kolona tatbik edildi. Her bir numune için elüsyon hacmi ( $V_e$ ) belirlendi.
3. Standartlar kolondan geçirildikten sonra molekül kütlelerini bilmediğimiz protein çözeltileri kolona tatbik edip aynı şekilde elüsyonlar alındı ve  $V_e$  değerleri belirlendi.
4. Standartların ve numunelerin  $K_{av}$  değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

$V_t$ =Jelin yatak hacmi.

$V_o$ =Void hacim (Blue Dekstranla belirlendi).

$V_e$ =Elüsyon hacmi.

5. Değerler hesaplandıktan sonra  $\log MA-K_{av}$  değerleri grafiği çizildi. Elde edilen grafikteki formülden  $K_{av}$  değerleri belirlenen proteinlerin molekül kütleleri hesaplandı.

### 3.2.4. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu metod glukoz 6-fosfat varlığında  $NADP^+$ 'nin indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı (Beutler 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

| Stok çözeltiler                                   | Kontrol küveti | Numune küveti |
|---------------------------------------------------|----------------|---------------|
|                                                   | Hacim (µl)     | Hacim (µl)    |
| 1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA<br>0,1 M $MgCl_2$ (pH= 8) | 200            | 200           |
| 2 mM $NADP^+$                                     | 100            | 100           |
| Saf su                                            | 660            | 560           |
| Enzim örneği                                      | 40             | 40            |
| 10 dakika inkübasyon                              |                |               |
| G6P                                               | -              | 100           |

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu metod 6-fosfoglukonat varlığında  $NADP^+$ 'nin indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı (Beutler 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

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

Glutatyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde spektrofotometrik metod kullanıldı. Carlberg and Mannervik'in tanımladığı gibi 1 ml'lik küvetlerle yapıldı (Carlberg and Mannervik 1985). Bu metod GSSG varlığında NADPH'ın yükseltgenmesinden dolayı azalan NADPH'ın 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. 1 dakikalık zaman aralıklarında absorbans azalışı kaydedildi. Küvet içeriği Çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

| Stok çözeltileri                | Kontrol küveti | Numune küveti |
|---------------------------------|----------------|---------------|
|                                 | Hacim (µl)     | Hacim(µl)     |
| 1mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH= 8) | 200            | 200           |
| 20 mM GSSG                      | 100            | 100           |
| 2mM NADPH                       | 100            | 100           |
| Su                              | 600            | 570           |
| Enzim numunesi                  | -              | 30            |

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

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

$\Delta OD$  : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

$V_T$  : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

$V_E$  : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

$S_F$  : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

### 3.2.5. Kantitatif protein tayini

Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltililerindeki 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 ( $\lambda_{max} = 465 \text{ nm}$ ) ve mavi ( $\lambda_{max} = 595 \text{ nm}$ ) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması sonucu kırmızı form mavi forma dönüşür. Reaksiyon hızı yüksektir ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976). Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti çok azdır (1-100  $\mu\text{g}$  arası).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafik gereklidir. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{l}$  alındı. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilisi 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 çözeltilisinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltililerindeki enzim numunelerinden 0,1 ml alınarak tüplere konuldu ve üzerine 5'er ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra

10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir numune için üçer adet deneme yapılarak bu üç değerin aritmetik ortalaması alındı. Standart grafikten yararlanılarak, elde edilen bu değerlere göre protein miktarları belirlendi.

### **3.2.6. Sıçan dokularından saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon ve kinetik çalışmaları**

#### **3.2.6.a. Enzimlerin optimum pH’larının belirlenmesi**

Enzimlerin optimum pH’larını belirlemek amacıyla 25 mM  $H_3PO_4$  -25 mM  $H_3BO_3$  ile pH 5-10 arası 0,5 artışla tampon çözeltiler hazırlandı. Her bir pH’da enzim aktivelerine bakıldı. Belirlene optimum pH’da aynı tuz konsantrasyonunda Tris-HCl ve fosfat tamponları ile de aktivitelere bakıldı. Aktivite ölçümlerinde en iyi aktivite gösteren tamponlarla çalışmalara devam edildi.

#### **3.2.6.b. Enzimlerin optimum iyonik şiddetlerinin belirlenmesi**

Enzimlerin optimum aktivite sağladığı iyonik şiddetin belirlenmesi için belirlenen optimum pH’da 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 mM Tris-HCl veya fosfat tamponları kullanılarak belirlendi. Ölçülen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

#### **3.2.6.c. $MgCl_2$ ve EDTA’nın enzimlerin aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesi**

Belirlenen optimum pH ve iyonik şiddette enzimlerin optimum EDTA ve  $MgCl_2$  konsantrasyonları belirlendi. Optimum EDTA 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM’lık EDTA tamponları kullanarak enzimlerin aktivitelere bakıldı. Enzimlerin optimum  $MgCl_2$  konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla da 25, 50, 100, 250, 500, 1000 mM  $MgCl_2$

çözeltisinde enzimlerin aktivitelerine bakıldı. Ölçülen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

#### **3.2.6.d. Enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi**

Enzimlerin optimum sıcaklıklarını belirlenmesi amacıyla enzim hariç diğer aktivite çözeltileri 0-90°C arasında 10°C artışla ısıtıldı ve her 10°C'de aktiviteleri ölçüldü. Enzim aktivitesi-sıcaklık grafikleri çizildi.

#### **3.2.6.e. Stabil pH'nın belirlenmesi**

Stabil pH'yı belirlemek amacıyla fosfat 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 ve Tris-HCl 7,5, 8, 8,5, 9 tamponları hazırlandı. 0,5 ml enzim 0,5 ml bu tamponlardan olmak üzere ependorf tüplerine alındı. 12 saat arayla aktivite ölçümleri yapıldı. Enzim aktivitesi-saat grafiği çizilerek sonuçlar değerlendirildi.

#### **3.2.6.f. Enzimlerin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi**

Enzimlerin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla substratların 100 kat seyreltilmiş çözeltilerinden 5 farklı konsantrasyonu ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikten yararlanarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi.  $NADP^+$  ve G6P için G6PD,  $NADP^+$  ve 6PG için 6PGD, NADPH ve GSSG için GR enzimlerinde  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi.

#### **3.2.6.g. Ürünlerin enzimler üzerinde inhibisyon etkisinin belirlenmesi**

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarla oluşan ürünlerin, enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini belirlemek için 5 farklı ürün konsantrasyonu ile aktivite üzerindeki etkisine bakıldı. Oluşan değerlerle % aktivite-ürün konsantrasyonu grafiği çizildi.



Grafik yardımıyla enzim aktivitesini %50 düşüren konsantrasyon değeri belirlendi. İnhibisyon şeklini ve  $K_i$  sabitini belirlemek amacıyla 5 farklı substrat konsantrasyonunda ürünlerin 2 sabit konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerin yardımıyla inhibisyon türü ve  $K_i$  sabitleri belirlendi.

### 3.2.7. Sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkilerinin belirlenmesi

İlaçların enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla kuvvet ortamına farklı konsantrasyonlarda ilaç katılarak aktivite değerleri okundu. İlaçların inhibisyon etkileri mümkün olan en yüksek konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlendi.  $IC_{50}$  değerlerin belirlenmesi için % aktivite-[I] inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek belirlendi. Bu amaçla 5 farklı inhibitör konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı.

Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi gösterenlerin  $K_i$  değerlerini belirlemek amacıyla enzimlerin aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bu substrat konsantrasyonları ön denemelerle belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden inhibisyon türü belirlendi. Grafik denkleminde inhibisyon türüne göre aşağıdaki formüllere göre  $K_i$  sabitleri belirlendi.

$$\begin{array}{ll} \text{Yarışmasız inhibisyon için} & V_{\max} = \frac{V_{\max}^I}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \\ \text{Yarışmalı inhibisyon için} & K_M = \frac{K_M^I}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \end{array}$$

Akciğerden saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktivitesi üzerinede furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol,

teikoplanin, teofilin ilaçların ve kotininin inhibisyon etkisine bakıldı. Kalpden saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerin aktivitesi üzerine de digoksin, dopamin, furosemid, adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının inhibisyon etkilerine bakıldı.

### 3.2.8. Sıçan dokularında G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı ilaçların *in vivo* etkilerinin belirlenmesi

Furosemid ve levofloksasin ilaçlarının *in vivo* etkilerini araştırmak amacıyla ağırlıkları 140–175 g arasında olan 18 adet sıçan üzerinde çalışılmıştır. Deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden (ATADEM) temin edildi. Her bir ilaç için 6'şar sıçan denek olarak kullanıldı. 6 sıçanda kontrol amacıyla kullanıldı.

Hayvanlara verilecek ilaç dozajları aşağıdaki formüle göre belirlendi. Bu formülde Km her canlı için vücut ağırlığının (kg), kapladığı vücut yüzey alanına (m<sup>2</sup>) bölünmesiyle hesaplanan bir sabittir. Bu formülle insanlar için kullanılan ilaç dozajlarının hayvanlar için karşılığı hesaplanabilmektedir (Reagan-Shaw *et al.* 2007).

$$\dot{ID} = HD \times \frac{H \text{ Km}}{\dot{I} \text{ Km}}$$

$\dot{ID}(\text{mg/kg})$ = İnsan dozu

$HD(\text{mg/kg})$ = Hayvan dozu

H Km= Hayvan için bulunan sabit (150 g bir sıçan için 6)

$\dot{I} \text{ Km}$ = İnsan için bulunan sabit (60 kg bir insan için 37)

Belirlenen ilaç dozajları, her iki ilaç içinde 10 mg/kg olacak şekilde hayvanlara intraperitoneal olarak uygulandı. İlaçların yarılanma ömrü ve dokulardaki maksimum doza ulaşma zamanları esas alınarak, hayvanların hayatları 23 dakika sonra sona erdirildi. Dokular hızlı bir şekilde alınıp fizyolojik serumla yıkandıktan sonra -80 °C'de

donduruldu. Aktivite ölçümleri yapılacağı zaman sıvı azotla un haline gelinceye kadar parçalanıp homojenat hazırlandı ve aktivite tayinleri yapıldı.

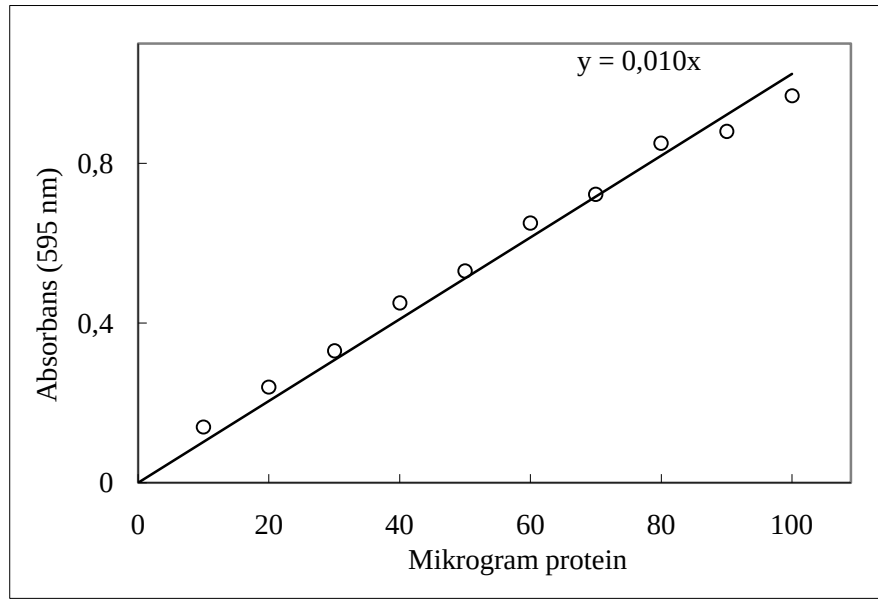
Sonuçların istatistikî analizi SPSS istatistik programı kullanılarak yapıldı. Bu amaçla varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Gruplar endüşük önemlilik farkına (LSD) göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi ve p değeri 0.05'den küçük olduğunda inhibisyon etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar için; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27.08.2010 tarih ve 8 sayılı oturumunun 28 no'lu kararı ile araştırmanın Etik Kurallara uygun olduğu yönünde Etik Kurulu Kararı verilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Grafik bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi yapıldı. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik

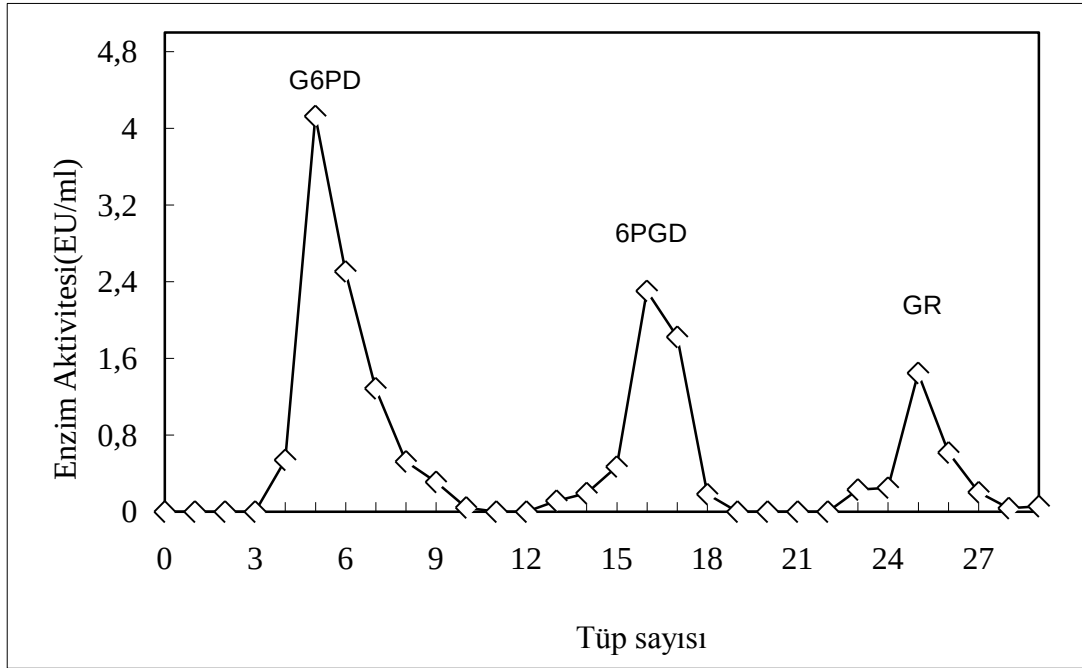
##### 4.2. 2', 5' ADP Sepharose 4B Afinite Kromatografisi Saflaştırma Sonuçları

Hazırlanan homojenat süzöldükten sonra afinite kolonuna tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra sırasıyla G6PD, 6PGD ve GR elüsyon çözeltileri ile elüsyon yapıldı. Elüatlar endorf tüplerine 1,5 ml’lik hacimlerle alındı. Elüatlarda 340 nm’de enzim aktiviteleri ölçüldü ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Enzim ünitesi-tüp

sayısı grafikleri aşağıda verilmiştir. Saflaştırma basamakları ve saflaştırma değerleri çizelgeler halinde verilmiştir.

#### 4.2.1. Sıçan akciğerinden G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite karomatografisi sonuçları

Afinite kolonundan yapılan elüsyonun sonucu ve saflaştırma basamaklarının sonuçları aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Sıçan akciğer G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği.

\*Kolon 1x10 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 1,5 ml.

**Çizelge 4.1.** Sıçan akciğeri G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 16                | 0,92             | 14,75                | 2,95                    | 0,31                      | 100     | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 6                 | 2,36             | 14,15                | 0,013                   | 181,38                    | 95,93   | 580,50                |

**Çizelge 4.2.** Sıçan akciğeri 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları

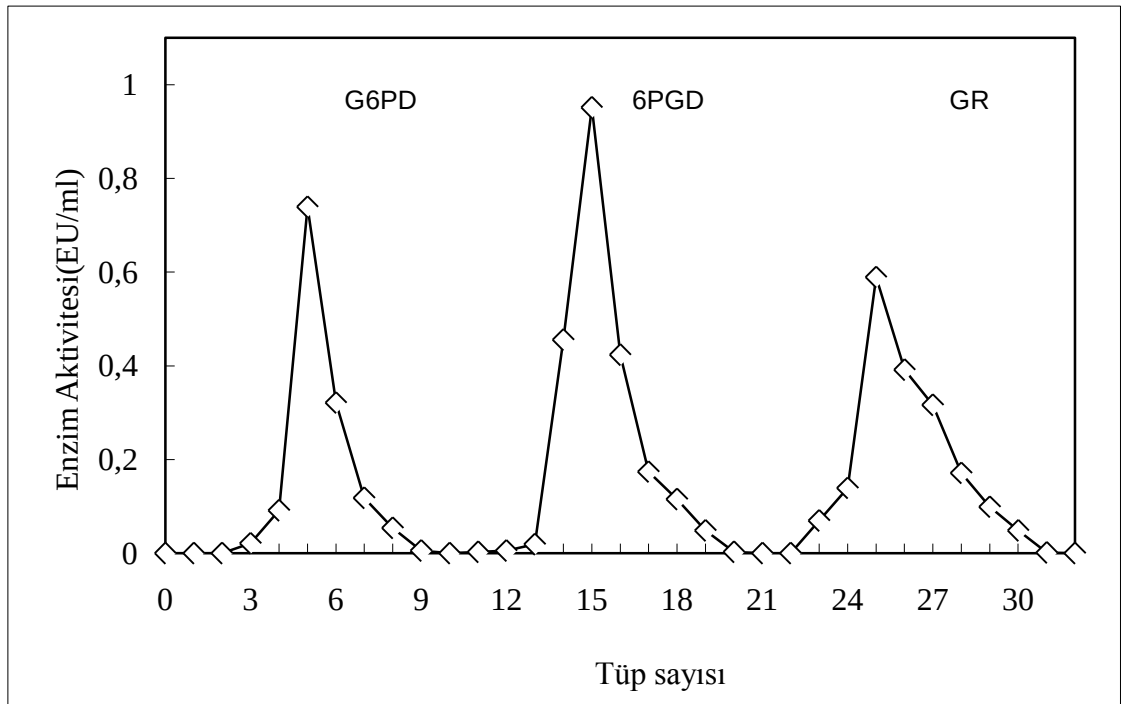
| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 16                | 0,50             | 8,06                 | 2,95                    | 0,171                     | 100     | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 4,5               | 1,61             | 7,23                 | 0,012                   | 133,976                   | 89,8    | 784,6                 |

**Çizelge 4.3.** Sıçan akciğeri GR enziminin saflaştırılması basamakları

| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 16                | 0,110            | 1,758                | 2,96                    | 0,04                      | 100     | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 4,5               | 0,370            | 1,664                | 0,0106                  | 34,88                     | 94,66   | 939,90                |

#### 4.2.2. Sıçan kalbinden G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite karomatografisi sonuçları

Afinite kolonundan yapılan elüsyonun sonucu ve saflaştırma basamaklarının sonuçları aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Sıçan kalp G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği.

\*Kolon 1x10 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 1,5 ml.

**Çizelge 4.4.** Sıçan kalbi G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 22                | 0,075            | 1,651                | 3,400                   | 0,022                     | 100,    | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 6                 | 0,252            | 1,511                | 0,007                   | 38,16                     | 91,55   | 1729                  |

**Çizelge 4.5.** Sıçan kalbi 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları

| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 22                | 0,145            | 3,183                | 2,870                   | 0,050                     | 100     | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 6                 | 0,482            | 2,894                | 0,008                   | 61,835                    | 90,9    | 1226                  |

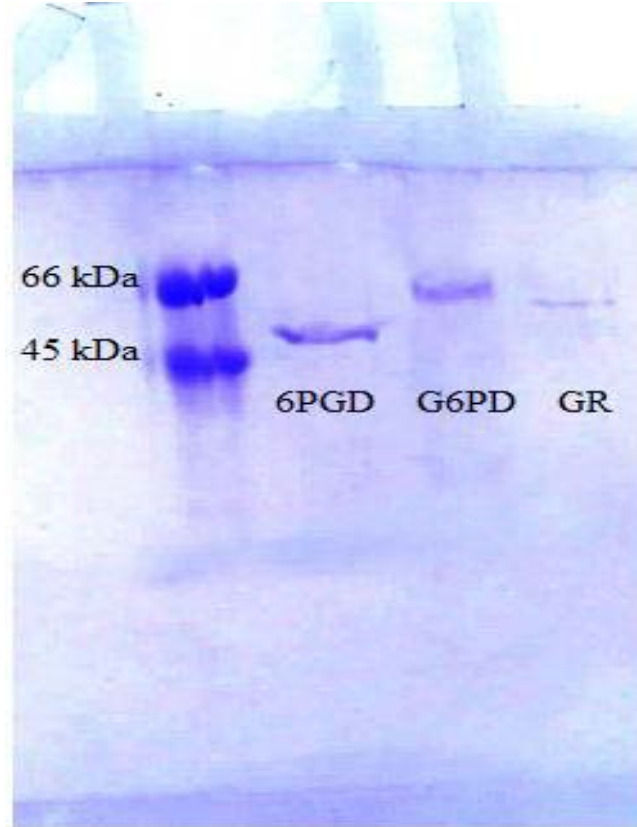
**Çizelge 4.6.** Sıçan kalbi GR enziminin saflaştırılması basamakları

| Saflaştırma basamakları | Toplam hacim (ml) | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam aktivite (EÜ) | Protein miktarı (mg/ml) | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Homojenat               | 22                | 0,118            | 2,594                | 3,4                     | 0,035                     | 100     | 1                     |
| Afinite kromatografisi  | 6                 | 0,407            | 2,444                | 0,004                   | 101,822                   | 94,21   | 2936,36               |



#### 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Sonuçları

Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimlerin saflığının kontrolü amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofözezi yapıldı.

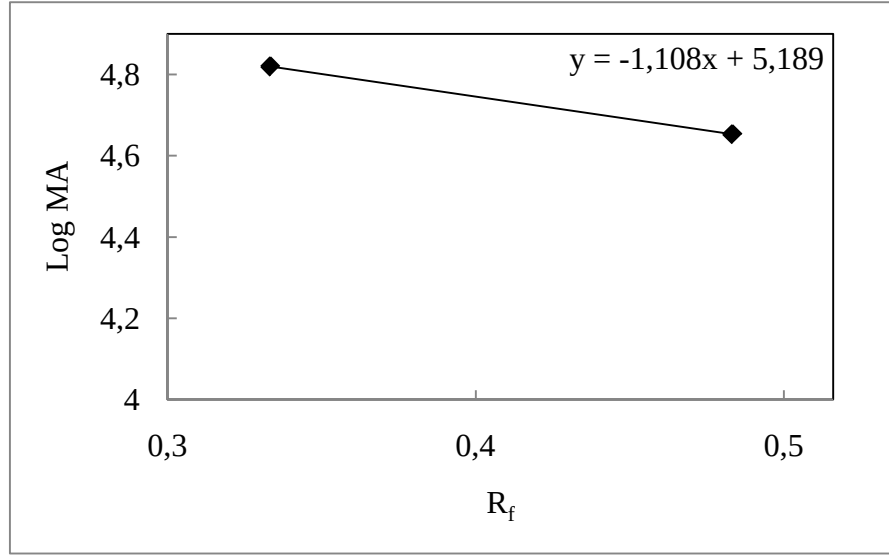


**Şekil 4.4.** Sıçan akciğerinden saflaştıırılan G6PD, 6PGD VE GR enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

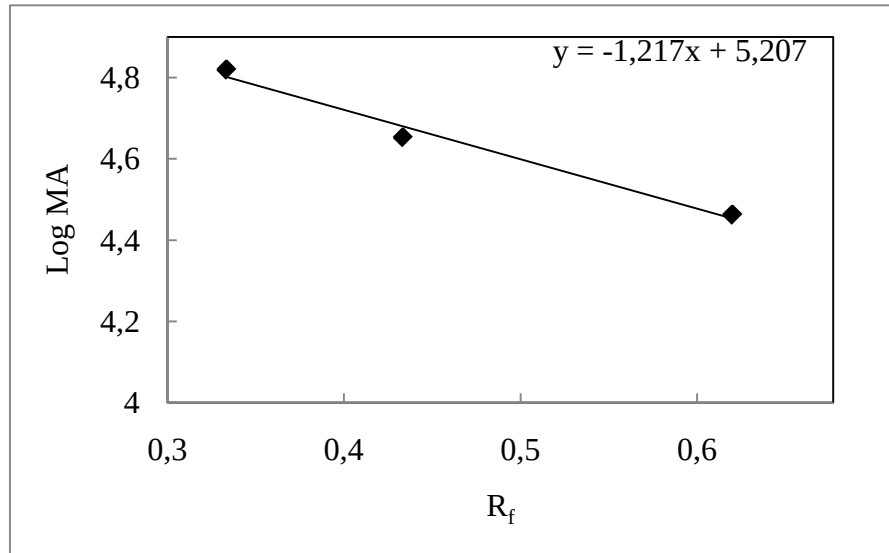
\* Standartlar yumurta albümin (45,000 Da), ve BSA (66,000 Da) kullanıldı.

**Çizelge 4.7.** Sıçan akciğerinden saflaştıırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE sonucu elde edilen molekül kütleleri

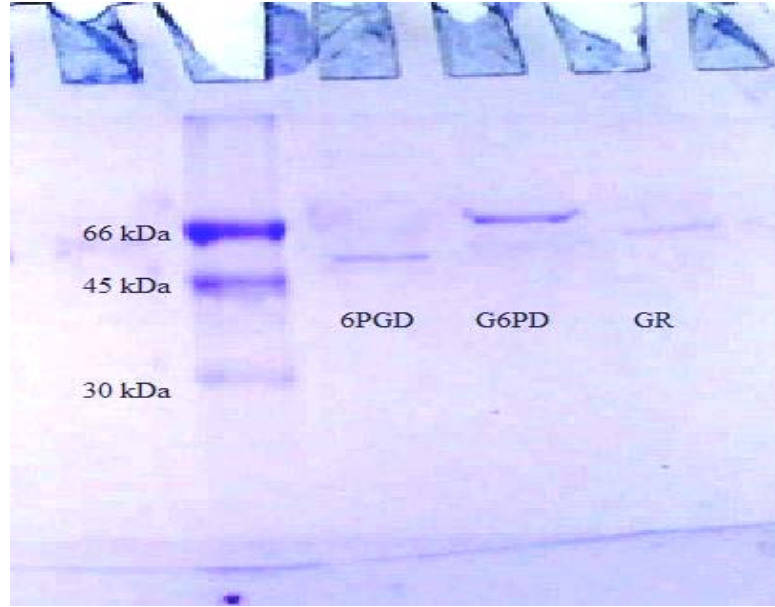
|                            | R <sub>f</sub> değeri | Molekül Kütleşi (Da) |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Yumurta albümin (standart) | 0,483                 | 45,000               |
| BSA (standart)             | 0,333                 | 66,000               |
| G6PD (akciğer)             | 0,348                 | 63,540               |
| 6PGD (akciğer)             | 0,425                 | 52,251               |
| GR (akciğer)               | 0,353                 | 62,735               |



**Şekil 4.5.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE sonucu molekül kütlelerini bulmak için çizilen logMA-R<sub>f</sub> değeri grafiği



**Şekil 4.6.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE sonucu molekül kütlelerini bulmak için çizilen logMA-R<sub>f</sub> değeri grafiği



**Şekil 4.7.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı.

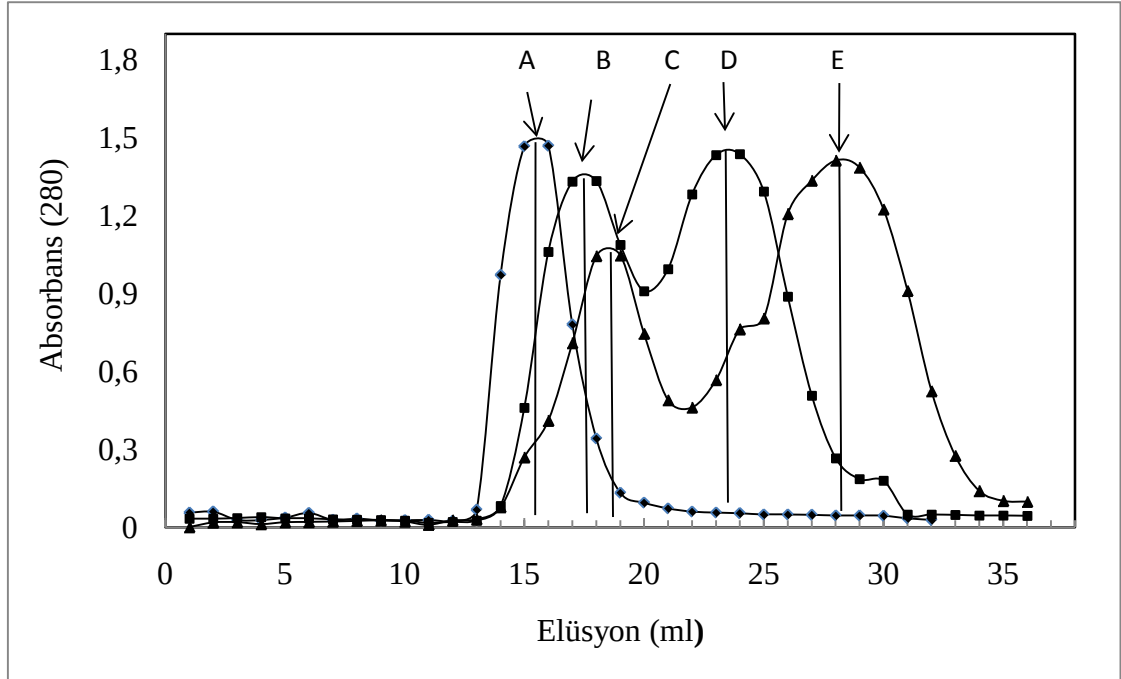
\*Standartlar karbonik anhidraz (29,000 Da), yumurta albümin (45,000 Da), ve BSA (66,000 Da) kullanıldı.

**Çizelge 4.8.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE sonucu elde edilen molekül kütleleri

|                              | R <sub>f</sub> değeri | Molekül Kütlesi (Da) |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| BSA (standart)               | 0,333                 | 66,000               |
| Yumurta albümin (standart)   | 0,433                 | 45,000               |
| Karbonik anhidraz (standart) | 0,620                 | 29,000               |
| G6PD (kalp)                  | 0,311                 | 67,250               |
| 6PGD (kalp)                  | 0,311                 | 55,402               |
| GR (kalp)                    | 0,341                 | 61,830               |

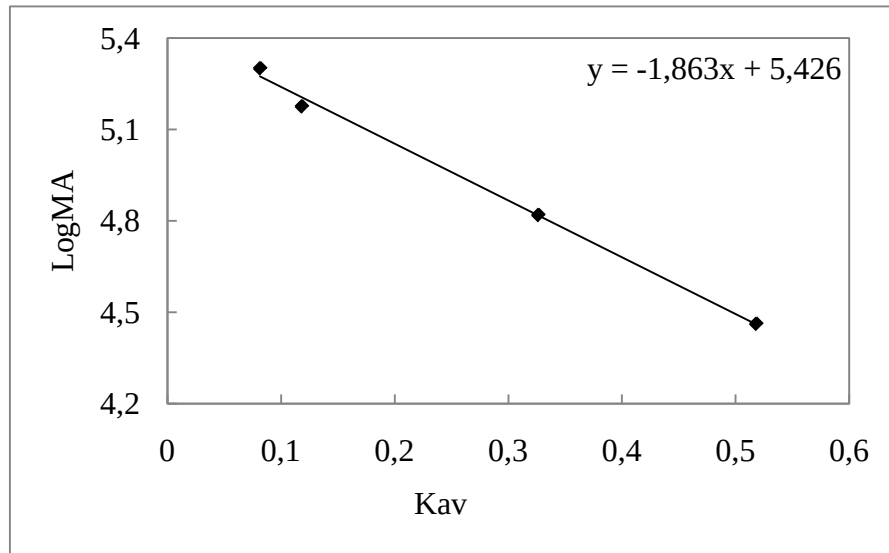
#### 4.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları

Enzimlerin doğal hallerinin molekül kütlelerini belirlemek için jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Bu amaçla kolondan geçirilen standartların elüsyonunu gösteren şekil aşağıda verilmiştir. Elüsyon grafiğinde, grafiğin net görülmesi amacıyla, sadece standartların en yoğun geldiği hacimler alındı. Standartların ve numunelerin  $K_{av}$  değerleri ile hesaplanan molekül kütleleri Çizelge 4.8’de verilmiştir.



**Şekil 4.8.** Jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile enzimlerin molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla kullanılan standartların kolondan elüsyon grafiği.

\*Void hacim için Blue Dekstran (A: 2,000 kDa. Standart olarak  $\beta$ -amilaz (B: 200 kDa), alkol dehidrogenaz (C:150 kDa), bovin serum albümin (D: 66 kDa) ve karbonik anhidraz (E: 29 kDa) kullanıldı.



**Şekil 4.9.** Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini yapmak için oluşturulan logMA- $K_{av}$  grafiği.

**Çizelge 4.9.** Sıçan kalp ve akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin jel filtrasyon sonucu molekül kütleleri

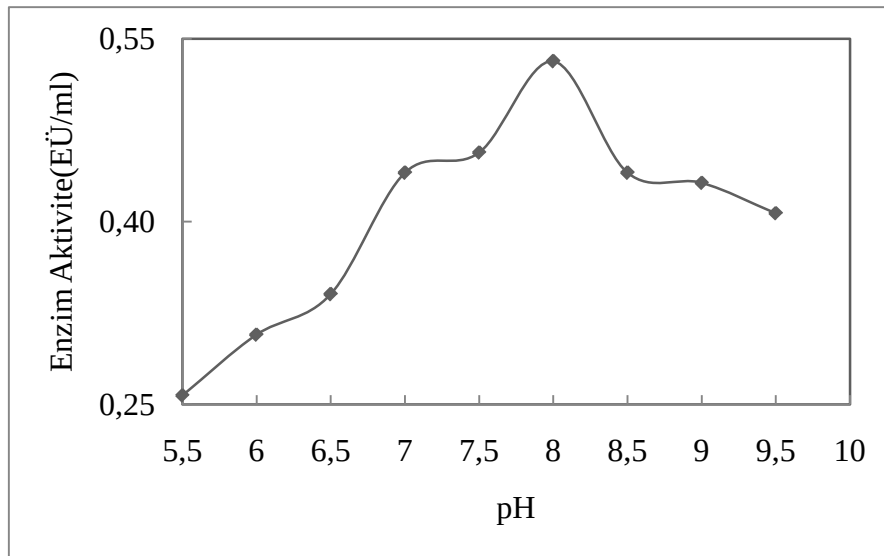
| Protein ve Enzimler           | K <sub>av</sub> değeri | Molekül Kütleleri (kDa) |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------|
| β-amilaz (standart)           | 0,081                  | 200                     |
| Alkol dehidrogenaz (standart) | 0,118                  | 150                     |
| Albümin (standart)            | 0,326                  | 66                      |
| Karbonik anhidraz (standart)  | 0,518                  | 29                      |
| Akciğer GR                    | 0,183                  | 121                     |
| Akciğer 6PGD                  | 0,212                  | 107                     |
| Akciğer G6PD                  | 0,159                  | 134                     |
| Kalp GR                       | 0,183                  | 121                     |
| Kalp 6PGD                     | 0,193                  | 116                     |
| Kalp G6PD                     | 0,159                  | 134                     |

#### 4.5. Enzimlerin Optimum Şartlarının, $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi ve Ürün İnhibisyon Çalışmalarının sonuçları

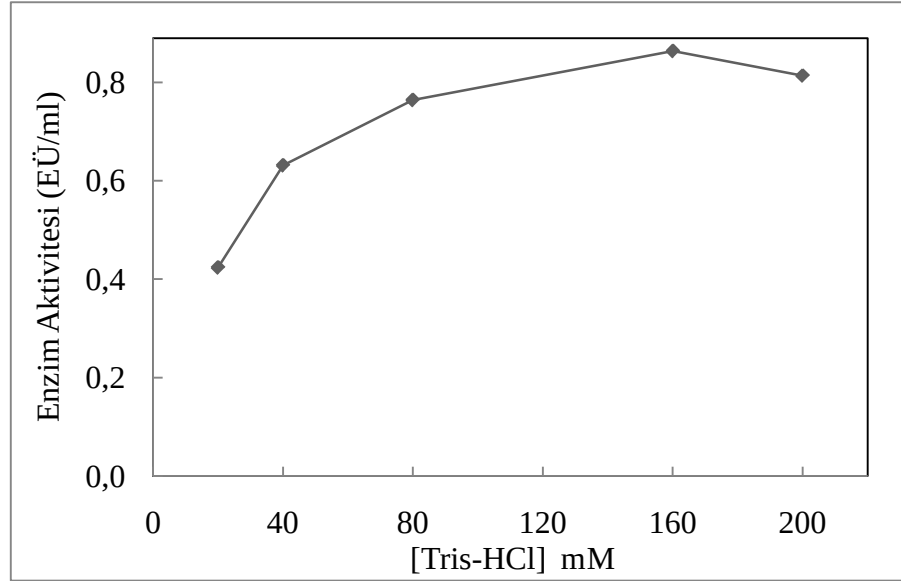
Çalışmalar bölüm 3.2.6’de belirtildiği şekliyle yapıldı. Çalışmaların sonucu elde edilen şekiller ve toplu sonuçlar çizelge halinde aşağıda verilmiştir.

##### 4.5.1. Sıçan akciğerinden saflaştırılan enzimler

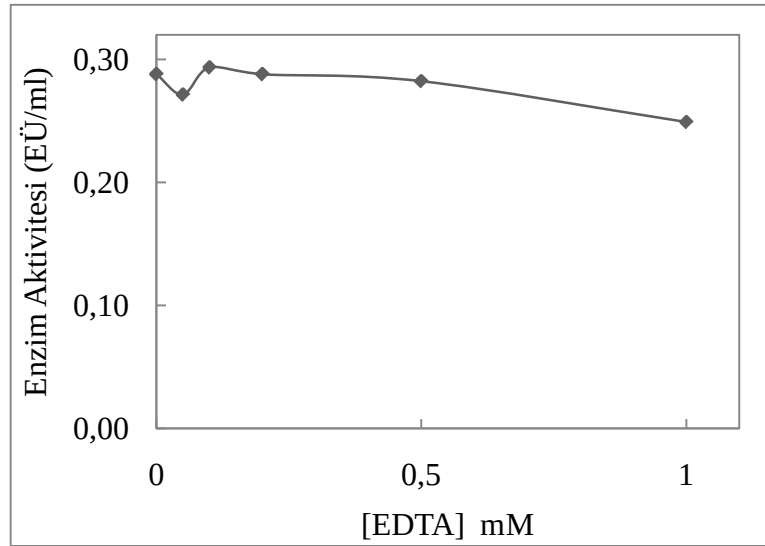
##### 4.5.1.a. Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları



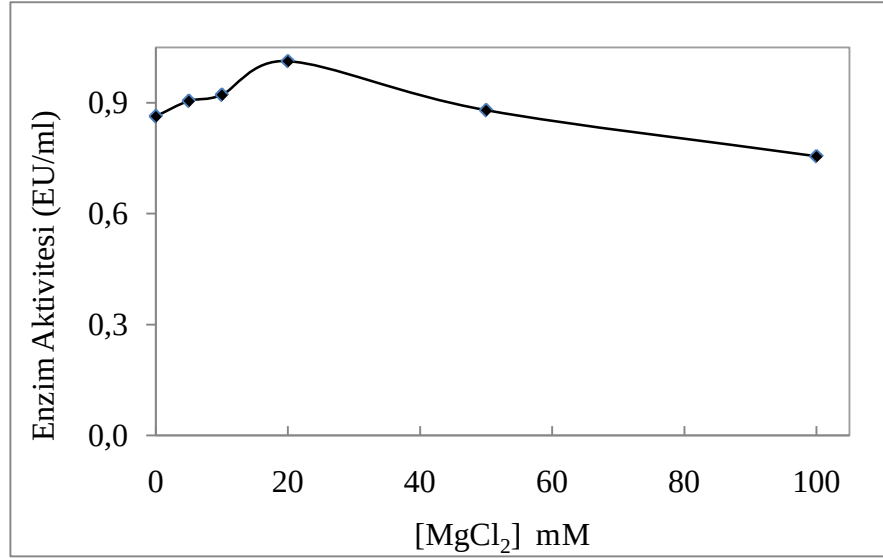
**Şekil 4.10.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



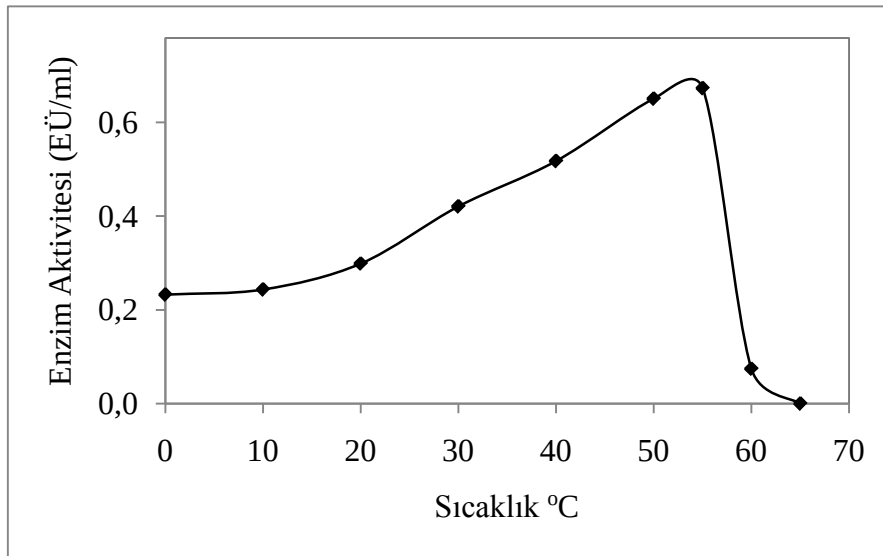
**Şekil 4.11.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD için iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



**Şekil 4.12.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik

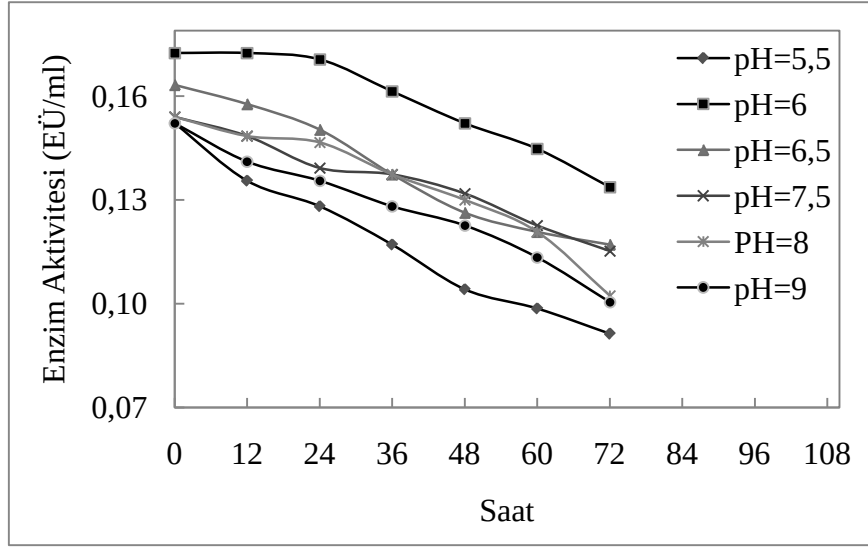


**Şekil 4.13.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik



**Şekil 4.14.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik





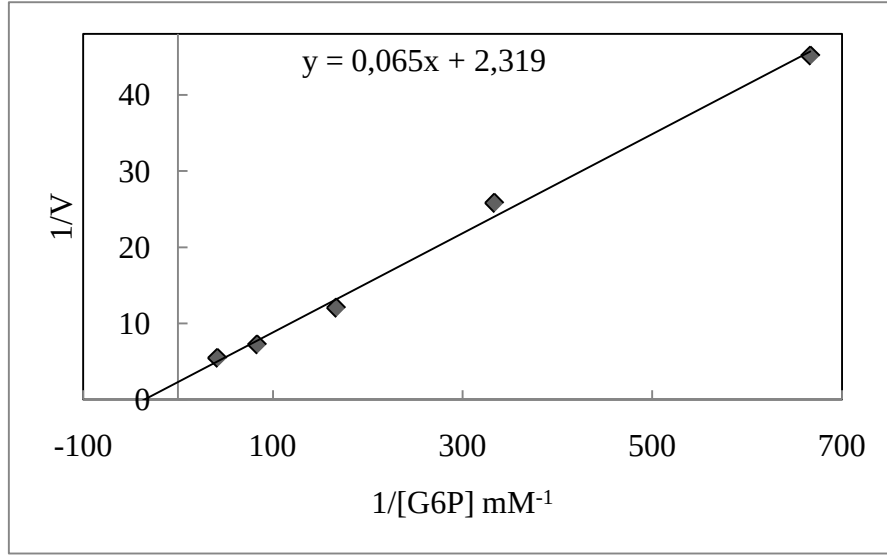
**Şekil 4.15.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik

**Çizelge 4.10.** Sıçan akciğeri G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

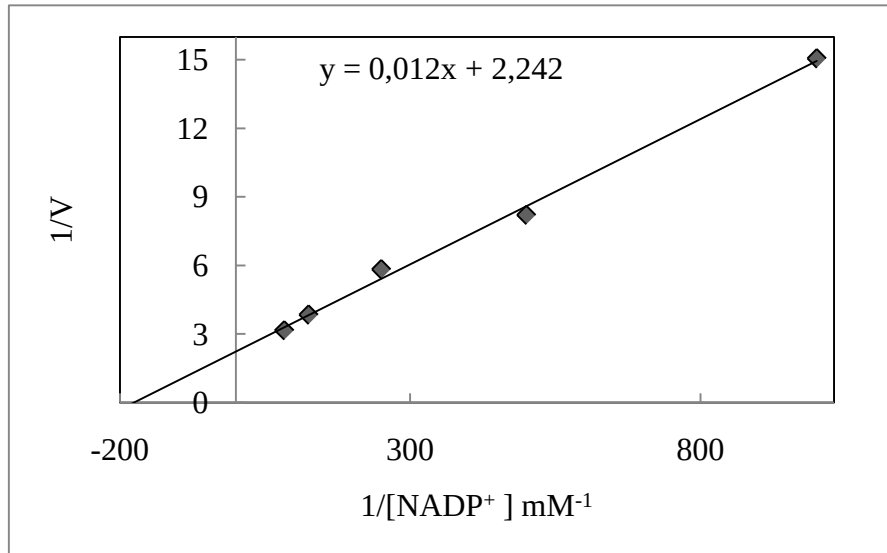
|                                          |                 |
|------------------------------------------|-----------------|
| Optimum pH                               | Tris-HCl pH=8   |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | Tris-HCl 160 mM |
| Optimum sıcaklık                         | 55°C            |
| Stabil pH                                | Fosfat pH=6     |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,1 mM          |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 20 mM           |

**Çizelge 4.11.** Sıçan akciğeri G6PD enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

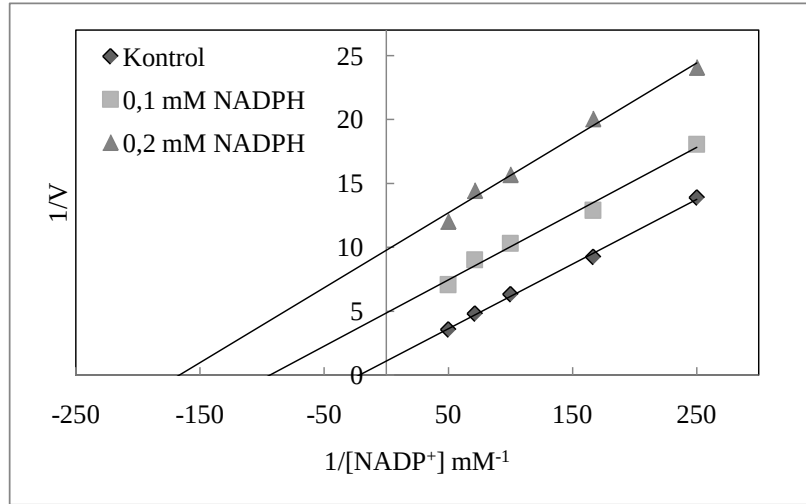
| Substratlar       | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------------|------------|-------------------|
| NADP <sup>+</sup> | 0,0053     | 0,446             |
| G6P               | 0,028      | 0,431             |



**Şekil 4.16.** Sıçan akciğer G6PD enziminin  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik.



**Şekil 4.17.** Sıçan akciğer G6PD enziminin  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerlerini bulmak için 5 farklı  $\text{NADP}^+$  derişimi kullanılarak çizilen grafik.

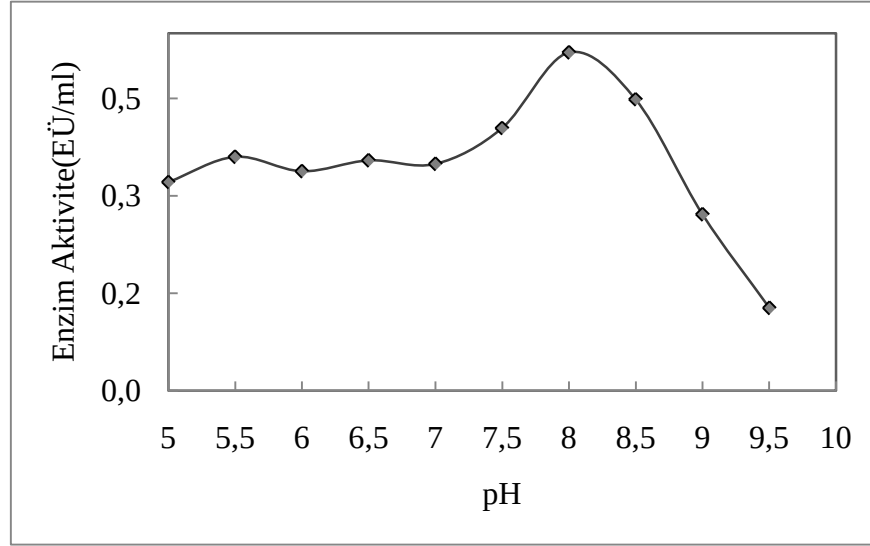


**Şekil 4.18.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD enziminde NADPH için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

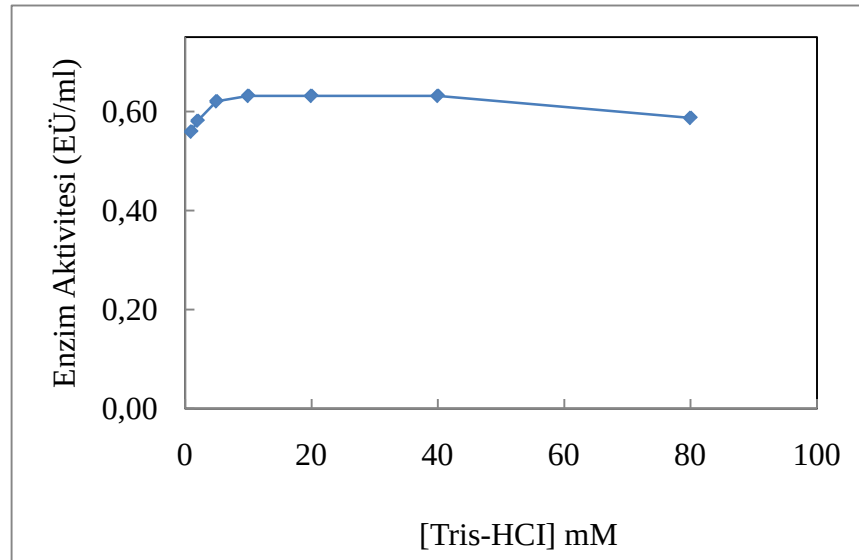
**Çizelge 4.12.** Sıçan akciğeri 6PGD enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

| Ürün                | [I] (mM)   | $K_i$ (mM)     | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|---------------------|------------|----------------|---------------------|-----------------|
| NADPH ( $V_{max}$ ) | 0,1<br>0,2 | 0,029<br>0,025 | $0,027 \pm 0,002$   | Yarı Yarışmalı  |
| NADPH ( $K_M$ )     | 0,1<br>0,2 | 0,030<br>0,030 | $0,030 \pm 0,0001$  | Yarı Yarışmalı  |

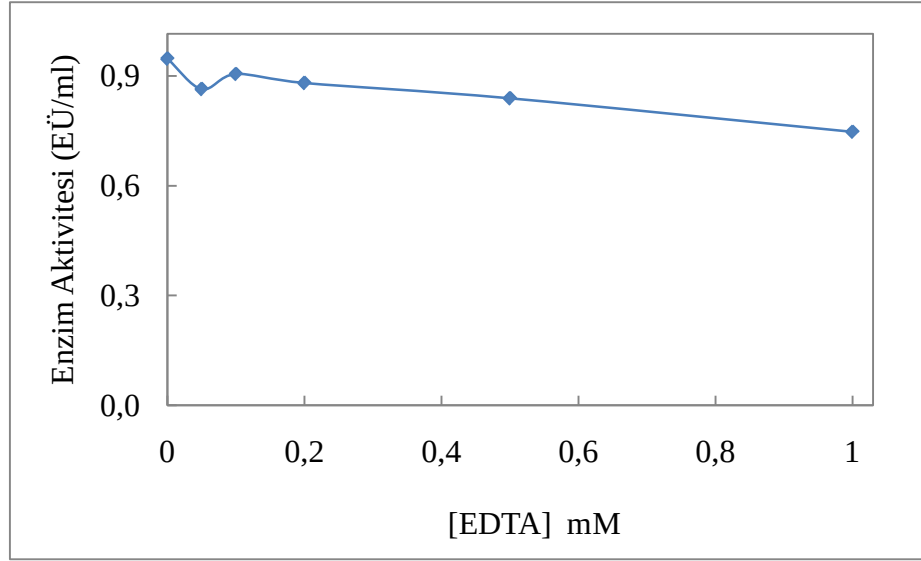
**4.5.1.b. Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları**



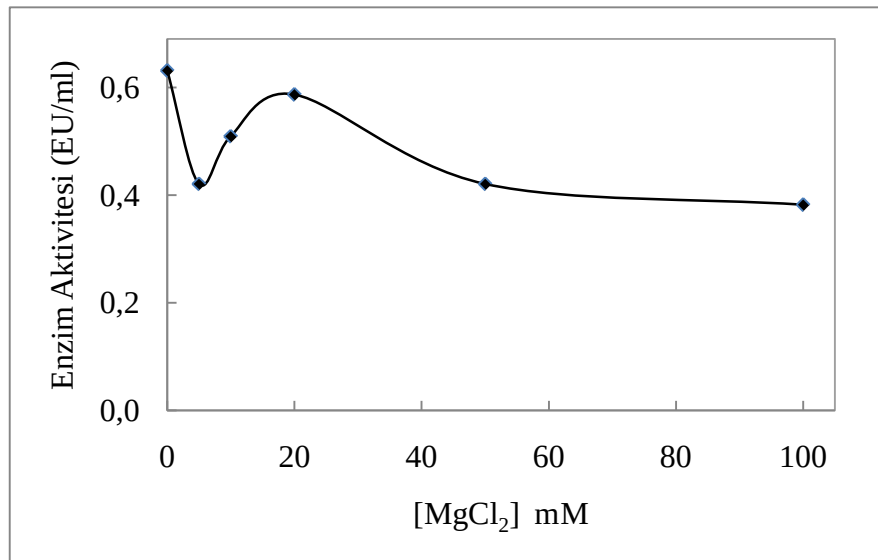
**Şekil 4.19.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



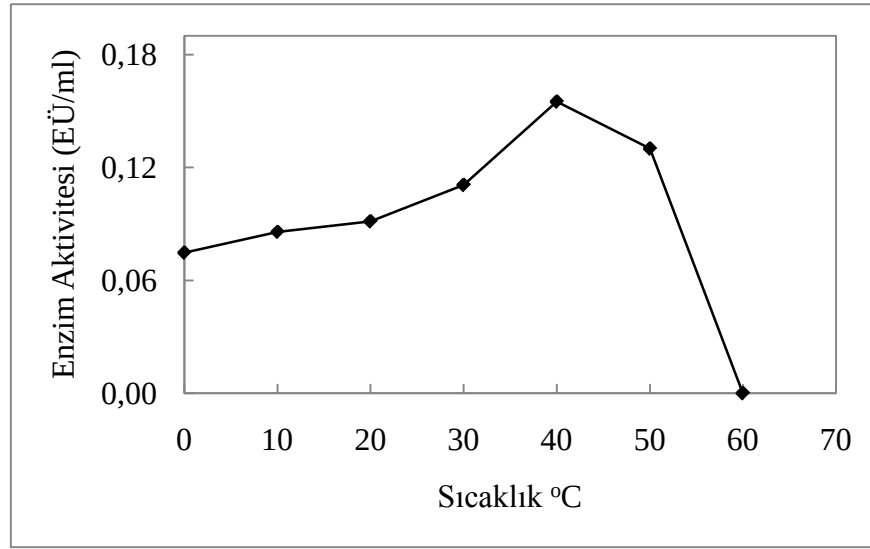
**Şekil 4.20.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD için iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



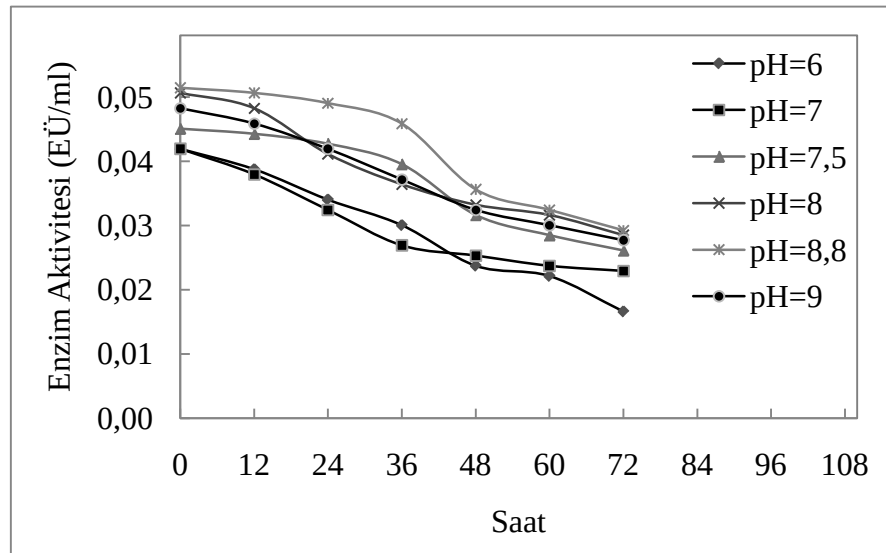
**Şekil 4.21.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik



**Şekil 4.22.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik



**Şekil 4.23.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik



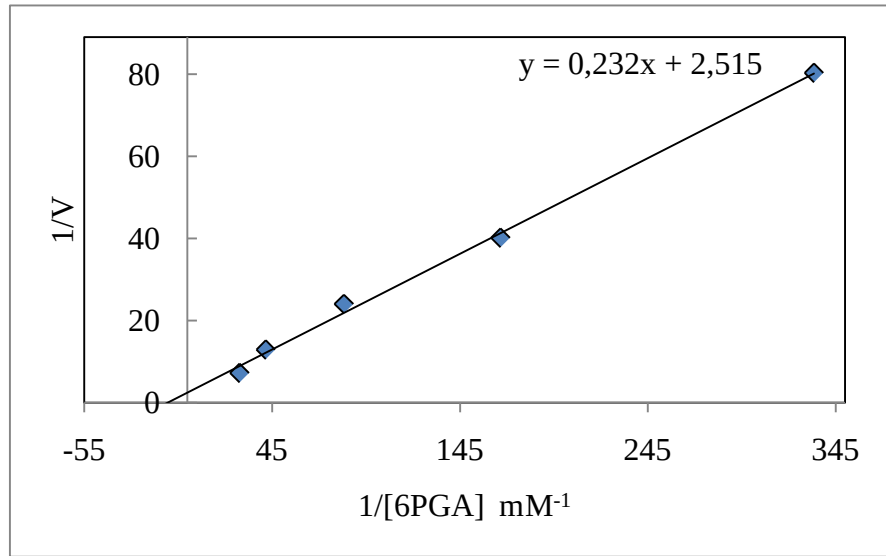
**Şekil 4.24.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik

**Çizelge 4.13.** Sıçan akciğeri 6PGD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

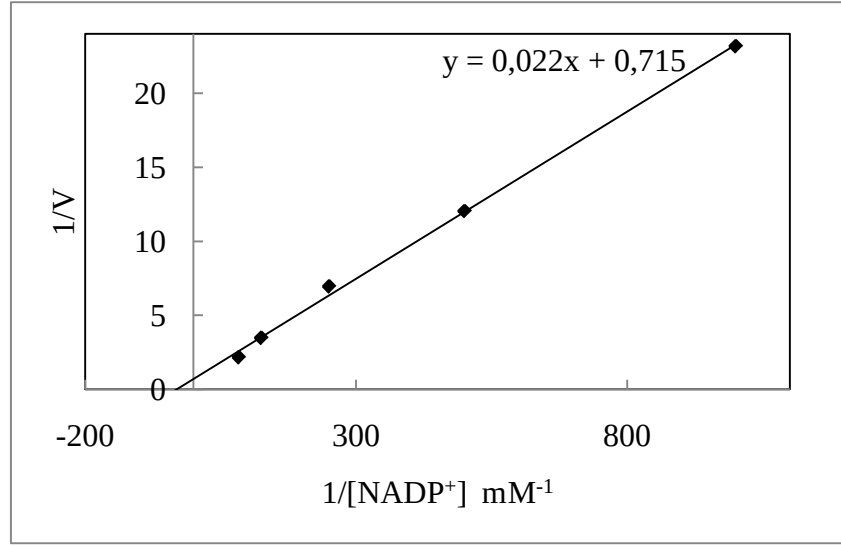
|                                          |                  |
|------------------------------------------|------------------|
| Optimum pH                               | Tris-HCl pH=8    |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | Tris-HCl 5-40 mM |
| Optimum sıcaklık                         | 40°C             |
| Stabil pH                                | Tris-HCl pH=8,5  |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,1 mM           |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 20 mM            |

**Çizelge 4.14.** Sıçan akciğeri 6PGD enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

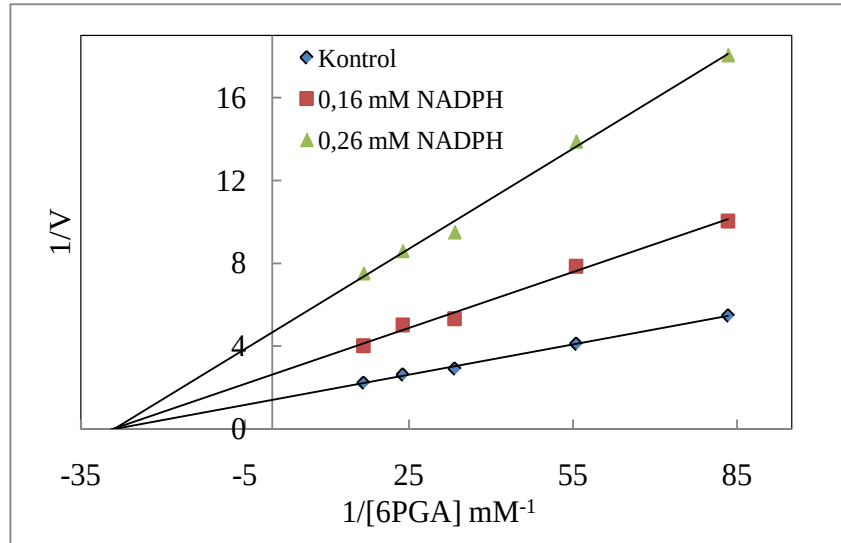
| Substratlar       | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------------|------------|-------------------|
| NADP <sup>+</sup> | 0,030      | 1,398             |
| 6PGA              | 0,092      | 0,397             |



**Şekil 4.25.** Sıçan akciğer 6PGD enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini bulmak için 5 farklı 6PGA derişimi kullanılarak çizilen grafik.



**Şekil 4.26.** Sıçan akciğer 6PGD enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini bulmak için 5 farklı  $NADP^+$  derişimi kullanılarak çizilen grafik.



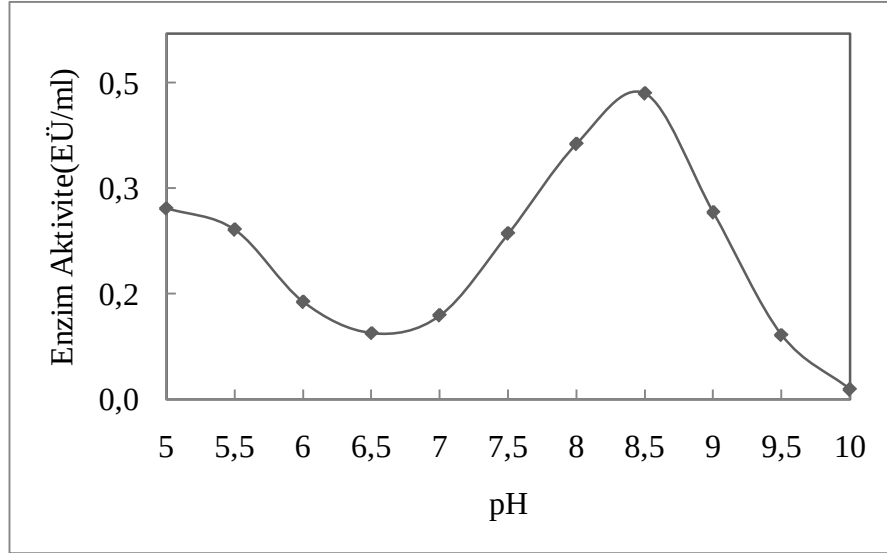
**Şekil 4.27.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminde NADPH için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.15.** Sıçan akciğeri 6PGD enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

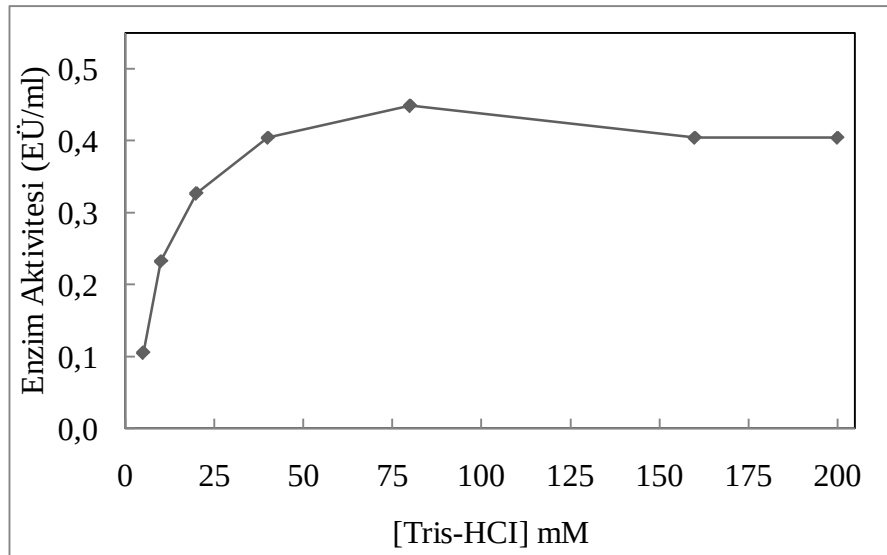
| Ürün  | [I] (mM) | $K_i$ (mM) | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|-------|----------|------------|---------------------|-----------------|
| NADPH | 0,16     | 0,183      | 0,147±0,05          | Yarışmasız      |
|       | 0,26     | 0,111      |                     |                 |



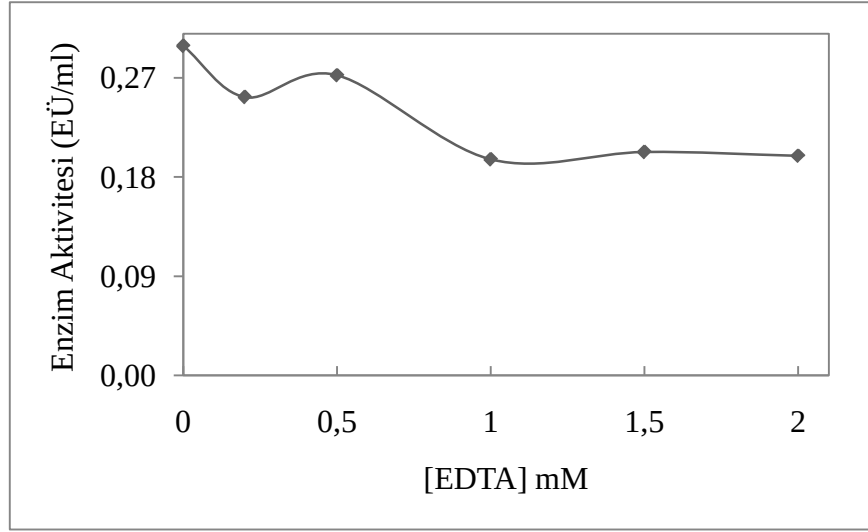
**4.5.1.c. Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları**



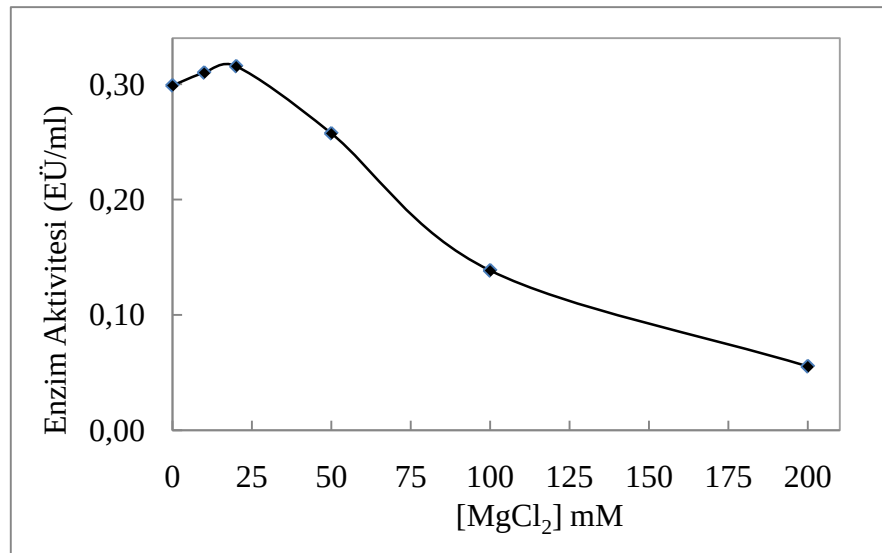
**Şekil 4.28.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



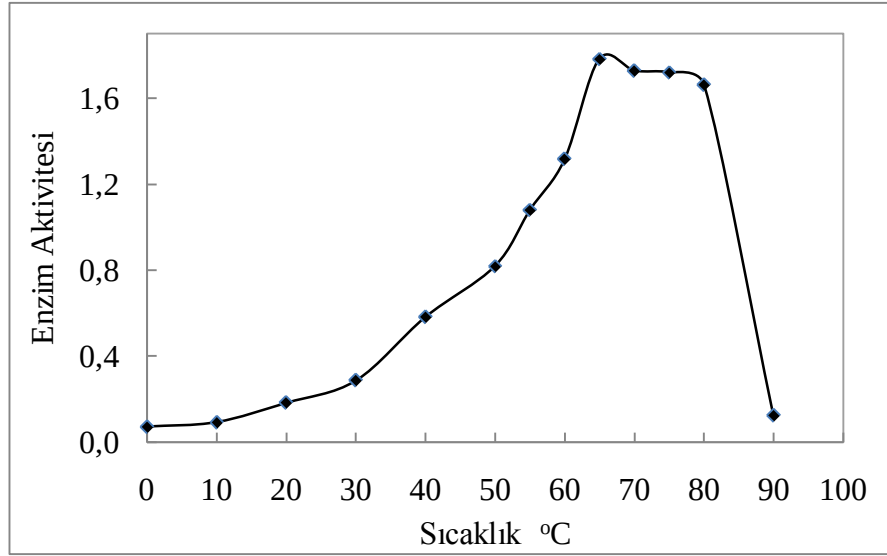
**Şekil 4.29.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR için iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



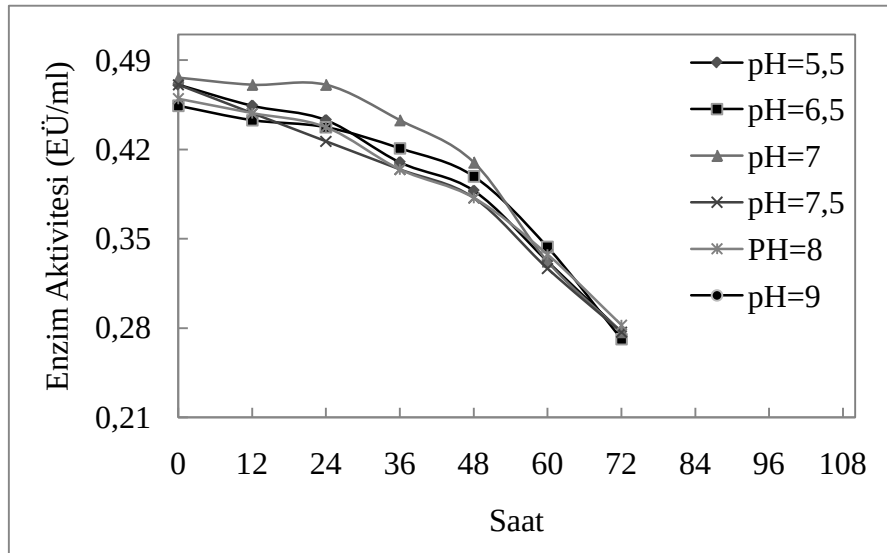
**Şekil 4.30.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik



**Şekil 4.31.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin aktivite hesaplamasında kullanılan optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesi için çizilen grafik



**Şekil 4.32.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik



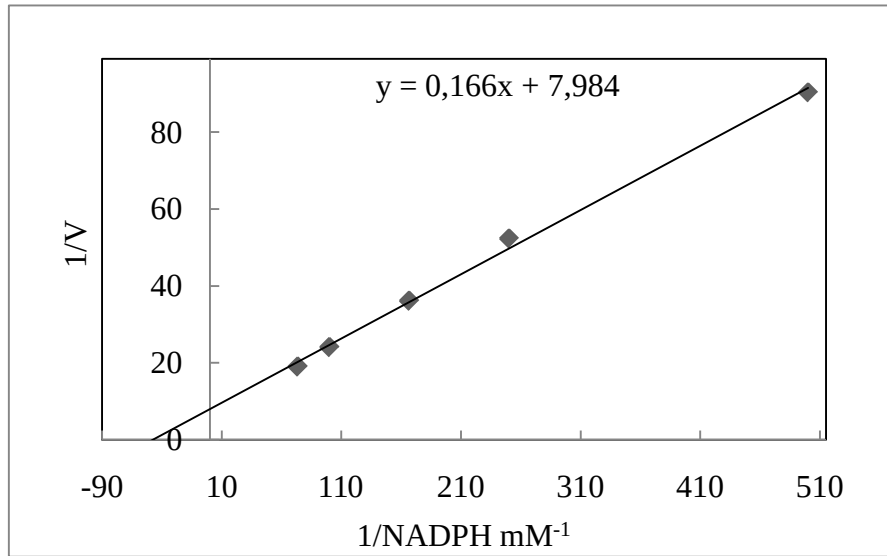
**Şekil 4.33.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için çizilen grafik

**Çizelge 4.16.** Sıçan akciğeri GR enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

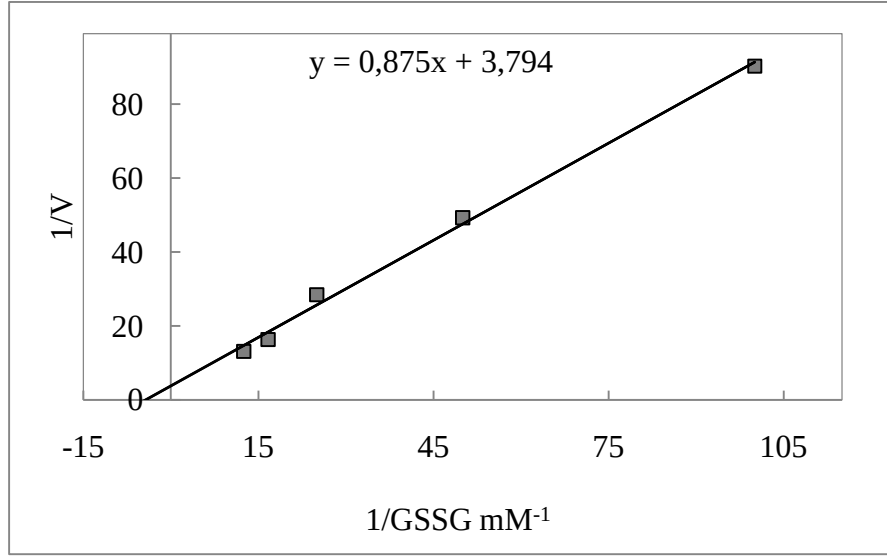
|                                          |                 |
|------------------------------------------|-----------------|
| Optimum pH                               | Tris-HCl pH=8,5 |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | Tris-HCl 80 mM  |
| Optimum sıcaklık                         | 60°C            |
| Stabil pH                                | Fosfat pH =7,0  |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,5 mM          |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 20 mM           |

**Çizelge 4.17.** Sıçan akciğeri GR enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

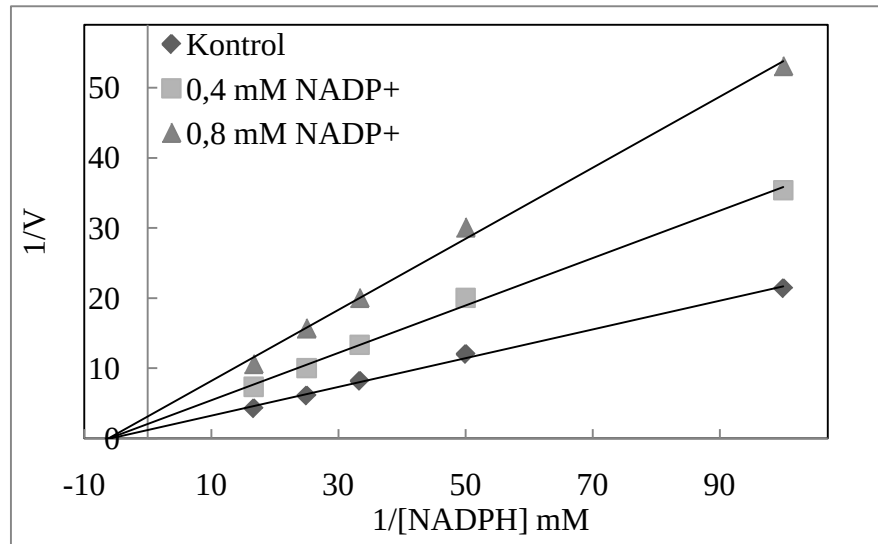
| Substratlar | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------|------------|-------------------|
| NADPH       | 0,020      | 0,125             |
| GSSG        | 0,230      | 0,263             |



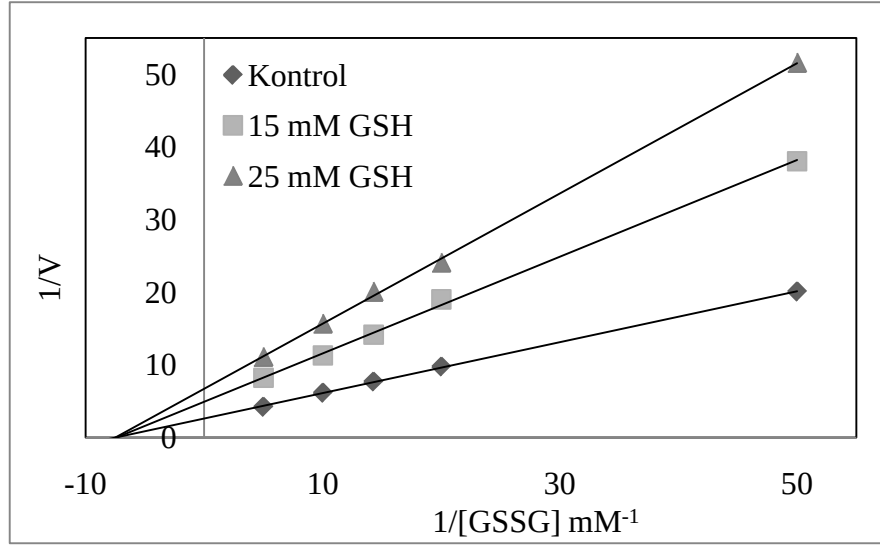
**Şekil 4.34.** 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak sıçan akciğेरinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik.



**Şekil 4.35.** 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik.



**Şekil 4.36.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminde NADP<sup>+</sup> için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı



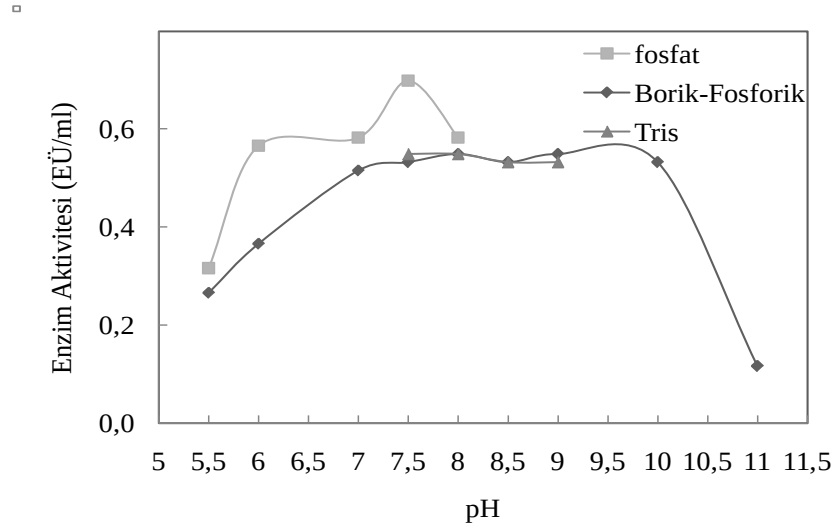
**Şekil 4.37.** Sıçan akciğerinden saflaştırılan GR enziminde GSH için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.18.** Sıçan akciğeri GR enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

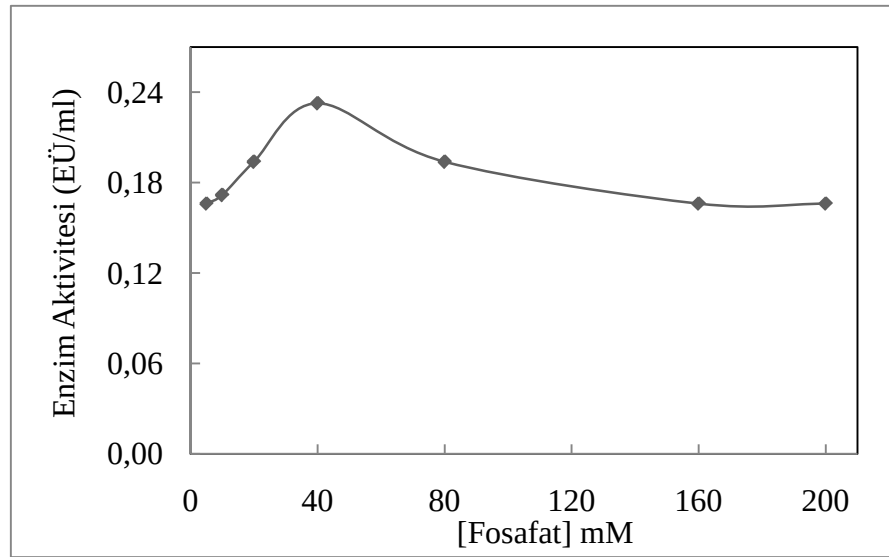
| Ürün              | [I] (mM) | $K_i$ (mM) | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|-------------------|----------|------------|---------------------|-----------------|
| GSH               | 15       | 17,45      | 16,66±1,11          | Yarışmasız      |
|                   | 25       | 15,87      |                     |                 |
| NADP <sup>+</sup> | 0,4      | 0,564      | 0,531±0,04          | Yarışmasız      |
|                   | 0,8      | 0,498      |                     |                 |

#### 4.5.2. Sıçan kalbinden saflaştırılan enzimler

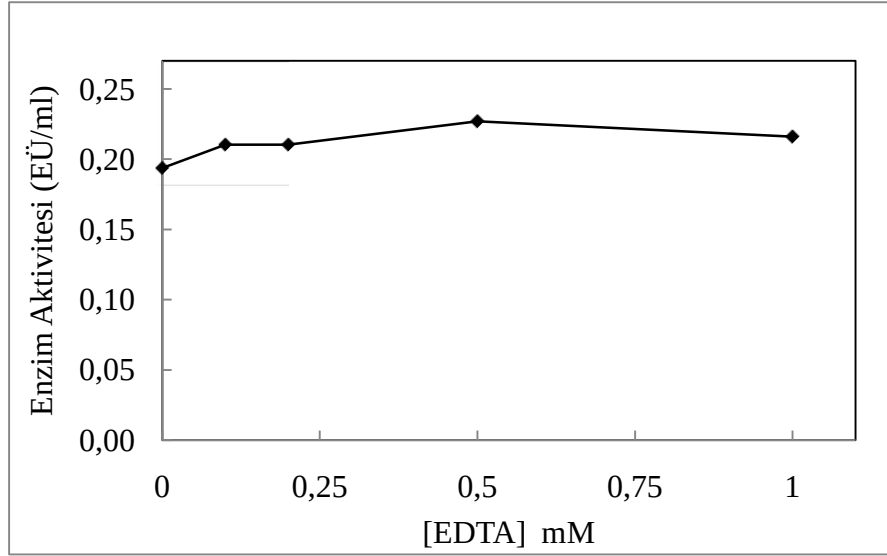
##### 4.5.2.a. Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları



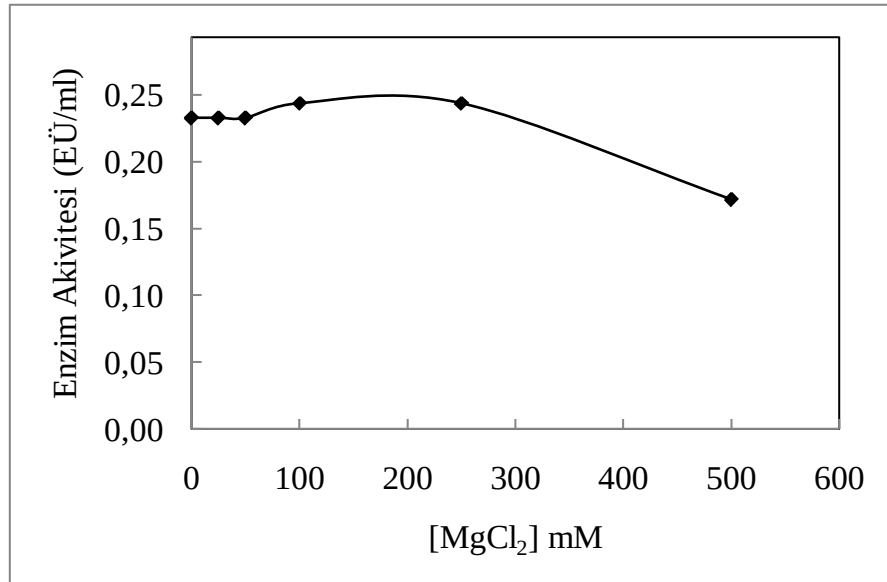
**Şekil 4.38.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



**Şekil 4.39.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

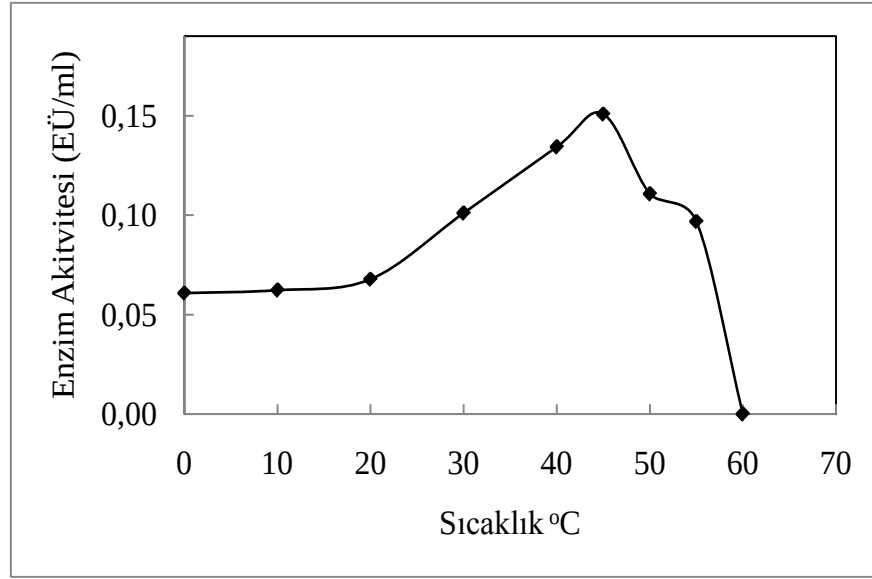


**Şekil 4.40.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

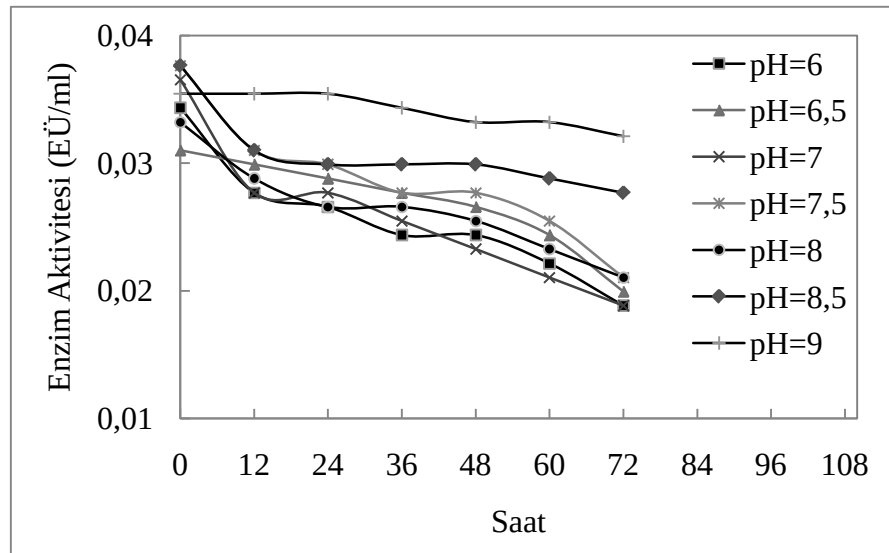


**Şekil 4.41.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik





**Şekil 4.42.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



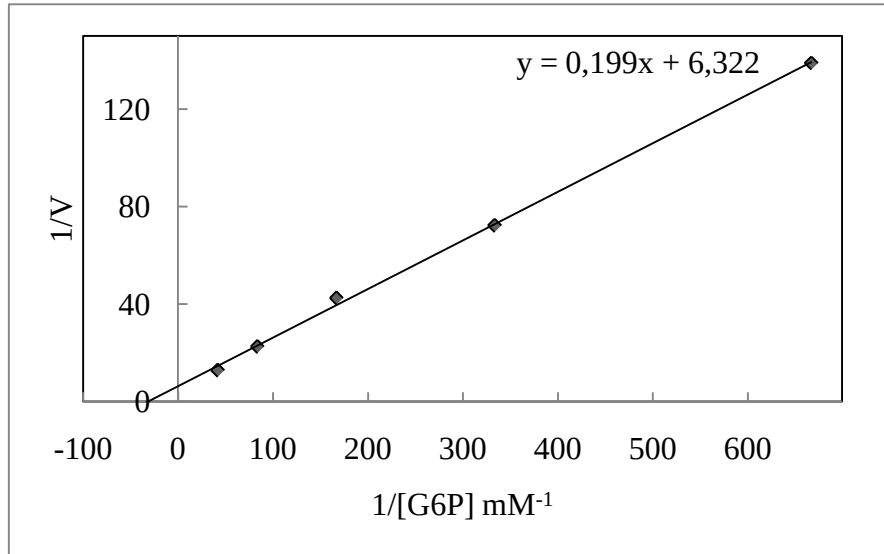
**Şekil 4.43.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

**Çizelge 4.19.** Sıçan kalbi G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

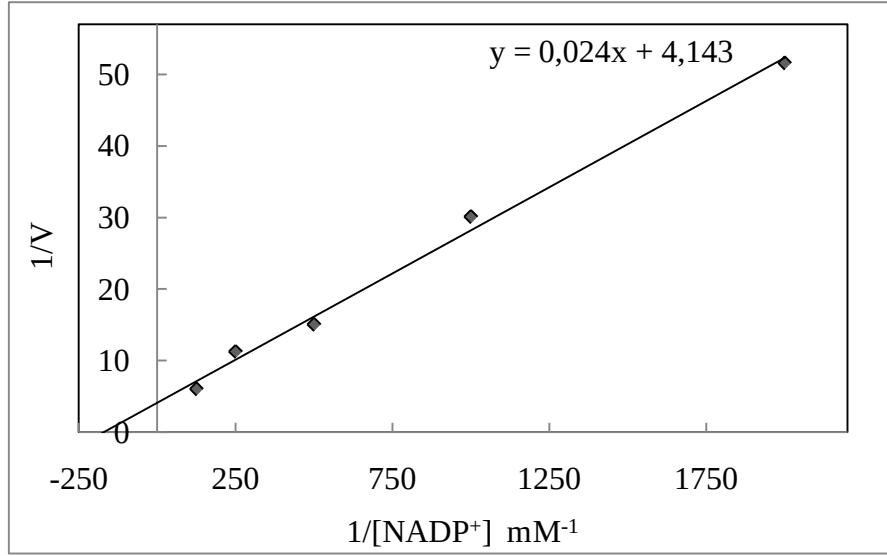
|                                          |                  |
|------------------------------------------|------------------|
| Optimum pH                               | Fosfat pH=7,5    |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | 40 mM Fosfat     |
| Optimum sıcaklı                          | 45°C             |
| Stabil pH                                | Tris-HCl pH =9,0 |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,5 mM           |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 100 mM           |

**Çizelge 4.20.** Sıçan kalbi G6PD enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

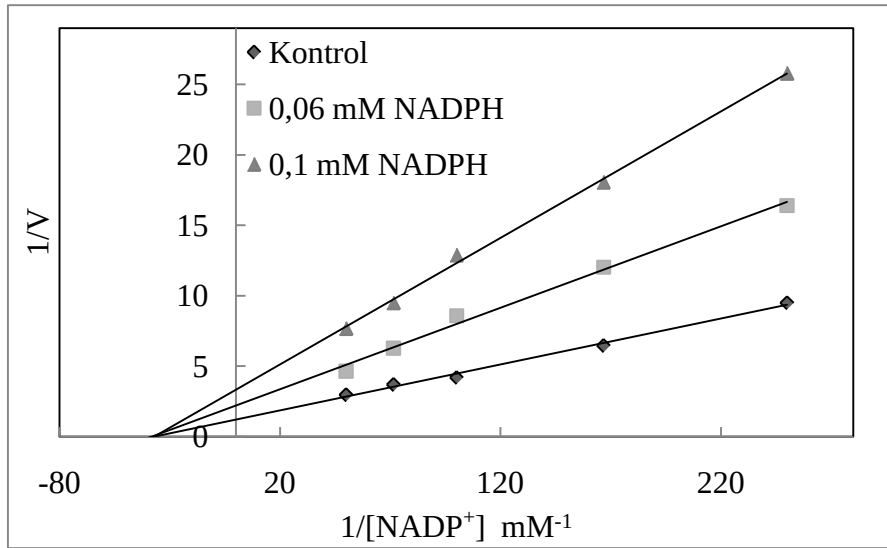
| Substratlar       | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------------|------------|-------------------|
| NADP <sup>+</sup> | 0,005      | 0,241             |
| G6PA              | 0,031      | 0,158             |



**Şekil 4.44.** 5 farklı G6PA derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için çizilen grafik.



**Şekil 4.45.** 5 farklı  $NADP^+$  derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enzimi için çizilen grafik.

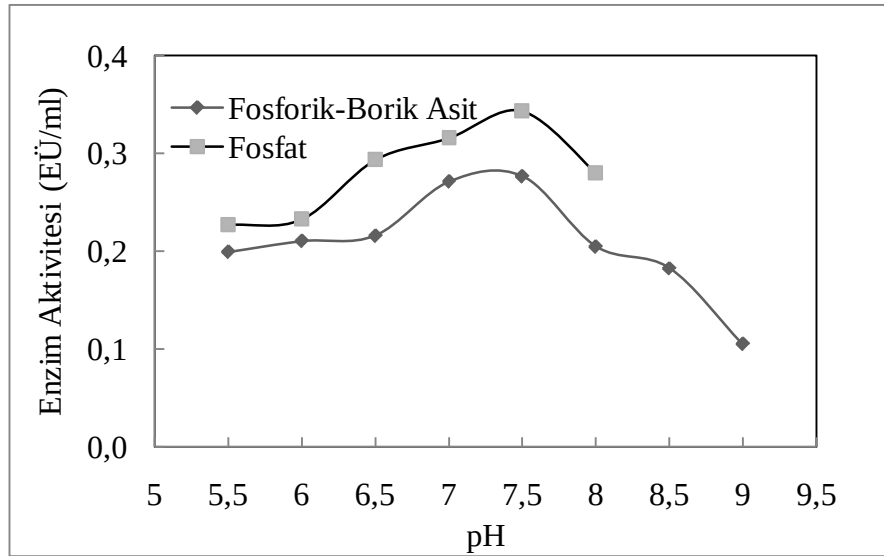


**Şekil 4.46.** Sıçan kalbinden saflaştırılan G6PD enziminde NADPH için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı

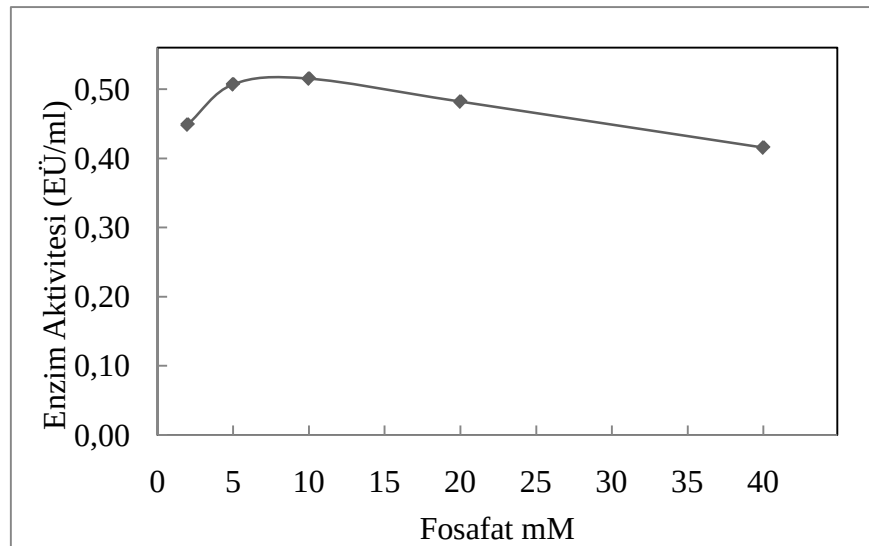
**Çizelge 4.21.** Sıçan kalbi G6PD enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

| Ürün  | [I] (mM)    | $K_i$ (mM)     | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|-------|-------------|----------------|---------------------|-----------------|
| NADPH | 0,06<br>0,1 | 0,070<br>0,056 | 0,063±0,009         | Yarışmasız      |

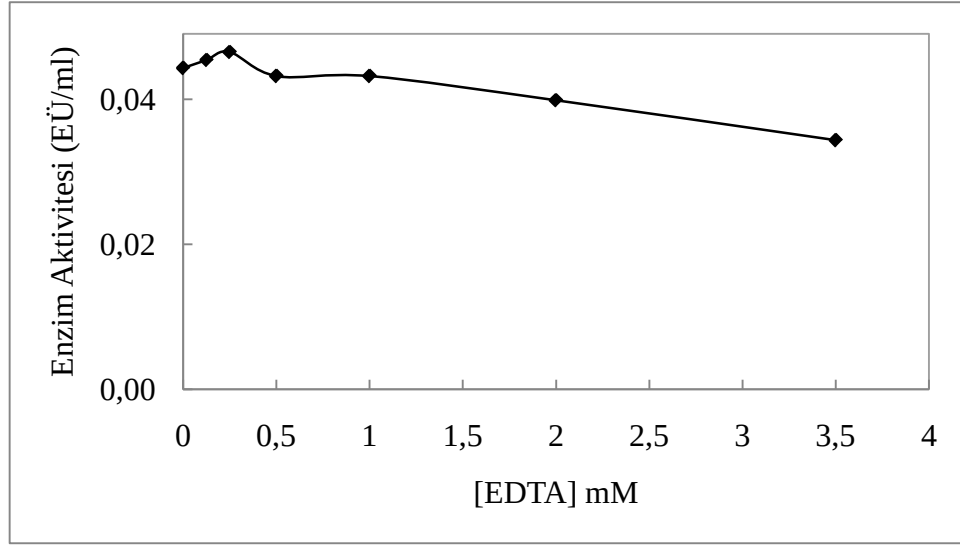
**4.5.2.b. Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları**



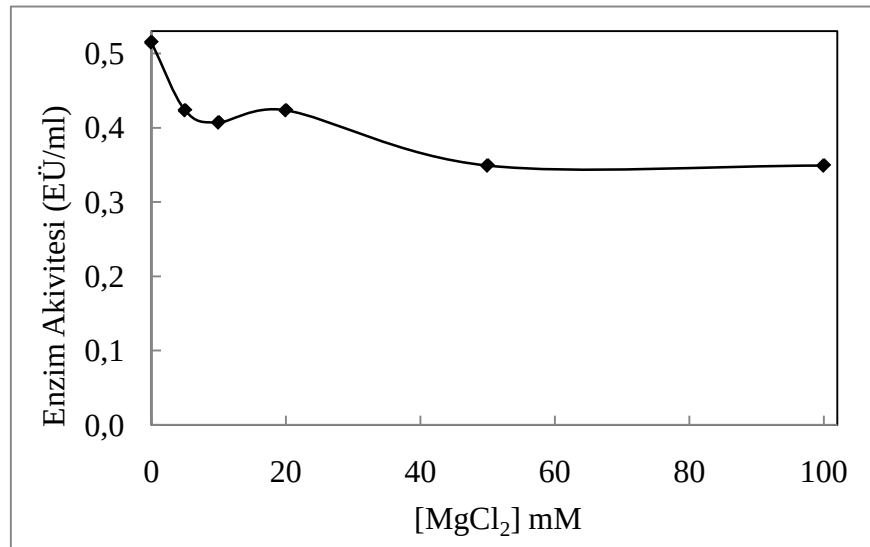
**Şekil 4.47.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



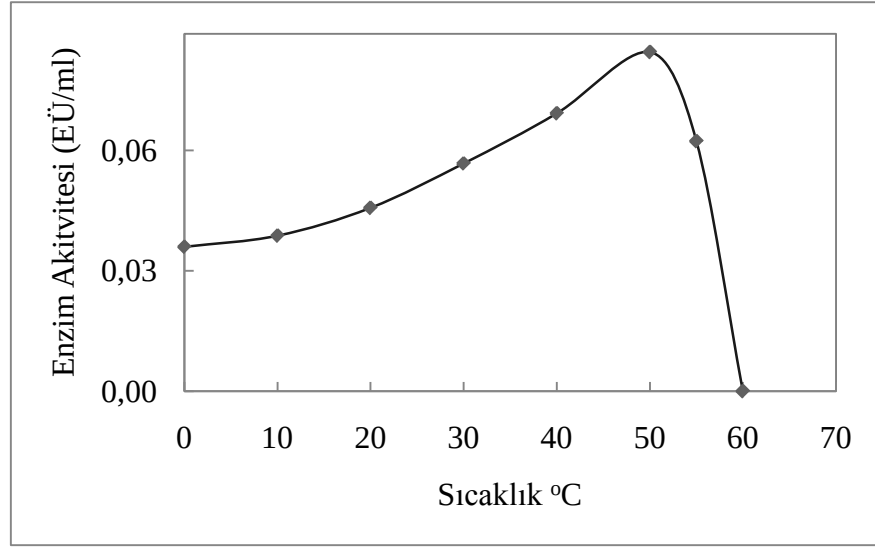
**Şekil 4.48.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



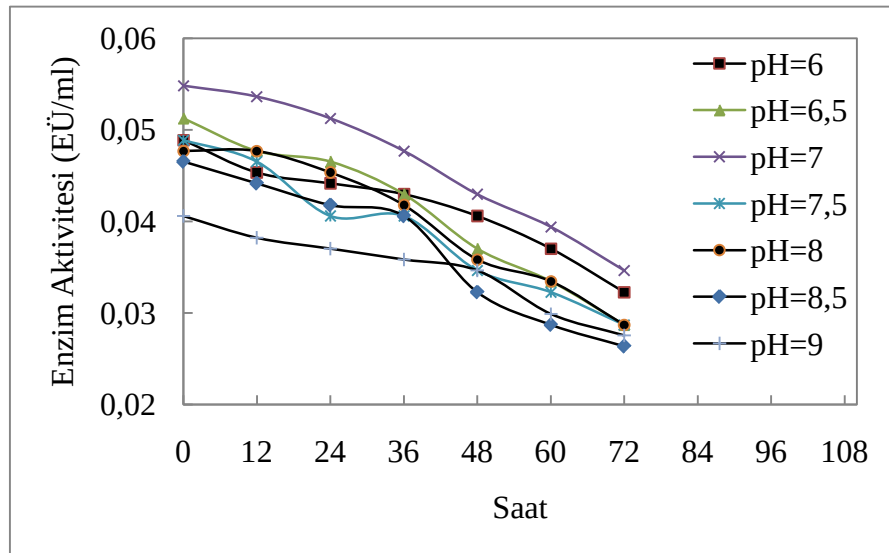
**Şekil 4.49.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



**Şekil 4.50.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



**Şekil 4.51.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



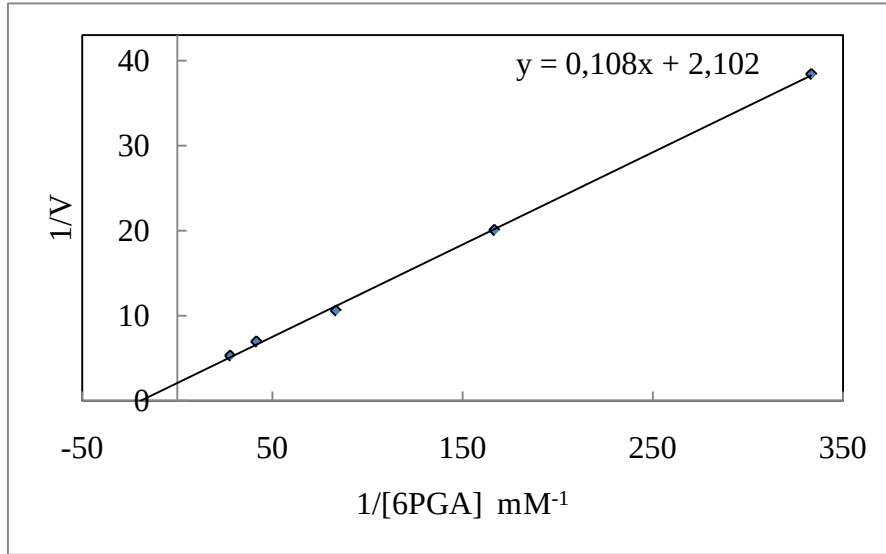
**Şekil 4.52.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

**Çizelge 4.22.** Sıçan kalbi 6PGD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

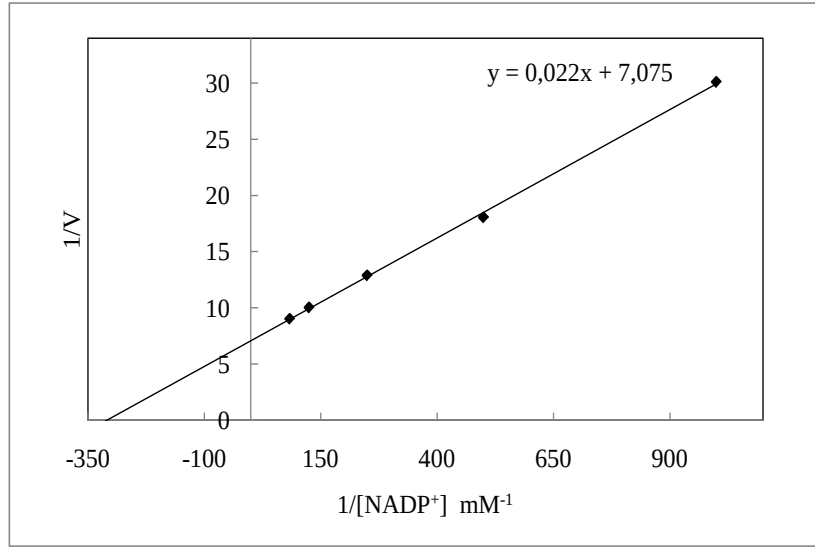
|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Optimum pH                               | Fosfat pH=7,5  |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | Fosfat 5 mM    |
| Optimum sıcaklık                         | 50°C           |
| Stabil pH                                | Fosfat pH =7,0 |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,125 mM       |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 20 mM          |

**Çizelge 4.23.** Sıçan kalbi 6PGD enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

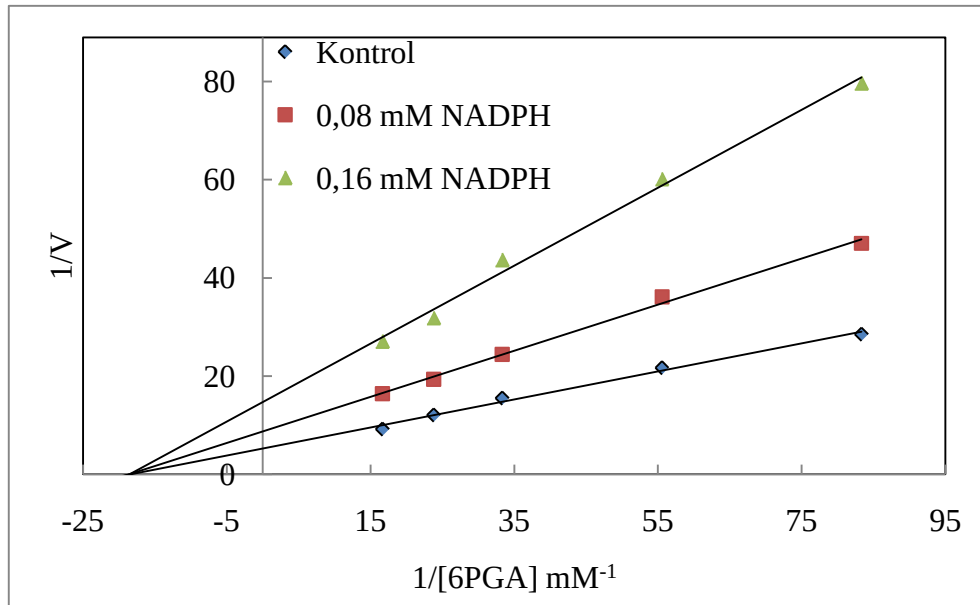
| Substratlar       | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------------|------------|-------------------|
| NADP <sup>+</sup> | 0,0031     | 0,141             |
| G6PA              | 0,051      | 0,475             |



**Şekil 4.53.** 5 farklı 6PGA derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için çizilen grafik.



**Şekil 4.54.** 5 farklı  $NADP^+$  derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enzimi için çizilen grafik.



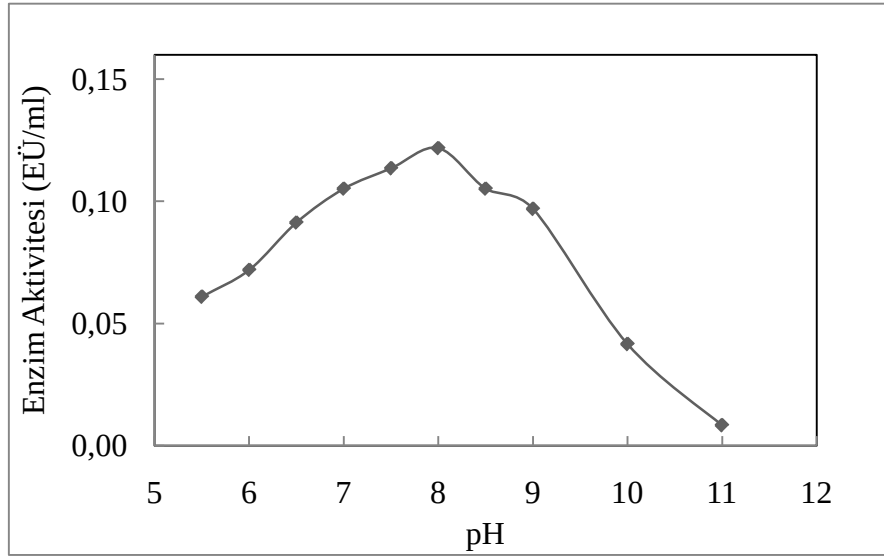
**Şekil 4.55.** Sıçan kalbinden saflaştırılan 6PGD enziminde  $NADPH$  için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiğı

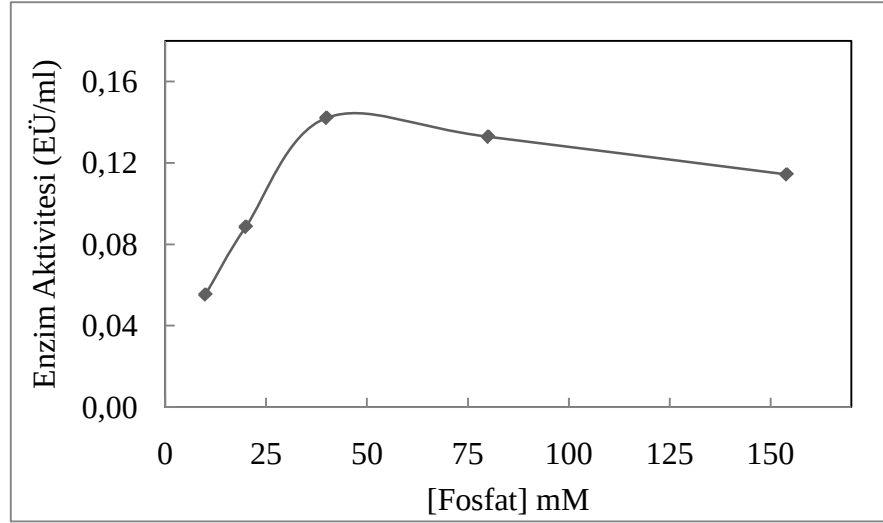


**Çizelge 4.24.** Sıçan kalbi 6PGD enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

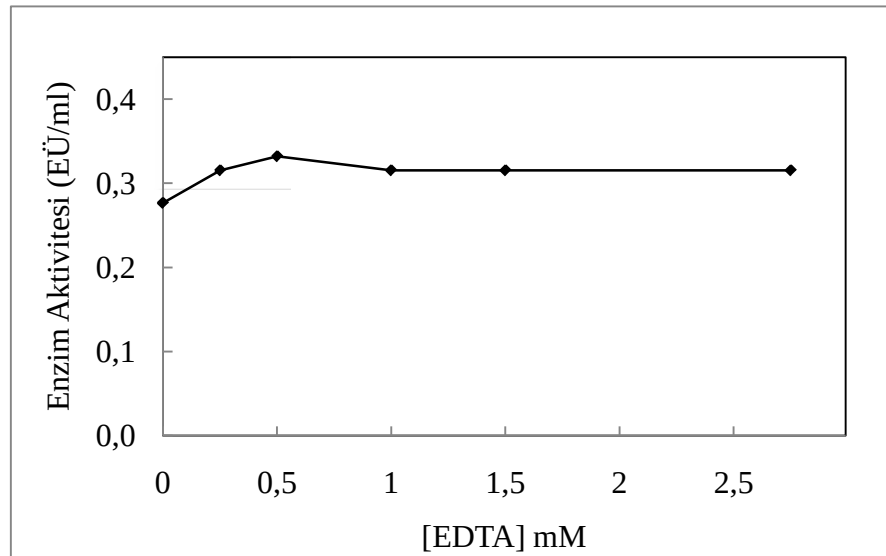
| Ürün  | [I] (mM)     | $K_i$ (mM)     | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|-------|--------------|----------------|---------------------|-----------------|
| NADPH | 0,08<br>0,16 | 0,114<br>0,083 | 0,099±0,02          | Yarışmasız      |

**4.5.2.c. Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için elde edilen kinetik çalışmaların sonuçları**

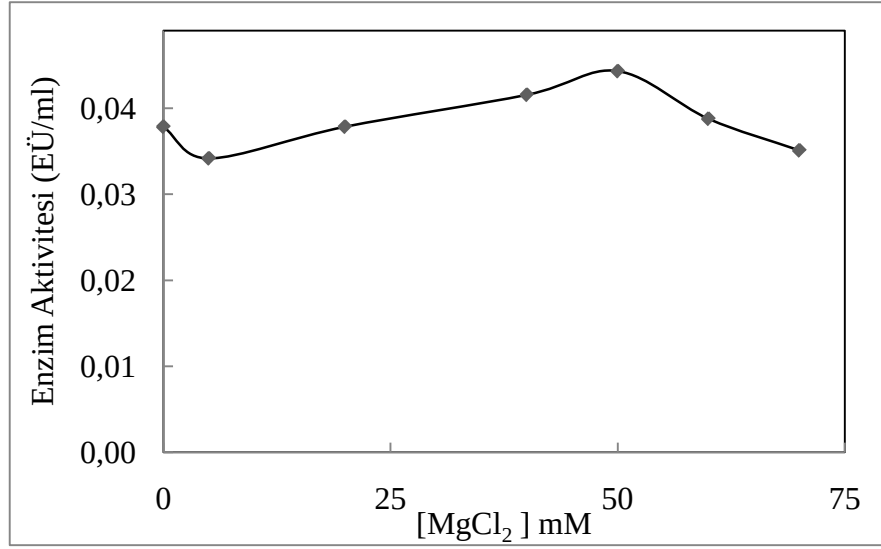
**Şekil 4.56.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



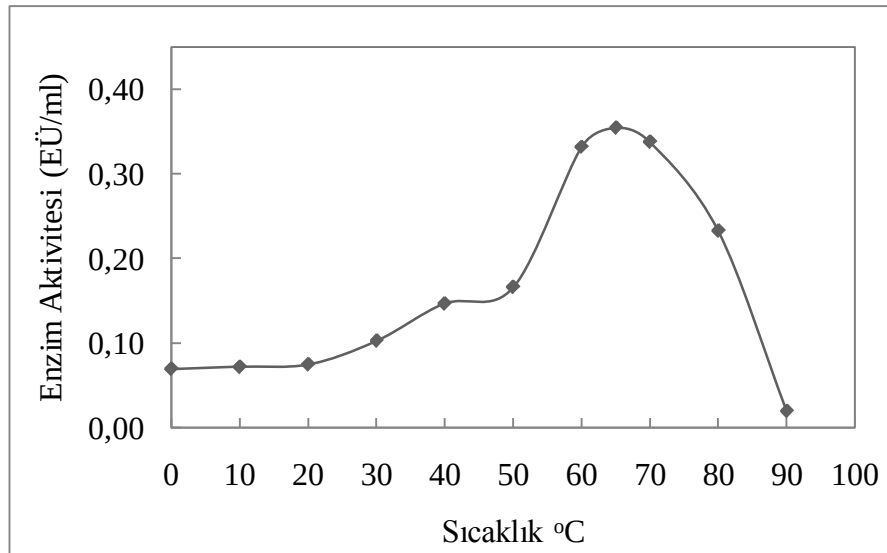
**Şekil 4.57.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



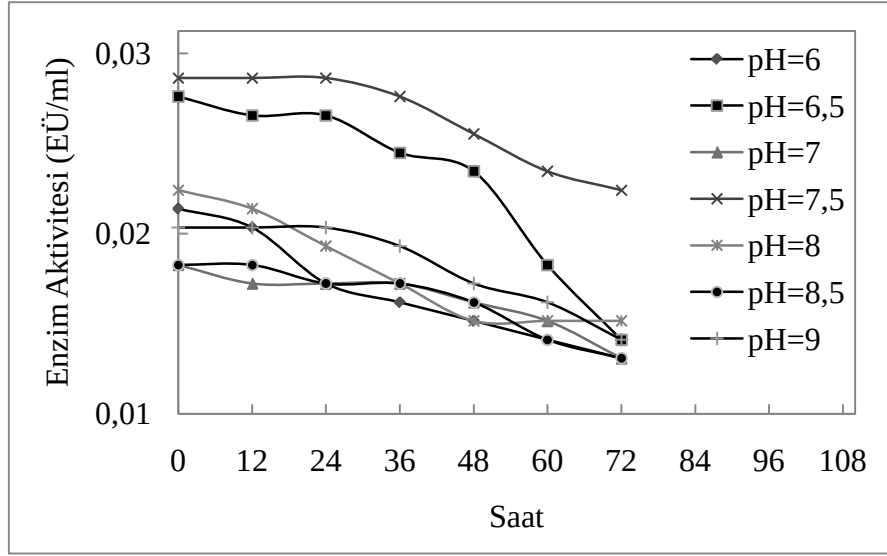
**Şekil 4.58.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum EDTA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



**Şekil 4.59.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum  $\text{MgCl}_2$  konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



**Şekil 4.60.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



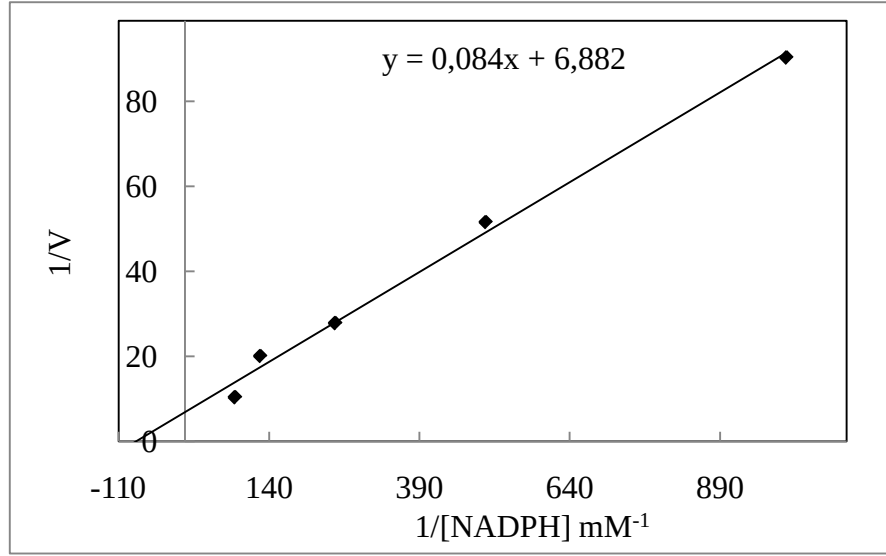
**Şekil 4.61.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

**Çizelge 4.25.** Sıçan kalbi GR enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

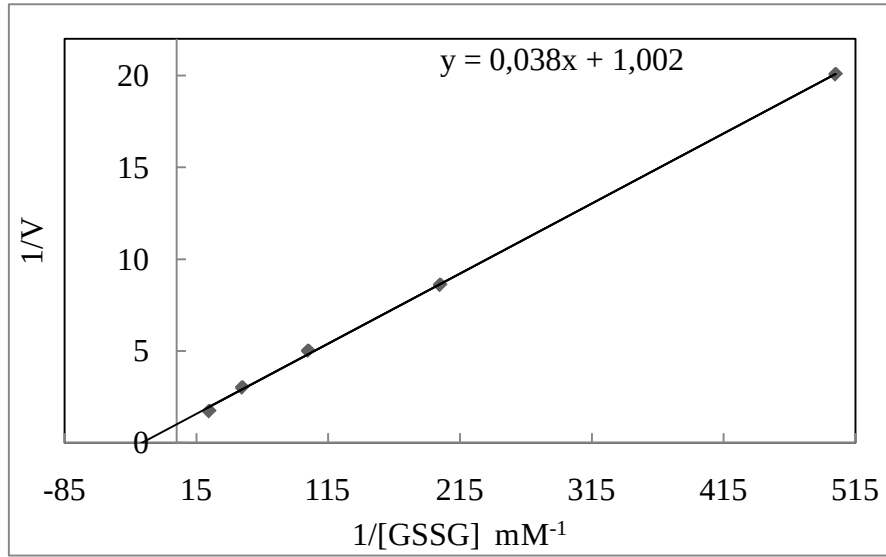
|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Optimum pH                               | Fosfat pH=8    |
| İyonik şiddet için tuz konsantrasyonu    | Fosfat 40 mM   |
| Optimum sıcaklık                         | 65°C           |
| Stabil pH                                | Fosfat pH =7,5 |
| Optimum EDTA konsantrasyonu              | 0,5 mM         |
| Optimum MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu | 50 mM          |

**Çizelge 4.26.** Sıçan kalbi GR enziminin substratları için bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri

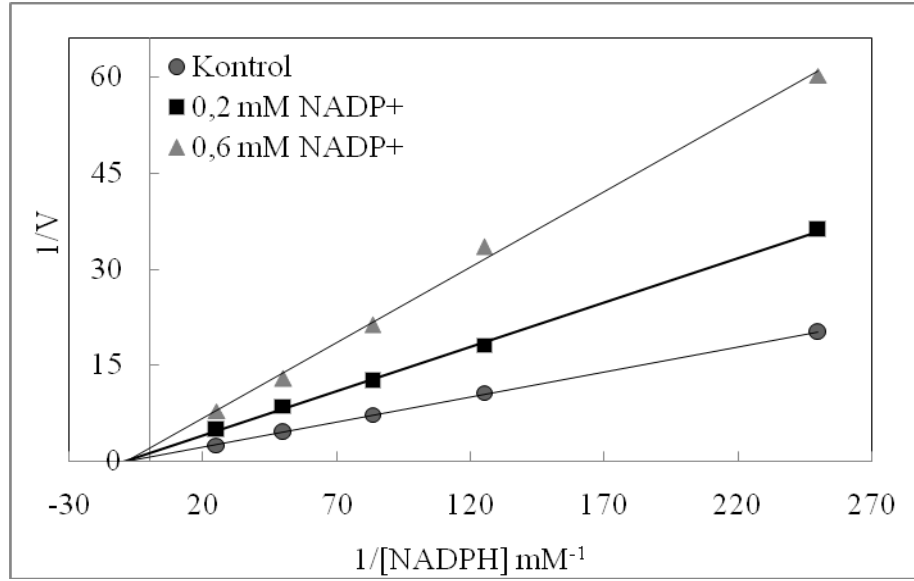
| Substratlar | $K_M$ (mM) | $V_{max}$ (EÜ/ml) |
|-------------|------------|-------------------|
| NADPH       | 0,012      | 0,145             |
| GSSG        | 0,037      | 0,998             |



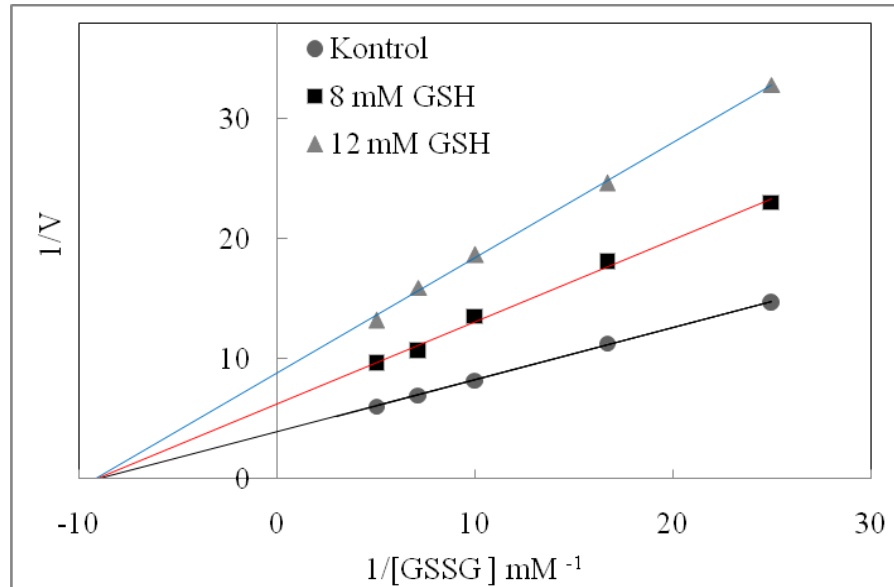
**Şekil 4.62.** 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik



**Şekil 4.63.** 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak sıçan kalbinden saflaştırılan GR enzimi için çizilen grafik.



**Şekil 4.64.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminde  $\text{NADP}^+$  için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.65.** Sıçan kalbinden saflaştırılan GR enziminde GSH için  $K_i$  sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

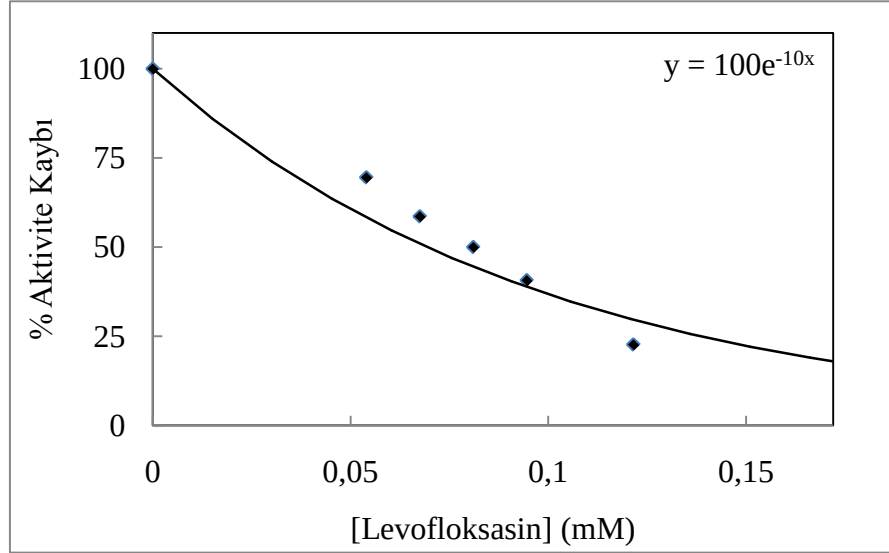
**Çizelge 4.27.** Sıçan kalbi GR enziminin ürünleri için bulunan  $K_i$  ve inhibisyon türü

| Ürün            | [I] (mM) | $K_i$ (mM) | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|-----------------|----------|------------|---------------------|-----------------|
| GSH             | 8        | 13,18      | 11,33±2,61          | Yarışmasız      |
|                 | 12       | 9,48       |                     |                 |
| $\text{NADP}^+$ | 0,2      | 0,212      | 0,250±0,053         | Yarışmasız      |
|                 | 0,6      | 0,288      |                     |                 |

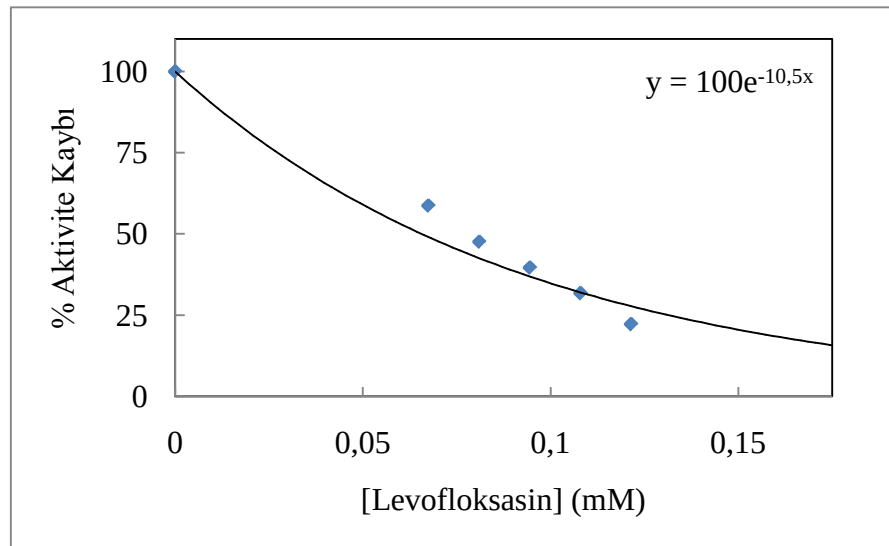
#### 4.6. İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

İlaçların hazırlandığı stok çözeltileri kullanılarak; akciğerden saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktivitesi üzerinede furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin, teofilin ilaçların ve kotininin, kalpden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerin aktivitesi üzerinede de digoksin, dopamin, furosemid, adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının inhibisyon etkilerine bakıldı. İlaçların inhibisyon etkisi gösterip göstermediği, inhibisyon etkisi gösterenlerin  $IC_{50}$  değeri, inhibisyon etkisi güçlü olanlar içinde  $K_i$  sabitleri belirlendi. Bu çalışmalara ait grafikler ilerleyen sayfalarda verilmiştir. Çalışmalarla ilgili toplu sonuçlar çizelgeler halinde verilmiştir.

**4.6.1. Sıçan akciğerden dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkilerinin sonuçları**

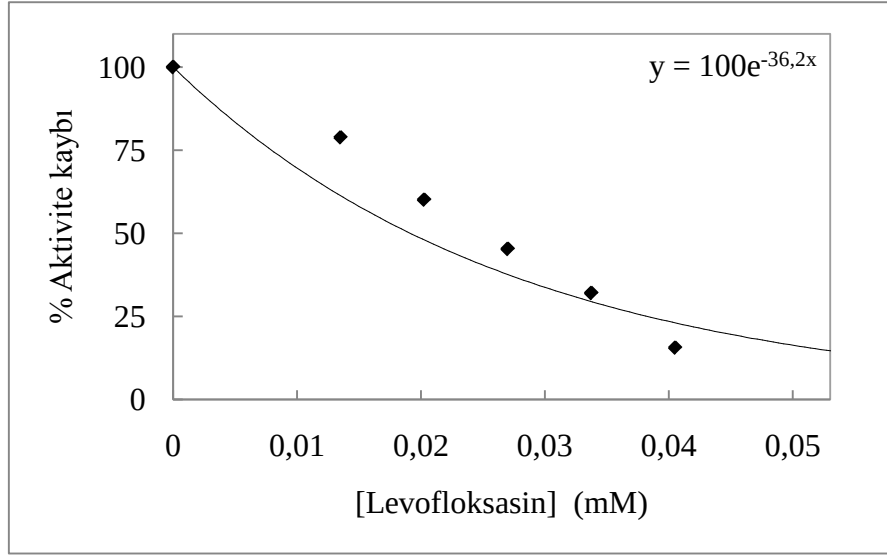


**Şekil 4.66.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiği

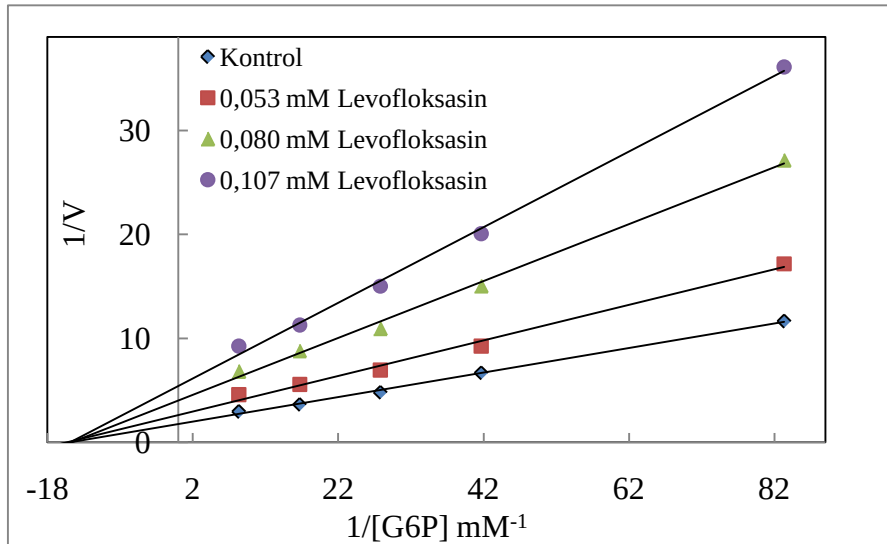


**Şekil 4.67.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiği

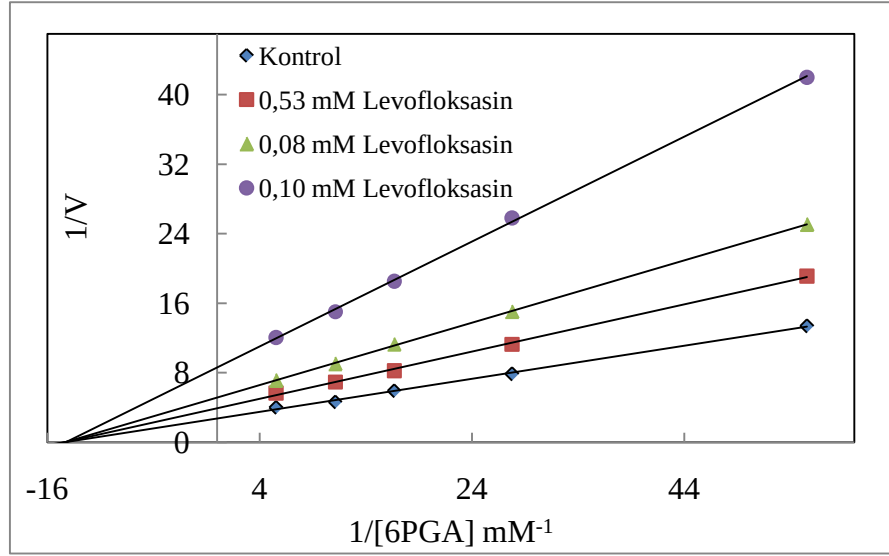




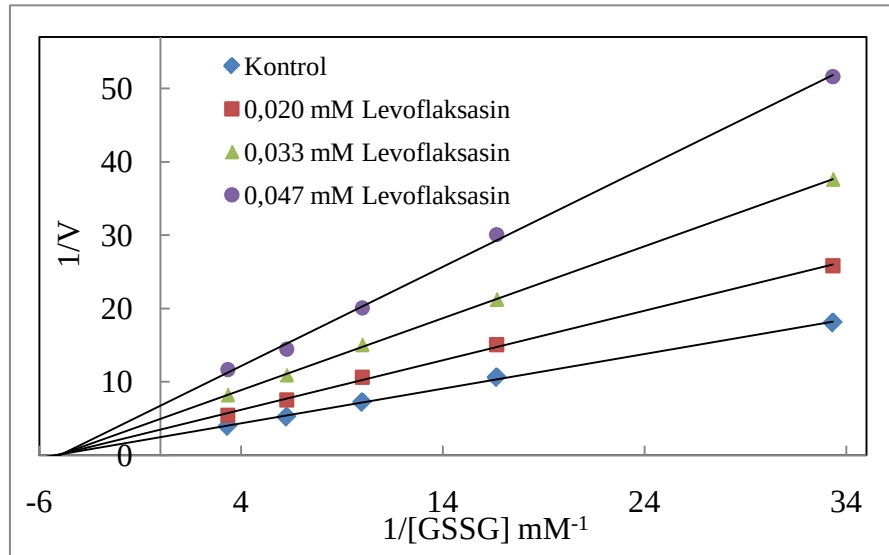
**Şekil 4.68.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine levofloksasin ilacının % aktivite-[I] grafiği



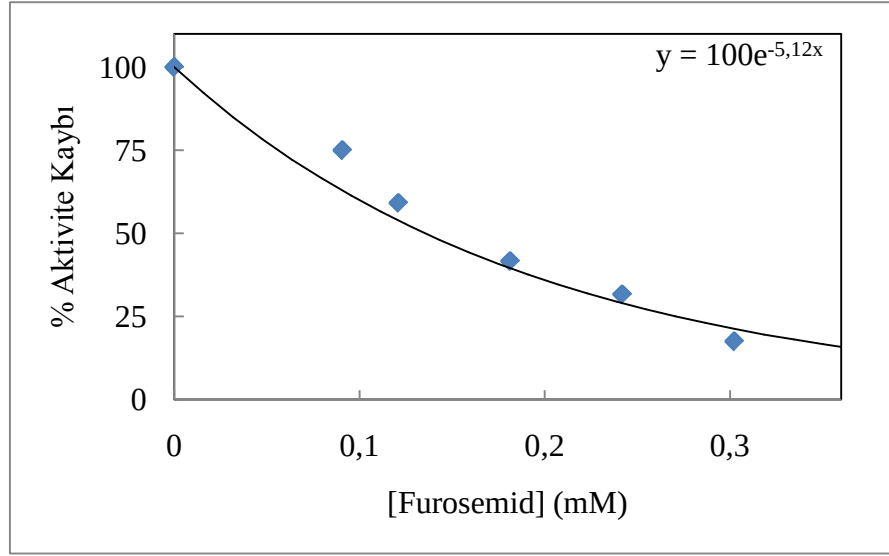
**Şekil 4.69.** Sıçan akciğer G6PD enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



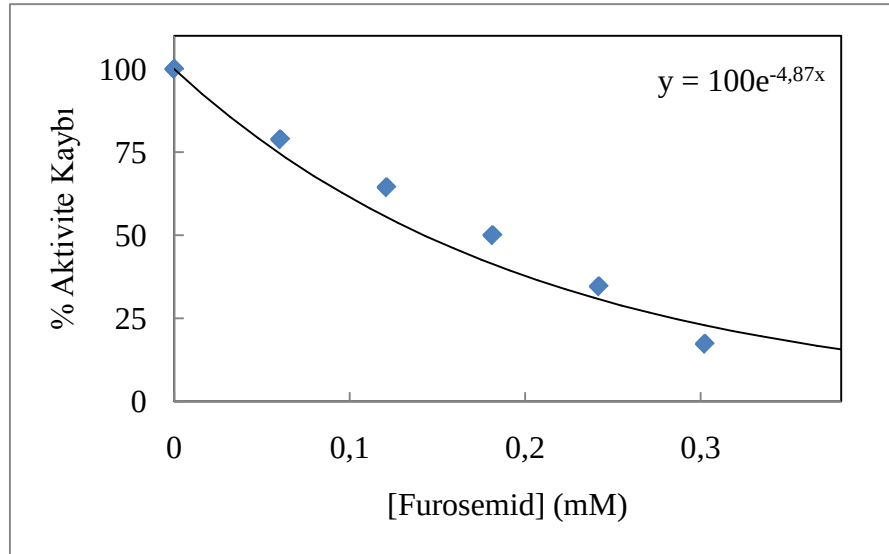
**Şekil 4.70.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



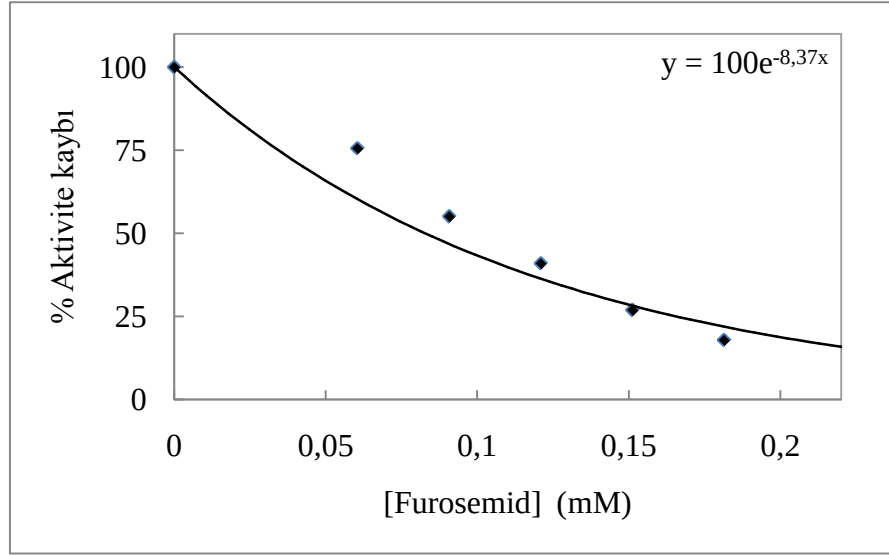
**Şekil 4.71.** Sıçan akciğer GR enziminde levofloksasin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



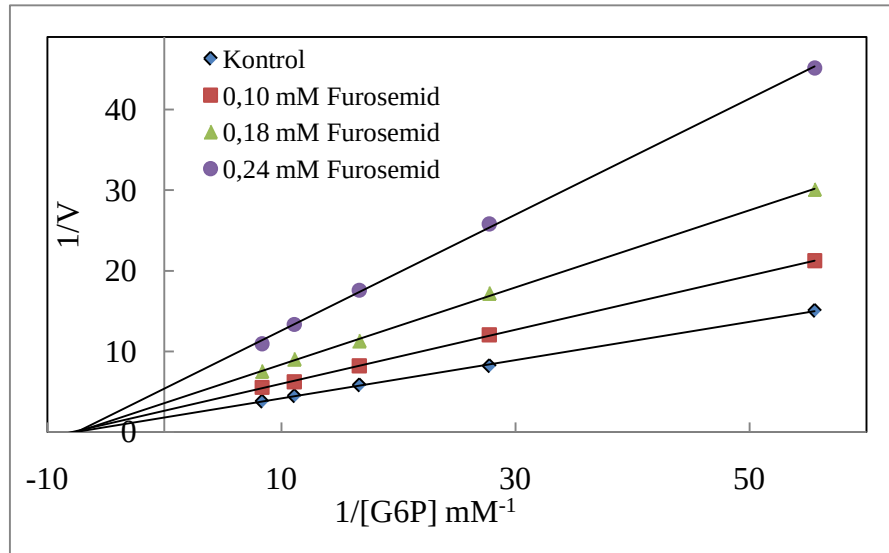
**Şekil 4.72.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



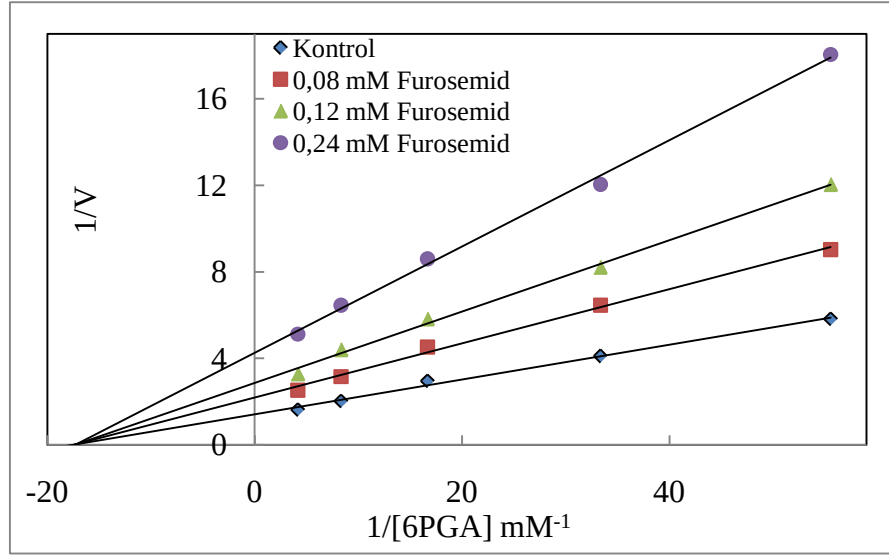
**Şekil 4.73.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



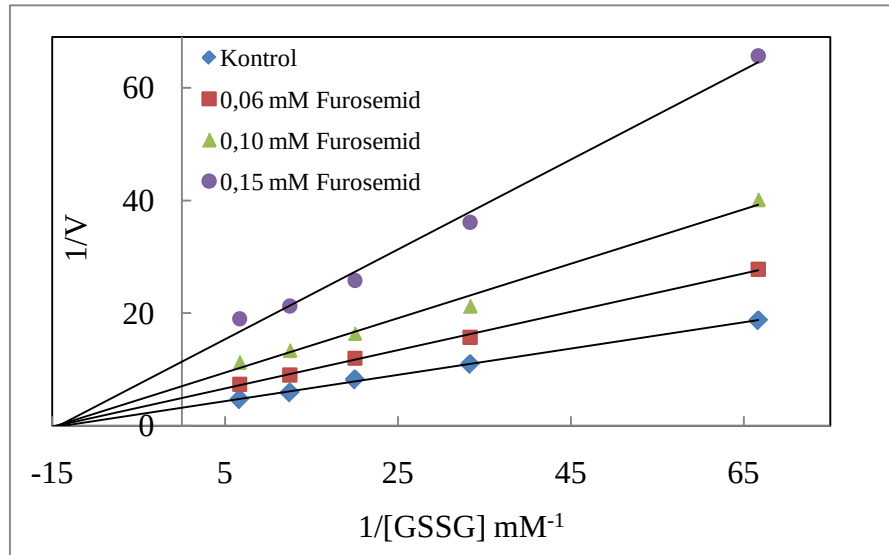
**Şekil 4.74.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



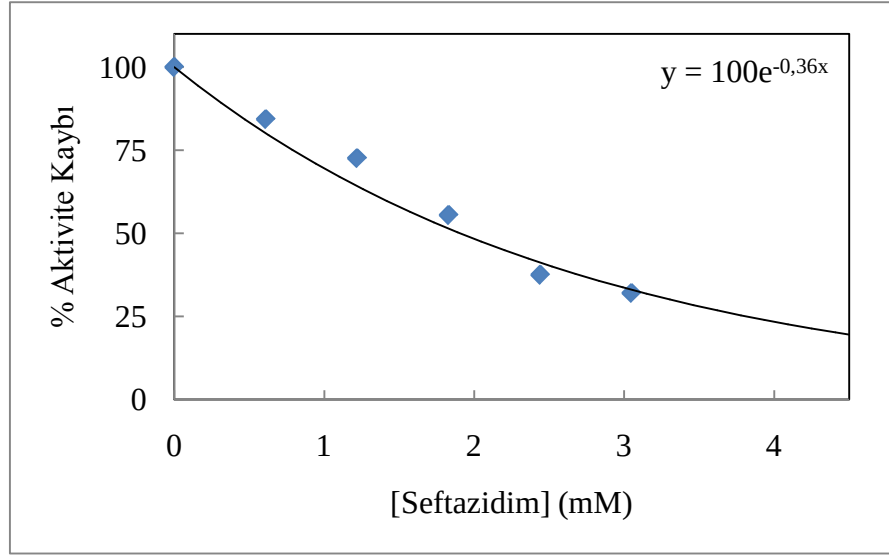
**Şekil 4.75.** Sıçan akciğer G6PD enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



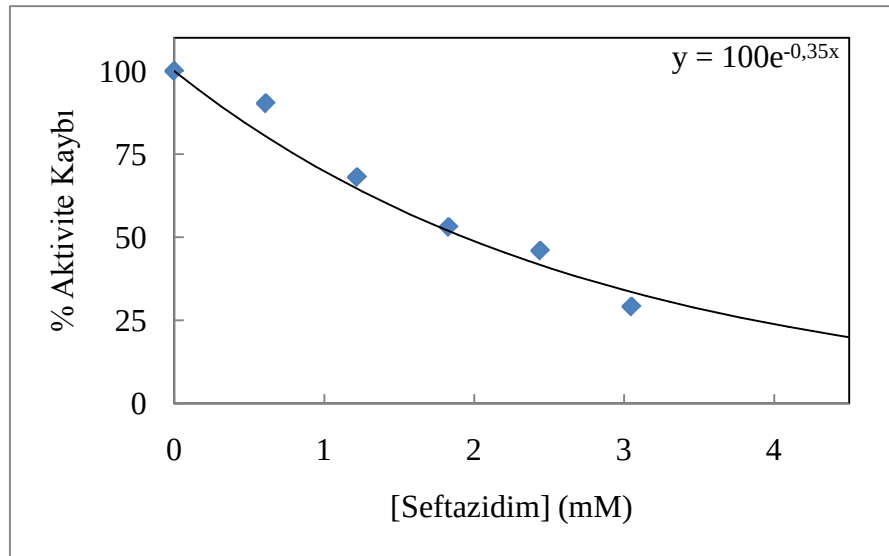
**Şekil 4.76.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



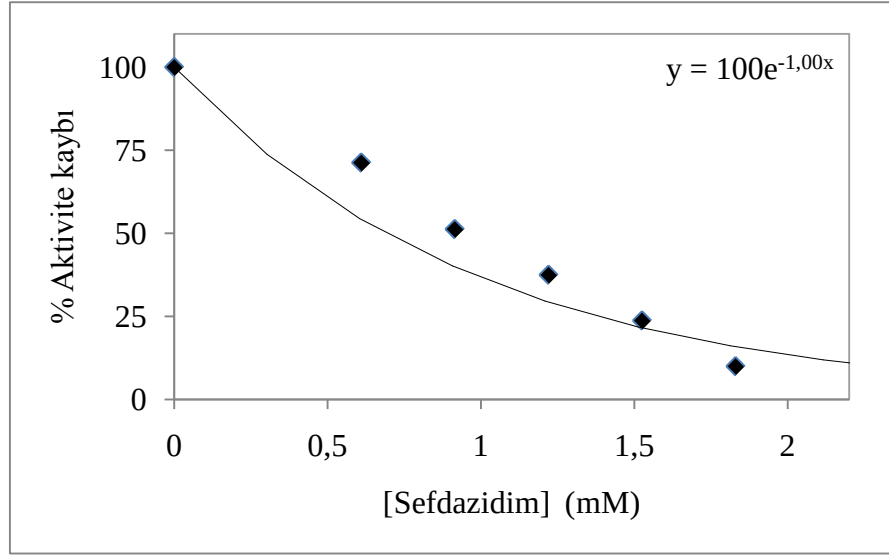
**Şekil 4.77.** Sıçan akciğer GR enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



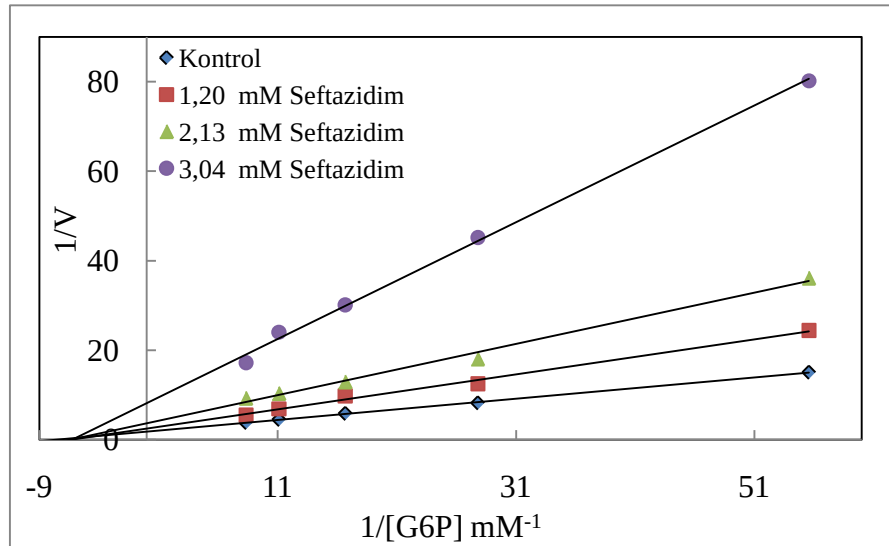
**Şekil 4.78.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine seftazidim ilacının % aktivite-[I] grafiği



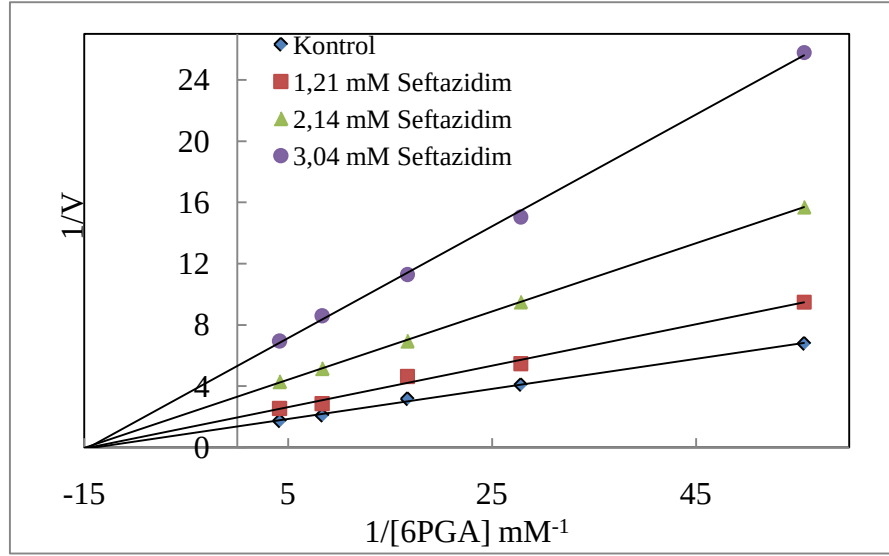
**Şekil 4.79.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine seftazidim ilacının % aktivite-[I] grafiği



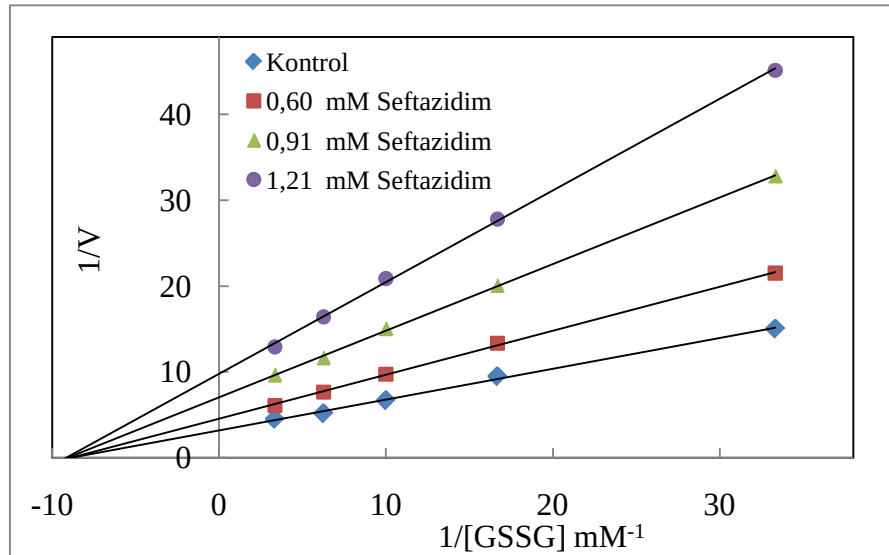
**Şekil 4.80.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine seftazidim ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.81.** Sıçan akciğer G6PD enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

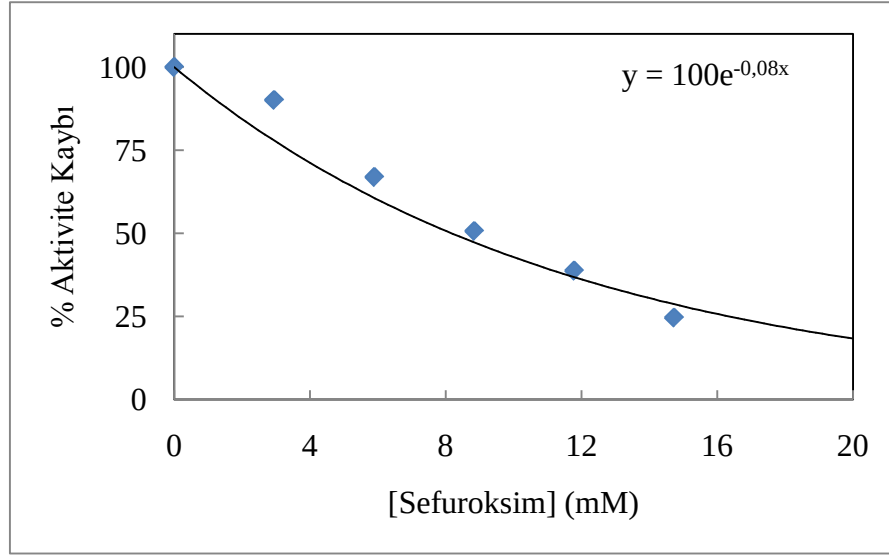


**Şekil 4.82.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

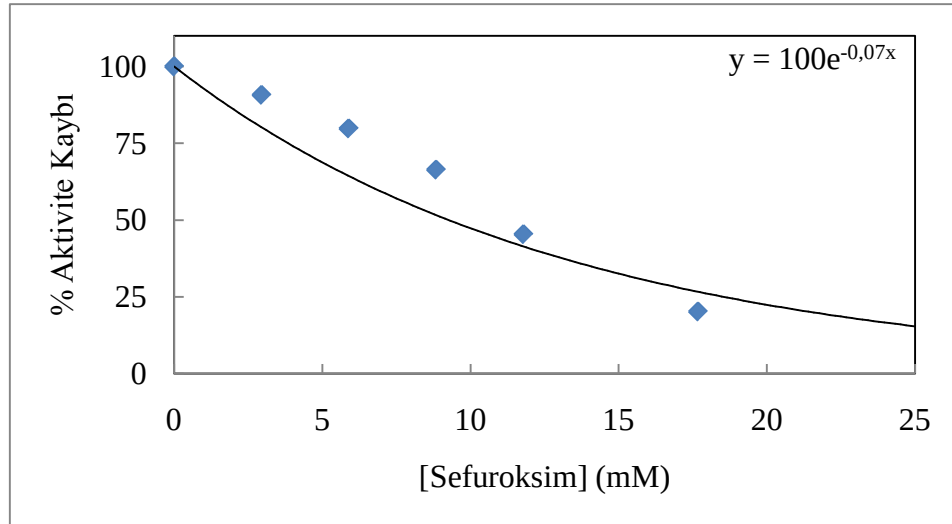


**Şekil 4.83.** Sıçan akciğer GR enziminde seftazidim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

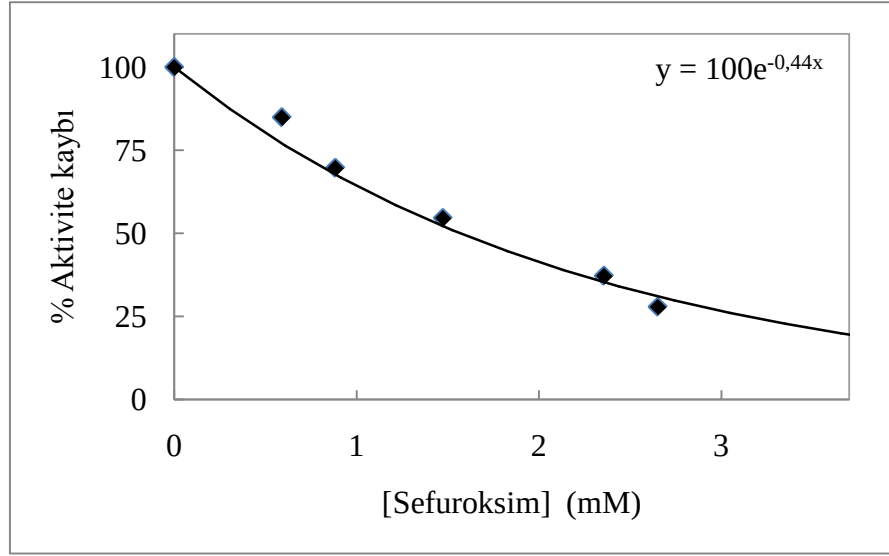




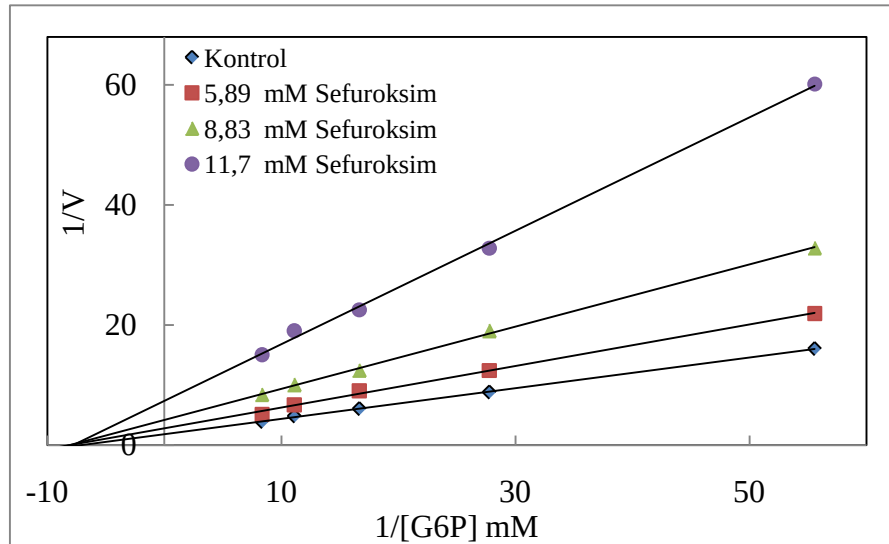
**Şekil 4.84.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I] grafiği



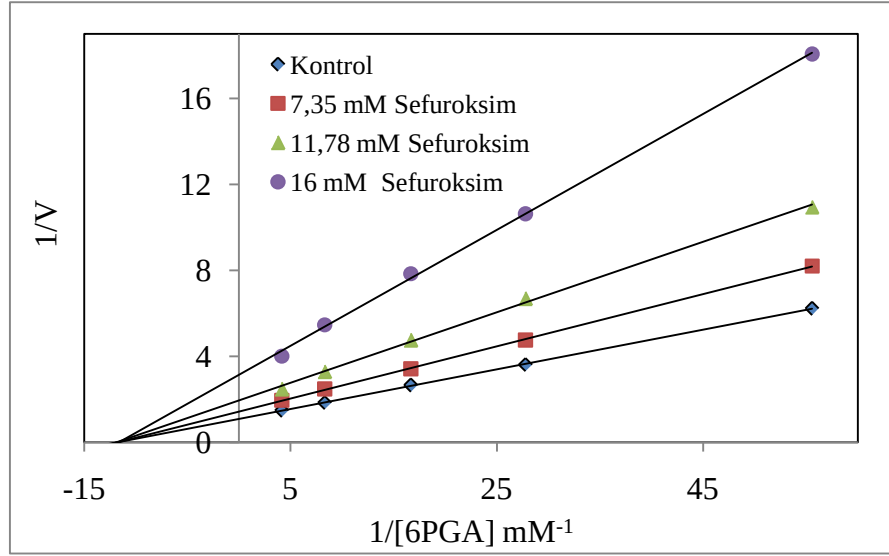
**Şekil 4.85.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I] grafiği



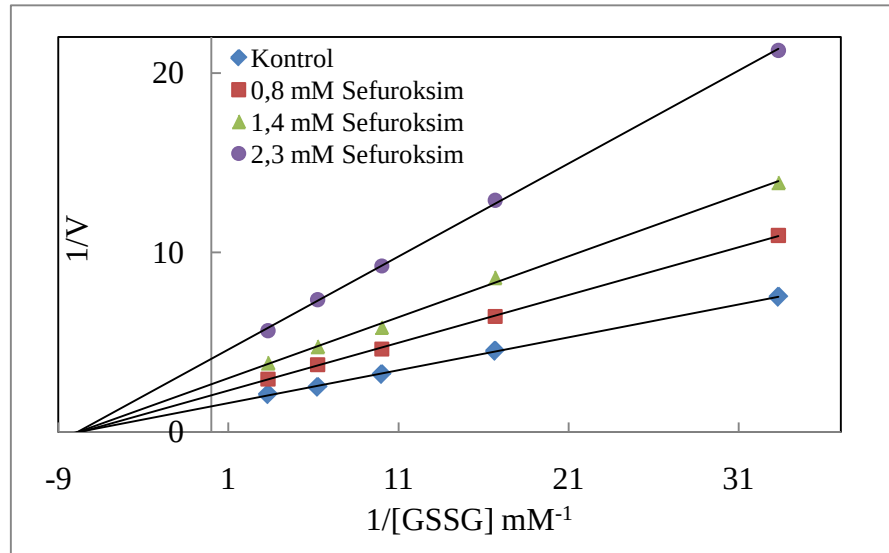
**Şekil 4.86.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine sefuroksim ilacının % aktivite-[I] grafiği



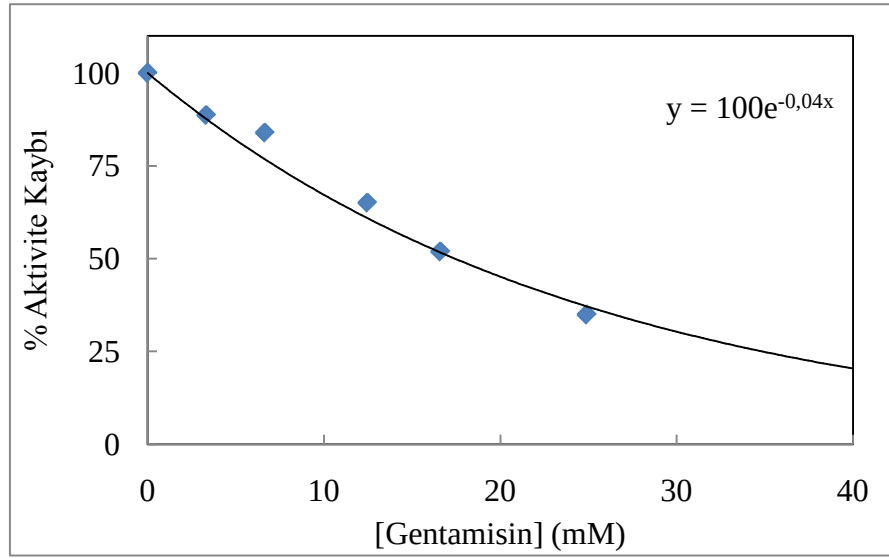
**Şekil 4.87.** Sıçan akciğer G6PD enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



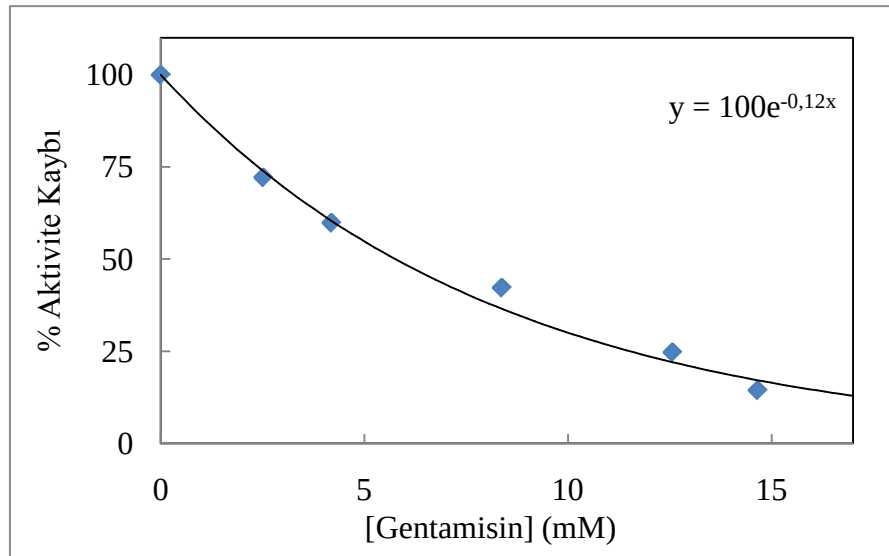
**Şekil 4.88.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



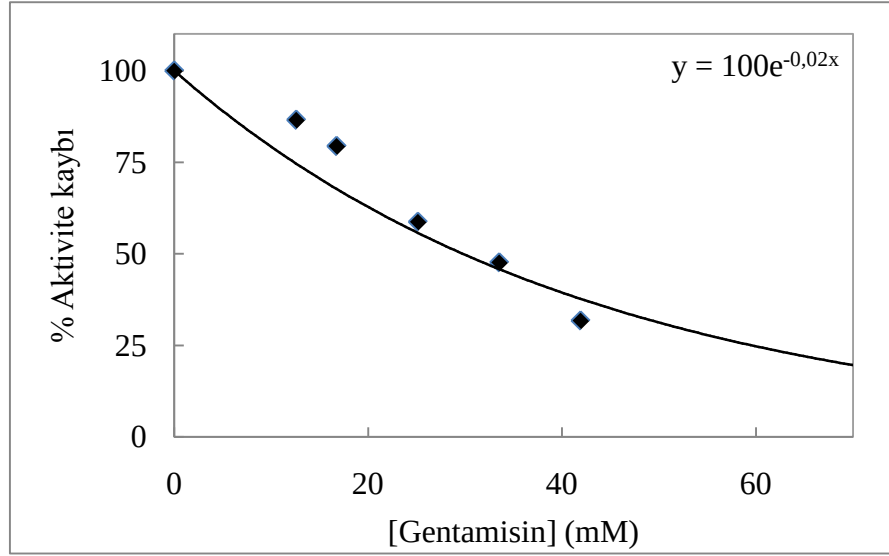
**Şekil 4.89.** Sıçan akciğer GR enziminde sefuroksim için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



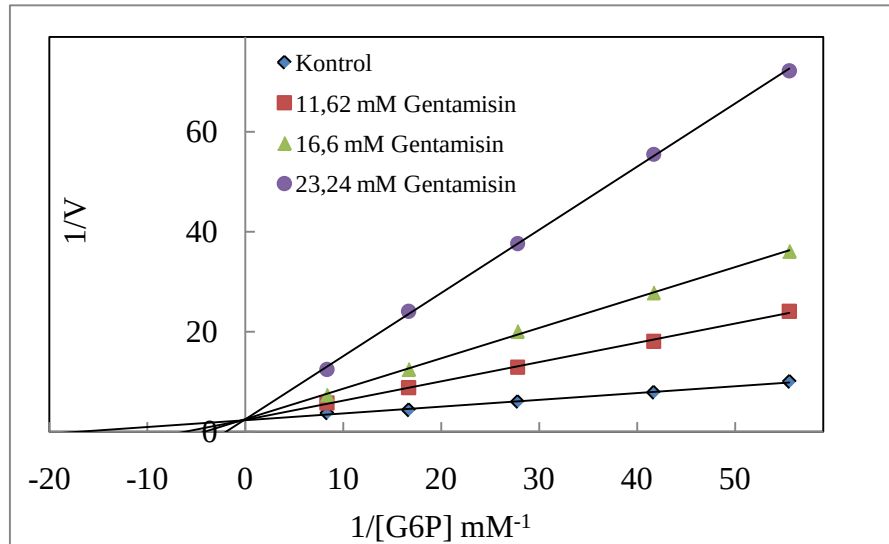
**Şekil 4.90.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



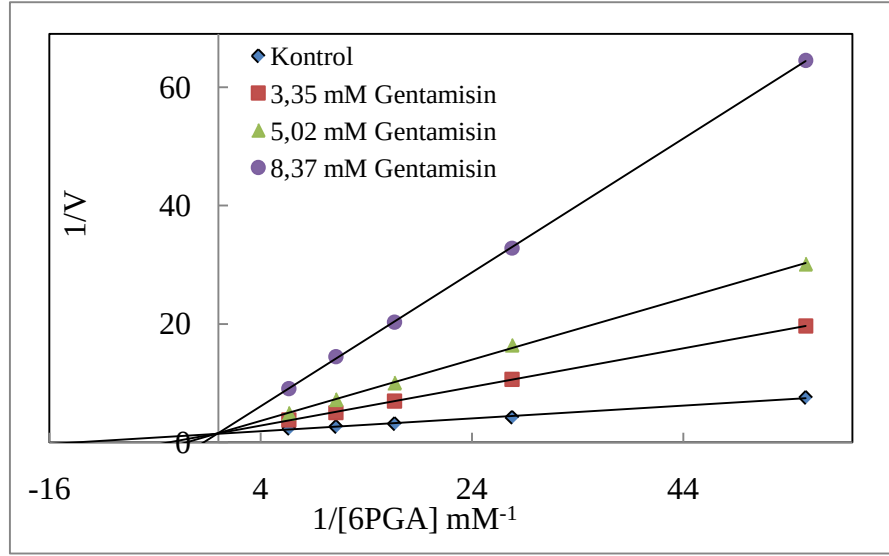
**Şekil 4.91.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



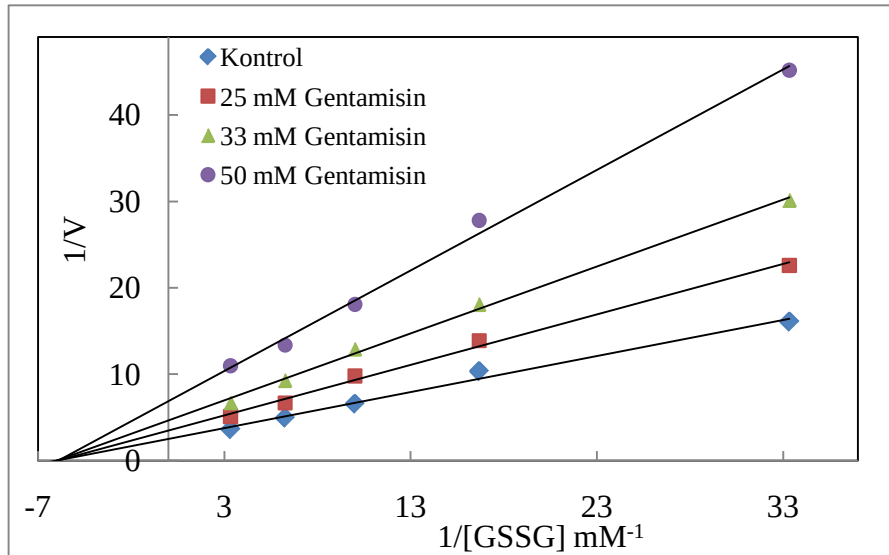
**Şekil 4.92.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine gentamisin ilacının % aktivite-[I] grafiği



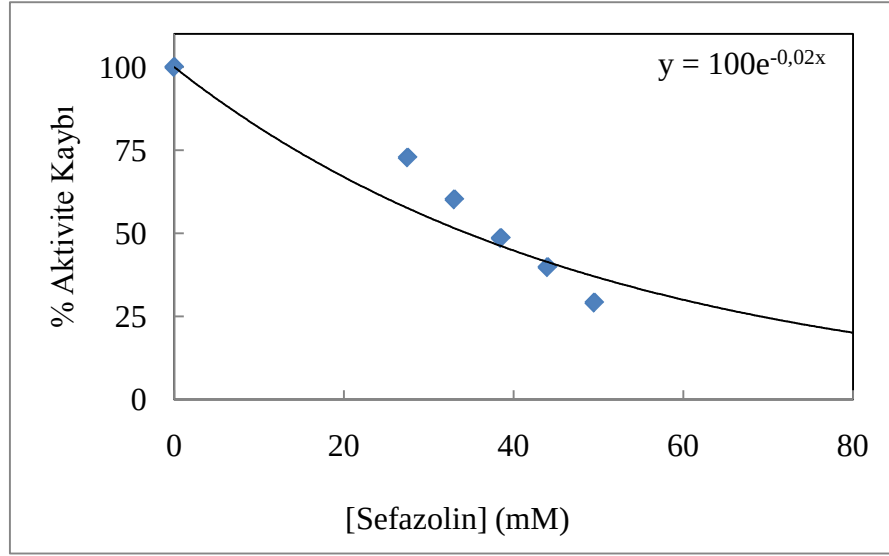
**Şekil 4.93.** Sıçan akciğer G6PD enziminde gentamisin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



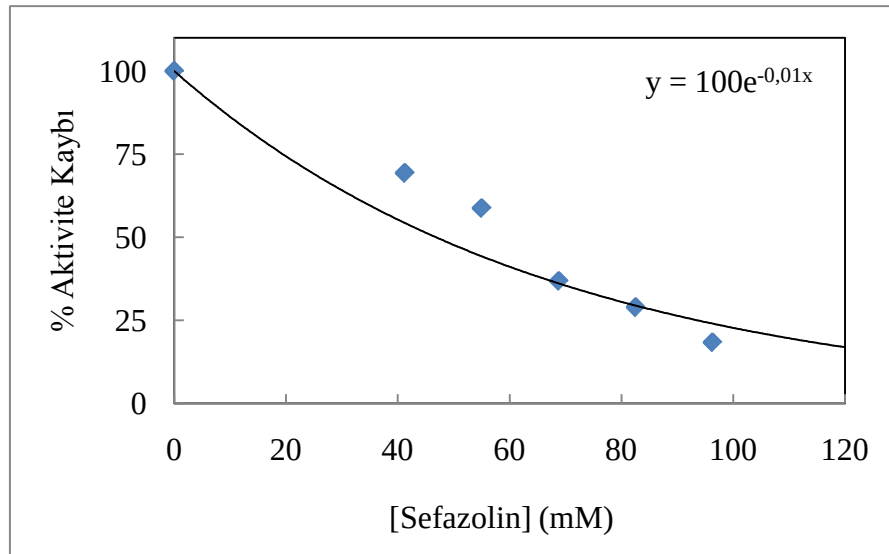
**Şekil 4.94.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde gentamisin için 5 farklı subsrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



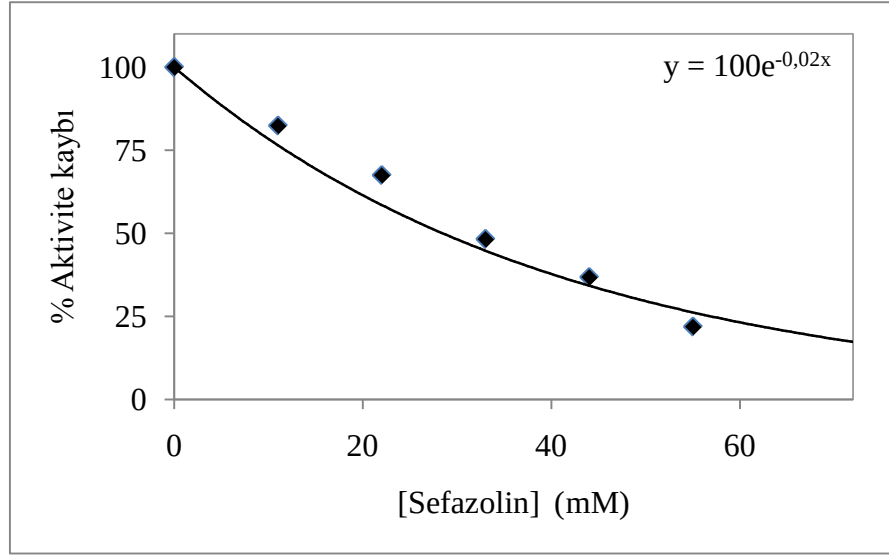
**Şekil 4.95.** Sıçan akciğer GR enziminde gentamisin için 5 farklı subsrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



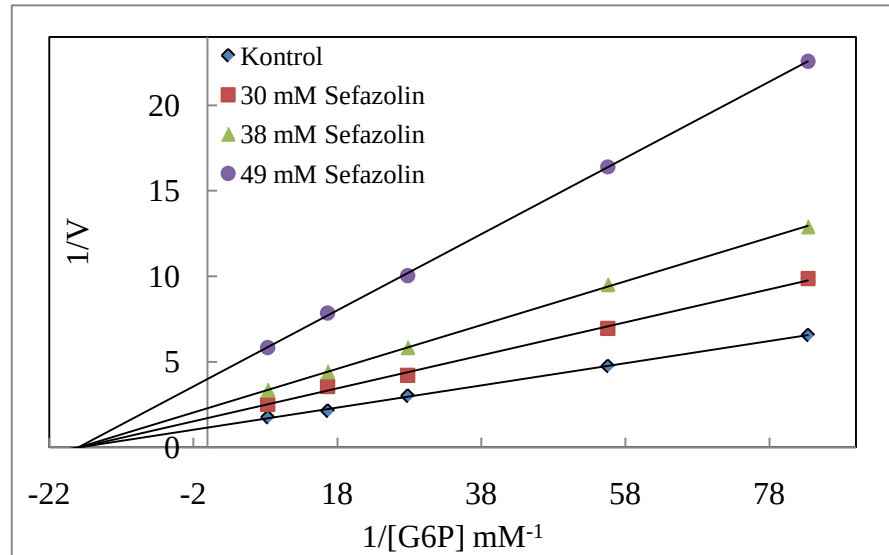
**Şekil 4.96.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.97.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I] grafiği

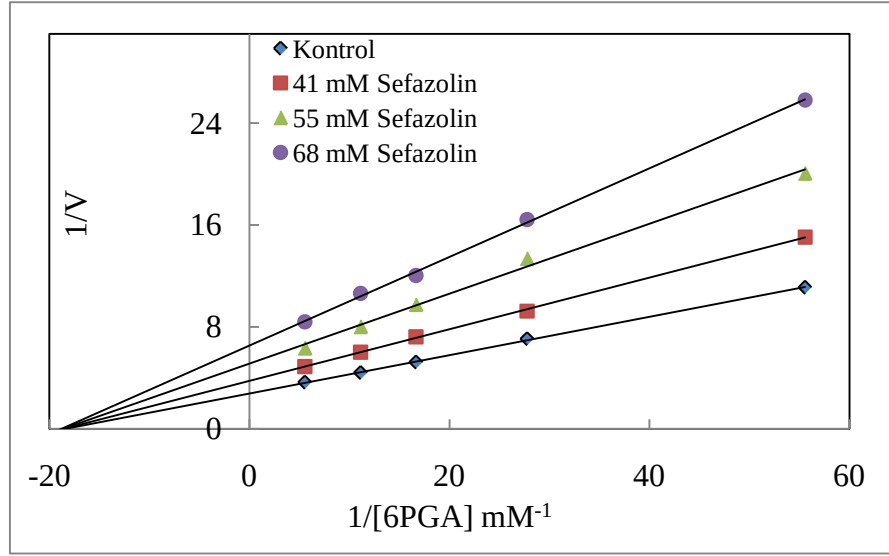


**Şekil 4.98.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine sefazolin ilacının % aktivite-[I] grafiği

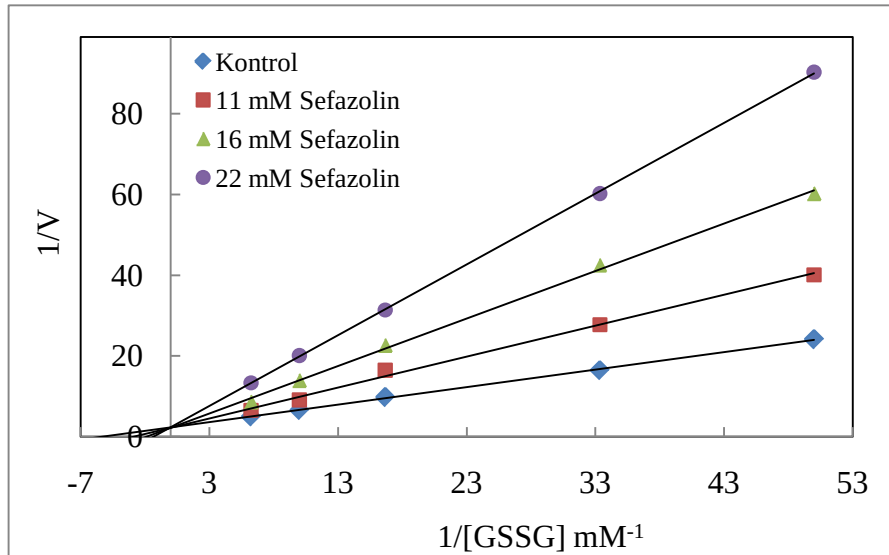


**Şekil 4.99.** Sıçan akciğer G6PD enziminde sefazolin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

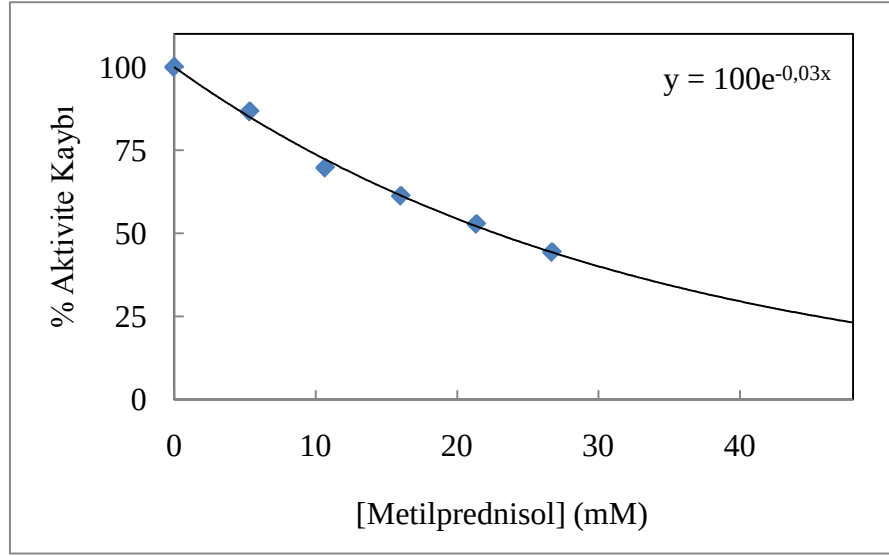




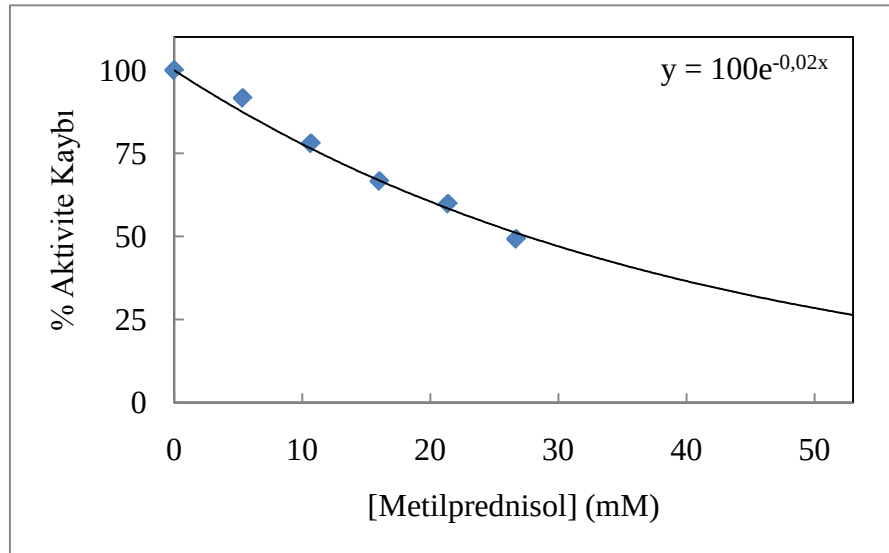
**Şekil 4.100.** Sıçan akciğer 6PGD enziminde sefazolin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



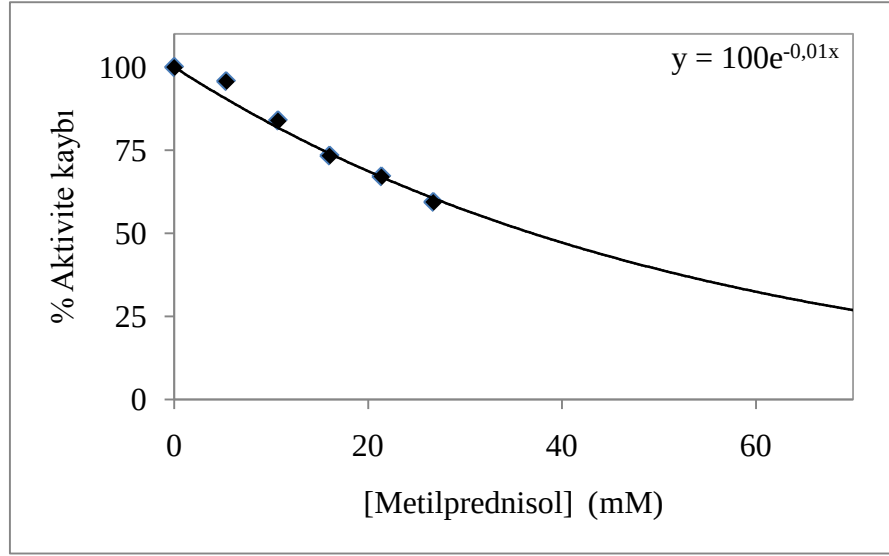
**Şekil 4.101.** Sıçan akciğer GR enziminde sefazolin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



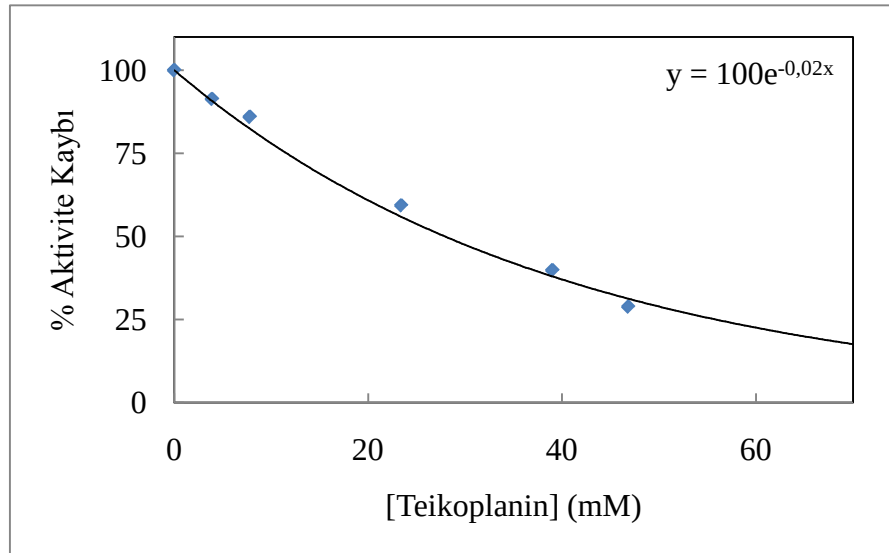
**Şekil 4.102.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği



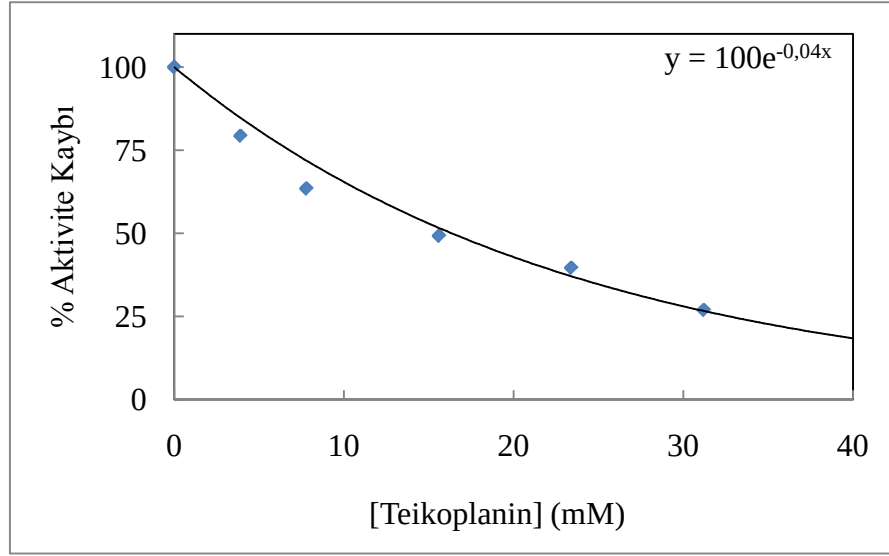
**Şekil 4.103.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği



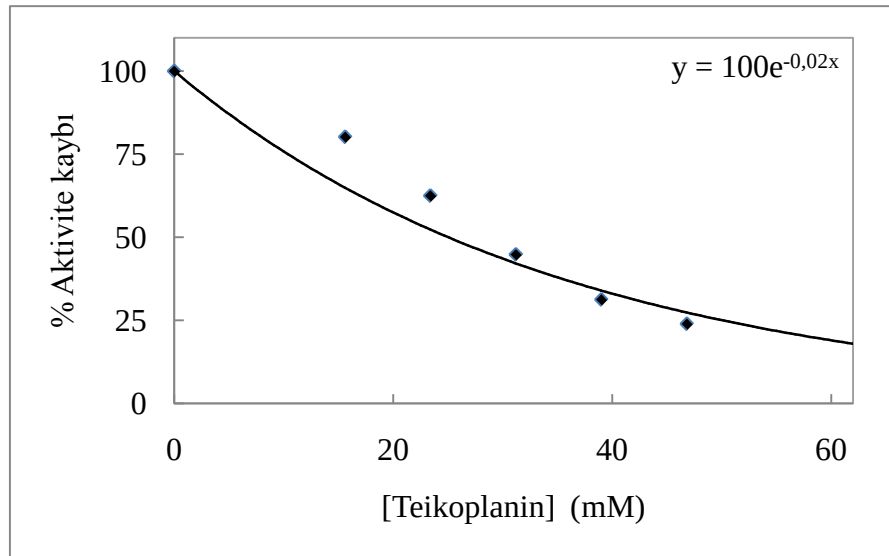
**Şekil 4.104.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine metilprednisol ilacının % aktivite-[I] grafiği



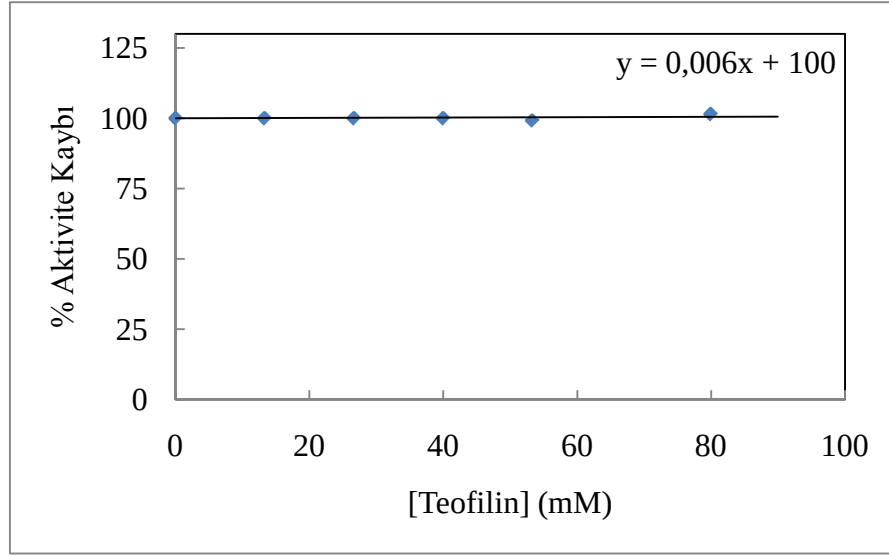
**Şekil 4.105.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği



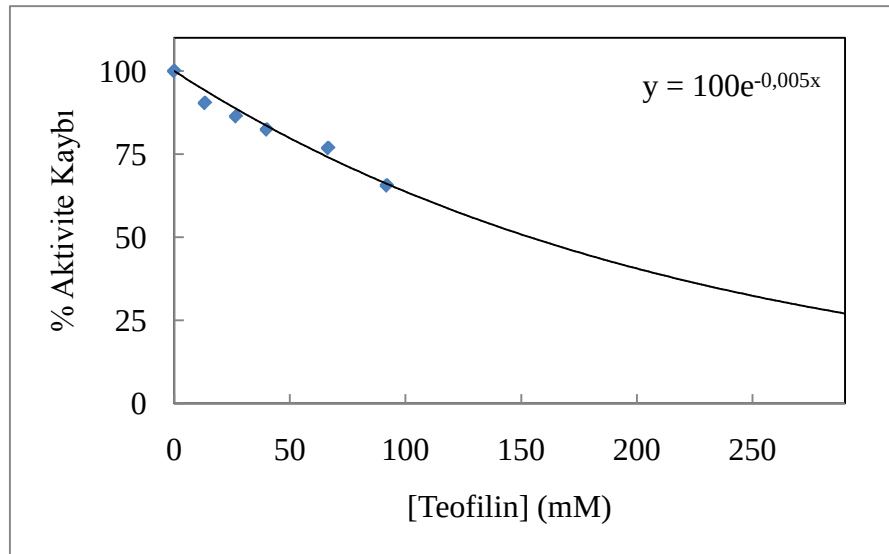
**Şekil 4.106.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği



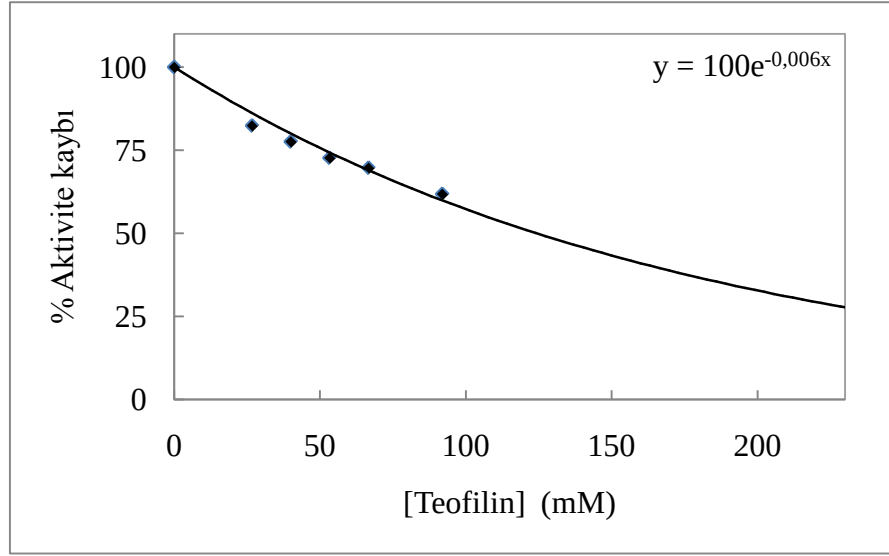
**Şekil 4.107.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine teikoplanin ilacının % aktivite-[I] grafiği



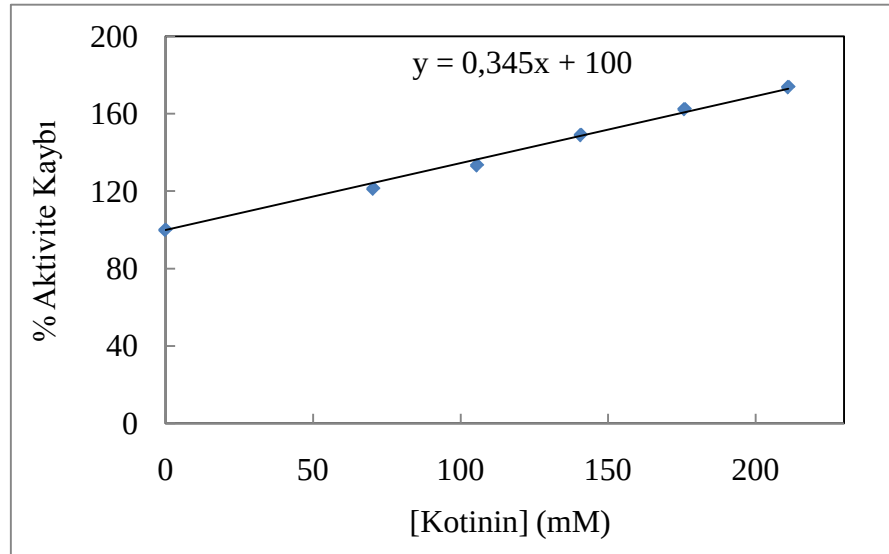
**Şekil 4.108.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği



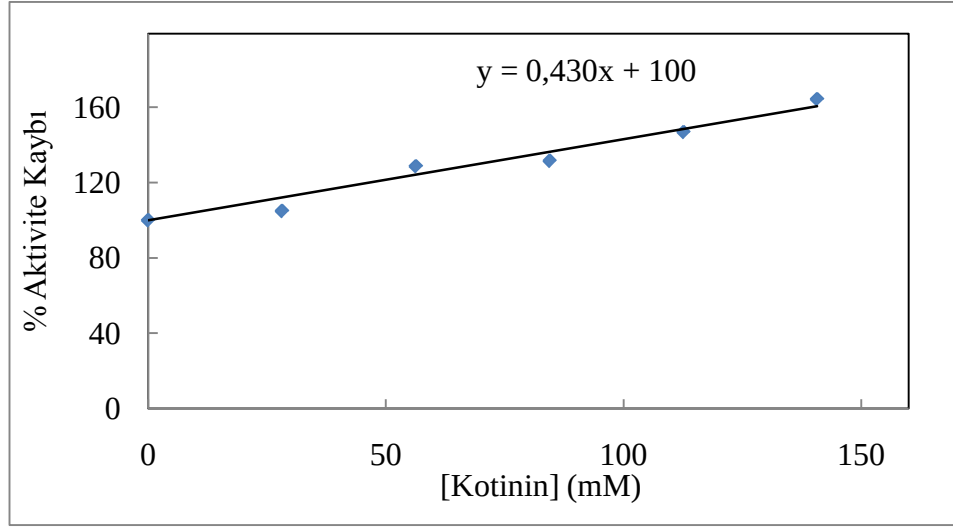
**Şekil 4.109.** Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği



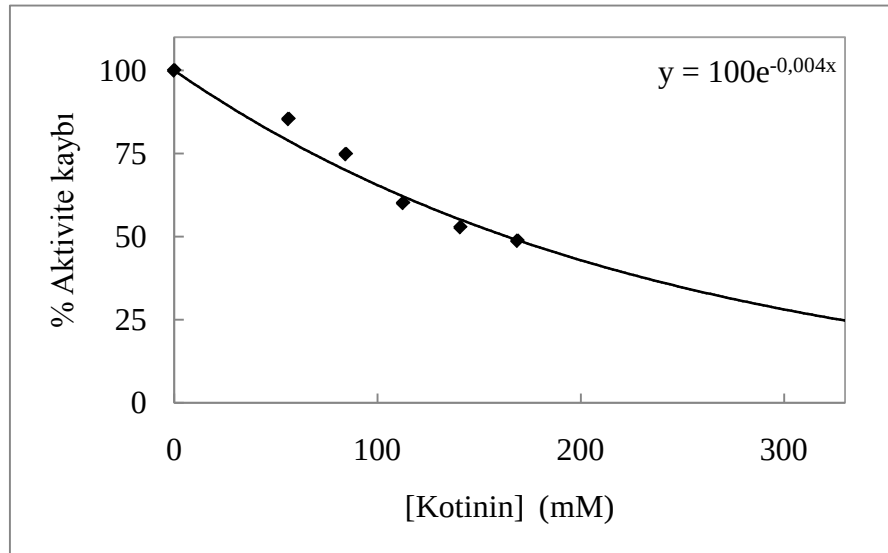
**Şekil 4.110.** Sıçan akciğer GR enzimi üzerine teofilin ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.111.** Sıçan akciğer G6PD enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği

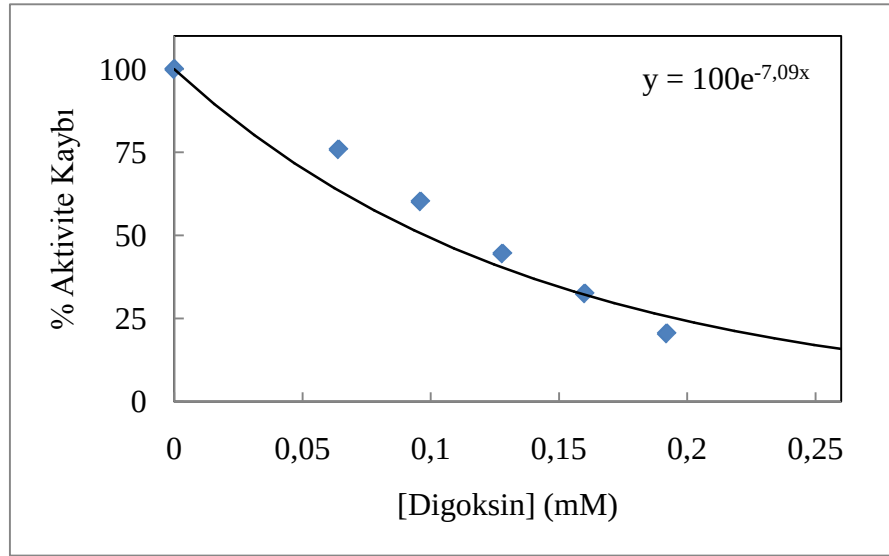


Şekil 4.112. Sıçan akciğer 6PGD enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği

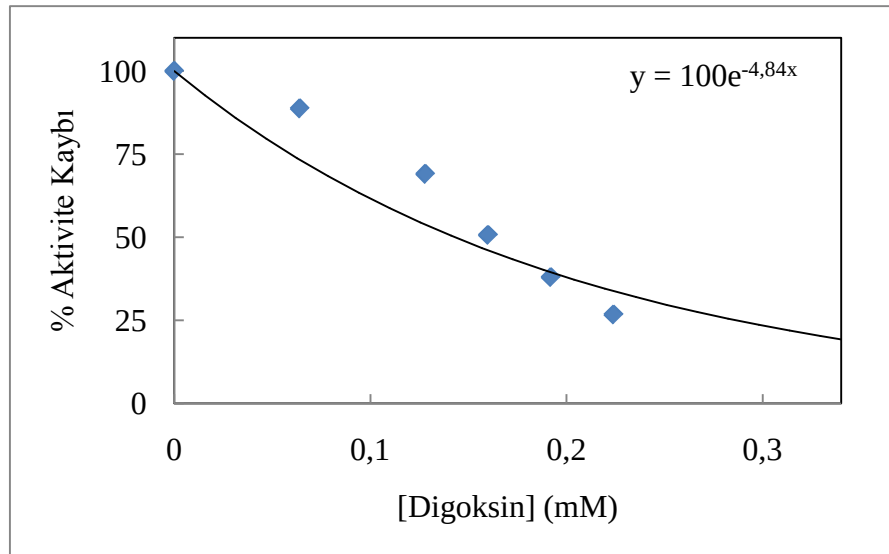


Şekil 4.113. Sıçan akciğer GR enzimi üzerine kotininin % aktivite-[I] grafiği

**4.6.1. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkilerinin sonuçları**

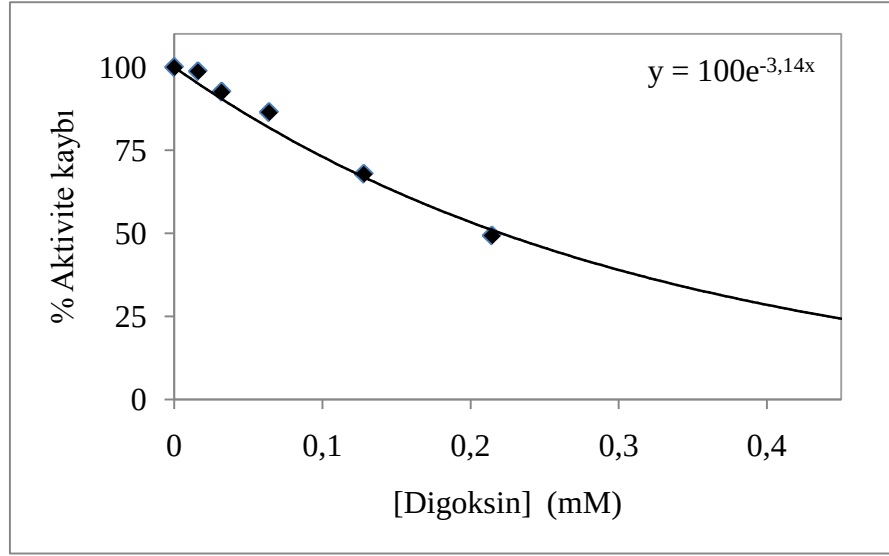


**Şekil 4.114.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği

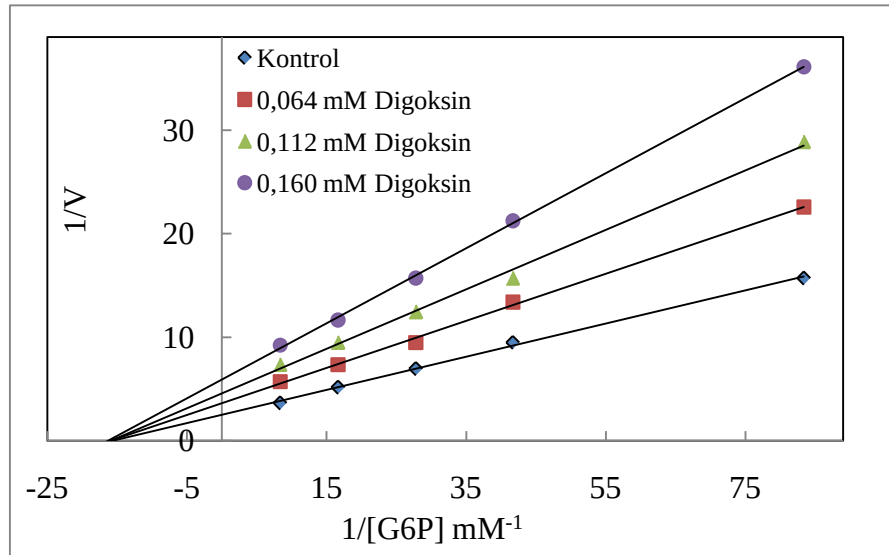


**Şekil 4.115.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği

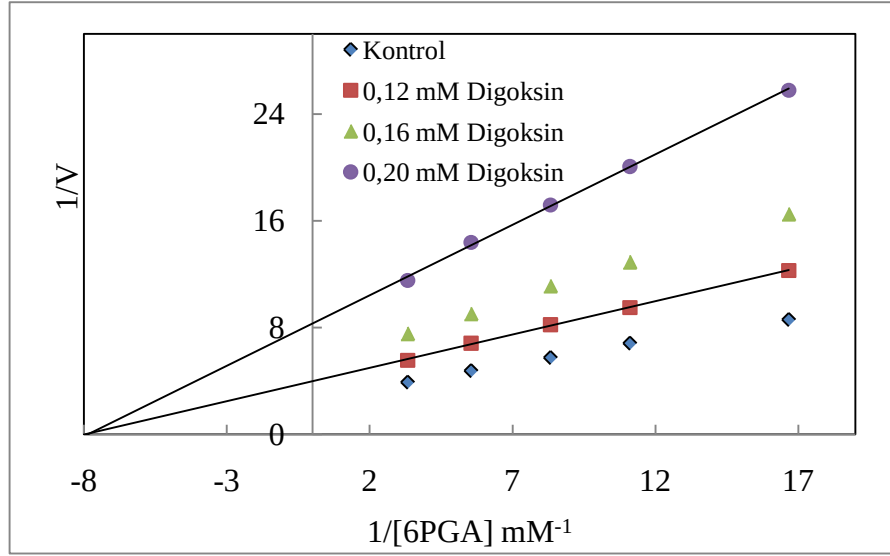




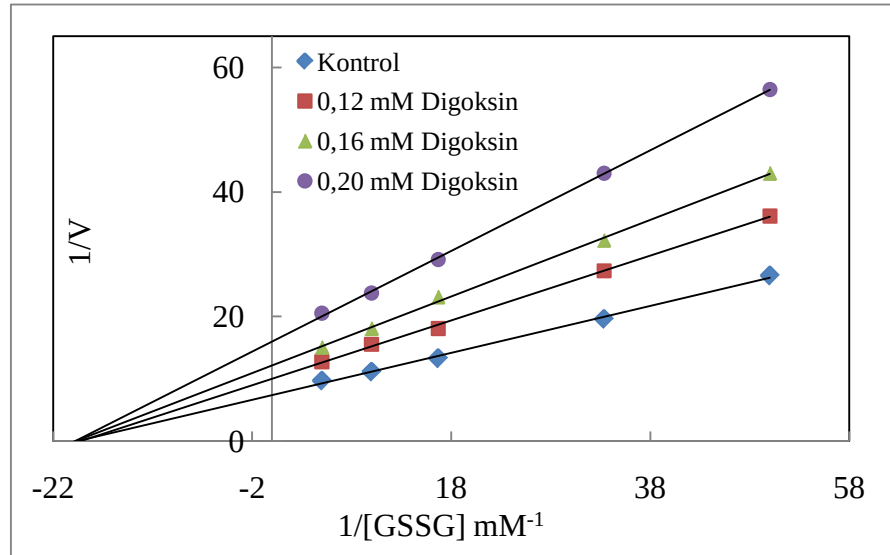
**Şekil 4.116.** Sıçan kalp GR enzimi üzerine digoksin ilacının % aktivite-[I] grafiği



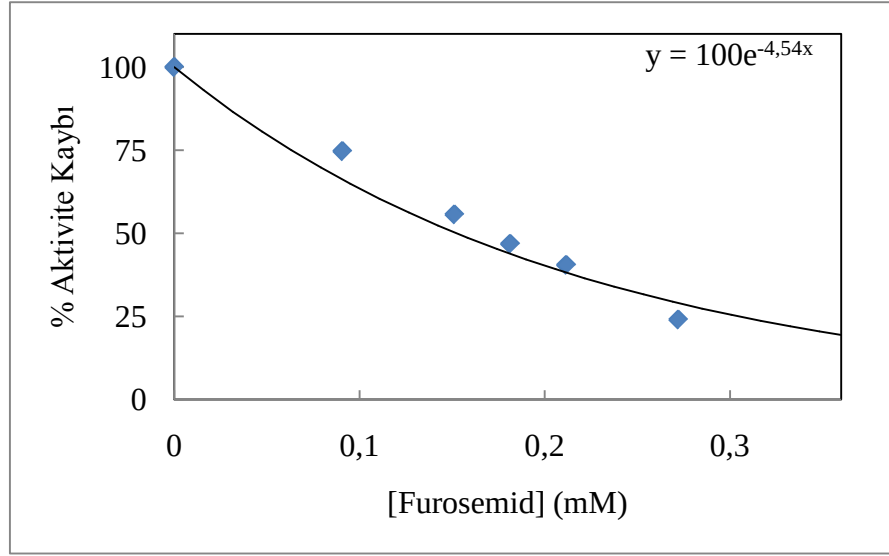
**Şekil 4.117.** Sıçan kalp G6PD enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



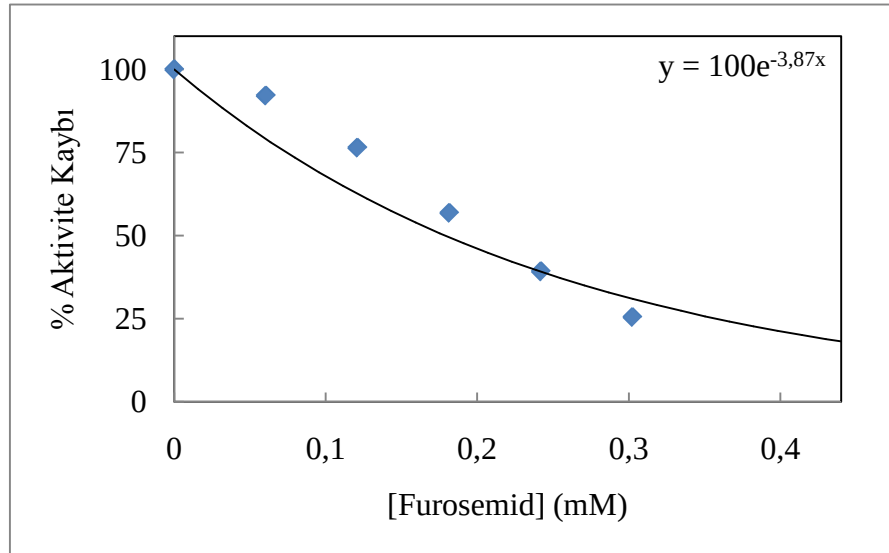
**Şekil 4.118.** Sıçan kalp 6PGD enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



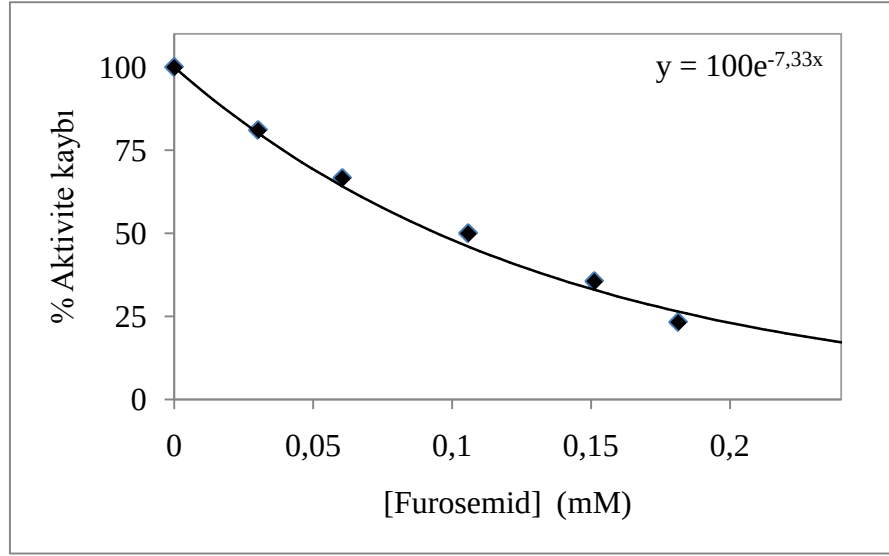
**Şekil 4.119.** Sıçan kalp GR enziminde digoksin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



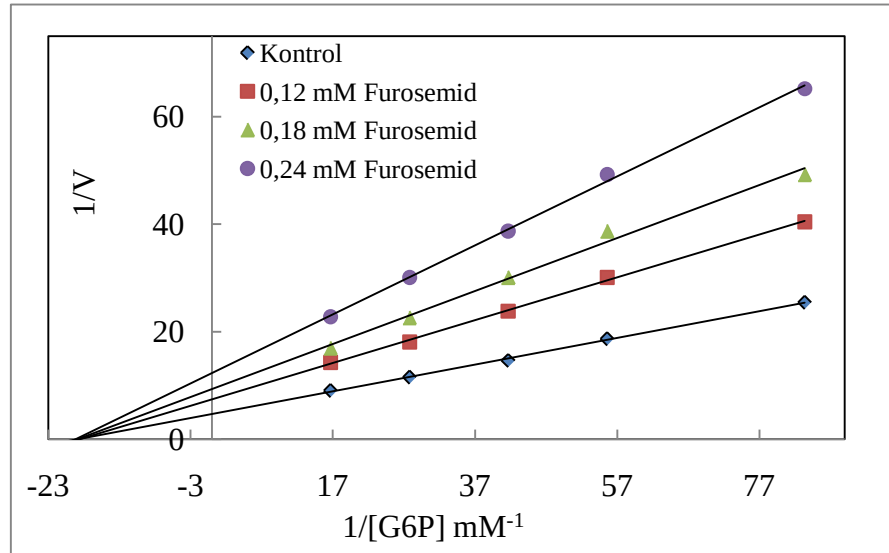
**Şekil 4.120.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



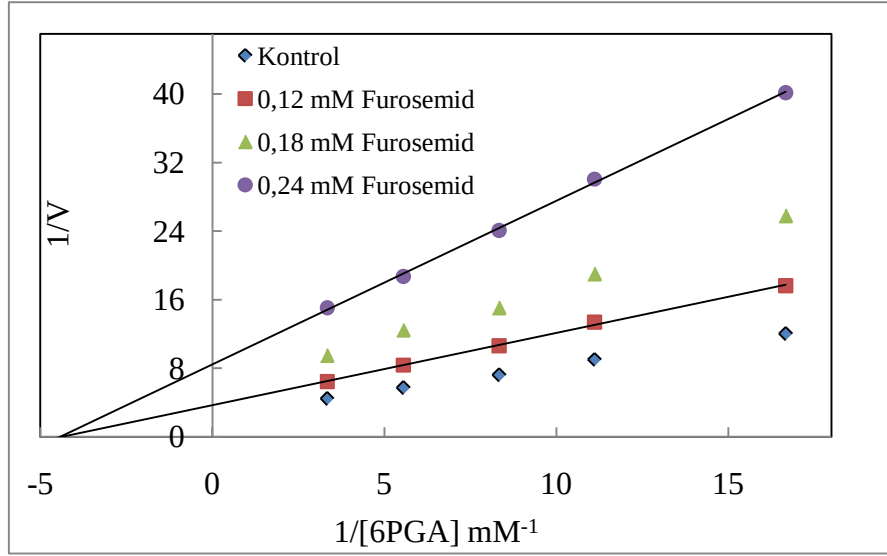
**Şekil 4.121.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



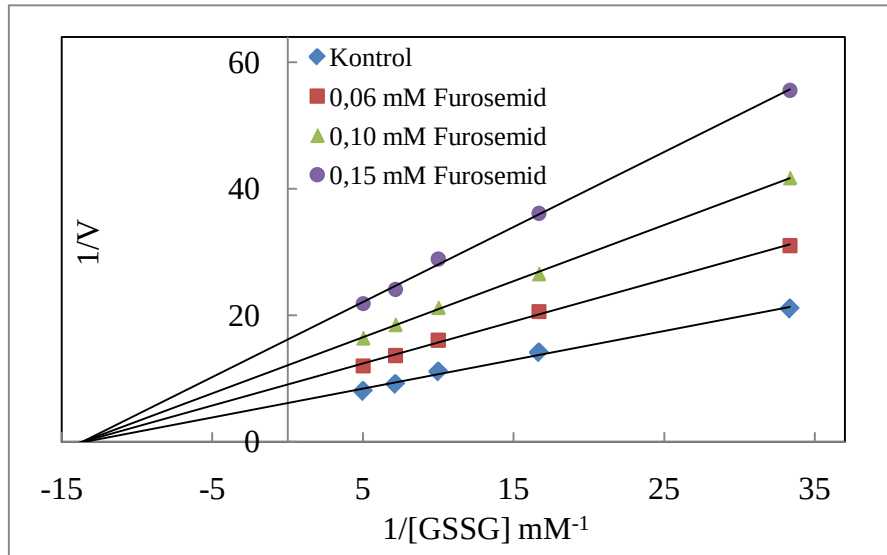
Şekil 4.122. Sıçan kalp GR enzimi üzerine furosemid ilacının % aktivite-[I] grafiği



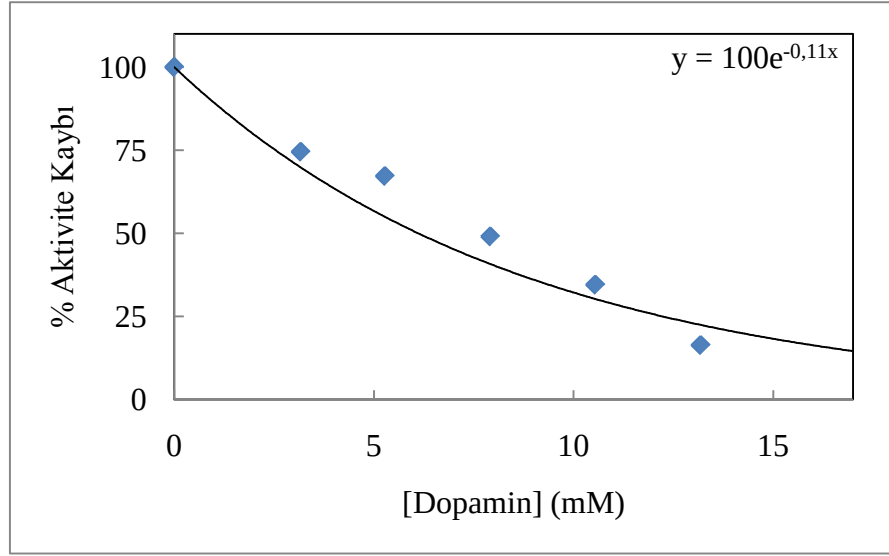
Şekil 4.123. Sıçan kalp G6PD enziminde furosemid için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



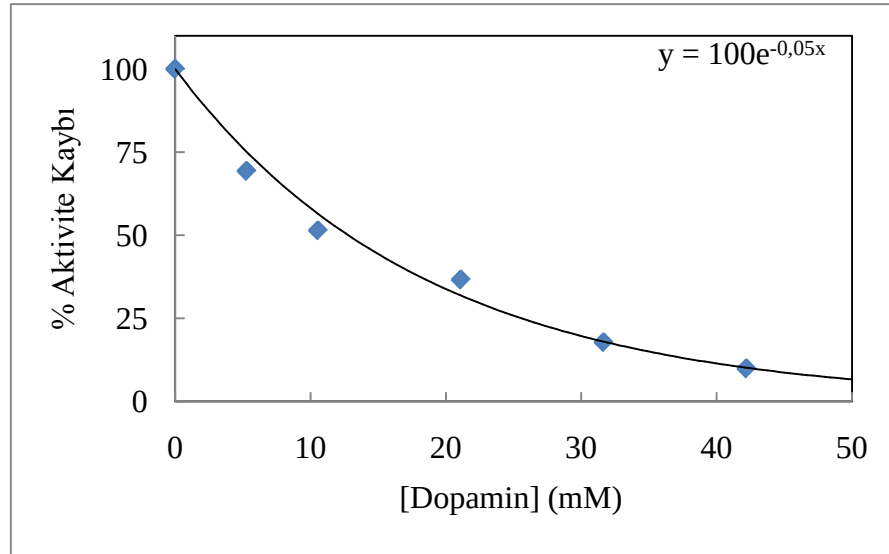
**Şekil 4.124.** Sıçan kalp 6PGD enziminde furosemid için 5 farklı subsrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



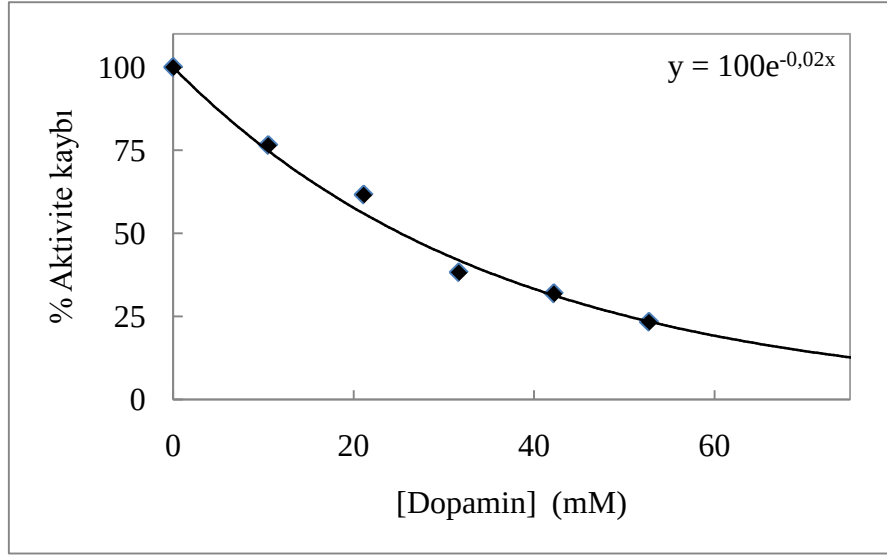
**Şekil 4.125.** Sıçan kalp GR enziminde furosemid için 5 farklı subsrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



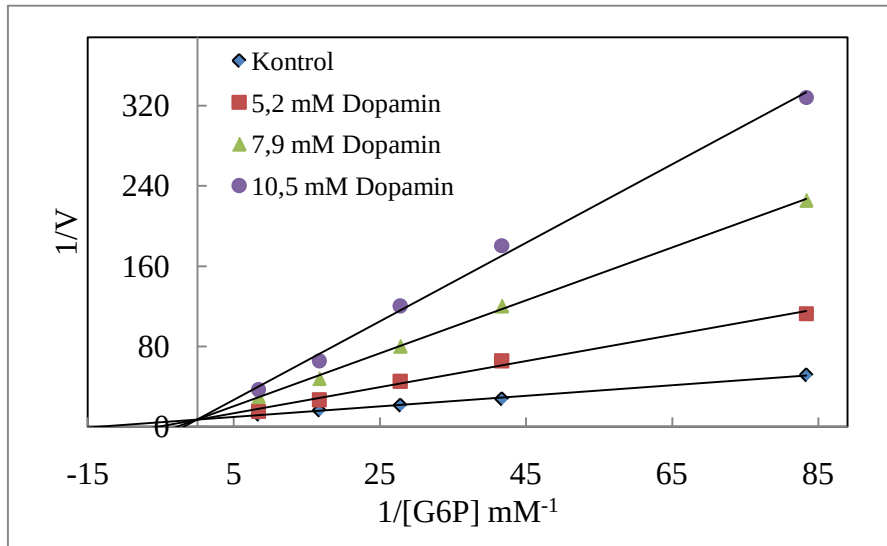
**Şekil 4.126.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği



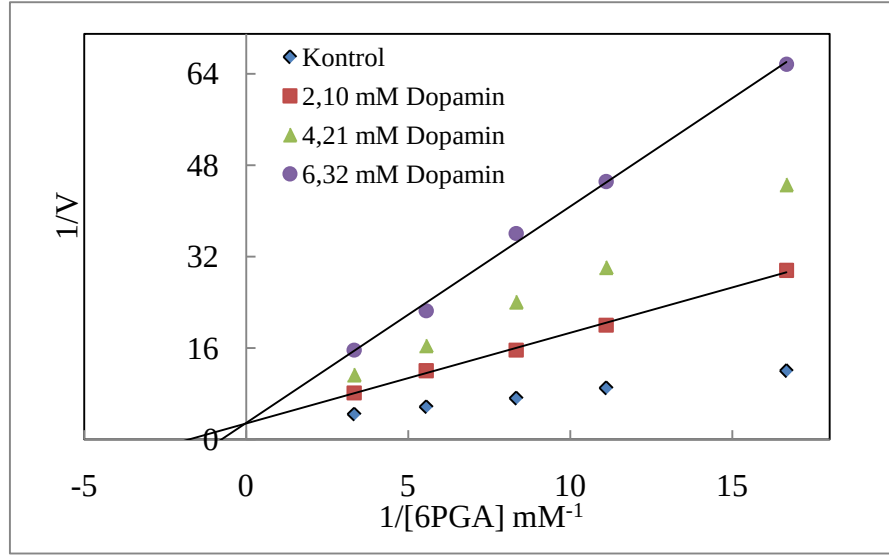
**Şekil 4.127.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği



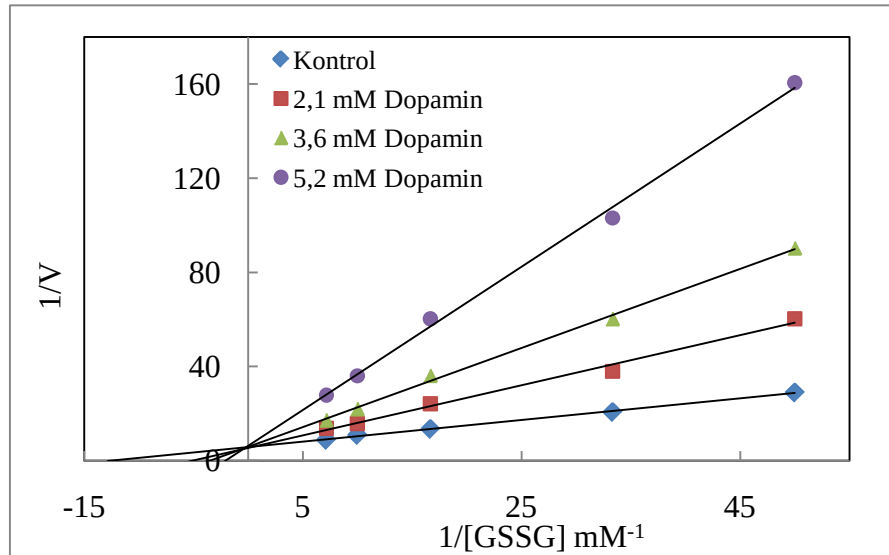
Şekil 4.128. Sıçan kalp GR enzimi üzerine dopamin ilacının % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.129. Sıçan kalp G6PD enziminde dopamin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

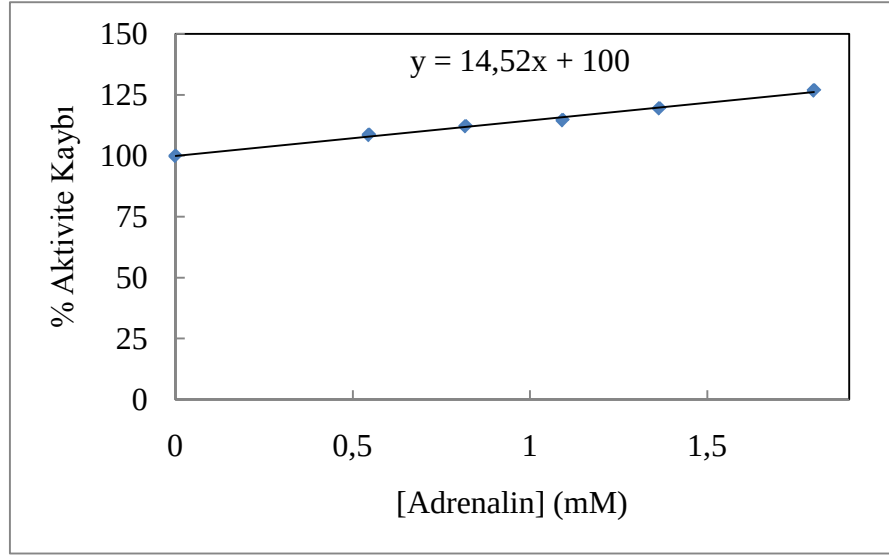


**Şekil 4.130.** Sıçan kalp 6PGD enziminde dopamin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

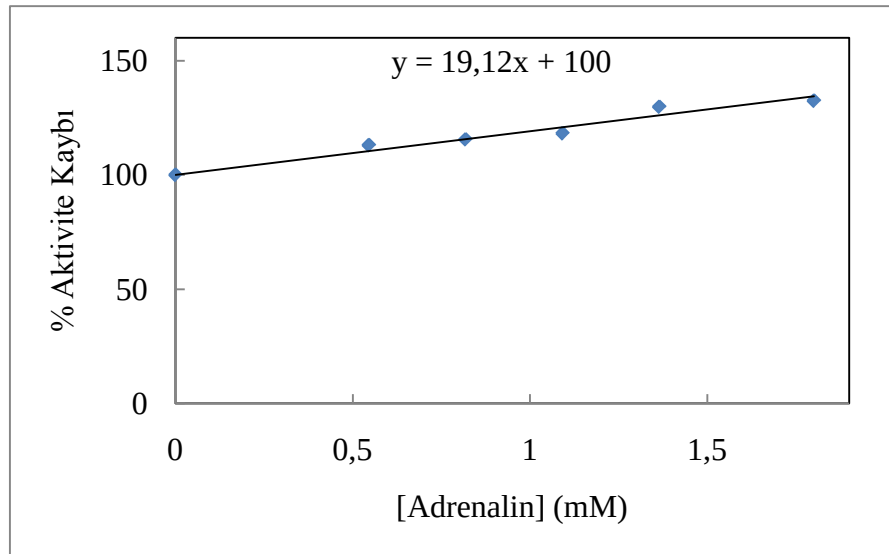


**Şekil 4.131.** Sıçan kalp GR enziminde dopamin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

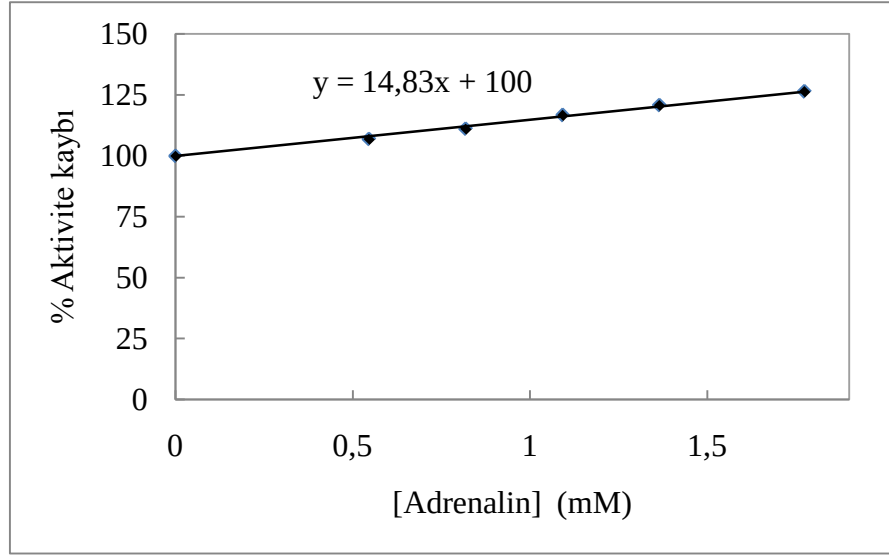




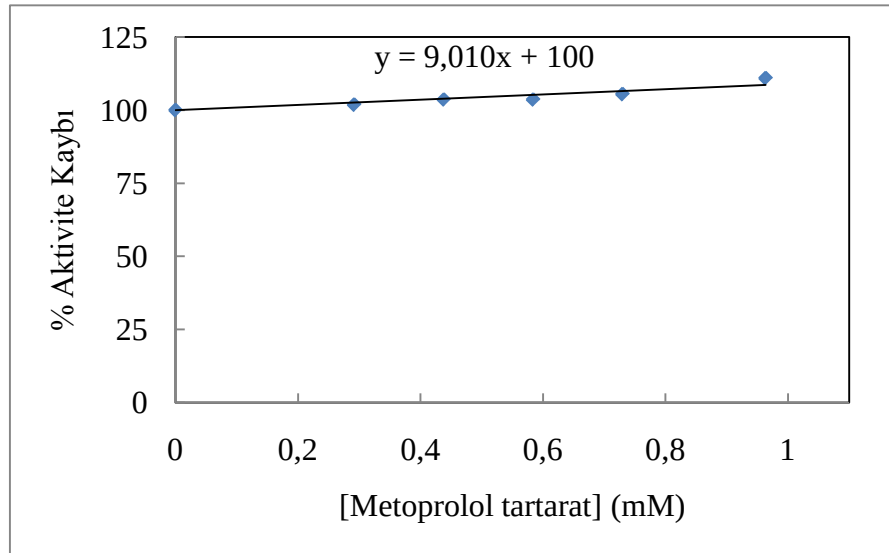
**Şekil 4.132.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği



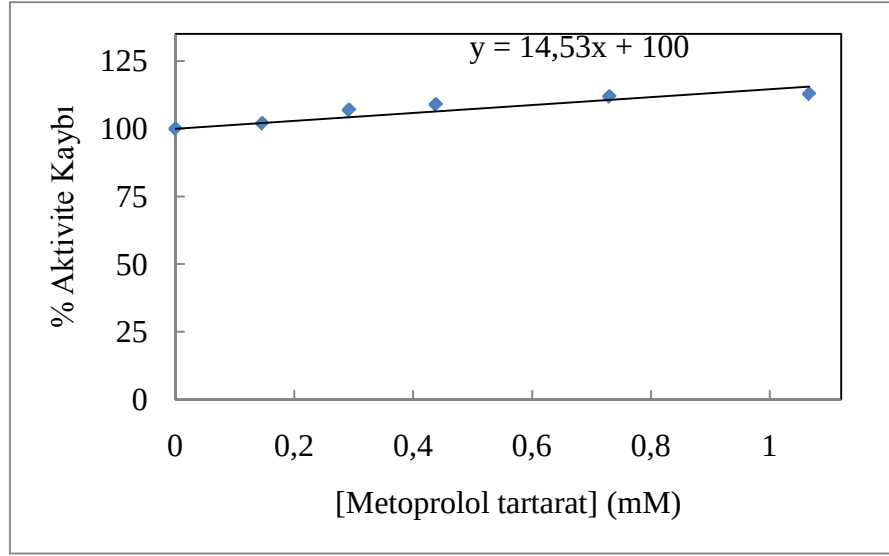
**Şekil 4.133.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği



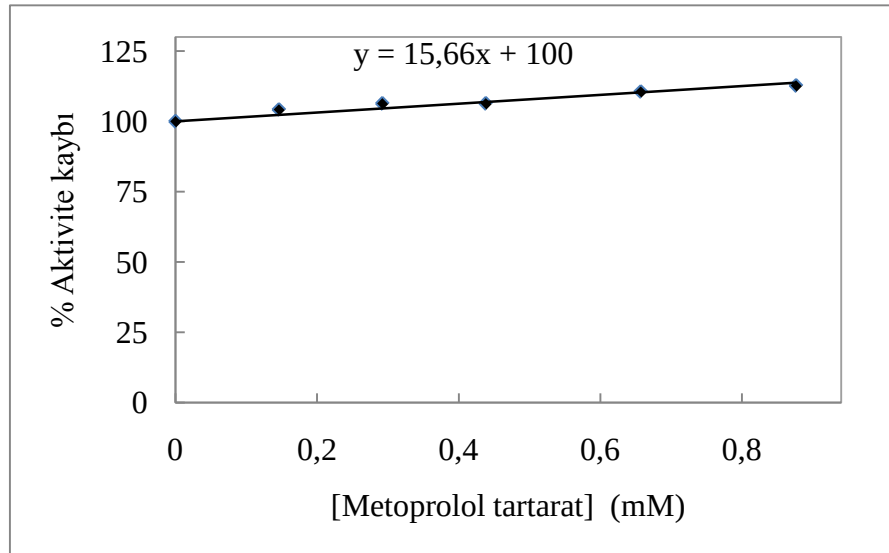
**Şekil 4.134.** Sıçan kalp GR enzimi üzerine adrenalin ilacının % aktivite-[I] grafiği



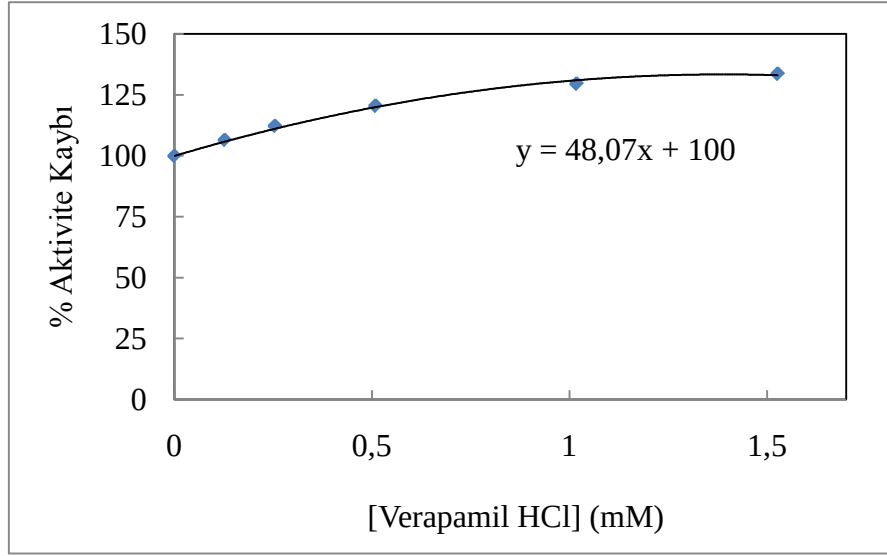
**Şekil 4.135.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının % aktivite-[I] grafiği



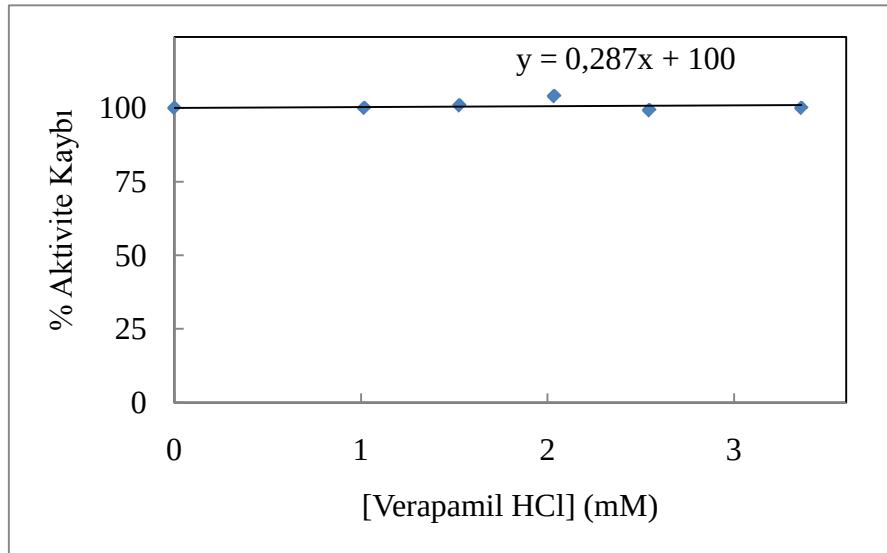
**Şekil 4.136.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının % aktivite-[I] grafiği



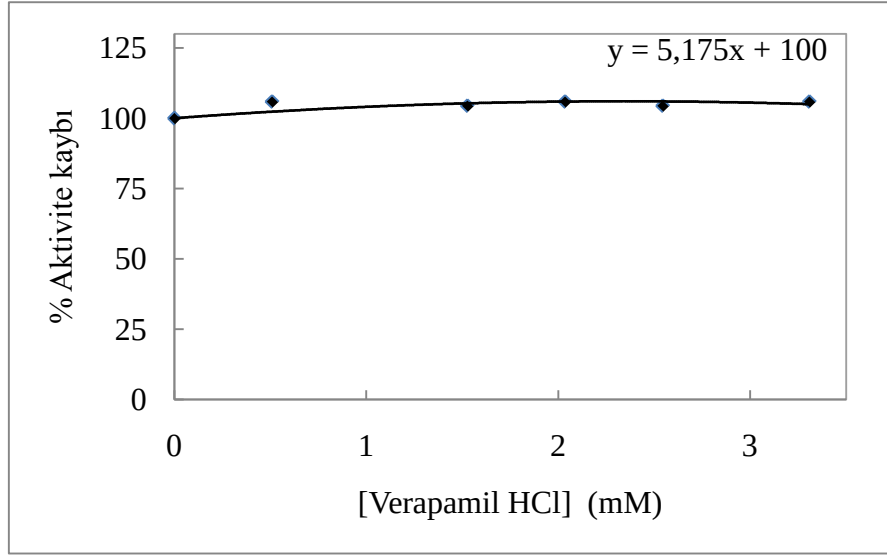
**Şekil 4.137.** Sıçan kalp GR enzimi üzerine metoprolol tartarat ilacının % aktivite-[I] grafiği



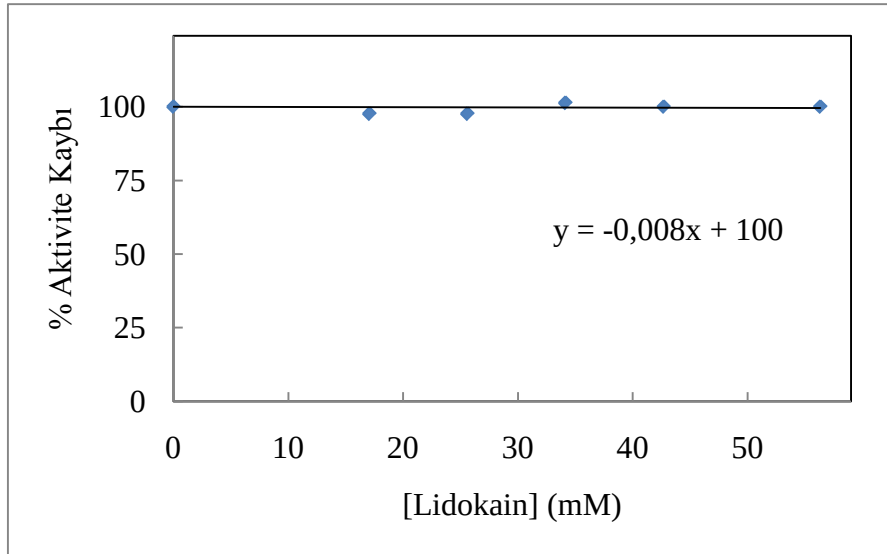
**Şekil 4.138.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine verapamil HCl ilacının % aktivite-[I] grafiği



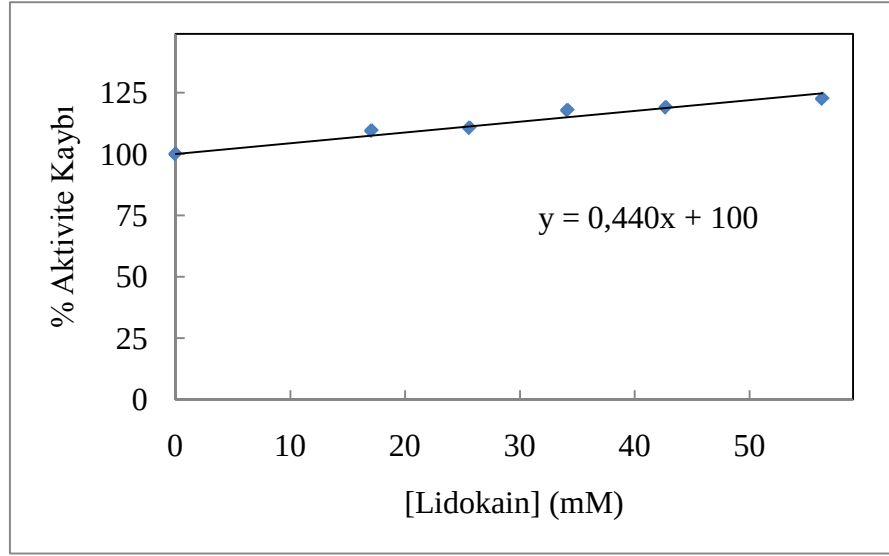
**Şekil 4.139.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine verapamil HCl ilacının % aktivite-[I] grafiği



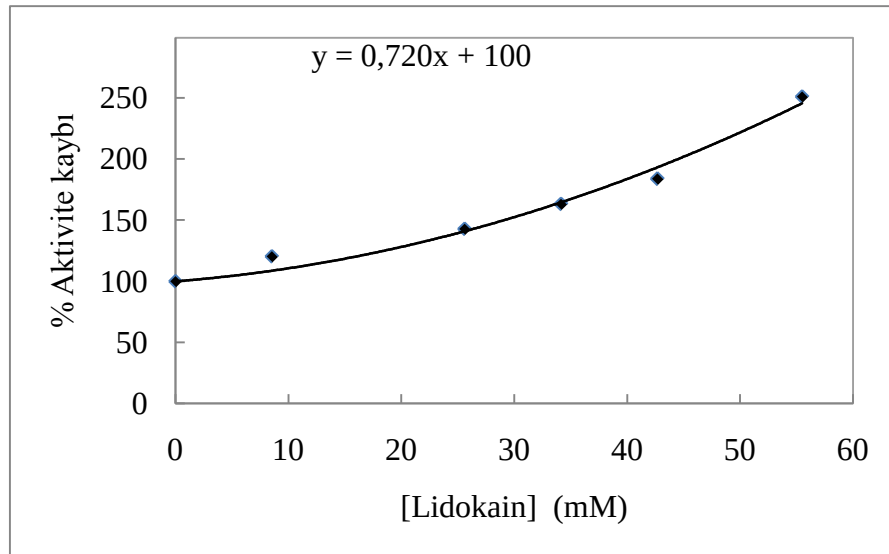
**Şekil 4.140.** Sıçan kalp GR enzimi üzerine verapamil HCl ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.141.** Sıçan kalp G6PD enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.142.** Sıçan kalp 6PGD enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.143.** Sıçan kalp GR enzimi üzerine lidokain ilacının % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.28.** İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları G6PD enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları

| DOKU    | Etkin madde         | IC <sub>50</sub><br>(mM) | Ortalama K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |
|---------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| AKCİĞER | Levofloksasin       | 0,07                     | 0,07 ±0,03                      | Yarışmasız      |
|         | Furosemid           | 0,13                     | 0,17±0,05                       | Yarışmasız      |
|         | Seftazidim          | 1,90                     | 2,03±1,18                       | Yarışmasız      |
|         | Sefuroksim          | 8,15                     | 7,21±3,63                       | Yarışmasız      |
|         | Gentamisin          | 17,34                    | 22,06±3,38                      | Yarışmalı       |
|         | Sefazolin           | 34,65                    | 40,11±21,12                     | Yarışmasız      |
|         | Metilprednisol      | 23,10                    | -                               | -               |
|         | Teikoplanin         | 27,72                    | -                               | -               |
|         | Teofilin            | Etkisiz                  |                                 |                 |
|         | Kotinin             | Aktive etti              |                                 |                 |
| KALP    | Digoksin            | 0,09                     | 0,13±0,01                       | Yarışmasız      |
|         | Furosemid           | 0,15                     | 0,17±0,02                       | Yarışmasız      |
|         | Dopamin             | 6,13                     | 10,26±1,49                      | Yarışmalı       |
|         | Adrenalin           | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Lidokain            | Etkisiz                  |                                 |                 |
|         | Metoprolol tartarat | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Verapamil HCl       | Aktive etti              |                                 |                 |

**Çizelge 4.29.** İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları 6PGD enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları

| DOKU    | Etkin madde         | IC <sub>50</sub><br>(mM) | Ortalama K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |
|---------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| AKCİĞER | Levofloksasin       | 0,07                     | 0,08±0,03                       | yarışmasız      |
|         | Furosemid           | 0,14                     | 0,17±0,05                       | yarışmasız      |
|         | Seftazidim          | 1,93                     | 1,79±0,91                       | yarışmasız      |
|         | Gentamisin          | 5,77                     | 7,03±1,74                       | yarışmalı       |
|         | Sefuroksim          | 9,24                     | 15,64±7,48                      | yarışmasız      |
|         | Sefazolin           | 46,20                    | 77,59±34,87                     | yarışmasız      |
|         | Teikoplanin         | 16,50                    | -                               | -               |
|         | Metilprednisol      | 27,72                    | -                               | -               |
|         | Teofilin            | 138                      | -                               | -               |
|         | Kotinin             | Aktive etti              |                                 |                 |
| KALP    | Digoksin            | 0,14                     | 0,18±0,09                       | yarışmasız      |
|         | Furosemid           | 0,17                     | 0,17±0,08                       | yarışmasız      |
|         | Dopamin             | 12,83                    | 5,59±1,69                       | yarışmalı       |
|         | Adrenalin           | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Lidokain            | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Metoprolol tartarat | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Verapamil HCl       | Etkisiz                  |                                 |                 |

**Çizelge 4.30.** İlaçların sıçan akciğer ve kalp dokuları GR enzimleri üzerine etkilerinin sonuçları.

| DOKU    | Etkin madde         | IC <sub>50</sub><br>(mM) | Ortalama K <sub>i</sub><br>(mM) | İnhibisyon türü |
|---------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| AKCİĞER | Levofloksasin       | 0,02                     | 0,03±0,01                       | Yarışmasız      |
|         | Furosemid           | 0,08                     | 0,08±0,03                       | Yarışmasız      |
|         | Seftazidim          | 0,68                     | 0,91±0,42                       | Yarışmasız      |
|         | Sefuroksim          | 1,56                     | 1,57±0,31                       | Yarışmasız      |
|         | Gentamisin          | 30,13                    | 43,37±17,91                     | Yarışmasız      |
|         | Sefazolin           | 28,88                    | 26,04±2,40                      | Yarışmalı       |
|         | Teikoplanin         | 24,75                    |                                 | -               |
|         | Metilprednisol      | 36,48                    |                                 | -               |
|         | Teofilin            | 115                      |                                 |                 |
|         | Kotinin             | 173                      |                                 |                 |
| KALP    | Furosemid           | 0,09                     | 0,10±0,01                       | Yarışmasız      |
|         | Digoksin            | 0,22                     | 0,25±0,08                       | Yarışmasız      |
|         | Dopamin             | 23,90                    | 4,90±1,10                       | Yarışmalı       |
|         | Adrenalin           | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Lidokain            | Etkisiz                  |                                 |                 |
|         | Metoprolol tartarat | Aktive etti              |                                 |                 |
|         | Verapamil HCl       | Aktive etti              |                                 |                 |

#### 4.7. İlaçların *in vivo* etkilerinin sonuçları

*In vitro* olarak yapılan çalışmada akciğer enzimleri üzerinde en fazla inhibisyon etkisi gösteren levofloksasin ve furosemid, kalp enzimleri üzerinde en fazla inhibisyon etkisi gösteren furosemid *in vivo* çalışmada tercih edildi. Sıçanların iç organlarını almak için ilaç verildikten 25 dakika sonra eterle uyutulmasını takiben ötenazi uygulandı.

Akciğer ve kalp dokularından homojenat hazırlandıktan sonra aktivite tayinleri yapıldı. Her bir ölçüm 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar Çizelge 4.31’de verilmiştir. Furosemid ve levofloksasinin hem akciğer, hem de kalpte enzim aktivitesi üzerine etkilerine bakılmıştır.



**Çizelge 4.31.** Sıçan kalp ve akciğer dokularında furosemid ve levofloksasinin *in vivo* aktivite ölçümlerinin ortalaması, standart sapması ve p değerleri sonuçları

| Enzim          |                 | X± SD (n=6)  | p     |
|----------------|-----------------|--------------|-------|
| G6PD (akciğer) | Kontrol         | 0,500 ±0,031 | -     |
|                | Furosemid       | 0,584±0,023  | 0,000 |
|                | Levofloksasinin | 0,510±0,039  | 0,591 |
| 6PGD (akciğer) | Kontrol         | 0,650±0,038  | -     |
|                | Furosemid       | 0,617±0,021  | 0,098 |
|                | Levofloksasinin | 0,603±0,035  | 0,025 |
| GR (akciğer)   | Kontrol         | 0,309±0,014  | -     |
|                | Furosemid       | 0,232±0,120  | 0,000 |
|                | Levofloksasinin | 0,305±0,018  | 0,605 |
| G6PD (kalp)    | Kontrol         | 0,062±0,007  | -     |
|                | Furosemid       | 0,067±0,008  | 0,236 |
|                | Levofloksasinin | 0,062±0,007  | 0,920 |
| 6PGD(kalp)     | Kontrol         | 0,120±0,018  | -     |
|                | Furosemid       | 0,126±0,011  | 0,376 |
|                | Levofloksasinin | 0,113±0,012  | 0,344 |
| GR (kalp)      | Kontrol         | 0,058±0,005  | -     |
|                | Furosemid       | 0,057±0,008  | 0,798 |
|                | Levofloksasinin | 0,055±0,002  | 0,522 |

\* İstatistikî sonuçlarla göre  $p<0,05$  bulunanlar önemli,  $p<0,01$  çok önemli,  $p>0,05$  anlamsız olarak değerlendirilmektedir.

Test sonucuna göre, sıçan akciğer dokusu GR ve G6PD enzimlerinin sonuçları çok önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. İlaçların diğer enzimler üzerindeki etkilerinde istatistiksel olarak kontrolden önemli farklılıklar tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

G6PD, 6PGD ve GR enzimleri canlı metabolizmanın önemli enzimlerindendir. Metabolizma için gerekli indirgeyici molekül olan NADPH ve birçok biyomolekülün yapıtaşı olan riboz-5-fosfat, G6PD ve 6-PGD enzimlerinin katilizlediği reaksiyonlar sonucu oluşur. Glutasyon redüktaz (GR), glutasyon disülfiti (GSSG) indirgeyerek glutatyon (GSH) dönüştüren antioksidan bir enzimdir.

Sözü edilen enzimlerin üçü de 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla birçok dokudan saflaştırılmıştır. Erat (2004) yaptığı çalışmada insan eritrositlerinden G6PD ve GR enzimlerini aynı kolondan ayrı ayrı saflaştırmayı başarmıştır. Bu çalışma kapsamında sıçan kalp ve akciğer dokularından G6PD, 6PGD ve GR enzimleri 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu kullanılarak aynı homojenattan sırayla saflaştırıldı. Saflaştırma basamakları; homojenat hazırlama ve afinite kromatografisi olmak üzere iki basamaktan ibarettir. Saflaştırma işlemleri homojenat hazırlama dahil yaklaşık olarak 5 saat sürmekte ve sonuçta üç enzim kolondan elüe edilebilmektedir. Bu işlemler sonucunda ortalama verim %92 gibi yüksek bir değer olarak belirlenmiştir. Elüsyon işlemi G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin elüsyon çözeltileri sırayla kolondan geçirilerek yapılmıştır. Bir önceki enzim tamamem kolondan alındıktan sonra diğerinin elüsyonuna geçilmiştir. Elüsyon işlemi her bir enzim için 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Bu saflaştırma yönteminin avantajları enzimlerin denatüre olma oranının az olması, saflaştırma süresinin kısalığı, daha az kimyasal kullanılması, çok hızlı ve yüksek verimle saflaştırma yapılmasıdır. Sözü edilen enzimlerin saflık derecesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez sonucunda G6PD, 6PGD ve GR için tek bantlar elde edilmiştir.

Saflaştırma basamaklarında, sıcaklığın kontrol altında tutmak ve aktivite kaybını azaltmak için daima kar ile soğutma yapılmıştır. Çözeltilerdeki protein miktarı mg seviyesinde Brodfard yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem hassasiyeti, daha az zaman alması ve az reaktif gerektirdiği için tercih edilmiştir.

G6PD ve 6PGD enzimlerinin aktivite ölçümleri Beutler, GR enziminin aktivite ölçümü Carlberg ve Mannervik metodlarına göre oda şartlarında yapılmıştır. Aktivite G6PD ve 6PGD enzimlerinde ortamdaki NADPH oluşumuyla, GR içinde azalmasıyla ölçülmüştür. Enzimlerin saflaştırılmasında, karakterizasyon işlemlerinde, kinetik çalışmalarında, ilaçların IC<sub>50</sub> değerleri ile K<sub>i</sub> sabitlerinin belirlenmesinde bu yöntem kullanılmıştır.

Sıçan akciğer ve kalp dokularından sırayla G6PD, 6PGD ve GR enzimleri saflaştırıldıktan sonra, karakterizasyon işlemleri ile kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

G6PD enzimi; akciğerden %95 verimle 580 kat, kalpten %91 verimle 1729 kat saflaştırma yapıldı. Spesifik aktiviteleri sırasıyla 181 ve 38 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Enzimin saflık derecesi ve alt birim molekül kütlesi SDS-PAGE ile belirlenmiştir. SDS-PAGE jeli üzerinde enzimin R<sub>f</sub> değeri belirlenmiştir. Bu değer kullanılarak satandartlarla çizilen grafikten elde edilen enzimlerin alt birim molekül kütleleri belirlenmiştir. Buna göre akciğer G6PD enziminin R<sub>f</sub> değeri ve molekül kütlesi 0,348 ve 63,54 kDa olarak, kalp için ise 0,311 ve 67 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon sonrası her iki dokudan saflaştırılan G6PD enzimlerinin K<sub>av</sub> değerleri ve doğal hallerinin molekül kütleleri 0,159 ve 134 kDa olarak eşit bulunmuştur. Kaz eritrositinde alt birim molekül kütlesi 73 kDa, doğal halinin ise 143 kDa olarak belirtilmiştir (Beydemir *et al.* 2003). Enzimlerinin doğal hallerinin molekül kütleleri, kaz eritrosit G6PD ile benzerdir.

G6PD enziminin optimum pH'sı sıçan akciğer dokusunda 8,0 (Tris-HCl), kalp dokusundanda ise 7,5 (fosfat) olarak bulunmuştur. Belirlenen değerler literatürde belirlenen aralıkta olup, akciğer için bulunan değer koyun karaciğeri için bulunan

değerle, kalp için bulunan değer de koyun böbreğinde bulunan değerle benzerlik göstermektedir (Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Ulusu 2005).

Optimum tuz konsantrasyonları sıçan akciğer dokusunda Tris-HCl için 160 mM, sıçan kalp dokusunda fosfat için 40 mM fosfat olarak belirlenmiştir.

G6PD enziminin aktivite çözeltilerinde kullanılan EDTA için yapılan optimum konsantrasyon çalışmalarında 1 mM'a kadar çalışılmış ve aktivite üzerine çok az etkili olduğu görülmüştür. G6PD enziminin aktivitesinin en iyi olduğu EDTA konsantrasyonları sıçan akciğer dokusu için 0,1 mM, sıçan kalp dokusu için de 0,5 mM olarak belirlenmiştir.  $MgCl_2$  için yapılan çalışmada sıçan kalp dokusu için 100 mM, sıçan akciğer dokusu için de 20 mM olarak belirlenmiştir.

G6PD enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri akciğer dokusunda 55°C, kalp dokusunda ise 45°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklıkla enzim aktivitesinin 3 katına kadar çıktığı gözlenmiştir. Her iki kaynaktan da 60°C üzerinde enzimin hemen denatüre olduğu tespit edilmiştir. Kalp dokusu için bulunan değer buzağı böbreği için bulunan değerle benzerlik gösterirken, akciğer dokusu için bulunan değer literatürde bulunan değerler aralığındadır (Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Ulusu 2005).

Sıçan akciğer ve kalp dokularından G6PD enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH'lar sırasıyla fosfat tamponunda 6,0 ve Tris-HCl tamponunda 9 olarak belirlenmiştir. Akciğer için belirlenen değer literatür ile benzerlik göstermezken, kalp dokusu için bulunan değer buffalo eritrositi ve kaz eritrosit G6PD enzimleri için elde edilen değerlerle aynıdır (Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003).

Sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda G6P ve  $NADP^+$  substratları için hesaplanan  $K_M$  sabitleri sırasıyla 0,028 ve 0,0053 mM;  $V_{max}$  değerleri ise 0,431 ve 0,466 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır. Sıçan kalp dokusundan

saflaştırılan G6PD enzimi için ise G6P ve NADP<sup>+</sup> substratları için hesaplanan K<sub>M</sub> sabitleri sırasıyla 0,031 ve 0,005 mM; V<sub>max</sub> değerleri ise 0,158 ve 0,241 EÜ/ml olarak bulunmuştur. K<sub>M</sub> sabitlerinde görüldüğü gibi her iki dokudan saflaştırılan G6PD enziminin NADP<sup>+</sup>'ya olan ilgisi G6P'ye göre daha yüksektir. Çünkü K<sub>M</sub> sabiti daha düşüktür. Bu durum literatürle uygunluk göstermektedir (Yılmaz *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003).

Bu çalışmada sıçan kalp ve akciğer dokularından saflaştırılan G6PD enzimin aktivitesi üzerinde NADPH'nin inhibisyon etkisi de araştırılmıştır. NADPH kalp dokusu G6PD'si üzerinde yarışmasız olarak inhibisyon etkisi gösterirken, akciğer dokusu G6PD enzimi üzerinde yarı yarışmalı olarak inhibisyon etkisini göstermiştir. NADPH'nin enzim üzerinde yarı yarışmalı inhibisyon etkisi daha önce rapor edilmemiştir. NADPH'nin K<sub>i</sub> sabitleri sıçan kalp ve akciğer dokularında sırasıyla 0,063 ve 0,0285 olarak Lineweaver-Burk grafikleri ile belirlenmiştir.

6PGD enzimi; sıçan akciğer dokusundan %90 verimle yaklaşık 784 kat, kalp dokusundan %91 verimle yaklaşık 1226 kat saflaştırılmıştır. Spesifik aktiviteleri sırasıyla 133,9 ve 61,8 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzim aynı afinite kolonu kullanılarak %78 verimle sıçan ve insan eritrositlerinden saflaştırıldığı belirtilmektedir (Beydemir *et al.* 2004; Adem 2006).

2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonla alınan 6PGD enzim numunelerinin, SDS-PAGE'de tek bantları elde edilmiştir. Jel üzerinde R<sub>f</sub> değerleri belirlenerek, standartlarla çizilen grafiğe göre molekül kütleleri hesaplanmıştır. R<sub>f</sub> değerleri ve molekül kütleleri sıçan akciğer dokusunda 0,425 ve 52,25 kDa; kalp dokusunda ise 0,311 ve 55,40 kDa olarak hesaplanmıştır. Jel filtrasyon sonrasında enzimlerin K<sub>av</sub> değerleri ve molekül kütleleri sıçan akciğer dokusunda 0,212 ve 107 kDa, sıçan kalp dokusunda 0,193 ve 116 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyon sonuçları beraber değerlendirildiğinde enzimin her iki dokuda da homodimer yapıda olduğu anlaşılmaktadır. Sıçan akciğer ve kalp dokuları 6PGD enzimlerinin molekül kütlesi ve yapısı için bulunan değerler, diğer dokulardan saflaştırılan 6PGD

sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Procsal and Holten 1972; Ceyhan *et al.* 2005; Betts and Mayer 1975).

6PGD enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri sıçan akciğer dokusunda 8,0 (Tris-HCl), kalp dokusunda 7,5 (fosfat) olarak belirlenmiştir. 6PGD enziminin akciğer dokusunda belirlediğimiz değer sıçan böbrek ve karaciğeri dokuları için belirlenen değerle aynıdır (Corpas *et al.* 1995). Kalp dokusundan saflaştırılan 6PGD için belirlenen optimum pH ise, sıçan ince bağırsak dokusu 6PGD enzimi için bulunan değere yakındır (Ceyhan *et al.* 2005)

Optimum tuz konsantrasyonları sıçan akciğer dokusunda Tris-HCl için 5-40 mM aralığında iken, sıçan kalp dokusunda fosfat için 5 mM olarak belirlenmiştir. Bu veriler enzimin düşük tuz konsantrasyonlarında aktivitesinin fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum literatürle benzerlik göstermektedir (Weisz *et al.* 1985)

MgCl<sub>2</sub> ve EDTA sıçan akciğer dokusu 6PGD enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiş, yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi artmıştır. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan enzim üzerine de EDTA 0,2 mM'da çok az bir aktivite artışı sağlarken yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi artmıştır. MgCl<sub>2</sub> ise enzim aktivitesini düşürmüştür. Bu durum literatürle farklılık göstermektedir (Veronese *et al.* 1974).

6PGD enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri sıçan akciğer dokusunda 40°C, sıçan kalp dokusunda ise 50°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklıkla enzim aktivitesinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Enzimin her iki kaynakta da 60°C üzerinde hemen denatüre olduğuda tespit edilmiştir. Enzimin akciğer dokusunda belirlenen optimum sıcaklık değeri, sıçan eritrositi ile; kalp dokusu için belirlenen değer de sıçan ince bağırsak dokusunda bulunan değerlerle aynıdır (Beydemir *et al.* 2004; Ceyhan *et al.* 2005).

Sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan 6PGD enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH'lar sırasıyla Tris-HCl tamponunda 8,5 ve fosfat tamponunda 7,0 olarak belirlenmiştir. Sıçan akciğer dokusu için belirlenen değeri literatürle benzerlik göstermektedir (Erat 2005).

Sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda 6PGA ve  $\text{NADP}^+$  substratları için hesaplanan  $K_M$  sabitleri sırasıyla 0,092 ve 0,030 mM;  $V_{\max}$  değerleri aynı sıra ile 0,397 ve 1,398 EÜ/ml olarak tespit edilmiştir. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda ise 6PGA ve  $\text{NADP}^+$  substratları için hesaplanan  $K_M$  sabitleri sırasıyla 0,051 ve 0,0031 mM;  $V_{\max}$  değerleri aynı sıra ile 0,475 ve 0,141 EÜ/ml olarak tespit edildi.  $K_M$  sabitlerinde görüldüğü gibi her iki dokudan da saflaştırılan 6PGD enzimlerin  $\text{NADP}^+$ 'ya olan ilgisi 6PGA'ya göre daha fazladır. Çünkü  $K_M$  değeri daha küçüktür. Bu durum literatürle benzerlik göstermektedir (Corpas *et al.* 1995; Ceyhan *et al.* 2005).

Bu çalışmada sıçan kalp ve akciğer dokularından saflaştırılan 6PGD enzimlerinin aktivitesi üzerinde NADPH'in inhibisyon etkisi araştırılmıştır. NADPH enzimleri yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek bulunan  $K_i$  sabitleri sıçan akciğer dokusunda 0,147 mM ve kalp dokusunda ise 0,099 mM olarak bulunmuştur. NADPH'in inhibisyon şekli literatürle benzerlik göstermektedir (Beydemir *et al.* 2004)

GR enzimi sıçan akciğer dokusundan %94 verimle yaklaşık 939 kat, kalpten %94 verimle yaklaşık 2936 kat saflaştırılmıştır. Spesifik aktiviteleri sırasıyla 34,88 ve 101,82 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır. Her iki dokudan da enzim yüksek verimle elde edilmiştir. Enzim daha önce aynı afinite kolonuyla %50'nin altında bir verimle saflaştırılmışken bu çalışmada verim %90'nın üzerine çıkmıştır (Erat 2004; Tekman *et al.* 2008). Verimin yüksek olmasının nedeni enzimlerin stabil pH'larında çalışılmış olması, saflaştırma işleminin kısa sürede yapılması ve saflaştırmanın tek basamakta yapılmış olamasıdır.

Afinite sonrası elde edilen GR enzim numuneleri ile yapılan SDS-PAGE’de tek bantlar elde edilmiştir. Sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin  $R_f$  değerleri ile bu değere göre molekül kütlesi sırasıyla 0,35 ve 62,73 kDa; kalp dokusu GR için  $R_f$  değeri ve molekül kütlesi ise 0,34 ve 61,83 kDa olarak hesaplanmıştır. Jel filtrasyon sonrası, her iki dokudan saflaştırılan GR enzimi için  $K_{av}$  değerleri 0,183 ve molekül kütleleri 121 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyon sonuçlarına göre enzimin doğal yapısı homodimer olduğu görülmektedir. Enzimlerin molekül kütleleri ve yapıları literatürle benzerlik göstermektedir (Carlberg and Mannever 1975; Acan and Tezcan 1989; Erat 2002).

GR enziminin optimum pH’sı sıçan akciğer dokusunda 8,5 (Tris-HCl tamponunda) ve sıçan kalp dokusunda 8,0 (fosfat tamponunda) olarak belirlenmiştir. Bulunan değerler literatürle benzerlik göstermektedir (Scott *et al.* 1963; Ulusu *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008). GR enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri tuz konsantrasyonları sıçan akciğer dokusu için Tris-HCl tamponunda 80 mM ve sıçan kalp dokusu için ise fosfat tamponunda 40 mM fosfat olarak belirlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu için çizilen şekiller incelendiğinde aktivite ölçümlerinde tuz konsantrasyonunun GR için çok önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Sıçan kalp ve akciğer dokularından saflaştırılan GR enzimleri için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH’lar fosfat tamponunda sırasıyla 7,5 ve 7,0 olarak belirlenmiştir. Her iki doku için bulunan değerler sığır eritrositi GR için bulunan değere yakındır (Erat 2002).

Sıçan kalp ve akciğer dokularından saflaştırılan GR enzimlerinin aktiviteleri üzerinde  $MgCl_2$  ve EDTA’nın etkisini araştırılmıştır.  $MgCl_2$  enzimlerin aktivitelerini çok az artırırken konsantrasyonu arttığında ise inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. EDTA, sıçan akciğer dokusunda GR enziminin aktivitesini özellikle 0,5 mM’dan sonra inhibe ettiği bulunmuştur. EDTA, sıçan kalp dokusu GR enzim aktivitesini ise arttırmış ve en uygun konsantrasyonu 0,5 mM olarak tespit edilmiştir.



Optimum sıcaklık değerleri her iki dokudan saflaştırılan GR enzimi için 65°C'dir. GR ısıya dayanıklı bir enzim olduğu belirtilmiştir (Lopez and Lee 1979). Akciğer GR enziminin aktivitesi sıcaklığın artmasıyla oda şartlarında ölçülen değer 10 katı kadar artmıştır. Enzimlerin aktivitelerini 80°C'ye kadar yüksek seviyede korudukları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir (Lopez and Lee 1979; Ulusu *et al.* 2005).

Sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda GSSG ve NADPH substratları için hesaplanan  $K_M$  değerleri sırasıyla 0,23 ve 0,020 mM;  $V_{max}$  değerleri aynı sırayla 0,263 ve 0,125 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan GR substratları GSSG ve NADPH için hesaplanan  $K_M$  değerleri sırasıyla 0,037 ve 0,012 mM;  $V_{max}$  değerleri aynı sırayla 0,998 ve 0,145 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Her iki dokuda, substratlar için hesaplanan  $K_M$  sabitlerinden görüldüğü gibi, GR enziminin NADPH'a olan ilgisi GSSG'a olandan daha fazladır. Çünkü  $K_M$  değerleri daha düşüktür. Bu durum ve bulunan değerlerin bazıları literatürle uygunluk göstermektedir (Ulus *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008).

Enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünleri olan  $NADP^+$  ve GSH moleküllerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve her iki dokudan saflaştırılan enzimleri yarışmasız olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. GSH için  $K_i$  sabiti sıçan akciğer dokusunda 11,33 mM ve sıçan kalp dokusunda ise 16,66 mM olarak bulunmuştur.  $NADP^+$  için  $K_i$  sabiti ise sıçan akciğer ve kalp dokularında sırasıyla 0,250 ve 0,531 mM olarak tespit edilmiştir. GSH için akciğer dokusunda bulunan  $K_i$  değeri balık karaciğeri için bulunan değere benzerlik göstermektedir (Tekman *et al.* 2008). Akciğer dokusunda  $NADP^+$  için hesaplanan  $K_i$  değeri sığır eritrosit enzimi için bulunan değere çok yakındır (Erat 2002).

İlaçların sözkonusu enzim aktivitelerini inhibe ettiği birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmayla rapor edilmiştir (Çiftci *et al.* 2000; Akyüz 2004; Erat ve Çiftci 2003; Şentürk 2006). Bu çalışmamızda sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine, tedavi sürecinde ilgili dokuları hedef alan ilaçlar

çalışılmıştır. İlaç ve kimyasalların inhibisyon etkileri  $IC_{50}$  değeri ve  $K_i$  sabitleriyle belirlenmektedir. Bu değerler düşük ise inhibisyon etkisi fazla, büyük ise azdır. Öncelikle ilaçların  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiş ve bu değeri düşük bulunan bazı ilaçların  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon türünün belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlaçların  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon türleri Lineweaver-Burk grafiğikleri çizilerek belirlenmiştir.

Çalışmalarda sıçan akciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkisi incelendi. Bu amaçla furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin ve teofilin ilaçları çalışıldı. Ayrıca nikotinin bir metaboliti olan kotininin enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisine bakıldı.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda levofloksasinin sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 0,07, 0,07 ve 0,02 mM olarak;  $K_i$  sabitleri aynı sırayla  $0,07 \pm 0,03$ ,  $0,08 \pm 0,03$  ve  $0,03 \pm 0,01$  mM olarak hesaplanmıştır. Levofloksasin üç enzimi de yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Levofloksasinin insan eritrosit 6PGD ve tavuk karaciğer dokusu GR üzerinde yarışmasız, koyun karaciğer GR üzerinde yarışmalı etkisi rapor edilmiştir (Akyüz 2004; Demir 2006; Erat ve Çiftci 2003).

Furosemidin sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 0,13, 0,14 ve 0,08 mM olarak;  $K_i$  sabitleri aynı sırayla  $0,17 \pm 0,05$ ,  $0,17 \pm 0,05$  ve  $0,08 \pm 0,03$  mM olarak hesaplanmıştır. Furosemidin üç enzimi de yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Furosemid insan eritrosit 6PGD enzimini yarışmasız olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bulunan değerler literatürle benzerlik göstermektedir (Akkemik *et al.* 2010).

Akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan biri de seftazidimdir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 1,90, 1,93 ve 0,68

mM olarak;  $K_i$  sabitleri aynı sırayla  $2,03 \pm 1,18$ ,  $1,79 \pm 0,91$  ve  $0,91 \pm 0,42$  mM olarak hesaplanmıştır. Seftazidim enzimleri yarışmasız olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Seftazidimin, insan eritrosit 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği literatürde rapor edilmiştir (Akyüz 2004; Şentürk 2006).

Sefuroksim sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitelerini yarışmasız olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Bulunan  $IC_{50}$  değerleri sırayla 8,15, 9,24 ve 1,56 mM olarak;  $K_i$  değerleri aynı sırayla  $7,21 \pm 3,63$ ,  $15,64 \pm 7,48$  ve  $1,57 \pm 0,31$  mM olarak hesaplanmıştır. Sefuroksimin insan eritrosit G6PD enzimini *in vivo* ve *in vitro*, 6PGD ve GR enzimlerini *in vitro* olarak inhibe ettiği literatürde rapor edilmiştir (Çiftci *et al.* 2000; Adem 2006; Şentürk 2006).

Akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi gentamisin tarafından inhibe edilmiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 17,34, 5,77 ve 30,13 mM olarak;  $K_i$  değerleri aynı sırayla  $22,06 \pm 3,38$ ,  $7,03 \pm 1,74$  ve  $43,37 \pm 17,91$  mM olarak hesaplanmıştır. Gentamisin G6PD ve 6PGD enzimlerini yarışmalı, GR enzimini yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Gentamisinin koyun ve balık eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimini yarışmasız olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Erdoğan *et al.* 2004; Beydemir *et al.* 2002). Akyüz (2004) yaptığı çalışmada gentamisinin insan eritrosit 6PGD enzim aktivitesini inhibe ettiğini belirtmiştir.

Sefazolin sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan enzimlerden G6PD ve 6PGD yarışmasız, GR enzimini de yarışmalı olarak inhibe etmiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 34,65, 46,20 ve 28,88 mM;  $K_i$  değerleri aynı sırayla  $40,11 \pm 21,12$ ,  $77,59 \pm 34,87$  ve  $26,04 \pm 2,40$  mM olarak hesaplanmıştır. Sefazolinin G6PD ve GR enzimleri üzerine inhibisyon etkisi literatürde belirtilmiştir (Çiftci *et al.* 2000; Beydemir *et al.* 2002; Erat ve Çiftci 2003). Akyüz (2004) insan eritrosit 6PGD enzimini, sefazolinin inhibe etmediğini belirtmiştir.

Teikoplanin ve metilprednisol sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini inhibe etmiştir. Teikoplanin için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 27,72, 16,50 ve 24,75 mM; metilprednisol için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri aynı sıra ile 23,10, 27,72 ve 36,48 mM olarak bulunmuştur. Teofilin enzimlerden 6PGD ve GR enzimlerini yüksek konsantrasyonda inhibe ederken, G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. Teofilin için belirlenen  $IC_{50}$  değerleri 6PGD için 138 mM, GR için de 115 mM olarak hesaplanmıştır. Teikoplaninin 6PGD üzerine inhibisyon etkisi literatürle benzerlik göstermektedir (Akyüz 2004)

Kotinin literatürde biyolojik olarak inaktif bir molekül olarak tarif edilmekle beraber, bunu destekleyecek yeterince çalışma yapılmadığı belirtilmektedir (Benowitz 1996). Sıçan akciğer dokusunda saflaştırdığımız enzimler üzerinde, kotininin *in vitro* olarak düşük konsantrasyonlarda etkisiz olduğu, yüksek konsantrasyonlarda G6PD ve 6PGD aktivitesini artırdığı, GR aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Kotininin GR için hesaplanan  $IC_{50}$  değeri 173 mM olarak bulunmuştur. Günde 20 adet sigara içen birinin serum kotinin seviyesi 0,001 mM olduğu düşünüldüğünde, çalışılan konsantrasyonların yüksekliği ve kotininin *in vivo* olarak bu enzimler üzerine ne kadar az etkili olabileceği hakkında fikir vermektedir.

Ayrıca sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkisi incelendi. Bu amaçla digoksin, dopamin, furosemid, adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat ve verapamil HCl ilaçları çalışıldı.

Digoksin ve furosemid sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini yarışmasız olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Digoksin için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırayla 0,09, 0,14 ve 0,22 mM;  $K_i$  sabitleri aynı sırayla  $0,13 \pm 0,01$ ,  $0,18 \pm 0,09$  ve  $0,25 \pm 0,08$  mM olarak tespit edilmiştir. Furosemid için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri de sırayla 0,15, 0,17 ve 0,01 mM;  $K_i$  sabitleri ise aynı sırayla  $0,17 \pm 0,02$ ,  $0,17 \pm 0,08$  ve  $0,11 \pm 0,01$  mM olarak hesaplanmıştır. Digoksin ve furosemidin inhibisyon etkisi literatürle benzerlik göstermektedir (Çiftci 1998; Akkemik 2010)

Dopamin sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırayla 6,13, 12,18 ve 23,90 mM;  $K_i$  sabitleri aynı sırayla  $10,26 \pm 1,49$ ,  $5,59 \pm 1,69$  ve  $4,90 \pm 1,10$  mM olarak bulunmuştur.

Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini adrenalin ve metoprolol tartarat aktive ederken, lidokain aynı dokudan saflaştırılan 6PGD ve GR'yi aktive G6PD enzimine etki etmediği tespit edilmiştir. Verapamil HCl aynı dokudan saflaştırılan G6PD ve GR enzimlerini aktive ederken, 6PGD enziminin aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Akciğerden saflaştırılan üç enzimimin aktivitesini *in vitro* olarak en fazla inhibe eden levofloksasin ve furosemid, kalp enzimlerinde ise furosemid olmuştur. Bu nedenle *in vivo* çalışmada bu ilaçlar tercih edilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda her iki ilacın da, istatistikî verilerle anlamlı olarak ( $p > 0,05$  olduğundan) kalp enzimleri üzerine herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. Akciğer enzimlerinden 6PGD üzerinde de ilaçların inhibisyon etkisi tespit edilmemiştir. Furosemidin akciğer G6PD enzimini %16 oranında aktive ettiği, GR enzimini %20 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Levofloksasinin, sıçan kalp ve akciğer dokularındaki G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine inhibisyon etkisi tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak çalışma kapsamında metabolizma için oldukça önemli üç enzim olarak bilinen G6PD, 6PGD ve GR sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılıp karakterize edildi. Bu çalışma Sprague–Dawley türü sıçanlar üzerinde yürütülmüştür. Enzimlerin optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum EDTA ve  $MgCl_2$  konsantrasyonu, stabil pH ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık gibi özellikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda enzim-substrat arasındaki ilginin bir göstergesi olan  $K_M$  sabitleri ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafikleriyle belirlenmiştir. Enzimlerin katelizlediği reaksiyonların ürünlerinin enzim aktivitesi üzerinde etkisi incelenerek, ürünlerin inhibisyon türü ve  $K_i$  sabitleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplanmıştır. Her üç

enzim de 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisi kullanılarak, aynı anda sırayla saflaştırılmıştır.

Bazı ilaçların saflaştırılan enzimler üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Seçilen ilaçlar dokularda oluşan rahatsızlıkların tedavisi için kullanılan ilaçlar olmasına dikkat edilmiştir. Sıçan akciğer dokusu G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinede furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin, teofilin ilaçların ve kotininin etkileri araştırılmıştır. Sıçan akciğer dokusu G6PD, 6PGD, GR enzimlerini *iv vitro* olarak inhibe eden furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Metilprednisol ve teikoplanin hariç diğer ilaçların K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir.

Nikotinin ana meteboliti olan kotininin sıçan akciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda G6PD ve 6PGD enzimlerini aktive ederken, GR enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerin aktivitesi üzerine de digoksin, dopamin, furosemidin inhibisyon etkisi tespit edilmiş ve ilaçlar için IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon türü belirlenmiştir. Adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının inhibisyon etkisi gözlenmemiş, bazılarının enzim aktivitesini artırdığı belirlenmiştir.

Levofloksasin ilacının her iki dokudaki üç enzimin aktiviteleri üzerinde *in vivo* etkisi araştırılmış ve ilacın enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkisi tespit edilmemiştir. Furosemidin kalpte üç enzim üzerinde *in vivo* olarak etkisi gözlenmezken, akciğerde G6PD enzimini aktive ettiği, GR enziminde inhibe ettiği, 6PGD enzimi üzerinde de herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir.

## KAYNAKLAR

- Acan, N.L., Tezcan E.F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Lett.* 250, 72–74.
- Acan, N.L., Tezcan E.F., 1995. Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. *Biochem. Mol. Med.* 54, 33–37.
- Adem, Ş., 2006. İnsan eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akyuz, M., Erat, M., Ciftci, M., Gumustekin, K., Bakan, N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19:361–5.
- Ahijevych, KL. Tyndale, RF. Dhath, RK. Weed, HG. and Browning KK., 2002. Factors influencing cotinine half-life during smoking abstinence in African American and Caucasian women. *Nicotine Tob Res*, 4, 423-431.
- Andersson, K., Jasson, A., Kuylensstierna, F., and Eneroth, P., 1993. Nicotine and its major metabolite cotinine have different effects on aldosterone and prolactin serum levels in the normal male rat. *Eur. J. Pharmacol*, 228, 305-312.
- Andersson, G., Vala, EK., and Curvall, M., 1997. The influence of cigarette consumption and smoking machine yields of tar and nicotine on the nicotine uptake and oral mucosal lesions in smokers. *J Oral Pathol Med*, 26, 117-123.
- Anonymous 2004. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, vol. 83, IARC Press, Lyon, France,
- Antonenkova, VD., 1989. Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem*, 183, 75-82.
- Arrick, B.A., and Nathan, C.F., 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficiency. A review, *Cancer Research*, vol. 44, 4224-4232.
- Barenghi, L., Ceriotti, F., Ripamonti, M., Luzzana, M., Bonini, P., 1987. Erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase measured by a differential pH technique. *Clin Chem.* 33/4 579-582.
- Beitner, R., Nordenberg, J., 1979. Inhibition of 6-PGD by glucose 1,6-bisphosphate, *Biochim Biophys Acta*, 583, 266-269.
- Benowitz, NL., Jacob, PK., Ahijevych, M., Jarvis, J., Hall, S., LeHouezec, J., Hansson, A., Lichtenstein, E., Henningfield, J., Tsoh, J., Hurt, RD., and Velicer, W., 2002. *Nicotine Tob, Res*, 4, 149-159.
- Benowitz, NL., Jacob, P., 2001. Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol*, 51, 53-59.
- Benowitz, NL., 1996. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev*, 18, 188-204.
- Benowitz, NL., and Jacob, P., 1994. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther*, 56, 483-493.
- Benowitz, NL., Zevin, S., and Jacob, P., 1997. Sources of variability in nicotine and cotinine levels use with use of nicotine nasal spray, transdermal nicotine and cigarette smoking. *Br J. Clin Pharmacol*, 43, 256-267.

- Benowitz NL., Jacob, P., Denaro, C., and Jenkins, R., 1991. Stable isotope studies of nicotine kinetics and bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*, 49, 270-277.
- Benowitz NL., 1988. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med*, 319, 1318-1330.
- Benowitz NL., 1986. The human pharmacology of nicotine. *Res Adv Alcohol Drug Probl*, 9:1-52.
- Benowitz, NL., Kuyt, F., Jacob, P., 1982. Circadian blood nicotine concentrations during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther*, 32, 758-764.
- Beutler, E., 1971. Red cell metabolism. *Manual of biochemical methods*. Academic pres, London; 12: 68-70.
- Beutler, E., 1973. Screening for Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. *Israel Journal of Medical Sciences*, (9):9-10: 1350-1352.
- Betts, SA., Mayer, RJ., 1975. Purification and Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Rabbit Mammary Gland. *Biochem. J.* 151, 263-270
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., and Küfrevioğlu, Ö. İ., 2002. Purification and Characterization of Glucose 6-phosphate Dehydrogenase from Sheep Erythrocytes and Inhibitory Effects of some Antibiotics on Enzyme Activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17: 4, 271 — 27
- Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Çiftci, M., Bakan, E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003. Purification of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Goose Erythrocytes and Kinetic Properties. *Turk J Vet Anim Sci* 27-1179-1185
- Beydemir, Ş., Ciftci, M., Yılmaz, H., Küfrevioğlu Ö.İ., 2004. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase: Purification, Characterization and Kinetic Properties from Rat Erythrocytes. *Turk J Vet Anim Sci* 28, 707-714
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
- Boggaram, V., Brobjer, KL., and Mannervik, B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crisitalization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340.
- Borregaard, N., Schwartz, JH., Tauber, A., 1984. Proton secretion by stimulated neutrophils. *J. Clin Invest*, 74, 455-9.
- Brandange, S., and Lindblom, L., 1979a. The enzyme "aldehyde oxidase" is an iminium oxidase. Reaction with nicotine delta l'(5') iminium ion. *Biochem Biophys Res Commun*, 91, 991-996.
- Bradford, MM., 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.
- Bublitz, C., Steavenson, S., 1988. The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 263, 12849-53.
- Bülbül, M., Erat, M., 2008. Investigation of the effects of some sulfonamide derivatives on the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, June; 23(3): 418–423
- Byrd, GD., Uhrig, MS., deBethizy, JD. Caldwell, WS., Crooks, PA., Ravard, A., and Riggs, R., 1994. Direct determination of cotinine-N-glucuronide in urine



- using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*, 23, 103-107.
- Byrd, GD., Chang, KM., Grene, JM., and deBethizy, JD., 1992. Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine and trans-3\_-hydroxycotinine in smokers. *Drug Metab Dispos* 20:192-197.
- Byrd, GD., Davis, RA., and Kazemi-Vala, E., 1995a. Comparison of methods for determining nicotine and its metabolites in urine, in Conference of the Society for Research on Nicotine and Tobacco, Mar 1995, San Diego, CA. Poster 9.
- Byrd, GD., Robinson, JH., Caldwell, WS. and deBethizy, JD., 1995b. Comparison of measured and FTC-predicted nicotine uptake in smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 122, 95-103.
- Coban, T.A., Senturk, M., Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I., 2007. Effects of some metal ions on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Prot. Peptide Letters* 14,1027–1030.
- Carlberg, I., and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Carlberg, C., and Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Pres, Orlando, FL.
- Carlberg, I., and Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B. *Analytical Biochemistry*, 116, 531-536.
- Caldwell, WS., Grene, JM., Byrd, GD., Chang, KM., Uhrig, MS., deBethizy, JD., Crooks, PA., 1992. Characterization of the glucuronide conjugate of cotinine: a previously unidentified major metabolite of nicotine in smokers' urine. *Chem Res Toxicol*, 5, 280-285.
- Carne, A., 1982. Purification by dye-ligand chromatography of an NADP-dependent enzyme, 6-phosphogluconate dehydrogenase from lamb's liver, *Anal Biochem* 121, 227-229.
- Ceyhan, D., Danisan, A., Ogus, H., Ozer, N., 2005. Purification and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *The Protein Journal*, Vol. 24, No. 5
- Chelchowska, M., Laskowska-Klita, T., Leibschang, J., 2006. Activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reductase in umbilical cord blood of newborns from mothers smoking during pregnancy, 63(10),970-3
- Corpas, FJ., Garcia-Salguero, L., Peragon, J., Lupianez, J.A., 1995. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Life Sciences* 6:179-189.
- Corpas, FJ, Garca-Salguero, L., Barroso, JB., Aranda, F., Lupitez, JA., 1995. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. II. Isolation and partial purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Moll Cell Biochem.* 144 (2): 97-104.
- Çiftci, M., 1998. Bazı İlaçların İnsan Eritrositlerinde Bulunan Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Çiftci M., Küfrevioğlu Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ. 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacol. Res.* 41, 109-113.
- Ciftci, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, MN., Pençe, S., Küfrevioğlu Ö.İ., 2001. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo. *Clinical Biochemistry* 34, 297–302
- Çiftci, M., Türkoğlu, V., Aldemir, S., 2002. Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver. *Vet. Med. Czech*, 47, (10–11): 283-288
- Ciftci, M., Beydemir, Ş., Yilmaz, H., Bakan, E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study. *Pol J Pharmacol.* 54: 275-280.
- Çiftci M., Erat, M., 2003. In Vitro Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase from Sheep Liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, December Vol. 18 (6), pp. 545–550
- Çiftci, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Altıkat S., 2003. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expression and Purification* 29, 304–310
- Çiftci, M., Çiltaş, A., Erdoğan O., 2004. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Vet. Med. Czech*, 49, (9): 327-333
- Gorrod, J.W., and Hibberd, A.R., 1982. The metabolism of nicotine-delta l'(5')-iminium ion, in vivo and in vitro. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 7, 293-298.
- Gorrod, J.W., and Jacob, P., 1999. Editors, *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*, Elsevier Science, Amsterdam 191-224.
- Cooper, A.J.L., 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N. Prusiner, S.B., Dimauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Burtterworth-Heinemann, Boston, 1195-1230.
- Curvall, M., Kazemi-Vala, E., and Englund, G., 1991. Conjugation pathways in nicotine metabolism, in *Effects of Nicotine on Biological Systems* (Adlkofer F and Thureau K eds) pp 69-75, Birkhauser Verlag, Basel.
- Danner, J., Lenhoff, H.M., and Heagy, W., 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH., *Analytical Biochemistry*, 82, 586-590.
- Dar, M., S. Li, C., and Bowman, E. R., 1993. Central behavioral interactions between ethanol, (-)-nicotine and (-)-cotinine in mice. *Brain Res. Bull*, 32, 23-28.
- Dar, M. S., Bowman, E.R., and Li, C., 1994. Intracerebellar nicotinic-cholinergic participation in the cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in mice. *Brain Res*, 644, 117-127.
- Del Mar M., Puerta M., Perlierra AG., 1986. Purification and properties of the enzyme 6- Phosphogluconate dehydrogenase from *dicentrarchus labrax* 1.liver. *Comp Biochem Physiol.*; 83 B (1): 215-220.
- Demir, H., Erat, M., Şakiroğlu H., 2006. In Vitro Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase Obtained from Chicken Liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*

30, 513-519

- Demir, E., 1994. Diabetlerde eritrosit glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz aktivitelerinin glikolize hemoglobin ve lipid peroksidasyonu ile değişimlerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum.
- Dimich, W.H., Gree H., Brauer M. and Leung V., Occup J., 1997. Analysis of nicotine and cotinine in the hair of hospitality workers exposed to environmental tobacco smoke. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 39, 946-948.
- Erat, M., 2002. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Erzurum.
- Erat, M., Ciftci, M., 2003. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase from sheep liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, December, Vol. 18 (6), pp. 545–550
- Erat, M., 2004. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2,5 -ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. *Protein Expr Purif*;34:257–260.
- Erat, M., Şakiroğlu H., Ciftci, M., 2005. Effects of some antibiotics on glutathione reductase activities from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, February; 20(1): 69–74
- Erat, M., 2005. Purification of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Chicken Liver and Investigation of Some Kinetic Properties *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Volume 35, Issue 1 , pages 53 - 69
- Erenmemisoglu, A., and Tekol, Y., 1994. Do nicotine metabolites have an effect on pain perception? Antinociceptive effect of cotinine in mice. *Pharmazie*, 49, 374-375.
- Erdoğan, O., Çiftci, M., Çiltaş, A., Hisar, O., 2004. Inhibition Effects of Some Antibiotics on the Activity of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Erythrocytes. *Turk J Vet Anim Sci* 28, 675-681
- Eisert, R. and Pawliszyn, J., 1997. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 69, 3140-3147.
- Eneroth, P., Fuxe, K., Gustafsson, J-Å., Hökfelt, T., Löfström, A., Skett, P., Agnati, L., 1977. The effect of nicotine on central catecholamine neurons and gonadotropin secretion. III. Studies on prepubertal female rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. *Med Biol*, 55, 167-176.
- Fujiwara, Y., Kondo, T., Murakami, K., and Kavakami, Y., 1989. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non insulin dependent diabetes. *Clin. Wochenschr*, 67, 336-341.
- Gabrielsson, J., and Boniesson, U., 1987. Constant-rate infusion of nicotine and cotinine. I. A physiological pharmacokinetic analysis of the cotinine disposition, and effects on clearance and distribution in the rat. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 15, 583-599.
- Garcia-Alfonso, C., Martinez-Galisteo, E., Llobell, A., Barcena, JA., Lopez-Barea, J., 1993. Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int J Biochem* 25: 61–68,

- Goldberg, S.R., Risner, M.E., Stolerman, I.P., Reavill, C., and Garcha, H.S., 1989. Nicotine and some related compounds: Effects on schedule-controlled behavior and discriminative properties in rats. *Psychopharmacology*, 97, 295-302.
- Gray, T.R., Shakleya, D.M., and Huestis, M.A., 2008. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, nor nicotine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 863, 107-114.
- Grunewald, R.W., Weber, I.I., Kinne-Saffran, E., 1993. Control of sorbitol metabolism in renal inner medulla of diabetic rats, *Biochim Biophys Acta*, 1225, 39-47.
- Gupte, S.A., Li K., Okada T., Sato K., Oka. M.L., 2002. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *JPharmacol Exp Ther.* 301, 299-305.
- Gül M., Kutay F.Z., Temocin S. and Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp.Biol.* 38, 625-634.
- Hanau, S., Rippa, M., Bertei, M., Dallochio, F., Barret, M.P., 1996. 6-phosphogluconate dehydrogenase from trypanosoma brucei kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur J Biochem.*; 240: 592-599.
- Hecht, S.S., Carmella, S.G., and Murphy, S.E., 1999b. Effects of watercress consumption on urinary metabolites of nicotine in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8: 907-913.
- Herzig, K.E., Callaway, E., Halliday, R., Naylor, H. Benowitz, N.L., 1998. Effects of cotinine on information processing in nonsmokers. *Psychopharmacology*, 135, 127-132.
- Hey, Y., Dean, P.D., 1983. Tandem dye-ligand chromatography and biospecific elution applied to the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochem J.* Feb 1,209(2), 363-71.
- Hochster, R.M., Kates, M., Quastel, J.H.: *Metabolic Inhibitors*. Academic Press, New York, 1972; 71-89
- Hurt, R.D., Dale, L.C., Offord, K.P., Lauger, G.G., Baskin, L.B., Lawson, G.M., 1993. Serum nicotine and cotinine levels during nicotine-patch therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 54,98-106.
- Hollenberg, P.F., 1992. Mechanisms of cytochrome p-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEP J* 6, 686-94.
- Hoffmann, D., Djordjevic, M.V., Hoffmann, I., 1997. *Prev. Med.* 26, 427-34.
- Hutchison, J.S., Winberry, L., Nakayama, R., Holten, D., 1984. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes. *Biochim el Biophysic Acta* 781:30-38.
- Jacob, P., Shulgin, A.T., and Benowitz, N.L., 1990. Synthesis of (3'R, 5'S)-trans-3'-hydroxycotinine, a major metabolite of nicotine. Metabolic formation of 3'-hydroxycotinine in humans is highly stereoselective. *J Med Chem*, 33: 1888-1891.
- Jacob, P., Hatsukami, D., Severson, H., Hall, S., Yu, L., and Benowitz, N.L., 2002. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 11, 1668-1673.
- Langone, J.J., Cook, G., Bjercke, R.J., and Lifschitz, M.H., 1988. Monoclonal antibody ELISA for cotinine in saliva and urine of active and passive smokers. *J. Immunol. Methods* 114, 73-78.

- Kataoka, H., Inoue, R., Yagi, K., and Saito, K., 2009. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 108-114
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı. Keenan, R.M.; Hatsukami, D.K., 1994. Pental, P.R.; Thompson, T.; and Grillo, M.A. Pharmacodynamic effects of cotinine in abstinent cigarette smokers. *Clin Pharmacol Ther*, 55, 581-590.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum. Kesim, MD., 2004. Sigara ve Gebelik. Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni, 38,2, 7-14.
- Kleina, J., Blanchette, P., And Korena, G., 2004. Assessing nicotine metabolism in pregnancy—a novel approach using hair analysis. *Forensic Science International* 145, 191-194
- Johansson, G., Joelsson, J., 1987. Affinity partitioning of enzymes using dextran-bound procion yellow HE-3G. Influence of dye-ligand density. *J Chromatogr.* 393 (2), 195-208.
- Kanji, MI., Toews, ML., Carper, WR., 1976. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Purification and partial characterization *JBC*, 251 (8), 2255-2257.
- Kim, K.S., Borzelleca, J.F., Bowman, E.R., and McKennis, H., 1968. Effects of some nicotine metabolites and related compounds on isolated smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 161, 59-69.
- Knapen, M. F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., and Steegers, E.A.P., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184.
- Kuehl, G.E., and Murphy S.E., 2003b. N-Glucuronidation of trans-3\_-hydroxycotinine by human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 16, 1502-1506.
- Kycrematen. GA. Vesell, ES., 1991. Metabolism of nicotine. *Drug Met Rev*, 23, 3-41.
- Kyerematen, GA. Owens, GF. Chattopadhyay, B, deBethizy, JD. Vesell, ES., 1988. Sexual dimorphism of nicotine metabolism and distribution in the rat. *Studies in vivo and in vitro. Drug Metab Dispos*, 16, 823-828.
- Kondo, T., Dale, O.L. and Beütler, E., 1980. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad.Sci. Biochemistry*, Vol. 77,11,6359-6362.
- Krebs, HA., Eggleston LV., 1978. The regulation of the pentosephosphate cycle in rat liver. In: Weber G (ed). *Adv enzymeregul.* Oxford: Pergamon Press Ltd, 12:421-33.
- Kuo, H.W., Yang, J.S. and Chiu, M.C., 2002. J. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay *Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 768, 297-303.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature, London*, 227,680.
- Levy, HR., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. In: Meister A (ed). *Advan Enzymol.* New York: John Wiley and Sons Inc., 48:97-191.
- Lopez-Barea, J., Lee, CY., 1979. Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation. *Eur J Biochem* 98: 487-499.

- Iyer, RB., Wang, J., Bachas, LG., 2002. Cloning, expression, and characterization of the *gsdA* gene encoding thermophilic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles*, 6 (4), 283-9.
- Madamanchi, NR., Anderson, JV., Alscher, RG., Cramer, CL., Hess, JL., 1992. Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiol* 100: 138–145,
- Man, C.N., Gam, L.H., Ismail, S., Lajis, R., and Awang, R., 2006. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry . *J. Chromatogr. B*, 844, 322-327.
- Mannervik, B., 1987. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 15 (4): 717-8.
- MacDougall, JM., Fandrick, K., Zhang, X., Serafin, SV., and Cashman, JR., 2003. Inhibition of human liver microsomal (S)-nicotine oxidation by (-)-menthol and analogues. *Chem Res Toxicol*, 16, 988-993.
- McBride, PH., 1992. The health consequences of smoking: cardiovascular diseases. *Med Clin North Am.* 76,333-353.
- McKie, R., 2004. Warning: nicotine seriously improves health. *The Observer*. [http://observer.guardian.co.uk/uk\\_news/story/0,6903,1263845,00.html](http://observer.guardian.co.uk/uk_news/story/0,6903,1263845,00.html).
- Meger, M., Meger-Kossien, I., Schuler-Metz, A., Janket, D., and Scherer, G., 2002. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 778, 251-261.
- Meister A., 1988. Glutathione Metabolism and It's Selective Modification. *J. Biol. Chem.*, 263 (33), 17205-17208
- Menezes, L., Kelkar SM., Kaklij GS., 1989. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6 phosphogluconate dehydrogenase from *lactobacillus casei*: Responses with different modulators. *Ind J of Biochem Biophys.* 26: 329-333.
- Misra, I., and Griffith, O.W., 1998. Expression and purification of human  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Prot. Expr. Purific.* 13, 268-276.
- Montgomery, R., Conway Tomas W., Spector Arthur A., Chappell, D., 1996. *Biochemistry A Case-oriented Approach*, Sixth edition. Mosby-Year Book.
- Moyer, T.P., Charlson, J.R., Enger, R.J., Dale, L.C., Ebert, J.O., Schroeder, D.R., and Hurt, R.D., 2002. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles *Clin. Chem.* 48, 1460-1471.
- Murphy. SE., Johnston, LM., Pullo, DA., 1999. Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. *Chem Res Toxicol*, 12, 639-645.
- Müller, F., *Chemistry & Biochemisry of Flavoenzymes*; Williams C.H., Ed.; CRC Pres: Boca Raton, Florida, 1992; 121-211.
- Neurath, GB., Dunger, M., Orth, D., and Pein, FG., 1987. Trans-3<sub>h</sub>-hydroxycotinine as a main metabolite in urine of smokers. *Int Arch Occup Environ Health*, 59, 199-201.
- Neurath GB., 1994. Aspects of the oxidative metabolism of nicotine. *Clin Investig*, 72, 190-195.

- Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Oeser, A., Tolbert, NE., Schnarrenberger, C., 1973. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves, *Arch.Biochem. Biophys.* 154, 438±448.
- Ohara, H., Russell, R., Uchida, K., and Kondo H., 2004. Purification and characterization of nad-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *leuconostoc lactis* sho-54. *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol. 98, No. 2, 126–128.
- Oldendorf, WH., 1974. Lipid solubility and drug penetration in the blood brain barrier. *Proc Soc Exp Biol Med.* 147, 813-815.
- Onat, T., 1996. Eritrosit Biyokimyasi. In Emerk K, Onat T ed. *Temel Biyokimya* Izmir, Saray Medikal Yayıncılık, 865-8797.
- Ozols J., 1993. Isolation and complete amino acid sequence of lumenal endoplasmic reticulum glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 5302±5306.
- Özabacıgil, F., 2005. İnsan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine *in vitro* ve tavşanlarda *in vivo* etkisinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Özer, N., Bilgi, C., Ögüs, H., 2002. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase purification and kinetic properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 253–262
- Pearse, B.M., Rosemeyer, M.A., 1975. 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, *Methods Enzymol*, 41, 220-226.
- Pelkonen, O. M., Pasanen, H., Kuha, B., Gachalyıl, M., Kairaluoma, E. A., Sotaniemi, S. S., Park, F. K., Friedman, H. V., Gelboin., 1986. The effect of cigarette smoking on 7-ethoxyresorufin O-deethylase and other monooxygenase activities in human liver: analyses with monoclonal antibodies *Br. J. clin. Pharmac.* 22, 125-134.
- Proscal, D., Holten, D., 1972. Purification and properties of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Activity at normal *in vivo* concentration of coenzyme, *Biochem*, 11(7), 1310-1314.
- Reclos, GJ., Hatzidakis, CJ., Kruithof, RA., 1999. G-6-PD Diagnosis: Modification of the standard method eliminates the need for an additional hemoglobin determination. *Pharmakeftiki* 12(1), 25-31.
- Reclos, GJ., Hatzidakis, CJ., Schulpis, KH., 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. *Journal of Medical Screening*, 7(1), 46-51.
- Reagan-Shaw, S., inakshi Nihal, M., Ahmad N., 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* Vol. 22, 659-661
- Reuter, R., Naumann, M., Metz P., Kopperschlager, G., 1990. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6. *Biomed Biochim Acta.* 49 (7): 539-46.

- Richman, P.G., and Meister, A., 1975. Regulation of  $\gamma$ - glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 1422-1426.
- Rippa, M., Picco, C., Signorini, M., Pontremoli, S., 1971. Evidence for a tyrosine residue at the triphosphopyridine nucleotide- binding site of 6-PGD, *Arch Biochem Biophys*, 147, 487-492.
- Risner, M. E., Goldberg, S. R., Prada, J. A., and Cone, E. J., 1985. Effects of nicotine, cocaine and some of their metabolites on schedule-controlled responding by beagle dogs and squirrel monkeys. *Pharmacol. Exp. Ther.* 234(1), 113-119.
- Roark, S., Brown, K., 1996. Effects of metal contamination from mine tailings on allozyme distributions of populations of Great plains fishs. *Environ Toxicol Chem.* ;15 (6): 921-927.
- Scott, E., Duncan, I.W., Eksrand, V., 1963. Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *J Biol Chem* 238:3928–3933
- Scott, W.A., Tatum E.L., 1971. Purification and partial characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 246 (20), 6347-6352.
- Scott. W A., 1975. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *neurospora crassa*. *Methods Enzymol*,41, 177-82.
- Segel I.H., 1968. *Biochemmical calculations*. Inc., New York,403.
- Serrano, A., Rivas, J., Losada, M., 1984. Purification and properties of glutathione reductase from the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain 7119. *J Bacteriol* 158:17–324
- Skowronski, R. J. and Feldman, D., 1994. Inhibition of Aldosterone Synthesis in Rat Adrenal Cells by Nicotine and Related Constituents of Tobacco Smoke. *Endocrinology*, 0013.7227/94/1346-2171.
- Shohet, S.B., and Beütler, E., 1986. Glutathione metabolism of the erythrocyte. *Williams Hematologie. The Erythrocyte*, Part Four.
- Siems. W.G., Sommerburg. O., Grune, T., 2000. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol.* 53(1). 9-17.
- Şentürk, M., 2006. Glutatyon redüktaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Takada, K., Swedberg, M. D. B., Goldberg, S. R., and Katz, J. L., 1989. Discriminative stimulus effects of intravenous 1-nicotine and nicotine analogs or metabolites in squirrel monkeys. *Psychopharmacology*, 99, 208-212.
- Tandoğan, B., 2004. Kuzu böbrek korteksinden, glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- Tandogan, B., Ulusu, N.N., 2005. Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Purified From Lamb Kidney Cortex. *Turk J Biochem* 30 (2); 178-182.
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 148, 117–121



- Toews, M.L., Kanji, M., Carper, W., 1976. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, J Biol Chem., 251 (22), 7127-7131.3.
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P., and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, Journal of Chromatography B. 684, 77-97.
- Topham CM., Dalziel K., 1986. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Biochem J. 234: 671-677.
- Türkoğlu, V., Aldemir, S., Ciftci, M., 2003. Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Sheep Liver. Turk J Chem 27, 395-402
- Ulusu, G., Erat, M., Ciftci, M., Sakiroglu, H., Bakan, E., 2005a. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. Turk J. Vet. Anim. Sci. 29, 1109–1117.
- Ulusu N.N., Kus M.S., Acan L., Tezcan E.F., 1999. A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31, 787-796.
- Ulusu, NN., Tandogan, B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. Mol Cell Biochem. 303(1-2): 45-51.
- Veronese, M.F., Boccu, E., Fontana, A., 1974. Isolation and some properties of 6-PGD from *Bacillus stearothermophilus*, Biochim Biophys Acta, 334, 31-44.
- Voncken, P., Rustemeier, K., and Schepers, G., 1990. Identification of cis-3'-hydroxycotinine as a urinary nicotine metabolite. Xenobiotica 20, 1353-1356.
- Yamamoto, K.I., and Domino, E.F., 1965. Nicotine-induced EEG and behavioral arousal. Int. J. Neuropharmacol, 4, 359-373.
- Yılmaz, H., Ciftci, M., Beydemir, Ş., Bakan, E., 2002. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from chicken erythrocytes investigation of some kinetic properties. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 32: 3, 287-301
- Zaheer, N., Tewari. KK., Krishan, PS., 1967. Mitochondria! forms of glucosc-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. Arch Biochem Biophys. 120, 22—34.
- Zubay, G., 1988. Biochemistry, Second Edition, Macmillan Publishing Company.
- Zevin, S. Jacob, P. and Benowitz N.L, 1997. Cotinine effects on nicotine metabolism. Clin Pharmacol Ther 61: 649-654.
- Zevin, S., Jacob P., Geppetti, P. Benowitz N.L., 2000. Clinical pharmacology of oral cotinine. Drug Alcohol Depend, 60, 13-18.
- Zuccaro, P., Pichini, S., Altieri, I., Rosa, M., Pellegrini, M., and Pacifici, R., 1997. Clin. Chem 43, 180-181.
- Weisz, KS., Schofield, PJ., Edwards, MR., 1985. Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification and kinetic properties. J of Neurochem. 44 (2): 510-517.
- Williams W.J., Beutler E., Ersleu A.J. and Lichtman M.A., 1986, Hematology, New York, McGraw-Hill Book Company, 567
- Wood T., 1986. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. Cell Biochem Funct, 4, 235-40.
- Worhingyon, DJ. and Rosemeyer, MA., 1976. Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. EÜr. J. Biochem., 15, 60(2), 459-66.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1977 yılında Ordu'nun Aybastı ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Aybastı'da tamamladı. Orta öğrenimini Fatsa'da bitirdi. 1996 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2000 yılında tamamladı. 2003 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Yüksek Lisans öğrenimini, Haziran 2006'da tamamladı. 2006 yılında başladığı doktora eğitimini 2011 yılında bitirdi. 2000 yılından beri Erzurum'da öğretmenlik yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.