

26758

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANDAN ASPARAJİN İLE GLUTAMİNİN İZOLASYONU
VE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ

BİYOKİMYA (ECZACILIK) PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Doç.Dr.Abdullah ÖZYER

Ecz. Sibel KONYALIOĞLU

İZMİR-1992

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Abdullah ÖZYER'e ve yüksek lisans öğrenimi yapmama olanak sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Aysen KARAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışma materyalinin sağlanmasında göstermiş oldukları ilgi ve yardımlarından dolayı Bio-Med tıbbi tahliller laboratuvarı sahibi Dr. Mehmet Tümer'e ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ 1

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II-1. Asparajin ve Glutaminin Organizmadaki

Görevleri..... 4

II-1.1. Glutaminin Görevleri..... 5

II-1.1.1. Kan ve Dokulardan Amonyanın

Uzaklaştırılması..... 5

II-1.1.2. Asid/Baz Dengesinin Korunmasındaki

Görevi..... 6

II-1.1.3. Glutaminin Azot Donörü Olarak

Katıldığı Biyosentezler..... 9

| | |
|--|----|
| II-1.1.4. Glutaminin Beyin Dokusundaki Görevi..... | 10 |
| II-1.1.5. Glutaminin Kanser Hücrelerindeki Görevi..... | 11 |
| II-1.1.6. Glutaminin Uzun ve Orta Peryodlu Açlıktaki Görevi..... | 13 |
| II-1.1.7. Glutamin ve Asparajinin İmmün Sistem Hücrelerindeki Görevi..... | 15 |
| II-1.1.8. Glutamin ve Asparajinin İnce Barsaklarda Yakıt Maddesi Olarak Kullanılması..... | 16 |
| II-1.1.9. Glutaminin Hızlı Bölünen Hücrelerdeki Görevi..... | 16 |
| II-1.1.10. Glutaminin Pankreatik Atrofi ve Karaciğer Yağlanması Önleyici Rolü..... | 16 |
| II-1.1.11. Travma ve Ameliyat Sonrası Oluşacak Negatif Azot Dengesinde Glutaminin Rolü..... | 17 |
| II-1.2. Asparajinin Görevleri..... | 18 |
| II-1.2.1. Asparajinin Kanser Hücrelerindeki Görevleri..... | 18 |
| II-1.2.2. Asparajin ve Glikoprotein Yapısı..... | 19 |
| II-1.2.3. Asparajinin Ornitin Dekarboksilaz İndüksiyonunda Rolü..... | 19 |
| II-1.2.4. Asparajinin Mitokondride Gliksallattan Glisin Sentezindeki Rolü..... | 19 |
| II-2. Glutamin ve Asparajinin Metabolizmaları..... | 20 |
| II-2.1. Glutaminin Metabolizması..... | 20 |
| II-2.1.1. Dokularda Glutamin Metabolizması..... | 20 |

| | |
|---|----|
| II-2.1.1.1. Kas Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi..... | 20 |
| II-2.1.1.2. Böbrek Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi..... | 22 |
| II-2.1.1.3. Barsak Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi..... | 24 |
| II-2.1.1.4. Karaciğer Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi..... | 26 |
| II-2.1.1.5. Adipoz Dokuda Glutamin Metabolizması ve Önemi..... | 27 |
| II-2.1.2. Glutaminin Biyosentezi..... | 28 |
| II-2.1.3. Glutaminin Katabolizması..... | 29 |
| II-2.2. Asparajinin Metabolizması..... | 30 |
| II-2.2.1. Asparajinin Biyosentezi..... | 30 |
| II-2.2.2. Asparajinin Katabolizması..... | 31 |
| II-3. Kanda ve Diğer Fizyolojik Sıvılarda Serbest Glutamin ve Asparajin Miktarı..... | 33 |
| II-4. Dokularda Serbest Glutamin ve Asparajin Miktarı..... | 35 |
| II-5. Primer Gut ve Glutamin Metabolizması..... | 36 |
| II-6. Amino Asit Tayinleri..... | 38 |

B Ö L Ü M III

A R A Ç G E R E Ç ve Y Ö N T E M L E R

| | |
|---------------------------------------|----|
| III-1. Kullanılan Maddeler..... | 45 |
| III-2, Kullanılan Aletler..... | 46 |
| III-3. Çözeltilerin Hazırlanması..... | 46 |
| III-4. Çalışma Materyali..... | 47 |

| | |
|--|----|
| III-5. Standart Grafiklerin Çizilmesi..... | 47 |
| III-5.1. Asparajinin TLC-SPK ve TLC-SCN Yöntemleri Yar- dımıyla Standart Grafiklerin Çizilmesi..... | 47 |
| III-5.2. Glutaminin TLC-SPK ve TLC-SCN Yöntemleri Yar- dımıyla Standart Grafiklerin Çizilmesi..... | 49 |
| III-6. Ekstraksiyon..... | 50 |
| III-7. TLC Uygulaması..... | 55 |
| III-7.1. Asparajin İçin TLC'nin Uygulanması..... | 55 |
| III-7.2. Glutamin İçin TLC'nin Uygulanması..... | 56 |
| III-8. Elde Edilen Sayısal Verilerin İstatistik Değerlendir- meleri..... | 57 |
| B Ö L Ü M IV | |
| B U L G U L A R..... | 60 |
| B Ö L Ü M V | |
| T A R T I Ş M A ve S O N U Ç | 72 |
| Ö Z E T..... | 84 |
| S U M M A R Y..... | 85 |
| K I S A L T M A L A R..... | 86 |
| K A Y N A K L A R..... | 87 |
| Ö Z G E Ç M İ Ş..... | 94 |
| T A B L O ve Ş E K İ L L İ S T E S İ..... | 95 |

B Ö L Ü M I

G İ R İ Ş ve A M A Ç

Çalışmamızda normal insan plazmasında bulunan glutamin ve asparajinin düzeylerini ölçmek için modifiye bir yöntem geliştirilmiştir. Esser (15), Voight (47) ve Wollenweber'in (55) çalışmaları esas alınmıştır. Bunlardan başka bu konuda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde, amino asitlerin seperasyonunda tek ve çift dimensiyonlu kağıt ve ince tabaka kromatografileri kullanılmıştır (2,3,6,13,35), İyon değiştirici kromatografi (34), katyon değiştirici kromatografi (19) ve kolon kromatografileri (4) ile kombine amino asit analizörlü sistemler bu iki amino asidin tanımı ve miktar tayinlerinde kullanılmıştır. Ayrıca ilgili enzimlerin kullanılmasıyla spektrofotometrik (SPK) ve fluorometrik yöntemler geliştirilmiştir (10,32). Bunlardan başka bazı iki değerlikli katyonlar ile kompleks tuzları oluşturmak suretiyle kompleksometrik ölçümlere gidilmiştir (17). Glutamin için kütle spektrometri yöntemi (24), hassas radyoaktif yöntem (1) ve gaz kromatografisi (8) yöntemleri üzerinde de çalışılmıştır.

Asparajin için asparajinaz enzimi ile muamele sonucu oluşan amonyakın iyon selektif elektrodlar ile miktar tayin -

leri yapılmıştır (32). Bu saydığımız yöntemlere ek olarak hem glutamin hemde asparajin tayinleri için yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) yaygın olarak kullanılmaktadır (28).

Araştırmamızda TLC yöntemi ile kombine olarak bir spektrofotometrik (TLC-SPK) yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. TLC'de separe edilen asparajin ve glutaminin kullanılan kadmiyum tuzu ile oluşturdukları renkli kompleks yapının absorbands değerlerinin SPK ile ölçümü esasına dayanır. Ayrıca bu çalışmada TLC-Scanner (TLC-SCN) aletinde elde edilen değerler ile TLC-SPK yöntemi ile bulunan değerleride karşılaştırma imkanı olmuştur.

Normal 35 kişinin kan plazmasındaki glutamin ve asparajin düzeyleri literatürlere uygun bulunmuştur (21,50,52,56,57). Yöntemimizin hassasiyetini saptamak amacıyla primer gut hastalarında yapılmış plazma glutamin ve asparajin değerleri ile bizim değerlerimiz karşılaştırılmıştır. Bulduğumuz değerler literatürler ile uygunluk göstermiştir (21,22,55,56).

Glutamin vücutta bir çok maddenin biyosentezine azot donörü olarak katılır (1,33,39). Böbreklerde asit/baz dengesinin korunmasında önemli role sahiptir (22,23,32,43,50). Beyinde iki nörotransmitterin prekürsörü durumundadır (31,45,48). Orta veya uzun süreli açlıkta glutamin yakıt maddesi olarak kullanılır (11,22,23,32,43). Ayrıca asparajin ve glutamin belirli kanser türlerinde önemli rol oynar (25,26). Hem asparajinin hemde glutaminin immün sistem üzerine önemli etkileri vardır (25). Bunlara ek olarak asparajin glikoproteinlerin yapısına girer, ornitin dekarboksilasyonunun indüksiyonunda görev alır (16). Mitokondride glioksalata bağlı glisin sentezinde asparajin görev alır (31).

Bu iki amino asidin kan plazmasında artıp azaldığı patolo...

jik olgular da söz konusudur. Asidosizde (33,35,38,50) glutamin, şizofrenide (36) asparajinde önemli artış olmaktadır. Bazı kanser türlerinde her iki amino asidde de azalmalar tesbit edilmiştir (25,26).

Literatür taramalarından edindiğimiz bilgiler ışığında diğer amino asidlere göre değişik fonksiyonlar gösteren asparajin ve glutaminin görevleri ,patolojik olgularda plazma seviyelerinin değişimi bizi, önce normal sonra patolojik plazmada bu iki amino asidin analizlerine götürmüştür. Bu araştırma kan plazmasında bulunan asparajin ve glutaminin kantitatif olarak tayinine olanak sağlamıştır. Standart grafiklerin çiziminden sonra asparajin için yöntemin uygulanması ve sonuç alınması 7 saatte , glutamin için 10 saatte tamamlanmaktadır. Aynı anda bir çok örneğin çalışılabilmesi mümkündür.

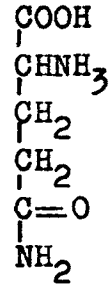
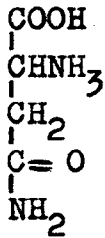
Sonuç olarak bu yöntemin ucuz, basit, sonuçların güvenilir olması ve az miktarda plazma gerektirmesi bu yöntemin avantajıdır. Bu araştıma bir ön çalışma olup patolojik olgulara uygulanabilir özellikle olduğu kanaatindeyiz.

B Ö L Ü M I I

G E N E L B İ L G İ L E R

Asidik Amino Asid Amidleri : Glutamin ve Asparajin

Aspartat ve glutamat amino asidlerinin karboksil grupları bir mol amonyak ile amidleşme reaksiyonuna girmesi sonucu oluşan yeni amino asidler asparajin ve glutamindir. Aspartat ve glutamat asidik özellikte iken asparajin ve glutamin nötraldir (5). Aşağıda asparajin ve glutaminin açık kimyasal formülleri ve kimyasal isimleri verilmiştir.



L-Asparajin: α - aminosüksinamik asit

L-Glutamin: Glutamik asit - 5 - amid.

Şekil 1. Asparajin ve glutaminin açık kimyasal yapıları ve kimyasal isimleri.

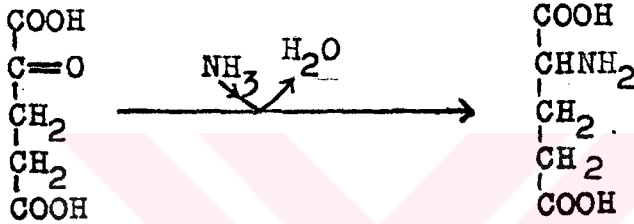
II-1. GLUTAMİN VE ASPARAJİNİN ORGANİZMADAKİ GÖREVLERİ

II-1.1. Glutaminin Görevleri

II-1.1.1. Kan ve Dokulardan Amonyakın Uzaklaştırılması

Amonyak , kan ve dokulardan aşağıdaki tepkimeler vasıtasıyla hızla uzaklaştırılarak , en az miktarlarda bulunması . (0.02-0.03 mM) sağlanır (5).

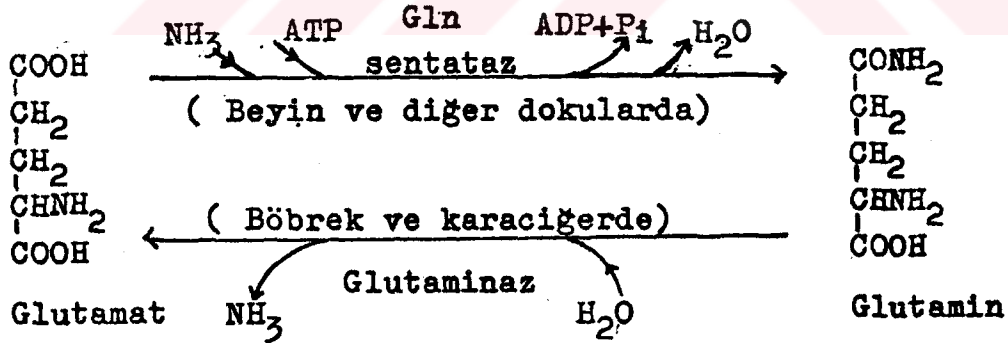
Ketoasidin aminasyonu :



α -Ketoglutarat

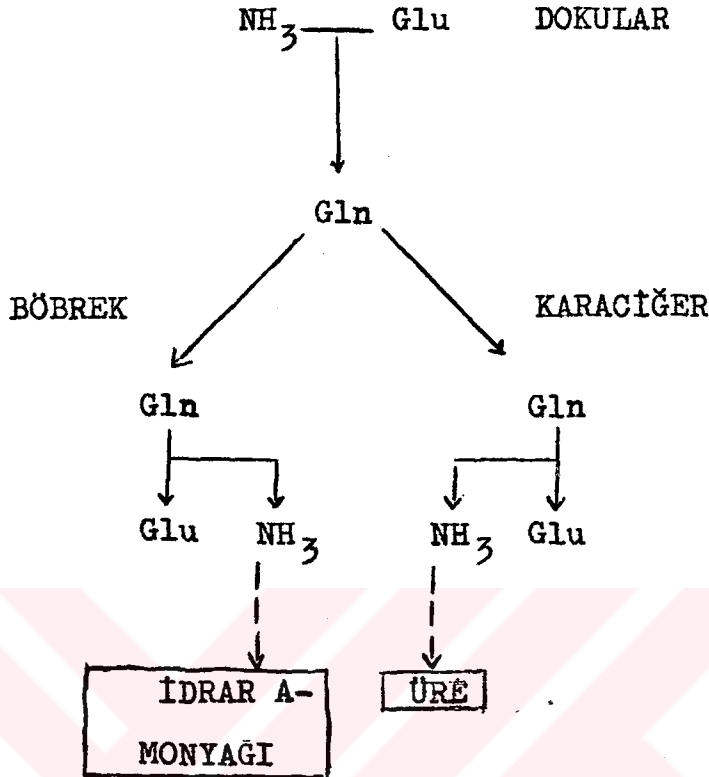
Glutamat

Glutamatın amidasyonu :



Glutaminin görevi amonyakı geçici olarak depolamak , taşımak ve dokularda amonyak konsantrasyonlarını toksik düzeylerin altında tutulmasını sağlamaktır. Bu özellikle amonyaka son derece hassas olan beyin için çok önemlidir. Karaciğer ve böbrekte glutaminden glutaminaz enzimiyle amonyak üretilir. Karaciğerde bu amonyak üreye çevrilirken böbrekte asit/baz dengesinin

korunmasında rol oynar. İdrar amonyağının %80'inin prekürsörü plazma glutaminidir (51).



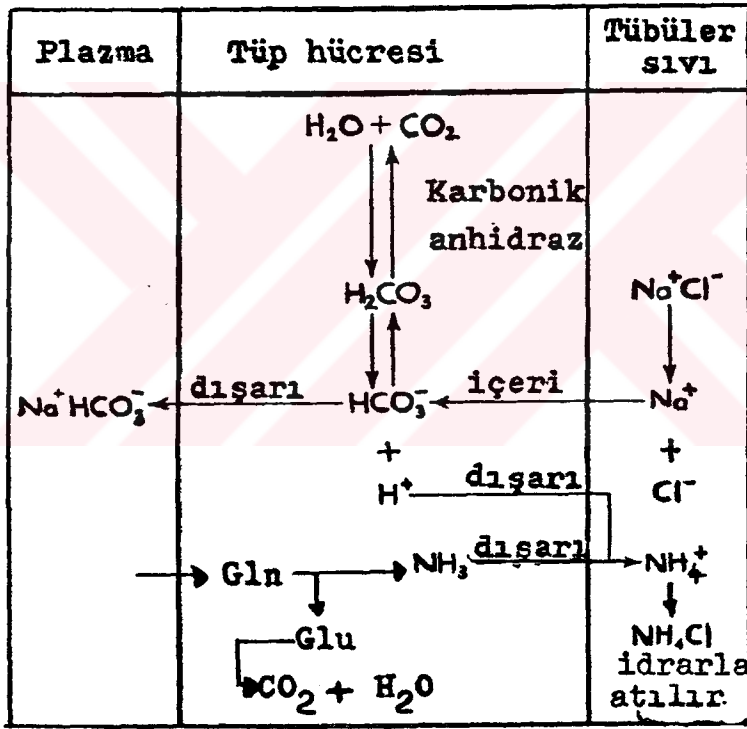
Şekil 2. Amonyakın glutamince diğer dokulardan taşınımı ve böbrek ile karaciğer tarafından farklı şekillere dönüştürülmesi.

II-1.1.2. Glutaminin Asit/Baz Dengesindeki Görevi

Kan pH derecesi genellikle çok dar sınırlar içerisinde düzenlenir. Normal pH değerleri 7.35-7.45'dir ve 6.80'nin altındaki değerler ile 7.70'in üstündeki değerler hayati tehlike oluşturur. Normal ve karışık bir diet ile beslenen bir insan 24 saatlik periyod içinde 40 mmol amonyak ve 40 mmol titre edilebilir asiti dışarı atar. Vücut bu asiti kompanse edebilmek için tampon sistemleri kullanır (5,50).

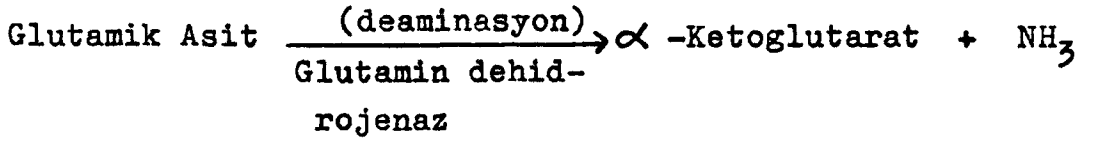
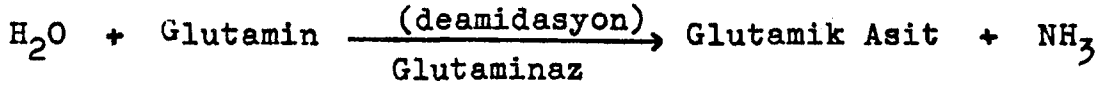
Bu tamponlayıcı sistemlerden biri amonyak tarafından oluşturulur. Şekil 3' de gösterildiği gibi distal tüp hücrelerinde karbonik anhidraz ile açığa çıkarılan H^+ iyonlarının amonyak ile birleşmesi sonucu oluşan amonyum hızla distal tüp lümenine

absorbe olur. Amonyum iyonu pozitif yüklü olduğu için membran-
dan geçişi uzun sürer ve distal sıvıda (idrarda) kalır. Amon-
yak tek bir H^+ iyonu absorblayabilir. Distal lümene geçen amon-
yum , distal sıvıda bulunan $NaCl$ gibi bir sodyum tuzunda, sod-
yumun yerine geçer ve Na^+-H^+ değıştokuş mekanizmasıyla Na^+ reabsor-
be edilir. Böylece sodyumbikarbonat ($NaHCO_3$) olarak Na plazma-
ya yeniden geçer. Amonyum ise idrara amonyumklorür (NH_4Cl) ola-
rak geçer. Ayrıca bu mekanizma , kanda sodyum düzeyinin korun-
masına yardım eder (5,7,32,50).



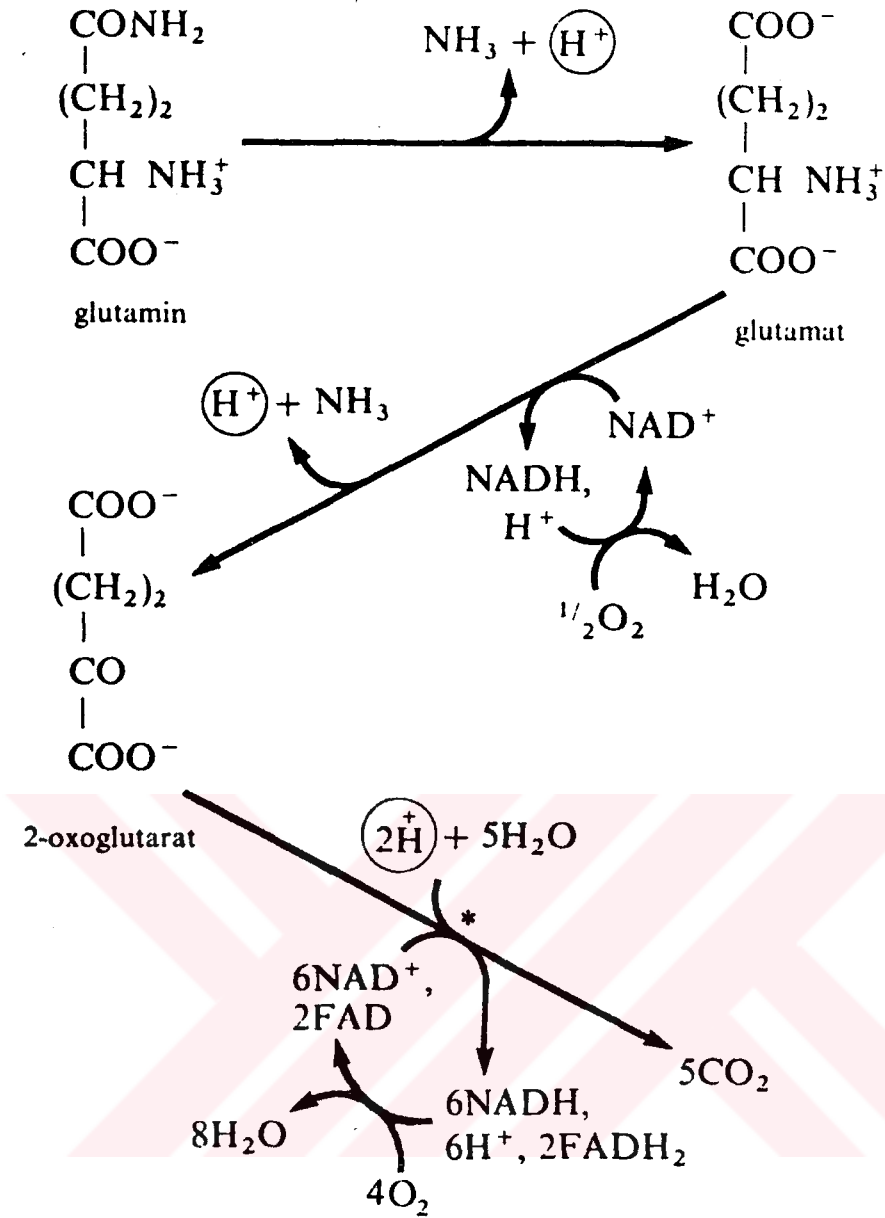
Şekil 3. Böbrek tüp hücrelerinde glutaminin asit/baz dengeesindeki görevi (50).

Amonyak , glutaminaz ve glutamin dehidrojenaz enzimlerinin katalizlediğı böbrek mitokondrisinde glutaminden hidroliz edilir. Reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (32).



Glutaminaz enzimi asidotik koşullarda indüklenebilir ve renal kompensasyonda H^+ iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Normal protein dietinde 0.2 ile 1 g. amonyak bu yollar ile uzaklaştırılır. Amonyakın 2/3' ü glutaminden, 1/3' ü de glutamattan deaminasyonla sağlanır (50). Böbrek sitozolünde adenin nükleotidinin amino grubuna azot akımı olduğu bilinir. Bu azot akımıyla pürin nükleotidinin halka oluşumu sağlanır. Ancak kronik asidosisli durumlarda pürin nükleotit halkasının oluşumunu sınırlayıcı enzim olan Adenilosüksinat sentetazın aktivitesi iki misli artarak idrar amonyum atılımını artırır. Yani asidosis durumunda böbrek sitozolünde amonyak üretimi olmaktadır (19,45). Sıçan ve Gine piglerinde yapılan bir çalışmada da (27) böbrek tübül hücrelerinde glutamin sentetazının H^+ iyonları konsantrasyonunca direkt olarak regüle edildiği gösterilmiştir. Kan pH'sı 7.1'de amonyojenezis oranı artarken, glutamin sentetaz H^+ iyonlarınca inhibe edilmiştir. Ancak kan pH'sı 7.4'de amonyajenezis oranı azalırken, glutamin sentetaz aktiftir.

Tübül hücrede glutaminin amid azotunu verdikten sonra CO_2 ve H_2O ' ya yıkılımı olur (32). Bu yıkılım yolu şekil 4' de verilmiştir.



Şekil 4. Böbrek tübüler hücrede glutaminin amid azotunu verdikten sonraki yıkılımı ve proton dengesi (32).

II-1.1.3. Glutaminin Azot Donörü Olarak Katıldığı Biyosentezler

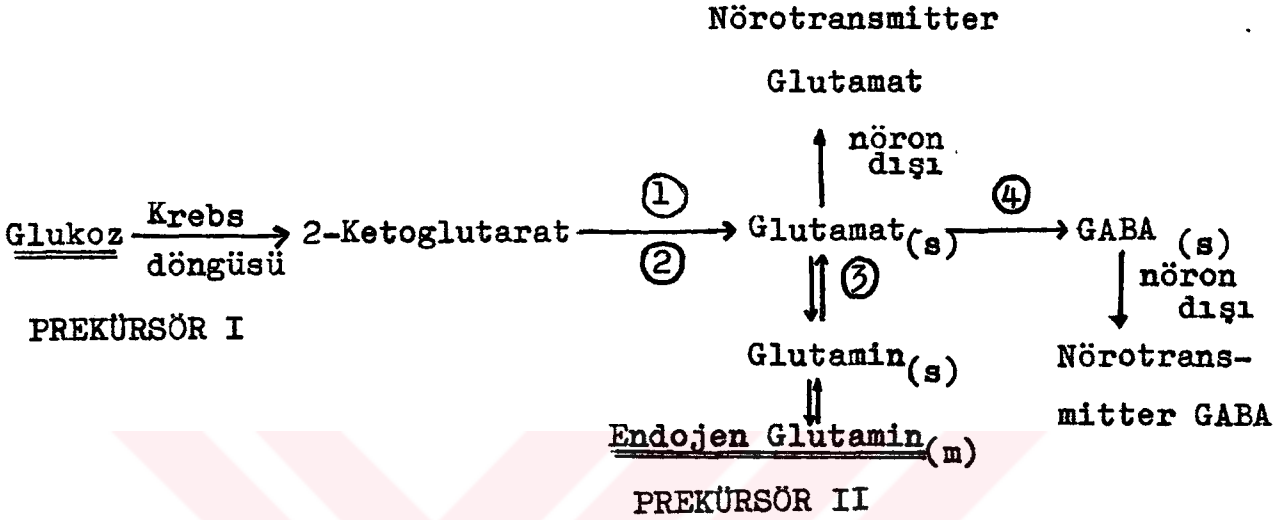
Pürin ve pirimidin nükleotitleri , histidin, triptofan ve asparajin amino asidleri , karbamil fosfat, nikotinamid adenin dinükleotit koenzimi , paraaminobenzoikasit (PABA) , glukozamin-6-fosfat'ın biyosentezlerine glutamin amid azotunu vererek katılır (1,38,39).

II-1.1.4. Glutaminin Beyin Dokusundaki Görevi

GABAnerjik nöronlarda γ -aminobütirik asit (GABA) ve glutamatnerjik nöronlarda glutamat nörotransmitterlerin prekürsörü glutamindir. Sıçan beyinde sinaptik ve nonsinaptik orjinli mitokondrilerin ayırt edilmesi için glutamin üzerinde durulan bir çalışmada, sinaptik mitokondrilerde nonsinaptik mitokondrilere kıyasla iki kez daha yüksek afininiteye sahip ve doyurulabilen bir transport mekanizmasıyla glutamin alınımı olur. Sinaptik mitokondrilerde bu alınımın V_{max} değeri nonsinaptik mitokondrilere kıyasla 7 kez yüksektir. Sinaptik ve nonsinaptik orjinli mitokondrilerde glutaminin farklı alınımalarının nörotransmitter glutamat sentezinin regülasyonunda önemli bir mekanizma oluşturduğu iddia edilmektedir. Glutaminin, glutamata hidrolizi başlıca beyin hücre mitokondrilerinde lokalize olmuş fosfata bağımlı glutaminaz enzimiyle katalize edilir. Böylece glutaminin mitokondri içine girmesi ve enzim aktivitesi ile glutamata dönüştürmek suretiyle glutamat nörotransmitteri regüle edilebilir. Mitokondri içine giren glutamin ile glutamat akımı arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Glutaminin mitokondri içine girişini, glutamat ve α -ketoglutaratın normal konsantrasyonları inhibe eder (45).

GABA nörotransmitteri bir çok hayvanda sinir dokularında bulunan önemli bir nörotransmitterdir ve geniş bir şekilde memelilerin beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. GABA memeli beyinde en önemli inhibitör transmitterdir. GABA'nın sentezi için glutamat kan akımından alınamaz, fakat hücre sitoplazmasında glukozun yıkılımı sonucu oluşan 2-ketoglutarattan nöron içinde ya transaminasyonla ya da glutamin dehidrojenazla a-

minasyon yoluyla glutamat üretilir. Ayrıca glutamin prekürsöründen oluşan glutamattan GABA sentezine gidilir (32). Tüm bu anlatılanları aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz.



Şekil 5. Glutaminin glutamat ve GABA nörotransmitterlerine çevrilmesi (s: sitoplazmik, m: mitokondrial).

1- Aminotransferaz

2- Glutamat dehidrojenaz

3- Glutaminaz (mitokondri dışı zarında, fosfata bağımlı).

4- Glutamat dekarboksilaz

- Glukozun Krebs döngüsüyle oluşturduğu glutamat havuzu, endojen glutaminin oluşturduğu glutamat havuzundan 2-3 kez daha büyüktür.

- Mitokondri iç zarında bir glutaminaz enzimi daha vardır. Bu enzim fosfata bağımlı olmayıp enerji üretimi için glutamat verir (45).

II-1.1.5. Glutaminin Kanser Hücrelerindeki Görevi

Glutaminin eksik olduğu ortamda değişik orjinli büyüyen

insan lösemi hücre çeşitleri karşılaştırılmıştır. Promiyelositik HL-60 B lenfoblastoid hücre çeşidinin büyümesi yüksek oranda glutamine bağımlı iken T hücreleri glutaminden bağımsız bir şekilde proliferere olabilmektedir (26). Memeli hücrelerinde geniş ölçüde metabolik yollara katılan en yüksek plazma düzeyine sahip amino asid glutamindir (11,26). Belirli tümör hücrelerinde bulunan glutamin ile normal dokular karşılaştırıldığında tümör hücreleri glutamini çabuk kullanıp, sentezini daha yavaş yaptıkları için glutamin eksikliğine maruz kalırlar. Sonuç olarak glutaminin azalmasıyla malign hücrelerin çoğalması ve DNA sentezinin inhibisyonu beklenir. Bu aşamada belirli pürin bazları veya nükleozidlerin eklenmesiyle DNA inhibitör etkileri ortadan kaldırılabilir. Böylece glutaminin prekürsör olarak katıldığı nükleik asitlerin hücre proliferasyonu için gerekli olduğu hipoteziyle uygunluk gösterir. Glutamin denova pürin sentezinin ilk basamağında gereklidir, birkaç basamak sonra hem AMP hem GMP için yaygın prekürsör olan IMP şeklini alır. Glutaminin eksikliğinde guanin nükleotid sentezi ve denova pürin sentezinin bastırıldığı görülür. İşte bu tip glutamine hassas olan malign tümörlerin tedavisi için glutamin eksikliği oluşturmak amacıyla glutaminaz enzimi kullanılır. Böylece malign hücrelerin proliferasyonu için gerekli olan glutamin hidroliz edilir. L- Glutaminaz klinikte nörotoksik olduğu için tekbaşına kullanılamaz. Ancak glutamin sentetaz aktivitesini sekonder olarak azaltarak glutamin eksikliği yaratan L-asparajinaz ile kontamine edilerek kullanılabilir. Glutamin eksikliği ile glutamin sentetaz aktivitesi arasında zıt bir korelasyon vardır. Yani malign tümör hücrelerine glutamin sağlamak için glutamin sentetaz indüklenir. L-Asparajinaz kullanımı saye-

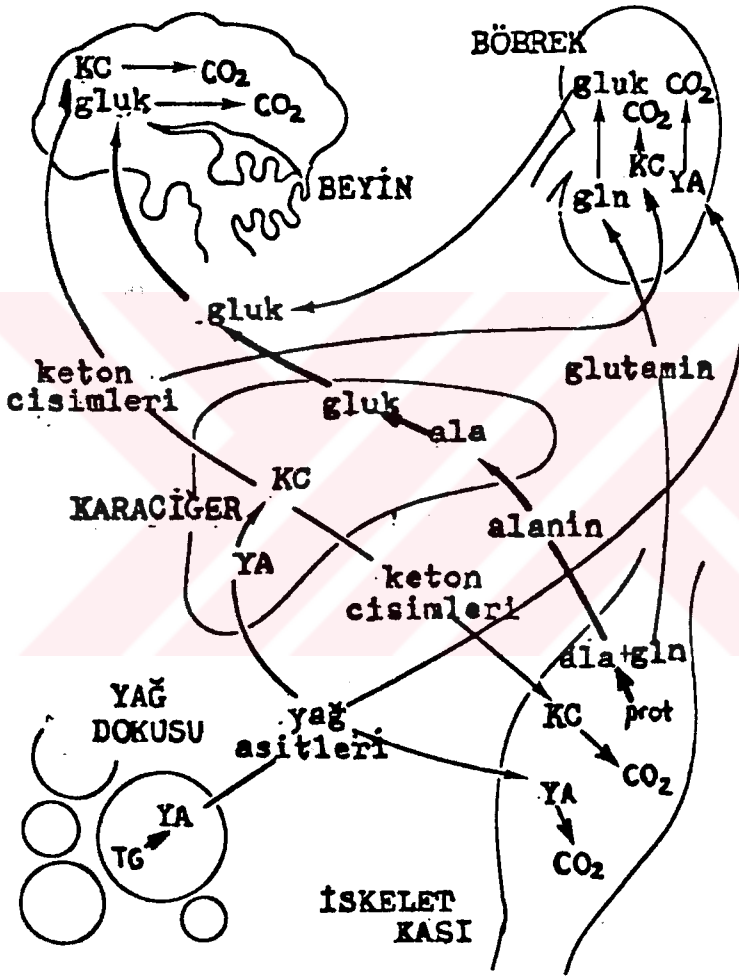
sinde bu enzim de inhibe edilmeye çalışılır (26).

II-1.1.6. Glutaminin Uzun ve Orta Peryodlu Açlıktaki Görevi

24 saat ile 24 gün gibi orta süreli açlık peryodunda vücut yakıt maddesi sağlamak amacıyla bazı metabolik değişikliklere uğrar. Öncelikle yüksek olan glukoneojenezis yolu azalır ve bir sonraki basamakta keton cisimleri gibi maddelerin kandaki konsantrasyonları artar. Bu değişiklikler dokulardan geçen arterio-venös kanın içindeki değişik konsantrasyonlardaki metabolit ve değişik yakıtların belirlenmesi ile bu peryodlar süresince oluşacak metabolik değişiklikler hakkında bilgi edinilmiştir. Açlığın ilk iki günü glukoneojenik prekürsörler laktat , gliserol ve amino asitlerdir. Laktat anaerobik glukoz metabolizmasından, gliserol adipoz dokudaki lipolizisten ve amino asitlerde kasta bulunan proteinlerin yıkılımı ile elde edilir (32).

Açlık süresince kas içinde uğradıkları metabolizmadan dolayı kan akımı içine glutamin ve alanin salınır. Glutaminin bir kısmı barsaklarda absorblayıcı hücreler tarafından metabolize edilir (7,18,22,32,43). Glutaminin %50'si kadarı da barsaklarda tekrar kan akımına verilmek üzere alanine çevrilir. Bu yolun net sonucu mükemmel bir glukoneojenik prekürsör olan alanin karaciğerde kullanılır. Her bir gün için gerekli 50 gram glukozu sağlamak için 90 gram iskelet kas proteini amino asitlere yıkılır. Kas proteinin yarısından çoğunun kaybına vücut dayanamaz ve bu yol sadece 17 gün sürer. Bir kişinin açlıktan ölmesindeki süreyi kas proteinlerinin yıkılımının sürmesi belirler. Açlık peryodunun sonlarına doğru asidosis ortaya çıkar. Çünkü kanda sirküle yağ asitleri, keton cisimlerinin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte böbrekte H^+ iyonlarının artığı gözlenir. Bu durumda idrarda

proton tamponu olan glutaminin azot atomlarından oluşan amonyağın H^+ iyonlarını elimine etmesi gerekirken, glutaminin C_{α} atomları glukozu çevrilir(32). Açlıkta karaciğer dokusunda da glutamin üretimi ve salınımı artar (7). Açlığın sonlarında artık önemli bir glukoneojenik prekürsör olan alanin yerini glutamine bırakır.



Şekil 6. Orta süreli açlık periyodunda yakıt kullanım modeli (32).

Uzun süreli açlıkta tek fark keton cisimleri kas ve karaciğere gitmeden doğrudan beyinde metabolize olur. (32).

II-1.1.7. Glutamin ve Asparajinin İmmün Sistem Hücrelerindeki Görevi

Glutaminin önemli miktarda immün sistem hücrelerine gerekli olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (11,25). Asparajin ve glutaminin immün sistem hücrelerindeki etkilerini incelemek amacıyla laboratuvar farelerine L-asparajinaz enzimi verilmiştir. Çünkü L-asparajinaz, glutaminaz aktivitesine aynı derecede sahiptir ve hem asparajin hem de glutamini birarada tüketir (glutamin + su → glutamat + amonyak). Bu sayede glutamin ve asparajinden yoksun bir ortam yaratılır. E. coli'den elde edilmiş L-asparajinaz enziminin dört gün boyunca farelere verilmesi ile dalağın B hücrelerinin sentezlendiği yerde histolojik değişikliklerle birlikte dalak ağırlığında azalma gözlenir. Ayrıca T hücre antijenleri taşıyan lenfositlerde artma, immüoglobülin taşıyan B lenfositlerde azalma olur. Hem Ig G hem de Ig M'nin miktarları azalır. Koyun kırmızı kan hücrelerinde sitotoksik cevaba karşı oluşan antikorlarda azalma olur. Timusta ağırlık kaybı ve hücre sayısında azalma oluşur. Tüm bu immünosüpresif etkiler glutamin ve asparajin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Ancak asparajinin tek başına eksikliği bu immünosüpresif etki için yeterli olmazken hem asparajin hem glutaminin eksikliği immünosüpresif etki oluşturduğu ileri sürülmüştür (23,25,43). Memelilerde asparajin sentezinde azot donörü glutamin olduğundan (23,25,38,43) glutamin eksikliği de asparajin eksikliğini önceden haber verir(25). Ayrıca glutamin ve asparajinin hidrolizi sonucu oluşan glutamat, aspartat, amonyakın da immünosüpresif etkiye sahip oldukları bilinmektedir (12).

II-1.1.8. Glutamin ve Asparajinin İnce Barsaklarda Yakıt Maddesi Olarak Kullanılması

İnce barsakların lümeninde glutamin, asparajin, glutamat ve aspartat büyük miktarlarda bulunur. Bu glutamin ve asparajinin ince barsaklardaki absorblayıcı hücrelerde metabolize edildiğini gösterir. Açlık süresince hatta bir gecelik açlık boyunca barsak lümeninde hazır bulunan bu amino asitlerin miktarları azalır (32). Bu durumda kan dolaşımındaki glutaminin çoğu sodyum gradientine bağlı olarak absorblayıcı hücrelerce alınır. Açlıkta ince barsaklar için tüm enerjinin % 40'ını glutamin sağlar (7,18,22,23,32,33,43).

II-1.1.9. Glutaminin Hızlı Bölünen Hücrelerdeki Görevi

Glutamin, pirimidin ve pürin nükleotitlerinin sentezi için gerekli aspartat ve azotu sağlayarak dokularda daima kullanılır. Tümör hücreleri ve hızla bölünen lenfositlerde glutamin önemli miktarda kullanılır. Bu hücreler düşük intraselüler glutamin ve yüksek glutaminaz aktivitesine sahiptirler. Glutamin bu hücrelerde hem yakıt maddesi olarak hem de nükleotit sentezlerine katılmak suretiyle görev yaparlar (18, 22,32).

II-1.1.10. Glutaminin Pankreatik Atrofi ve Karaciğer Yağlanmasını Önleyici Rolü

Glutamin barsak ve pankreatik acinar hücreleri için önemli solunum yakıtıdır ve azotun organlar arası transportunda önemli rol oynar. Hepatik metabolizmayı etkiler. İnce barsağın bir bölümü çıkarılmış olan sıçanların glutamin içermeyen bir diet ile beslenmeleri sonucu pankreas ağırlığı ile pankreasın DNA ve protein içeriği azalırken karaciğerde lipid içeriği artar. Pankreas -

taki acinar hücrelerin büyüklüğü, sayısı ve protein içeriğinin azalmasından dolayı pankreatik atrofi oluşur. Glutamin eklenmiş ana diet pankreas acinar hücre metabolizması için önemli bir substrattır ve acinar hücrelerin protein sentez kapasitesini korur. Glutamat ve glutamin indirekt olarak pankreasın büyümesini uyaran humoral stimülatördür (kolinerjik ve/veya GABAnerjik), Glutamin içermeyen hipertonic glukoz çözeltisi ile beslenen kemirgenlerde ise karaciğerde dört değişik anormallik oluşur. Bunlar; artmış karaciğer yağ sentezi, karaciğer yağ mobilizasyonunun düzenlenememesi, artmış hepatik yağ alınımı ve azalmış hepatik yağ oksidasyonudur. Bu bulgulara rağmen karaciğer yağlanmasını önleyen glutaminin mekanizması henüz anlaşılammıştır. (23).

II-1.1.11. Travma ve Ameliyat Sonrası Oluşacak Negatif Azot Dengesinde Glutaminin Rolü

Kas dokusunda önemli miktarda bulunan amino asitler glutamin ve alanindir. Travma ve özellikle abdominal cerrahi girişim sonrasında iskelet kasında fazla miktarda glutamin kana salınır. Glutaminin büyük miktarlarının kas dışına salınımı kas kütlelerinde negatif azot dengesine yol açar. Ancak ameliyat sonrası total parenteral beslenme (TPB) sıvısına glutamin veya 2-ketoglutarat eklenmesiyle negatif azot dengesi önlenir. Ameliyat sonrası TPB ile verilen glutamin veya 2-ketoglutaratın görevi kastedeki protein metabolizmasına "C" iskeletini sağlayarak kasta glutamin konsantrasyonunun inişini azaltmaktır. Böylece azot dengesi korunur (22,43). Ayrıca cerrahi travmalardan başka endotoksemi ve sepsisin etkisiyle de kaslarda negatif azot dengesi oluşur (43).

II-1.2. Asparajinin Görevleri

II-1.2.1. Asparajinin Kanser Hücrelerindeki Görevleri

Akut lenfositik lösemililerde önemli miktarda asparajin sentetaz eksikliği söz konusudur. Böylece normal hücreler için non-esansiyel olan asparajin malign hücreler için esansiyeldir. Asparajinaz akut lenfositik löseminin tedavisinde kullanmak amacıyla E. coli ve V. succinogenes'den elde edilir. Asparajinaz, asparajini irreversibl bir şekilde aspartat ve amonyum iyonlarına dönüşümü katalize eder. Eğer asparajinaz aktivitesi kan dolaşımında korunur ise, kanda asparajin düzeyi belirlenemez ve asparajine duyarlı lösemi hücreleri ölür. Asparajinazla yapılan invitro çalışmalar asparajinin T hücreleri ile akut lenfositik lösemiye karşı etkili olduğunu göstermiştir. Ancak B hücreleri asparajine karşı duyarsızdır. Asparajinazın ya karışık lenfosit reaksiyonları veya diğer mitojenlerden biri ile stimüle edilmiş lenfositlerin invitroblastojenik cevaplarının kuvvetli bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (16,25). Plazmada asparajinaz konsantrasyonu 1 IU/ml olduğu an blastojenezis total olarak bastırılır. Blastojenezisin asparajinaz enziminin inhibisyonunda üç açıklama yapılabilir : 1- Asparajin, doku kültür ortamından hızla uzaklaştırılır. 2- Glutamin tüketilir. 3- Lenfosit membranlardaki glikoprotein reseptörleri asparajinazca duyarsız hale getirilir. Bu tahminler 1969 ile 1974 yılları arasında ortaya atılmış olmalarına rağmen normal ve lösemili lenfositlerin invitro asparajinaz inhibisyonu hala tam manasıyla anlaşılammıştır (25). L-Asparajine hassas hücrelerde glisin amino asidinin tüketimi hızlanır ve bu olayın asparajinaza dirençli tümörlerde olmayışı da önemli bir delildir. Asparajine hassas

tümör hücrelerinde glisin eksikliği yaratır. Çünkü asparajin, glisinin prekürsörü olan glioksalatı , glisine asparajin aminotransferaz vasıtasıyla dönüştürülür. Eğer ortamda yeterince asparajin yok ise glisin de oluşamaz. Glisin malign hücreye ulaşamaz ise yine hücre ölümü ile sonlanır (30).

II-1.2.2. Asparajin ve Glikoprotein Yapısı

İmmüoglobülin ve protein yapıllı hormonlar gibi hücrelerden salgılanan bir çok glikoproteinlerde amino asid ile şekerin bağlanması asparajin ve şeker arasındaki bir N glikozit bağı ile olur (32).

II-1.2.3. Asparajinin Ornitin Dekarboksilaz İndüksiyonunda Rolü

Asparajin, Na^+ iyonu ve intraselüler alkali pH hücre proliferasyonunun kontrolünde kritik rol oynar. Hücre içi pH'nın düzenlenmesinde Na^+/H^+ kanalı görev yapar. Na^+/H^+ değıştokuşu ile , H^+ hücre dışına çıkarak intraselüler pH'da artma oluştururken Na^+ da hücre içine girer. Intraselüler Na^+ konsantrasyonunun artmasına bağılı olarak L-serin , L-alanin ve özellikle intraselüler alkalizasyonu oluşturan L- asparajinin hücre içine alınımı kolaylaştırır. Ornitin dekarboksilazı kullanarak poliamin biyosentezinin artışını sağlayacak hormon ve büyüme faktörlerinin etki edebilmesi için amino asidler ve Na^+ 'un bulunması zorunludur. Özellikle L-asparajinin mM seviyesinde dahi , herhangi bir metabolik değışiklik veya proteinlere inkorpore olmaksızın, sadece pH'da artma sağlayarak ornitin dekarboksilazı indükler. Bu indüklemelerde hücre proliferasyonunu sağlar (16).

II-1.2.4. Asparajinin Mitokondride Glioksalattan Glisin Sentezindeki Rolü

Mitokondride asparajin- glioksalat transaminasyonu vardır.

Asparajin aminotrasferaz enzimince asparajinin amid N'u gliksalata transfer edilerek glisin sentezlenir. Glisin özellikle kanser hücreleri için önemlidir. Mitokondride asparajinin normal katabolizması sonucu oksaloasetata çevrilişi ortamda asparajine uygun bir aminoakseptörvar ise inhibe edilir. Bu aminoakseptörler gliksalat ve pirüvattır (30).

II-2. GLUTAMİN VE ASPARAJİNİN METABOLİZMALARI

II-2. 1. Glutaminin Metabolizması

II-2.1.1. Dokularda Glutamin Metabolizması

II-2.1.1.1. Kas Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi

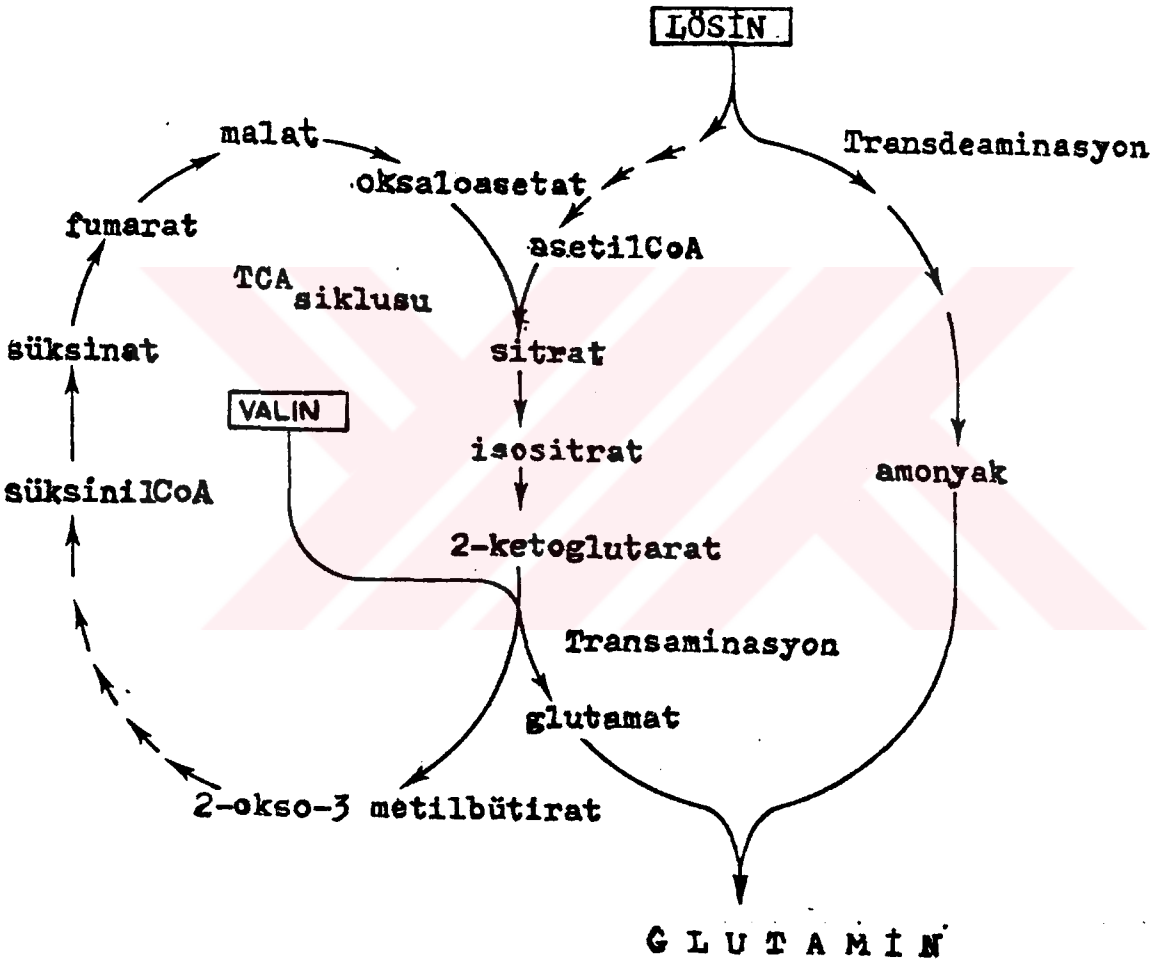
Kasta, karaciğer dokusundan daha çok amino asid oksidasyonu gözlenir. Bunun önemi üç şekilde açıklanabilir: İlki amino asidlerin oksidasyonu kas için gerekli ATP'nin önemli miktarlarını verir. Örneğin valin ve lösinin birer moleküllerinin glutamin amino asidine çevrilmesi ile 16 molekül ATP üretilir. Buna karşın iskelet kasında valin ve lösin gibi dallanmış zincirli amino asidlerin katabolizması düşüktür ve kasın dinlenmesi için gerekli ATP'nin %10 kadarını sağlayabilir. Ancak amino asidin CO₂' e kadar tamamen oksidasyonu ATP'nin oluşumunu iki katına çıkarır. Kasta daha yüksek oranda okside olarak enerji elde edilmesini sağlayan amino asidler aspartat, glutamat, ve glutamindir (32).

İkinci olarak alanin karaciğerde önemli bir glukoneojenik prekürsördür. Uzun süreli açlık döneminde kana geçen glutamin barsak hücrelerinde alanine çevrilerek kullanılır (32).

Üçüncü olarak asid/baz dengesinin korunmasının gerekli olduğu durumlarda ve lenfositler gibi hızlı bölünen hücreler için kastan glutamin salınımı olur (7,18,23,32,39).

Kasta glutamin orijini olarak bilinenler hem amonyak hemde

glutamat kaynakları olarak düşünülmektedir. Lösinin "C" iskeleti 2-ketoglutaratı verir. Lösin amino asidine ait azot ise ya karaciğerde amonyak üretim tarzına benzer glutamat dehidrojenaz enzimiyle, yada pürin nükleotit halkasının enzimlerince gerekli miktarda amonyaga dönüştürülür. Sonuçta glutamata amonyagin inkorporasyonu glutamini verir (Şekil 7.,22,32).



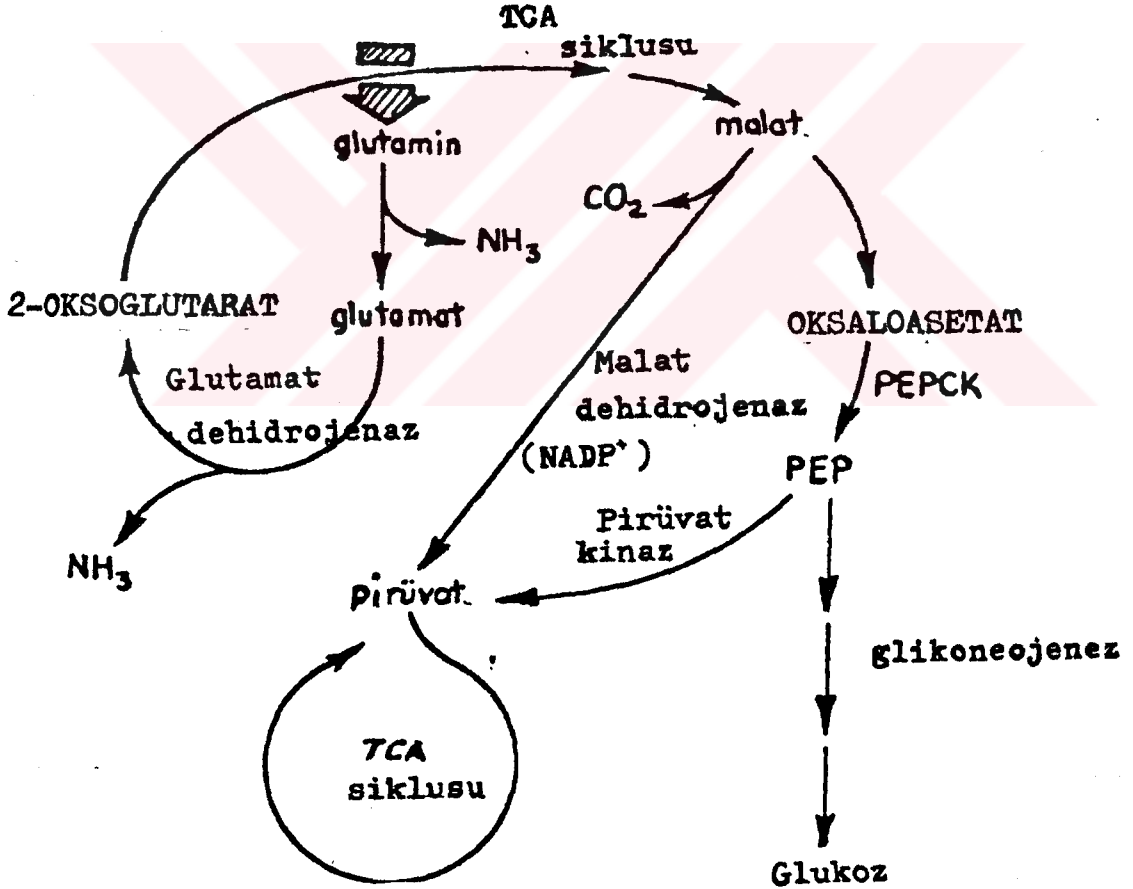
Şekil 7. Kasta glutamin sentezi için önerilmiş yol (32).

Yapılan bir çalışmada intraselüler glutamin konsantrasyonu ile iskelet kas protein miktarı arasında iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Artmış glutamin konsantrasyonu protein sentezinin artmasına neden olmaktadır. Invitro hepatik ribozomlarca proteine , lösin inkorporasyonunu artıran glutamat ve glutamin,

daha az olarakda aspartat ve asparajin hücre serbest sistem stimülasyonunda diğer amino asitlerden daha etkili bulunmuştur(16,20

II-2.1.1.2. Böbrek Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi

Glutaminin, böbrekte önemli metabolik rolü atılabilen protonlarla kolayca ve yeterli miktarda amonyak üretimi ve bu sayede vücudu asidosise karşı korumaktır (7,27,32,49). Amonyak böbrekte amino asit metabolizmasından sağlanır. Amonyagin en büyük prekürsörü glutamindir. Burada asparajinde olaya azda olsa katılır. Böbrekte glutamin metabolizması şekil 8'de gösterilmiştir.



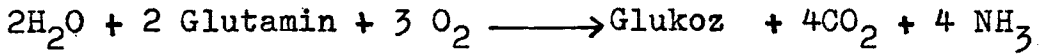
Şekil 8. Böbrekte glutaminin metabolizması (32).

Glutamin, böbreğin hem distal hemde proksimal tüpleri vasıtasıyla glomerüller filtrat ve kan akımından alınır. Hücre için-

de glutamini glutamata çevirerek amonyak üretimini katlizleyen glutaminaz enzimi bulunur. Böbrekte bulunan glutaminaz enziminin iki çeşidi (izoenzimler) vardır. Bunlardan biri mitokondride bulunur, aktivasyonu için fosfat iyonlarına gereksinim duyar ve fosfata bağımlı glutaminaz enzimi olarak bilinir. Diğeri ise fosfat iyonlarının yokluğunda aktiftir ve luminal membranın iç kısmında lokalize olmuştur (9,22,32,40,49,50). Mitokondriyal enzimin amonyak üretiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Yani glutaminin çoğu mitokondrial membrana geçerek böbrekte metabolize olur. Bu geçiş mitokondrinin yüksek enerji durumuyla bağlantılı bir taşıyıcı mekanizmayla gerçekleştirilir. Fosfat iyonlarına bağımlı glutaminaz enzimiyle üretilen glutamat glutamat dehidrojenaz ile 2-ketoglutarata çevrilirken ikinci bir amonyak molekülü daha oluşturulur. Sitrik asit siklusunun normalde oluşan bir kısım reaksiyonuyla da 2-ketoglutarat malata çevrilir. Malat mitokondrinin dışına verilir. Bundan sonra malat ya malat dehidrojenaz ile oksaloasetat yada malik enzim vasıtasıyla da pirüvata çevrilebilir. Oksaloasetat , fosfoenolpirüvat karboksikiaz enzimiyle PEP'ye çevrilir, ve PEP'de pirüvata pirüvat kinaz enzimiyle çevrilir. Her iki yolda da pirüvat oluşumu görülür. Pirüvat mitokondri içine girdikten sonra sitrik asit siklusunda tamamen oksidasyon için pirüvat dehidrojenaz ile asetil Co A'ya çevrilir. Tüm bu reaksiyonlar özetlenirse :



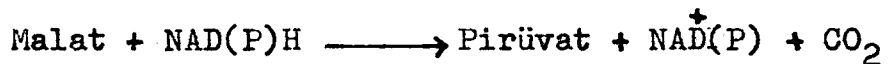
Ayrıca böbrekte fruktoz - bifosfataz ve glukoz -6-fosfotaz enzimlerinin varlığında PEP'de glikoneojenik yol vasıtasıyla glukozu çevrilir. Bu reaksiyon özetlenecek olursa,



Glutamin metabolizmasında PEP'nin oksidasyonu asetil -Co A'ya veya glukoz oluşumu için fruktoz bifosfota çevrilmesi bazı koşullara bağlıdır. Örneğin açlık süresince glutaminden üretilen PEP tümüyle glukozla çevrilir. Bu koşullar altında böbrekte oluşan pirüvatın oksidasyonu inaktif şekilde bulunan pirüvat dehidrojenazdan dolayı şiddetle inhibe edilir (32).

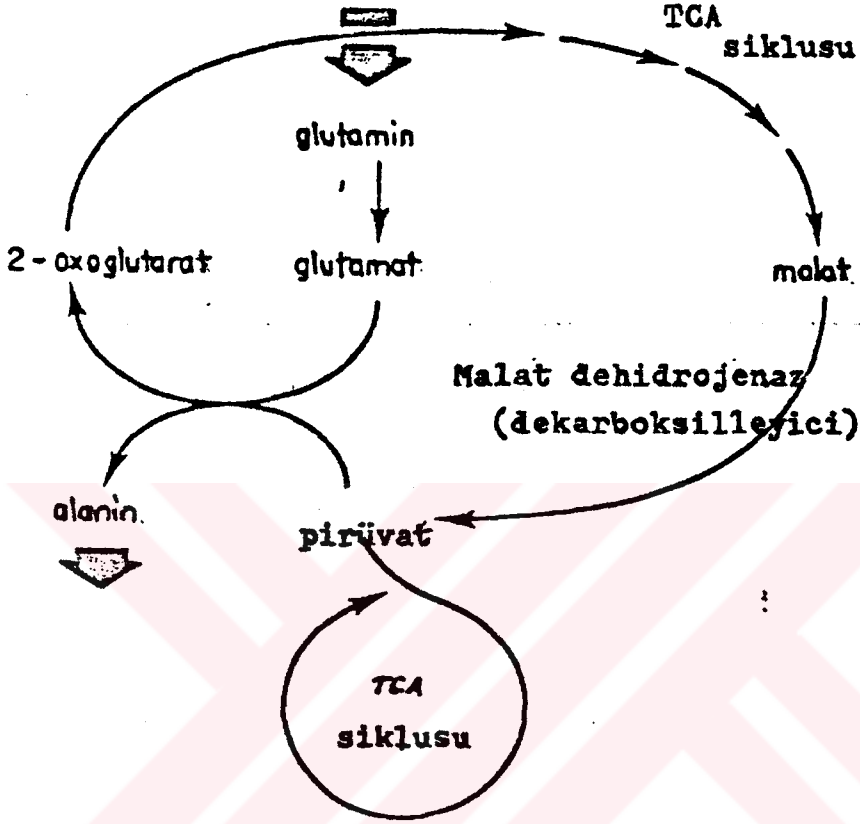
II-2.1.1.3. Barsak Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi

Son yıllarda glutamin , glutamat , aspartat ve asparajin amino asitlerinin ince barsakların hücreleri içinde metabolize oldukları gözlenmiştir. Bu metabolizma alanin amino asidine , sitrülline ve laktata çevrilme veya saydığımız bu dört amino asidin CO_2 'e oksidasyonunu içerir. Bu amino asitlerin metabolizmasından türeyen bir kısım azot atomları alanin veya sitrülline inkorpore olmadan amonyak şeklinde kan dolaşımına salınır. Barsaktaki glutamin metabolizması genel olarak böbrekteki glutamin metabolizmasına benzer, fakat iki spesifik değişiklik vardır. Glutamat , glutamat dehidrojenaz enzimiyle değil transaminasyon ile 2-ketoglutarata çevrilir. Malatın pirüvata çevrilmesi de dekarboksilleyici malat dehidrojenaz enzimiyle olur. Bu enzim NADH veya NADPH ile ilişkili olarak aşağıda gösterildiği gibi işlev görür.



Üretilen pirüvat ya sitrik asit siklusu ile okside edilebilir veya aminotransferaz vasıtasıyla alanine çevrilebilir. En azından

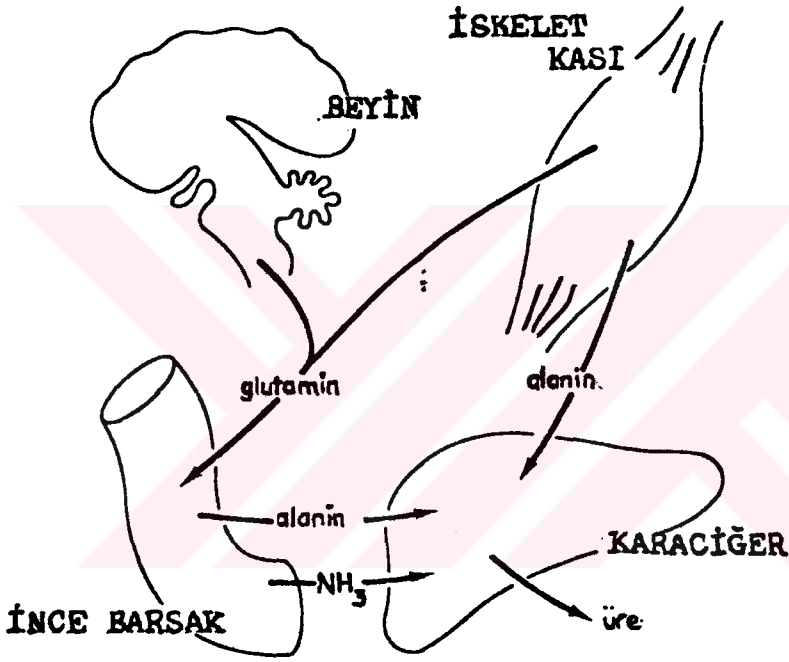
glutaminin % 50'si absorblayıcı hücrelerce tamamen okside edilebilir (Şekil 9. , 32).



Şekil 9. İnce barsak hücrelerinde glutamin metabolizması(32)

Barsağın amonyak ürettiği ancak birkaç yıldır bilinmektedir. Bunun son yıllara kadar barsak içinde yayılmış üreden barsak bakterilerinde bulunan üreaz enziminin etkisiyle ortaya çıktığı tahmin edilmekteydi (5). Günümüzde geçerli görüş, glutaminin azot atomuna ait amidten amonyakın derive edilmesidir ve karaciğerde üre sentezi için miktar olarak önemli bir kaynak oluşturmasıdır. Glutamin hem ince barsakların lümeninde sindirilmiş proteinden hem de glutaminaz enzimi tarafından deamidasyonun yapıldığı yer olan ince barsakların absorblayıcı hücreleri tarafından alınır.

Glutamin ile birlikte diet glutamat , aspartat ve asparajinin amino grubundaki azot atomları amonyaktan başka alanin, prolin ve sitrülün şeklinde incebarsaklardan ayrılır. Amonyak ve bu üç azotlu madde hepatik portal ven ile karaciğere taşınır. Bu azotlu bileşiklerin azot atomlarınınin % 60 kadarının sıçanda üre olarak atıldığı tahmin edilmektedir (Şekil 10., 32).

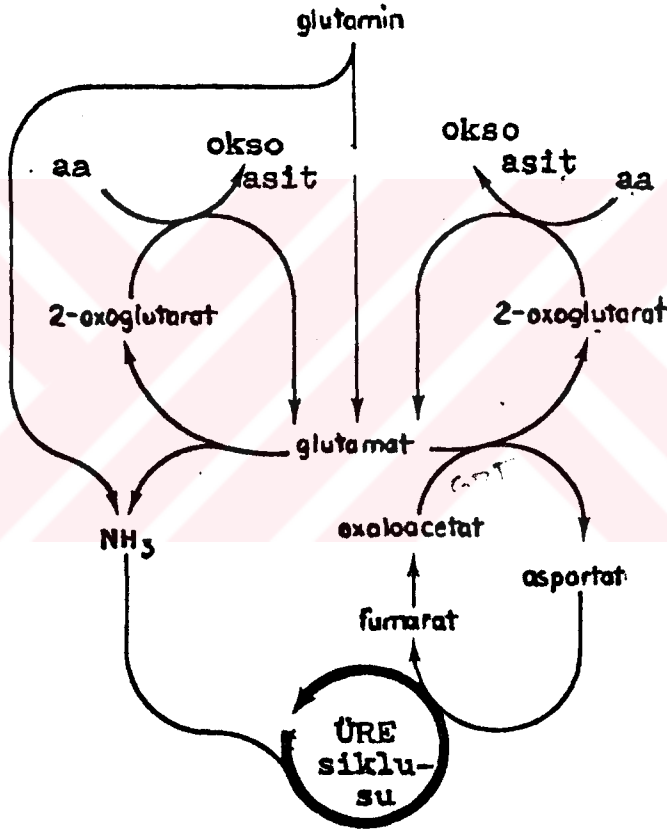


Şekil 10. Karaciğerde üre sentezi için azotlu maddelerin sağlanması (31).

II-2.1.1.4. Karaciğer Dokusunda Glutamin Metabolizması ve Önemi

Incebarsakların absorblayıcı hücreleri hepatik portal ven içine amonyak vermesinden dolayı bu ven diğer damarlardan 10 kez daha yüksek amonyak konsantrasyonuna sahiptir ve karaciğerde sentezlenen ürenin % 30'u bu amonyakça karşılanır. Karaciğerde ü-

re siklusuna girecek azot kaynakları dokulardan salınan glutamir ye alanin ,diyetten gelen amino asidlerin transdeaminasyonu sonu cu oluşan azot ve barsaklardaki amonyaktır. Şekil 11.'de göste - rildiği gibi üre sentezine girecek olan aspartat,glutamattan transaminasyonla sentezlenirken, glutamat da glutaminden deaminasyonla sentezlenir. Böylece glutamin karaciğerde üre sen - tezi için gerekli amonyak ve aspartat oluşum mekanizmalarına doç rudan katılır (7,32).



Şekil 11. Karaciğer dokusunda glutaminin aspartat ve amonyak oluşumundaki görevi (32).

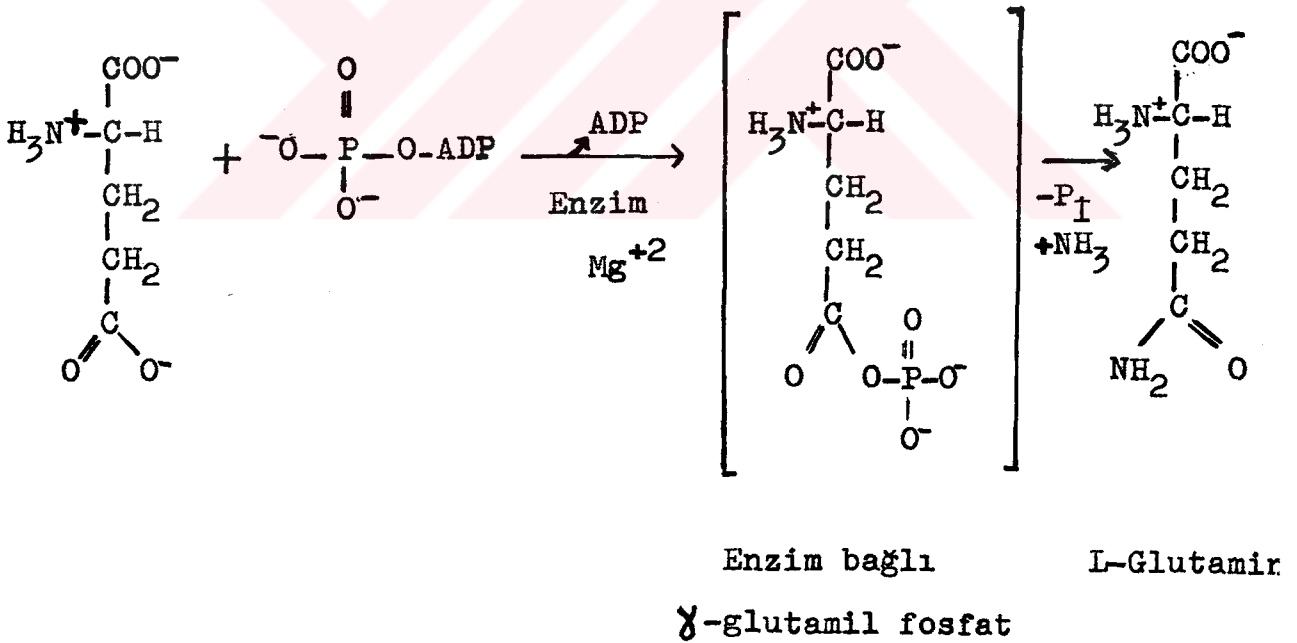
II-2.1.1.5. Adipoz Dokuda Glutamin Metabolizması ve nemi

Son alışmalar adipoz dokuda glutamin metabolizmasınının kas dokusundaki metabolizmaya benzer bir metabolizma olduğunu gs -

termiştir. Yağ dokusunda da dallanmış zincirli amino asitlerin metabolizmaları sonucu alanin ve glutamin amino asitleri oluşturulmaktadır. Ancak dallı zincirli amino asitlerin kaç karbonunun bu amino asitlerin oluşumu için krebs döngüsünün arabasamağına vereceği ve kaç tanesinin lipojenezis için asetil-CoA'ya çevrileceği bilinmemektedir (32).

II-2.1.2. Glutaminin Biyosentezi

Glutamin, glutamin sentetaz enziminin etkisiyle doku içinde sentezlenir. Koyun beyninden yüksek oranda saflaştırılmış glutamin sentetazın, glutamin biyosentezinin mekanizmasını tayin çalışmalarında kullanmışlardır (5). Glutamin üretiminde kullanılan ve glutamata amonyakın inkorporasyonunu sağlayan glutamin sentetaz enzimi ATP'ye bağımlıdır. Biyosentez mekanizması şekil 12' de görülmektedir.



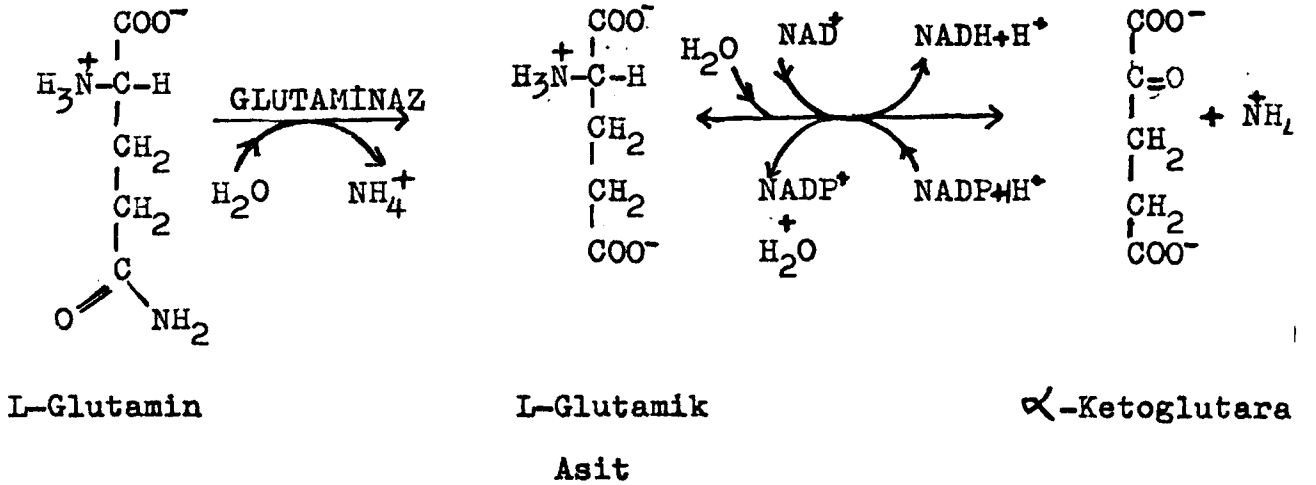
Şekil 12. ATP'ye bağımlı Glutamin sentetaz ile glutamatin, glutamine çevilişi (52).

Bu reaksiyonda glutamatin karboksilat grubu ATP'nin γ - fosforil grubuna atak yapar, ADP ayrılır ve yüksek enerji üreten anhidrid

γ - glutamil fosfattan bir P_i ayrılır ve amonyak yerini alarak glutamin oluşur(52). Glutamin sentezi böbrek, karaciğer, retina, beyin ve kas dokularında olmaktadır. Kan glutamini ise büyük olasılıkla karaciğer tarafından sentezlenmektedir (38). Glutaminin biyosentez kontrol mekanizması , glutamattan glutamin sentezini sağlayan glutamin sentetaz enziminin bazı inhibitörlerince sağlanır. Glutaminin azotunu kullanan metabolitlerin 6'sı ,bu enzimin kısmi inhibitörleridir. Bunlar AMP, triptofan, glukozamin-6-fosfat, karbamilfosfat, histidin, GTP'dir. E.coli'de glutamin sentetaz aktivitesi alanin,serin, ve glisin ilede inhibe edilmektedir. Bu enzimin gerçekte onbeş inhibitörü tesbit edilmiştir. Bunlardan başka metal iyonları ve proteinler ile substrat inhibitörleri glutamin sentetazı bağlama yeteneğinde olduğu gösterilmiştir (38).

II-2.1.3. Glutaminin Katabolizması

Glutamin, beyin, böbrek, karaciğer, retina gibi dokularda bulunan glutaminaz enzimi ile hidroliz edilir (5,31,38,50).



Şekil 13. Glutaminin Katabolizması (5).

Glutamin, glutaminaz enzimi vasıtasıyla glutamik asit ve amonyaga hidroliz olur. Glutamik asit glutamat dehidrojenaz enzimiyle α -ketoglutarata indirgenir (Şekil 13) ve daha sonra Krebs siklusu yoluyla okside edilir veya glukozaya çevrilir (5).

II-2.2. Asparajinin Metabolizması

Memeli asparajinin metabolizması hakkında L-asparajinazın antineoplastik etkisinin keşfine kadar hiçbir önemli araştırma yapılmamıştır. L-Asparajinaz enziminin tümör hücrelerindeki işlevlerine göre bazı hücresel kuralların belirlenmesine rağmen, normal hücrelerde asparajinin metabolizması konusunda ne kadar az şey bildiğimiz dikkat çekicidir.

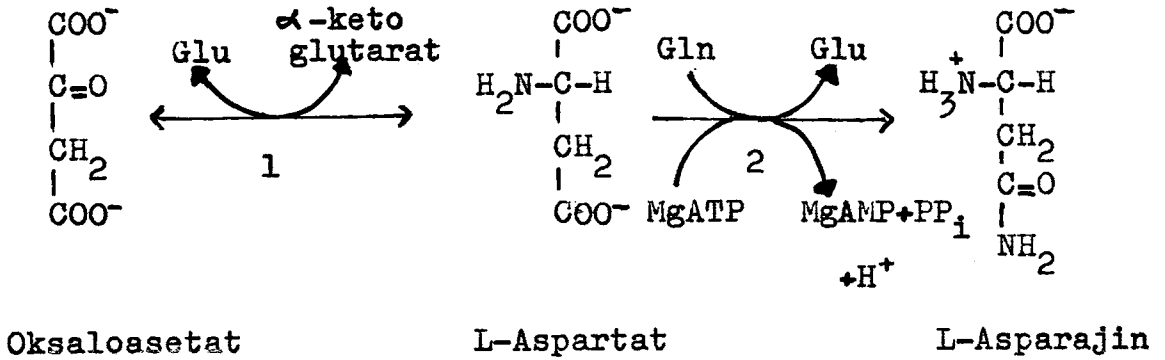
Miktar olarak en fazla asparajinin metabolizmasının olduğu yer karaciğerdir ve çok spesifik olarak sıçan karaciğeri mitokondrisi asparajinin metabolizmasındaki organellerin rolünün çalışılmasında iyi bir model teşkil etmiştir. Hücre sitoplazmasında asparajinin biyosentezi gerçekleşirken, yıkımı hem sitoplazmada hem de mitokondride farklı enzimler vasıtasıyla olur. Ayrıca asparajinin üçüncü bir yıkılım yolu daha bulunmuştur (29).

II-2.2.1. Asparajinin Biyosentezi

Oksaloasetatın β -C'nuna glutamik asitten bir amino grubunun transfer edilmesi ile aspartat amino asidi oluşturulur. Bu reaksiyonu katalizleyen aspartat transaminazdır. Aspartatın karboksilat grubuna bir amino grubunun eklenmesiyle de asparajinin sentezlenir. Bu reaksiyonu ise Mg^{++} -ATP ve glutamine bağımlı asparajinin sentetaz enzimi katalizler (38).

Asparajinin biyosentezinde azot donörü olarak glutamin kullanılır. Bazı organizmalarda glutamin yerine amonyaga bağımlı olan ikinci bir asparajinin sentetaz yolu daha vardır. Bu yol sade-

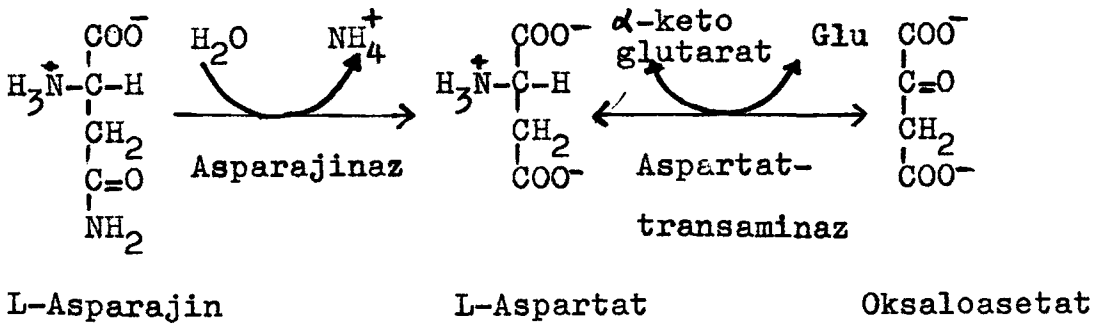
ce büyük ihtimalle amonyak konsantrasyonunun yüksek olduğu zaman kullanılmaktadır (30,50). Bu asparajinin biyosentezi hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir(Şekil 14, 30).



Şekil 14. Asparajinin Biyosentezi (38). 1: Aspartattransaminaz
2: Asparajin sentetaz.

II-2.2.2. Asparajin Katabolizması

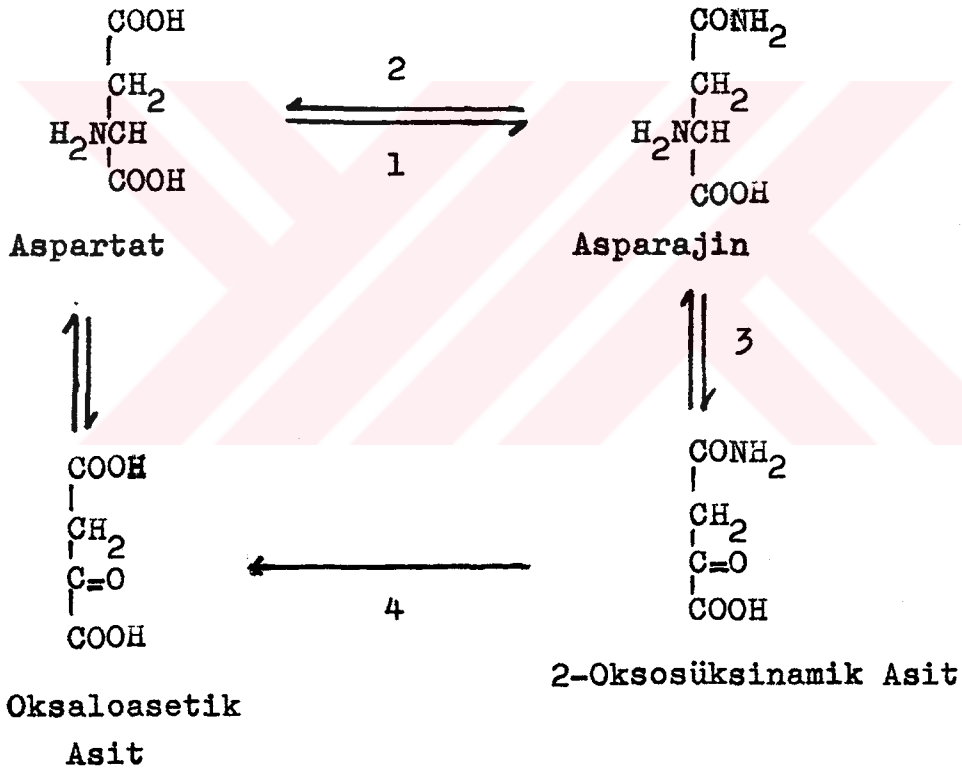
Asparajin önce asparajinaz enzimi ile hidroliz edilerek aspartat ve amonyum iyonlarını verir. Aspartat daha sonra α -keto-glutarata bağımlı bir transaminaz ile oksaloasetata çevrilir. Oluşan oksaloasetat Krebs siklusuna katılarak okside edilebilir veya glukozaya çevrilir (Şekil 15., 38).



Şekil 15. Asparajinin Katabolizması (38).

Asparajinaz enzimi karaciğer, böbrek ve beyinde bulunur (9,30,36). Yıkılımı hücre sitoplazmasında gerçekleşir (30).

Asparajinin indirgenmesi için ikinci bir yol mitokondride gerçekleşir. Mitokondrideki asparajin katabolizmasında iki farklı enzim görev almakta olup bu enzimler sitoplazmada bulunmazlar. Bunlar, asparajinaminotransferaz ve w-amidaz'dır. Asparajin mitokondride önce asparajinaminotransferaz enzimi vasıtasıyla β-ketosüksinamata (= 2-oksosüksinamik asit) ve w-amidaz enzimiyle de oksaloasetikaside ve amonyaga çevrilir. Bu oksaloasetikaside mitokondrinin matriksinde hızla oluşur ve sitrik asit siklusuna katılır (Şekil 16, 30).



Şekil 16. Hücre mitokondrisinde asparajinin metabolizması (30,36)

1: Asparajin sentetaz 2: Asparajinaz 3: Asparajinaminotransferaz.
4: w-amidaz.

Asparajinin üçüncü bir yıkılım yolu daha bulunmuştur. Asparajinaminotransferazı inhibe eden aminooksiasetatın varlığında ortama

ketoasid olmayan bir substrat eklendiğinde, beklenmedik bir şekilde büyük miktarda CO₂ oluşur. Bu bilgi oldukça ilginçtir. Çünkü ne oksaloasetik asitten aspartik asite, daha sonra transaminasyonla tekrar oksaloasetik asit dönüşümü olan katabolizma reaksiyonlarına asparajin katılmaz. Bu araştırma işaretlenmiş, asparajin ile aynı işaretli CO₂ varlığı ile ispat edilmiştir. Ancak bu yolun detayları şu anda kesin değildir (30).

II-3. Kanda ve Diğer Fizyolojik Sıvılarda Serbest Glutamin ve Asparajin Miktarları

Normal insan plazmasında glutamin düzeyi 5.8-9.7 mg/100ml asparajin düzeyi ise 1.0-1.4 mg/100ml olarak bulunmuştur (50). İnsan fetal plazmasında glutamin 11.2 mg/100ml, asparajin 0.6mg/100ml olarak verilmiştir. Bir başka kaynağa göre insan plazmasında 0.5-0.7mM, intraselüler sıvıda 2.3-7mM glutamin bulunur (56). Aç ve normal bir insanın plazma glutamin düzeyi 6-10 mg/100ml'dir. (57). Normal insan idrarında glutamin 100mg/24 saat ve asparajin 54mg/24 saat miktarında atılır (20,21). Kolon kromatografisi yönteminde normal insan kan plazmasında glutamin düzeyi 0.49 mikromol/ml, asparajin düzeyi 0.05 mikromol/ml iken normal insan idrarında glutamin 0.21 µg/ml, asparajin ise 0.29 µg/ml düzeylerinde bulunmuştur (31). İyon değiştirici kromatografi yöntemi ile normal insan plazmasındaki glutamin düzeyi 0.206-0.766 mikromol/ml , asparajin düzeyide 0.018-0.084 mikromol/ml olarak verilmiştir. Bu yöntem ile bazı patolojik olgulardaki bu iki amino aside ait veriler tablo 1'de gösterilmiştir (34).

Kronik şizofreni gibi psikotik hastalıklı bir insanın açlık plazmasındaki asparajin konsantrasyonu normal düzeyin 4-8 katı kadardır. Asparajin düzeyi serebrospinal sıvı ve eritrositlerde

| Hastalık | Glutamin $\mu\text{mol/ml}$ | Asparajin $\mu\text{mol/ml}$ | Glutamin/ Asparajin |
|--|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Etiyolojisi bilinmeyen konvülsif hastalar. | 0.847 | 0.047 | 18.00 |
| Battered Child Sendromu | 0.429 | 0.038 | 11.3 |
| Konjestif kalp hastalığı | 0.419 | 0.029 | 14.4 |
| Pankreatitis | 0.370 | 0.018 | 20.6 |
| Erythema multiforme bullosum | 0.395 | 0.012 | 32.9 |
| Kronik bronşit pulmoner fibrozis | 0.495 | 0.039 | 12.7 |

Tablo 1. Bazı patolojik olgularda asparajin ve glutaminin kan plazma konsantrasyonları (34).

daha çok artmıştır. Asparajin konsantrasyonundaki önemli artış büyük olasılıkla beyinde asparajinaz enzimi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Buna göre şizofrenili hastaların değişik fizyolojik sıvılarındaki asparajin konsantrasyonları plazmada 58-13 mikromol/ l, serebrospinal sıvıda 6.9-29 mikromol/l, eritrositlerde 10.2 - 22 nmol/g olarak verilmiştir (27).

Hiperamonemia ile karakterize edilen hepatik ansefalopati ve Reye sendromu ile üre siklusunda doğuştan olan metabolizma bozukluklarında plazma-glutamin miktarı artar. Hiperornitemide, ornitintranskarbamilaz yetersizliği ile karbamilfosfat sentetaz yetersizliğinde kanda glutamin konsantrasyonu artar (8).

II-4. Dokularda Serbest Glutamin ve Asparajin Miktarı

100 g kuru köpek dokusundaki mg cinsinden bulunan glutamin miktarlarını aşağıda olduğu gibi ifade etmiştir : Kalp 225mg, diafram 183 mg , iskelet kası 122 mg, beyin 64mg, karaciğer 45 mg, böbrek 11.3 mg'dır. (50).

Sıçan serebral korteksinde glutamin ve asparajin içerikleri üzerinde fluorometrik çalışmalar sonucu glutamin 4.03 μ mol/g, asparajin 1.26 μ mol/g olarak verilmiştir (31). Fare beyin ve karaciğer dokularında spektrofotometrik yöntem çalışmaları sonucu glutamin beyinde 3669.1 nmol/g, karaciğerde 2937.5 nmol/g olarak bulunmuşken asparajin beyinde 60.8 nmol/g, karaciğerde 505.8 nmol/g olarak bulunmuştur (10).

Hem respiratuar asidosis hemde metabolik asidosisde açıkça renal glutamin sentezinin azaldığı gösterilmiştir. Gine domuzlarıyla yapılan bir çalışmada pH ile glutamat, amonyak ve glutamin arasındaki ilişki tablo 2'de gösterilmiştir. Asidosisde glutamin ile birlikte glutamat ve amonyak miktarıda azalır (27).

| Metabolik değişiklikler | pH 7.4 | pH 7.1 | pH 7.1(CO ₂) |
|-------------------------|----------|----------|--------------------------|
| Glutamat | 438 ± 80 | 214 ± 62 | 102 ± 113 |
| Amonyak | 400 ± 62 | 228 ± 36 | 169 ± 41 |
| Glutamin | 503 ± 78 | 246 ± 45 | 226 ± 61 |

Tablo 2. Gine domuzu böbreğinden izole edilmiş kortikal tüplerce yapılan glutamin sentezine respiratuar veya metabolik asidosisten kaynaklanan düşük pH'nın etkisi gösterilmiştir (27). (Değerler nmol/gr. olarak verilmiştir).

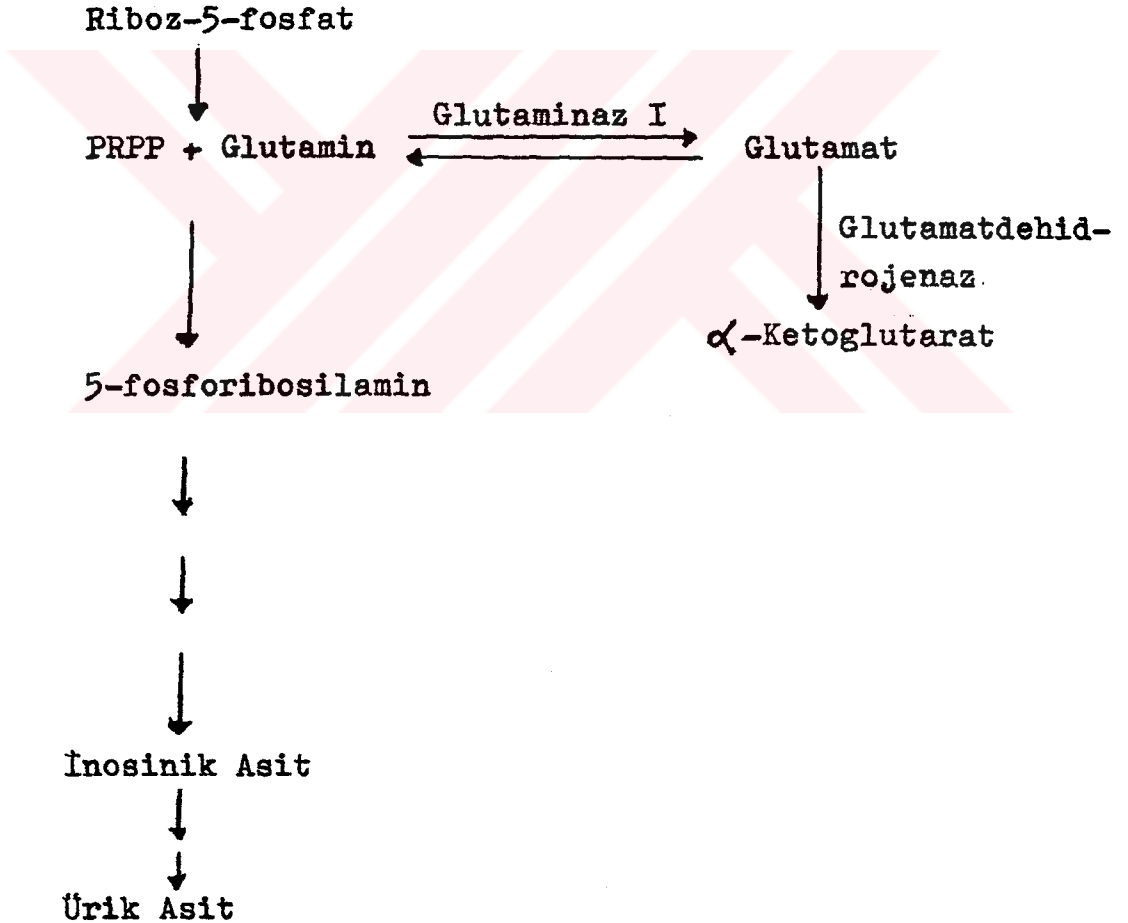
II-5. Primer Gut ve Glutamin Metabolizması

Gut hastalığı hiperürisemi ile birlikte akut artrit nöbetleri eklemlerde ve eklem çevresinde sodyum urat birikimi (tofüs) ile böbreklerde ürik asit taşı oluşumuyla gözlenen metabolik bir bozukluktur. Gutu olan hastaların %90'ı erkektir. Bunun nedeni erkeklerde plazma-ürük asit düzeyinin kadınlara göre normalde daha yüksek olmasıdır. Hastalığın başlangıcı 40-60 yaşları dolayındadır. Hastalık belirgin ailevi yığılım göstermektedir. Hiperürisemi kalıtsal bir metabolik bozukluk sonucu ortaya çıkarsa primer gut, bazı çevresel faktörler ve kazanılmış hastalıklar (lösemi, kronik nefrit, polistemia) çıkarsa sekonder gut terimi kullanılmaktadır. Ürik asit insanlarda pürin metabolizmasının son ürünü-

dür ve pürin sentezini artıran nedenler ürik asit oluşumunu artırarak hiperürisemiye neden olur. Hiperürisemide gut hastalığının başlıca nedenidir. Glutamin pürin biyosentezine katılır ve pürin halkasının 3 ve 9 nolu azot atomlarını kendi amit-azotundan verir(49).

Primer guta neden olabilecek serum ürik asitinde artma spesifik enzim bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Primer gutta olduğu saptanan glutamin ile ilgili enzim defektleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:

Pürin Biyosentez Basamağında ,



Şekil 17. Primer gutta glutamin metabolizma bozukluğu (5,45).

Pürin biyosentezinin düzenlenmesinde glutaminin intraselüler konsantrasyonu önemli rol oynamaktadır. Denova pürin biyosentezinin reaksiyon oranının düzenlenmesinde belirleyici tek amino asit substratı glutamindir (21). Metabolizma sırasında kullanılacak glutamin konsantrasyonunun artmasına neden olabilecek iki enzimatik anormallik ileri sürülmüştür. Bu enzimatik anormalliklerden biri olan renal glutaminaz I eksikliği, böbreklerde daha az miktarda glutaminin hidroliz olmasını sağlayarak, glutamin miktarının artmasına yol açmaktadır. Gutlu hastalarda görülen amonyak atılmasındaki azalma bu şekilde açıklanmaktadır. Ayrıca primer gutlularda fazla tübüler reabsorbsiyonuyuda idrarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0.001$) glutamin içeriğinde azalma olmaktadır. Böbreklerde glutamin birikintisinin önemli ölçüde artması, karaciğerde pürin biyosentezi için daha fazla substratın sağlanmasına yol açmaktadır.

Diğer enzimatik bozuklukta glutamat dehidrojenaz enziminin eksikliği, glutamin sentezi için daha fazla glutamat sağlayacağından glutamin yapımında bir artışa neden olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca yüksek glutamat konsantrasyonu glutaminaz I'i inhibe ederken glutamin sentetazıda indükleyici etkiye sahiptir. Karaciğer ve böbreklerde artmış olan glutamin, plazma düzeyini artırmaksızın hızlı bir şekilde pürin metabolizmasına katılır. Böylece primer gutlu kişilerdeki plazma glutamin düzeyi ile normal kişilerin plazma glutamin seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamaktadır ($p > 0.2$, 20,21,56,57).

II-6. Amino Asid Tayinleri

Amino asidlerin tanımı ve miktar tayinleri için oldukça değişik yöntemler uygulanmıştır. 1950-60'lı yıllarda amino asidle-

rin teşhisleri için tek ve çift dimensiyonlu kağıt kromatografileri oldukça sık kullanılan yöntemlerdendi (13,41). Özellikle 60'lı yıllara gelindiğinde kağıt kullanımına oranla daha pratik oluşu, materyalden kazanç ve daha kısa zamanda daha hassas maddeler üzerinde çalışma olanağı yaratan tek ve çift dimensiyonlu ince tabaka kromatografileri geliştirildi ve amino asidler bu kromatografi türüne başarıyla uygulandı (2,3,6,13,35,47,51,55). Ayrıca TLC ile kombine olarak amino asidlerin teşhis ve miktar tayinleri için spektrofotometrik (SPK) yöntemler geliştirilmiştir (15,47,55). 1962 yılında amino asidlerin bazı iki değerlikli katyonlar ile kompleks tuzları oluşturmalarından hareketle bakır-iodometri yöntemi ile titrimetrik olarak miktar tayinlerine gidilmiştir (17). 1965'de iyon değiştirici kromatografi üzerinde özellikle asparajin ve glutamin miktar tayinleri yapılmış ve bu tayinlere etki edebilecek ortam koşulları (ısı, nem) araştırılmıştır (34). 1967 yılında fizyolojik sıvılarda nötral ve asidik amino asidlerin kolon kromatografisi için değişik türde reçine kullanımları ile birlikte amino asid analizörleri de devreye sokulmuştur (4). 1970'li yıllara gelindiğinde biyolojik materyalde L-glutamin ve L-asparajinin miktar tayinleri için ilgili enzimlerin kullanılması ile spektrofotometrik ve fluorometrik yöntemler geliştirilmiştir (10,31). Yine bu yıllarda amino asid analizörleriyle birlikte uygulamaya sokulan yeniden düzenlenmiş katyon değiştirici kromatografi kullanılmıştır (19). 1975'de glutaminin pikomol (pm) düzeyindeki miktarlarını ölçebilecek hassaslıkta radyoaktif bir metod ve yine aynı hassaslıkta çalışan filtrasyon yöntemleri uygulanmaya başlanmıştır (1,52). Ayrıca gaz kromatografisi hem asparajin hemde glutamin için kul-

lanılmıştır (8). Yine aynı yıllarda asparajin için herhangi bir belirteç kullanmaksızın immobilize edilmiş asparajinaz ile asparajinin inkübasyonu sonucu oluşacak amonyum iyonlarının konsantrasyonu, amonyum iyon seçicili elektrod kullanmak suretiyle miktarı ölçülür ve buradan asparajin konsantrasyonu belirlenir (33). 1982'deki bir çalışmada kütle spektrometri yöntemi için biyolojik örneklerden glutaminin amid azotunun izolasyonu ile miktar tayinine gidilmiştir (24). Analizör uygulamaları genellikle değişik türde kromatografi yöntemleri ile kombine çalışılmaktadır. Özellikle katyon değiştirici kromatografi , iyon değiştirici kromatografi ve kolon kromatografileri ile oluşturulan amino asid analizörlü düzenekleri sıklıkla kullanılmışlardır. Günümüzde hem asparajin hem glutamin ve tüm amino asidlerin miktar tayinleri için kullanılan yöntemler yüksek performanslı likit kromatografisidir (28).

Bununla birlikte TLC uygulamaları ucuz, basit ve çabuk sonuç vermesinden dolayı hala tercih edilmektedir.

İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (14)

İnce tabaka kromatografisi (İTK) bir fizikokimyasal ayırma yöntemi olup bir karışımı oluşturan maddeleri çabuk, hassas ve iyi bir çözümüyle ayırdığından diğer tanı ve ayırma yöntemleri içinde önemli bir yere sahiptir.

İTK'da stasyoner faz olarak kullanılan adsorban madde, cam yada metal plaklar üzerine ince bir tabaka halinde kaplanır. Ayrılacak maddeler karışımının uygun bir çözücüdeki çözeltisi ya noktalar yada bantlar şeklinde plak üzerine uygulanır ve bu plak uygun bir çözücü sistemi (mobil faz) içeren sıkı kapatılmış bir tankın içine yerleştirilir. Çözücü sistemi adsorban üzerinde

kapiller hareketle yükselirken karışımdaki maddelerde birbirinden ayrılır (plağın devolope olması). Renksiz maddeler plak üzerine bir uygun belirteç püskürtülerek görünür hale getirilir.

Bilinmeyen bir karışımın ayrılmasında adsorban ve çözücü sistemi beraberce görev yaptıklarından bunların seçimi uygun bir biçimde yapılmalıdır. Ayrıca devolope işlemi ve tankın atmosferi gibi uygun çalışma koşullarını seçmek de önemlidir.

Stasyoner Faz : Tabaka, çeşitli firmalar tarafından özellikle İTK için yapılmış adsorbanlardan biri ile hazırlanır. Adsorban cam yada metal plak üzerinde düzgün bir şekilde kaplanmalı, kalınlığı her yerinde aynı olmalıdır. Kaplanmış plağın boyutları 20x20 cm veya 20x10 cm kalınlığı ise 0.1-0.3 mm olabilir. Analitik amaçlar için kullanılacak en uygun tabaka kalınlığı 0.2mm'dir.

Plakların Hazırlanması : Gerekli miktarda adsorban tartılarak distile su ile geniş ağızlı bir balonda hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat ederek homojen bir kütle elde edilinceye kadar karıştırılır. Tüm karıştırma süresi 90 saniyeyi aşmamalıdır. Bu şekilde hazırlanan sulu süspansiyon hemen plak çekme aletinin içine konur, önceden temizlenmiş, kurutulmuş plaklar üzerine süratle ve kesintisiz tek bir hareketle yayılır. Hazırlanan plaklar oda ısısında 1 gece (8-12 saat) bekletildikten sonra adsorbanın cinsine göre farklı ısı derecelerinde aktive edilir. Aktive edilmiş plaklar, labaratuardaki nem ve buhardan korunması için kullanılıncaya kadar desikatörde saklanır.

Mobil Faz : Bir yada birkaç çözücünden ibaret olabilir. Çözücüler analitik saflıkta olmalıdır. Mobil faz birkaç çözücünden ibaret ise karışım oranı toplam hacim 100 olacak şekilde belirtilir. adsorbsiyon kromatografisinde çözücüler elüsyon etkilerine

göre elüotropik seri diye adlandırılan bir grup altında toplanmıştır. Örneğin polar olmayan heksan zayıf, kloroform orta kuvvette bir elüsyon etkisine sahipken , polar çözücü olan metanol kuvvetli bir elüsyon etkisine sahiptir. Dielektrik değişiminde bir bileşiğin polaritesi hakkında bilgi verir. Yani bir çözücünün dielektrik sabitesi ne kadar yüksek ise polariteside o kadar yüksektir. Göç hızı çözücünün viskozitesine ve doğal olarak tabakanın yapısına bağlıdır.

Amino asitlerin organik çözeltilerdeki çözünürlükleri çok sınırlı olduğundan kromatografi için uygun sistemler genellikle su içermelidir. Metanol, aseton ve etanol gibi çözümler polar organik bileşenler olarak kullanılırlar. Bu sistemler ile genellikle tatmin edici ayırım elde edilebilir, oldukça diffüzdürler. Bununla birlikte sürüklenmeye meyillidir. Bu eğilimleri %1 veya %2'lik glasiyel asetik asit ekleyerek ve her amino asit için eklenen miktarları 2 mikrogram artırarak kontrol altına alınabilir.

Metanol veya etanol yerine propanol veya butanol kullanıldığında küçük lekeler oluşur. Fakat avantaj artan viskoziteye bağlı olarak azalan akış hızı ile biraz bozulur. Çözgen viskozitesi arttıkça lekeler genellikle daha az yayılır. Fenol bu etki için iyi bir örnektir. Eğer viskoz alkolün yerine düşük viskoziteli non-polar sıvılar geçerse metanol, piridin ve glasiyel asetik asit gibi bir çözücü eklenmelidir. Bu tip sistemlerde ayırım çok tatmin edici ve süratlidir. Amino asitlerin tek dimensiyonlu TLC'de 0.7'lik limiti aşmazlar. Bütün incelenen solventlerde başlangıç ile sınır uzaklık arasındaki 2/3'lik mesafe ayırım için kullanılır. Çözgenin su miktarının artırılması küçük R_f değerlerini büyüklelerinden daha fazla yükselmesine neden olur . Net olarak elde

edilen ayırımın bozulmasına yol açar (44).

Kromatografi Tankına Konan Mobil Faz Seviyesi ve Tankın

Doyurulması : Mobil faz tankın içine 5-8 mm yüksekliğinde

doldurulur ve sıkıca kapatılır. Tanka iç duvarını çepeçevre saracak şekilde temiz bir süzgeç kağıdı yerleştirilir. Böylece tankın çözücü buharıyla doyması sağlanır. Bu doyurma derecesinin, kromatogramda lekelerin yeri birbirinden ayrılması üzerine önemli bir etkisi vardır. Bu nedenle plaklar, çözücü buharıyla doyurulmuş tanklar içinde devolope edilmelidir(14).

Orneklerin Plağa Uygulama Yerleri : Plağın yan kenarından

enaz 1 cm, alt kenarından ise 1.5 cm uzaklıkta olacak şekilde karışım çözeltisi özel mikroenjektörler veya mikropipetler yardımı ile tatbik edilirler. Tatbik edilen lekelerin çapları mümkün olduğu kadar küçük olmalı ve bu lekeler enaz 1 cm aralıklı olmalıdır. Az uçucu çözeltiler kısımlar halinde uygulanır ve her kısmın ardından çözücünün uçması sağlanır. Daha sonra front çizgisi belirlenir.

Standart Çözelti ve Analiz Örneği Çözeltisi: Örnek çözelti

daima standart karışım ile yanyana plağa uygulanır. Standart ve örnek çözeltileri mümkün olduğu kadar aynı çözücü ile hazırlanmalıdır. Örneğin plazmada çalışılıyor ise plazmada bulunması gereken glutamin sınırları içerisindeki kadar glutamin içeren standart solüsyonu tatbik edilmelidir. Böylece leke büyüklüklerinin karşılaştırılması ek bilgiler sağlar.

Lekelerin Ortaya Çıkartılması : Kromatogramda ayrılan renk-

siz maddeler çeşitli şekillerde ortaya çıkartılır. U.V. ışınlar altında floresans gösteriyorlarsa kromatogramdaki lekelerin saptanması basittir. Aksi halde maddelerin bir kimyasal reaksiyon

ile renkli türevlerini oluşturmalarından yararlanılarak kromatogram bir belirteç ile muamele edilir, gerektiğinde ısıda uygulayarak maddelerin lekeleri belirgin hale sokulur. Ninhidrin bütün amino asitler için kullanılabilen bir belirteçtir.

TLC- SCANNER (TLC-SCN)

TLC-Scanner (TLC-SCN) hem emisyon (yayma) hemde absorpsiyon (emme) esasına göre TLC plağındaki lekeyi zigzaglar şeklinde salınım hareketleri yaparak tarama ve ölçme yeteneğine sahip olan bir alettir. Çalışma prensibi kısaca açıklanacak olursa : TLC plağındaki okunacak lekenin absorbladığı maksimum dalga boyundaki ışık demeti çeşitli optik düzenekler vasıtasıyla lekeye gönderilir. Ancak gönderilen bu monokromatik ışık lekeye yansıtılmadan önce düzenleyici monitörden geçirilir. Daha sonra TLC plağındaki lekeye gönderilir. Lekede ışığın bir kısmı absorblanır ve bu kısımda yansıtılır. Yansıyan ışın ölçme dedektörü üzerinde toplanır. Her iki dedektörün üzerinde oluşan elektrik enerjisinin verim oranının logaritması o leke için ölçülen alan değerini verir. Okunacak leke u.v. bölgede (200-400 nm) absorbens göstermesi halinde dötaryum lambası, görünür bölgede (350-630 nm) absorbens göstermesi halinde tungsten lambası kullanılır. Miktar tayini yapılmak istenen maddeye ait lekenin tam ve doğru ölçülebilmesi için spektrofotometrik çalışmalarda olduğu gibi lekenin maksimum absorbens gösterdiği ışığın dalga boyu belirlenmelidir. Lekenin boyutlarına göre manuel olarak salınım hareketlerinin genişliği (x) ve uzunluğu (y) ayarlanarak okumalar yapılır. Buna göre asparajin amino asidine ait TLC plağındaki lekenin maksimum absorbens gösterdiği dalga boyu 406 nm iken glutaminin maksimum absorbens gösterdiği dalga boyu 413 nm olarak bulunmuştur (42).

B Ö L Ü M III

A R A Ç, G E R E Ç ve Y Ö N T E M L E R

III-1. KULLANILAN MADDELER

Asparajin (Sigma)

Glutamin (Sigma)

Ninhidrin (Merck)

Kadmiyum Asetat Dihidrat (Merck)

Sodyum Sitrat (Merck)

2,4,6-Kollidin (Sigma)

Aseton (Merck)

Metanol (Merck)

Hidroklorik Asit (Merck)

Piridin (Merck)

Amonyak (Merck)

Isopropanol (Merck)

Eter (Merck)

Silikajel 60G (Merck)

Selüloz MN300 (Macharey Nagel + Co 516 Düren)

III-2. KULLANILAN ALETLER

ITK Yayıcısı (Desaga)

ITK Tankları (Desaga)

20 x 20 cm lik cam kromatografi plakları

ITK Plak Yayma Tepsisi

Etüv (Heraeus)

Hassas Terazı (Sartorius)

Kurutma Makinası (Etap)

Mikroenjektör (Hamilton)

Santrifüj (Nüvefuj 615)

Otomatik Karıştırıcı (Nüvemix)

Spektrofotometre (Perkin Elmer Spectrophotometer Coleman 295)

TLC-Scanner Aleti (Model CS 920 Shimadzu)

III-3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Renklendirme Çözeltisi: 0.5 g ninhidrin tartılır. Üzerine 5 ml 2,4,6-kollidin eklenir. Aseton ile çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanır.

Standart Asparajın Çözeltileri: Sırası ile %100 mg , %110 mg., %120 mg., %130 mg. ve %140 mg ' lık asparajinin distile sudaki çözeltileri hazırlanır.

Standart Glutamin Çözeltileri: Sırası ile %100 mg , %125 mg %150 mg., %175 mg ve %200 mg ' lık glutaminin distile sudaki çözeltileri hazırlanır.

%0.5 g. Kadmiyum Asetat İçeren Metanol: 0.578 g. Kadmiyum a-
setat dihidrat tartılır ve metanol ile çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanır.

%1 Hidroklorik Asit İçeren Aseton

Solvent Sistemleri:

A- Metanol-Piridin-Su (80:20:4) (v/v)

B- İsopropanol-%10 Amonyak (70:30) (v/v)

III-4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Çalışma materyali olarak normal ve gutlu kişilere ait kan plazması üzerinde çalışılmıştır. Normal (kontrol) grubuna ait kan örnekleri, hiçbir hastalığı olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan 20 kadın ile 15 erkek toplam 35 kişiden alınmıştır. Normal grubu oluşturan kişilerin yaşları 18-80 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 37.25'dir. Gutlu olgulara ait kan örnekleri 15 erkek hastadan alınmıştır. Bu gruba ait yaşlar 42-60 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 51.3'dür. Serum ürik asit miktarları %9.6-%12.0 mg arasında olan kesin gut tanısı konmuş, guttan başka herhangi önemli bir hastalığı olmayan (poli-stemia, lösemi, nefrit) ve herhangi bir ilaç kullanmayan kişilerden kan örnekleri alınmıştır.

20 mg kadar katı sodyum sitrat içeren santrifüj tüpüne, normal kişinin kol veninden 5 ml kan alınır. Hafifçe karıştırarak sitrat ile kanın teması sağlanır. Sitratlı kan 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilir ve plazma derhal bir puar yardımıyla ayrılır. Plazmanın 1.5 ml'si çalışma için ayrılır. Geriye kalan plazma temiz bir tüp içinde ağzı parafinlenerek -16°C'de analize dek saklanır.

III-5. STANDART GRAFİKLERİN ÇİZİLMESİ

III-5.1. Asparajinin TLC-SPK ve TLC-SCN Yöntemleri Yardımıyla

Standart Grafiklerin Çizilmesi

Tatbik noktaları, selüloz MN300 İTK plağının alt kenarından 1.5 cm, yan kenarlardan 2 cm'lik mesafe bırakılacak şekilde

de işaretlenir. Tatbik noktalarından 15 cm yukarıya front çizgisi çekilir. Plazmada bulunabilecek asparajinin minimum ve maksimum miktarları gözönüne alınarak hazırlanan asparajin standart çözeltileri sabit hacimli ve artan konsantrasyonlar halinde kurutma makinası ve mikroenjektör yardımıyla TLC plağına tatbik edilir. Buna göre birinci tatbik noktasına %100 mg , ikinci tatbik noktasına %110 mg , üçüncü tatbik noktasına %120 mg , dördüncü tatbik noktasına %130 mg ve beşinci tatbik noktasına %140 mg'lık asparajin standart çözeltisinden 10'ar mikrolitre hacimlerinde uygulanır.

Metanol- piridin - su (80:4:20) (v/v) içeren solvent sistemi ile tank, plak konmadan enaz bir saat önce hazırlanarak doyurulmalıdır. Plak doygun TLG tankına konur. Oda ısısında bu plağın devolope süresi 60 dakikadır. Devolope işlemi bittikten sonra plak tanktan çıkarılır ve solventin uçması için bir süre oda temperatüründe veya 10 dakika 70°C'de etüvde bekletilir.

Asparajin lekelerini belirlemek için plak, renklendirme çözeltisi içeren daldırma kabına 30 saniye gibi kısa bir süre daldırılır ve çıkarılır. Daha sonra 70°C derecede 30 dakika lekenin oluşumu için etüvde bekletilir.

Kirli sarı bir renk olan asparajin lekelerinin , önce TLC-SCN aletinde maksimum absorbands gösterdiği 406 nm dalga boyunda alan değerleri ölçülür. Asparajinin tatbik edilmiş yüzde konsantrasyonları ile ölçülen alan değerleri karşılaştırılarak asparajin için TLC-SCN'e ait bir standart grafik çizilir (Grafik I)...

Daha sonra spektrofotometrik yönteme geçilir. Asparajine ait lekeler 2 cm çapında bir daire şeklinde spatül ile kazınarak santrifüj tüplerine aktırılır. Ayrıca kör içinde plaktan 2 cm

çapındaki bir dairenin alanı kadar boş selüloz MN300 kazınır ve santrifüj tüpüne aktarılır. Bu tüplerin herbirine ve köre %0.5 g kadmiyum asetat içeren metanolden 2'şer ml ilave edilerek, karıştırıcıda süspansiyon haline getirilir. Tüplerin ağzı parafinlenerek oda ısısında 2 saat kompleks oluşumu için beklenir. Bu sürecin sonunda tüpler 3000rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve normal süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntü metanol ile 10 ml'ye tamamlanır. Spektrofotometrik olarak maksimum absorbanans gösterdiği 494 nm dalga boyunda köre karşı süzüntüdeki renkli kompleks oluşumlarının optik dansitesi ölçülür. Ölçülen optik dansite değerleri ile asparajinin tatbik edilmiş yüzde konsantrasyonları arasında asparajin için TLC-SPK yöntemine ait standart grafik çizilir (Grafik II).

III-5.2. Glutaminin TLC-SPK Yöntem ve TLC-SCN Yardımıyla Standart Grafiklerin Çizilmesi

Silikajel 60G TLC plağındaki tatbik noktaları aynı selüloz MN300 TLC plağında olduğu gibi belirlenir. Plazmada bulunabilecek minimum ve maksimum miktarları göz önüne alınarak hazırlanan glutamin standart çözeltileri sabit hacimli ve artan konsantrasyonlar halinde silikajel 60G TLC plağına tatbik edilir. Buna göre birinci tatbik noktasına %100 mg., ikinci tatbik noktasına %125 mg., üçüncü tatbik noktasına %150 mg., dördüncü tatbik noktasına %175 mg ve beşinci tatbik noktasına %200 mg'lık glutaminin standart çözeltilerinden 10'ar mikrolitre hacimlerinde uygulanır.

Solvent sistemi Isopropanol-%10 amonyak (70:30) (v/v) içerir. Önceden bu solvent ile doyurulmuş tank içine plak yerleştirilir. Devolope süresi 3.5 saattir. Devolope işlemi tamamlandıktan sonra plak tanktan çıkarılır ve kurutulur. Özellikle sol-

vent sisteminde kullanılan amonyanın plaktan tamamen uçurulması için plak asgari 105°C'de 2 saat hava akımlı etüvde kurutulmalıdır.

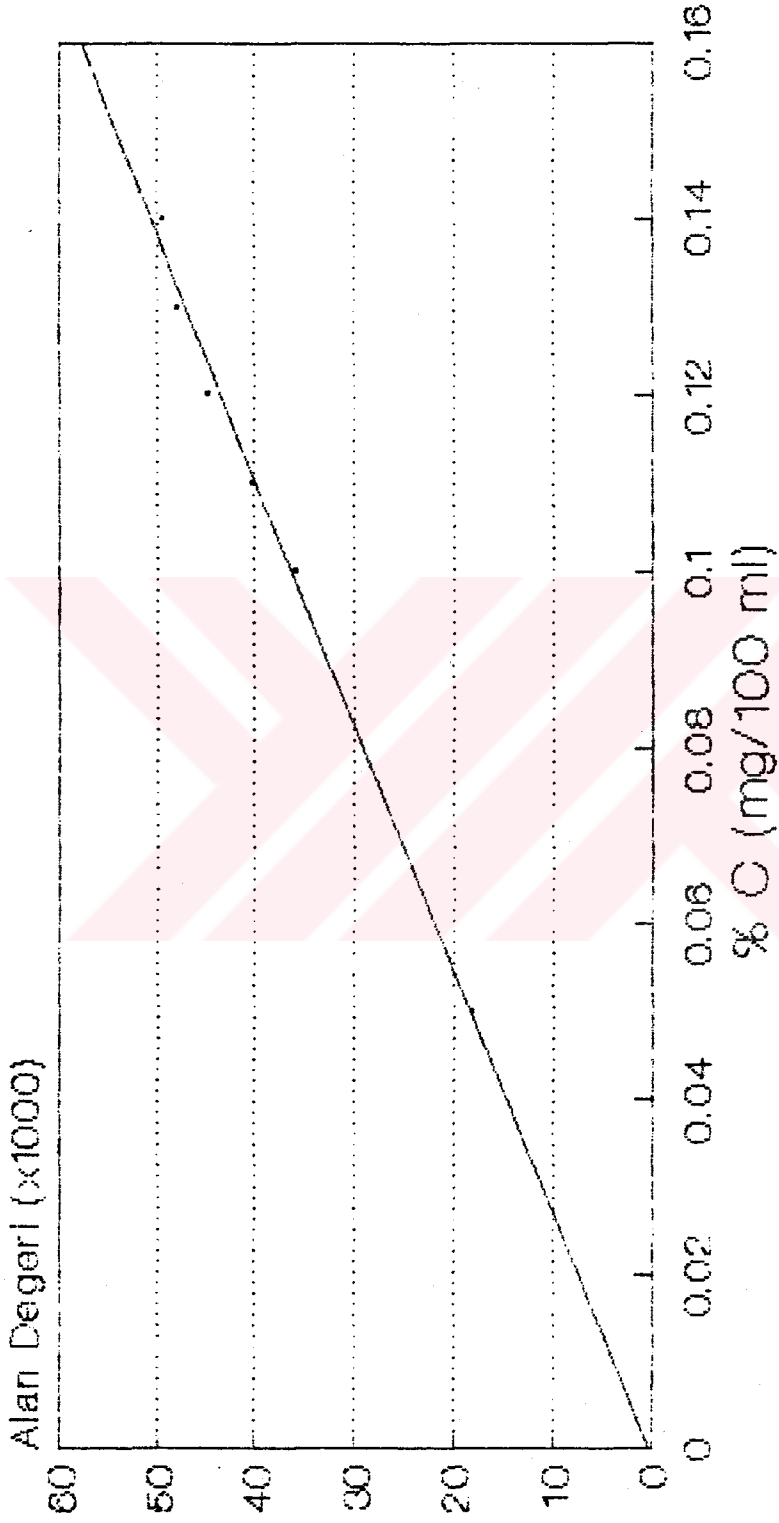
Glutamin lekelerini belirlemek için plak renklendirme çözeltilisine 30 saniye daldırılıp çıkarıldıktan sonra 105°C'de 20 dakika etüvde tutulur.

Koyu pembe bir renk olan glutamin lekelerinin yine önce TLC-SCN'de maksimum absorbands gösterdiği 413 nm dalga boyunda alınan değerleri ölçülür. Glutaminin tatbik edilmiş yüzde konsantrasyonları X eksenine alan değerleri Y eksenine konarak glutamin için TLC-SCN'e ait standart grafik çizilir (Grafik III).

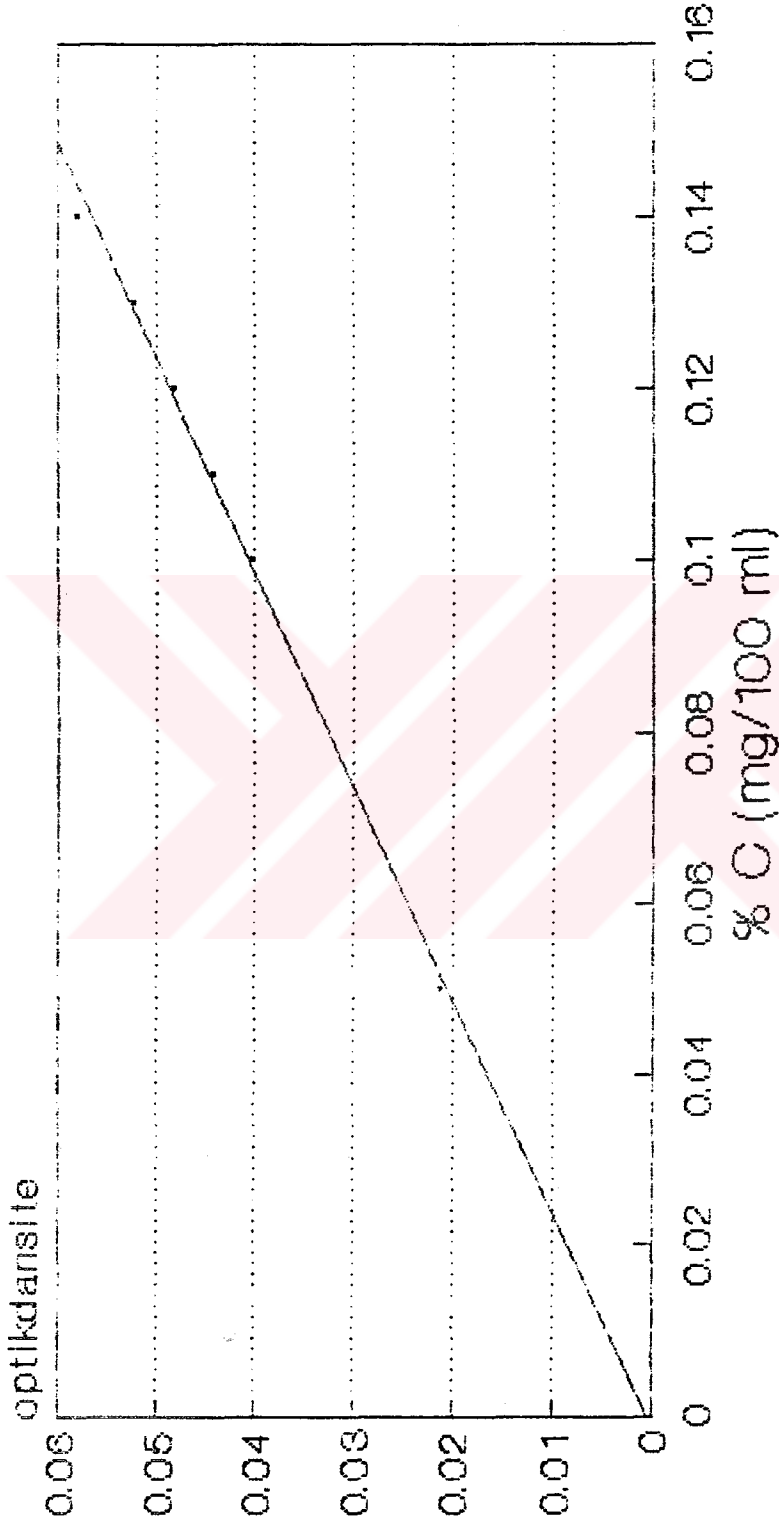
TLC-SPK yöntem ise asparajinde anlatılmış olduğu gibidir. Ancak TLC-SPK'da glutamin için maksimum dalga boyu 500 nm'dir. Burada glutaminin yüzde konsantrasyonlarına karşılık okunan optik dansiteleri arasında da glutamin için TLC-SPK yönteme ait standart grafik çizilir (Grafik IV).

III-6. EKSTRAKSİYON

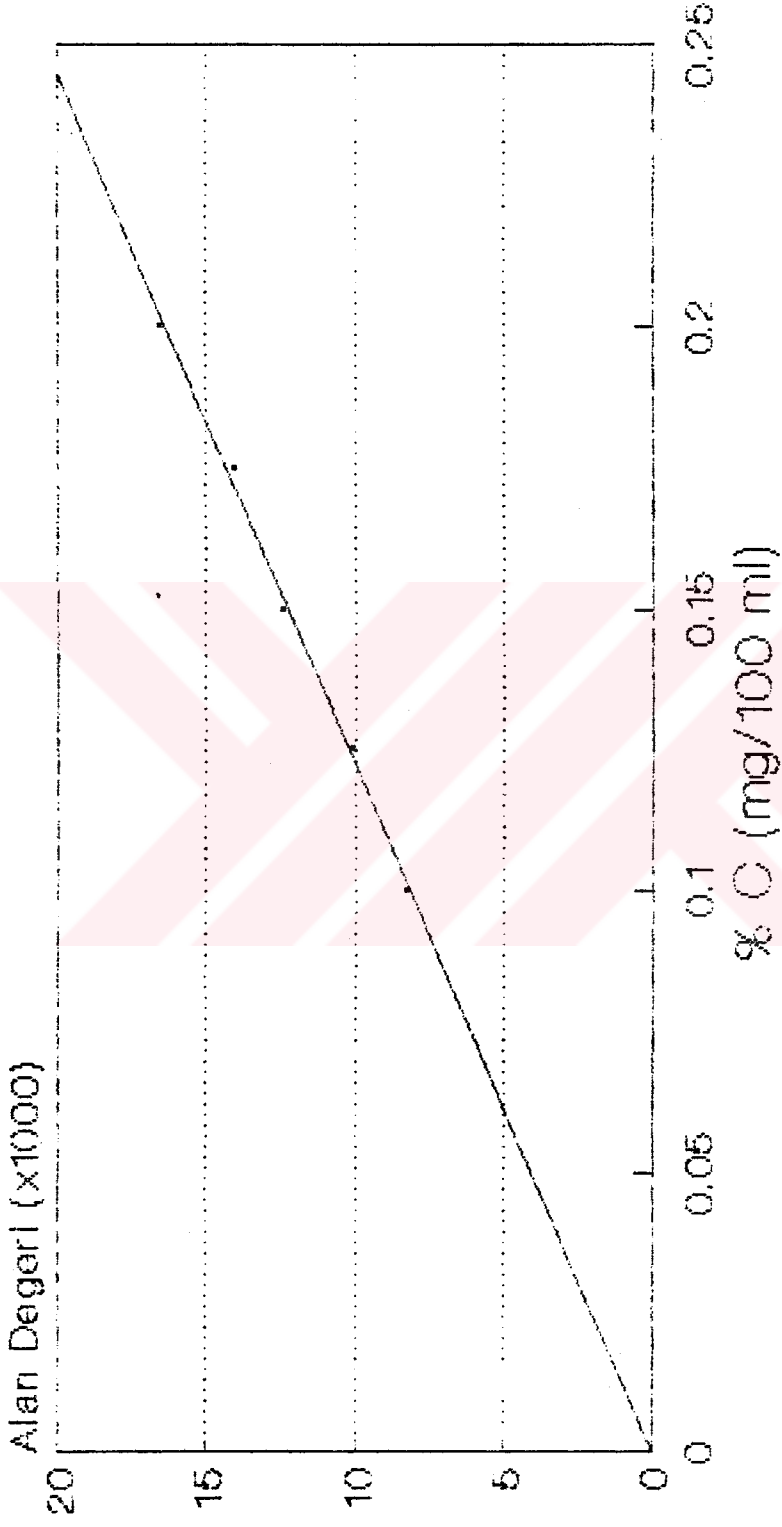
Santrifüj tüpüne alınmış 1.5 ml plazma üzerine %1 hidroklorik asit içeren asetonun 12 ml'si ilave edilir ve tüpün ağzı parafinlenerek 2 saat oda ısısında bırakılır. Bu sürenin sonunda plazma-aseton süspansiyonu 3000rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant süzülerek bir porselen kapsüle alınır. Santrifüj tüpünde kalan çökelek içine tekrar %1 hidroklorik asit içeren asetonun 2 ml konarak santrifüj edilir ve süpernatant süzülerek aynı porselen kapsüle konur. Bu santrifüj işlemi iki veya üç kez tekrarlanır. Biriktirilen süpernatant 37°C'de kuru hava akımında uçurulur. Kapsül içinde kalan artık 0.5 ml suda çözündürülür ve ayırma hunisinde eşit miktar eter ile iki veya üç kez ekstrakte



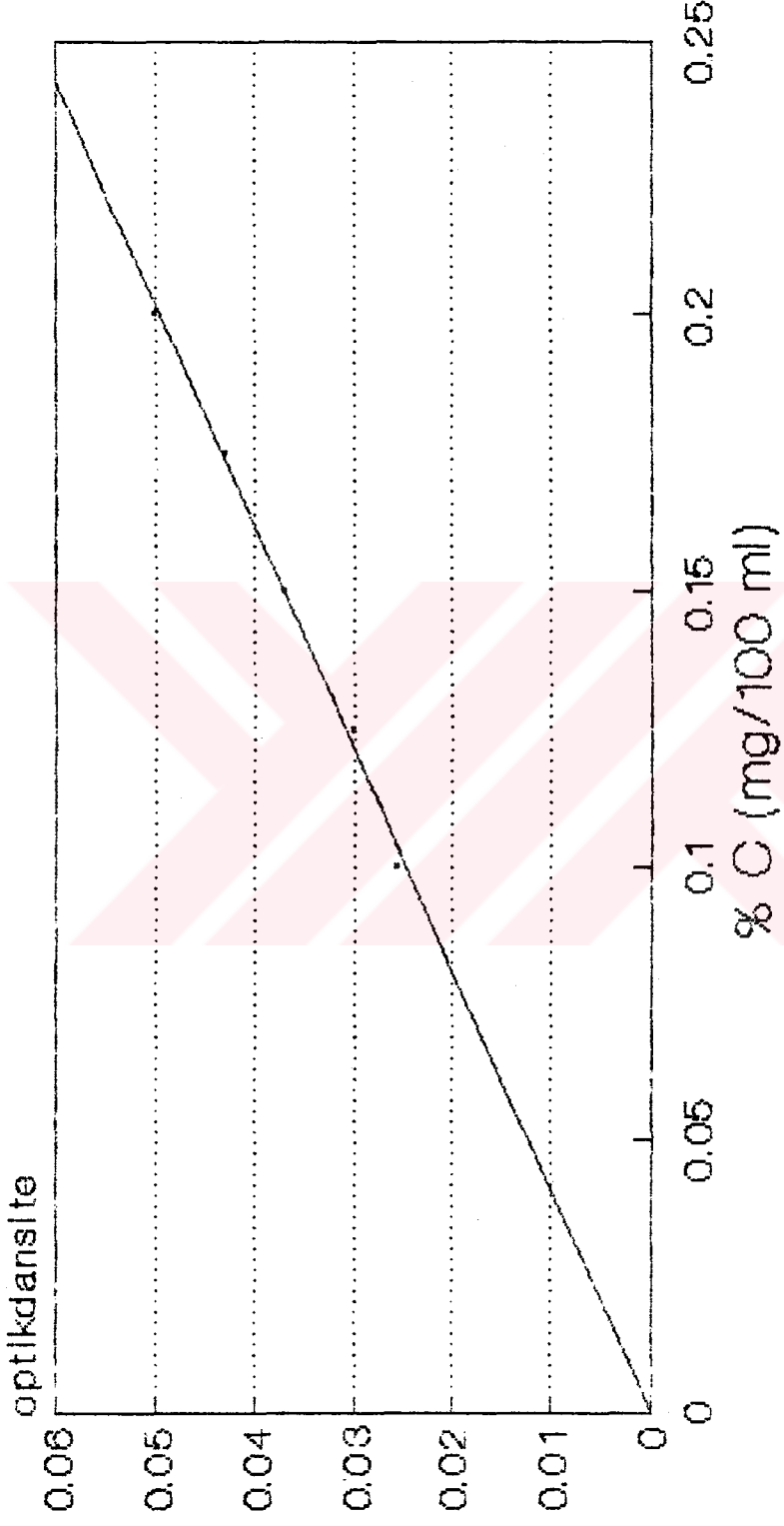
**Grafik I-Asparajin TLC scanner aletinde
çalışmalar sonucu çizilen stand. grafik**



Grafik II-Asparajin Spektrofotometrik yöntemle çizilen standart grafik



Grafik III=Glutaminin TLC scanner aletin de çalışmalar sonucu çizilen stand. gra.



Grafik IV:Glutaminin Spektrofotometrik yöntemle çizilen standart grafik

edilir. Altta kalan sulu kısım temiz bir kapsüle alınır ve 37°C' de kuru hava akımlı etüvde kapsüldeki su uçana kadar bırakılır, kapsül içindeki artık 150 mikrolitre suda çözündürülerek TLC plağına tatbik edilecek duruma getirilmiş olur (43).

III-7. TLC UYGULAMASI

III-7.1. Asparajın İçin TLC'nin Uygulanması

15 g selüloz MN300 tartılır, kapaklı 150 ml'lik balona konur. Üzerine 90 ml distile su ilave edilir ve kuvvetlice çalkalayarak süspansiyon haline getirilir. Önceden yıkanıp kurutulmuş 20x20 cm'lik 5 cam kromatografi plağı önce alkol sonra eter ile silinip kurulur. Plaklar üzerine selüloz MN300 süspansiyonu plak çekme aleti ile 0.25 mm kalınlığında yayılır. Plaklar oda ısısında bir gece kurumaya bırakılır. Sonra selüloz plakları 100°C'de 10 dakika etüvde tutulmak suretiyle aktive edilir ve kullanılıncaya dek desikatörde saklanır.

Selüloz MN300 TLC plağı asparajın için standart grafik çizme çalışmalarında anlatılmış olduğu şekilde tatbik noktaları ve front çizgisi belirlenir. 100 mikrolitre plazma ekstraktı mikroenjektör ile alınır. Kromatografi plağına ufak hacimlerde verilip, kurutmak suretiyle 100 mikrolitrelik plazma ekstraktının tümü tatbik edilir. Asparajının standart çözeltisinde bir sonraki tatbik noktasına uygulanır. Bu kromatografi plağına bir plazma ekstraktı bir standart çözelti tatbik etmek suretiyle üç veya dört plazma örneği uygulanabilir.

Plak, metanol-piridin-su (80:4:20) (v/v) solvent sistemiyle doyurulmuş tank içinde devolope edilir. Devolope işleminin sonunda plak tanktan çıkarılarak 10 dakika 70°C'de kurutulur. Amino asid lekelerini ortaya çıkarmak için renklendirme çözelti-

sine daldırılır ve 70°C'de 30 dakika tutulur.

Belirli bir maddenin belirli bir solvent sisteminde ve belirli bir adsorbanda diğer tüm koşullar standardize edildiğinde tek bir R_f değerine sahip olacaktır. Bu ilkedен hareketle asparajin standardı ile plazmada bulunan asparajin TLC plağında aynı hizada çıkacaktır. Böylece plazma asparajinine ait leke belirlenir.

Bundan sonraki işlemler asparajinin standart grafiklerini çizme çalışmasında anlatıldığı gibi TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemlerinin uygulanmasına geçilir. Önce TLC-SCN'de plazmadaki asparajine ait lekenin maksimum absorbanans gösterdiği 406 nm dalga boyunda alan değeri ölçülür. Ölçülen bu alan değeri asparajin %C (mg/100 ml)- TLC-SCN standart grafiği vasıtasıyla asparajinin plazmadaki konsantrasyonu % mg olarak hesaplanır. TLC-SPK yöntem için aynı plazmanın asparajinine ait lekenin kadmiyum asetat ile oluşturduğu kırmızı - pembe renkli kompleks yapısının 494 nm'de köre karşı optik dansitesi okunur. Bu optik dansite asparajin % C (mg/100 ml) - TLC-SPK yöntem standart grafiği aracılığı ile asparajinin plazmadaki konsantrasyonu % mg olarak hesaplanır.

III-7.2. Glutamin İçin TLC'nin Uygulanması

35 g silikajel 60G tartılır, kapaklı 150 ml'lik balona konur. Üzerine 70 ml distile su ilave edilir ve kuvvetlice çalkalayarak süspansiyon haline getirilir. Önceden anlatılmış olduğu gibi temizlenmiş beş cam kromatografi plağına silikajel 60G süspansiyonu plak yayma aleti ile 0.25 mm kalınlığında yayılır. Plaklar oda ısısında bir gece kurumaya bırakılır ve 110°C'de 30 dakika etüvde tutularak aktive edilir ve kullanılıncaya dek desikatörde saklanır.

Plazma ekstraktının plağa tabiki ve tatbik noktalarının belirlenmesi asparajinin separasyonu için yapılan işlemlere benzer. Ancak burada tatbik edilen ekstrakt hacmi daha az olup 20 mikrolitredir. Silikajel 60G plağına bir plazma bir standart tatbiki ile üç veya dört plazma örneği tatbik edilebilir.

Plak isopropanol-%10 amonyak (70:30) (v/v) içeren solvent sistemiyle doyurulmuş tank içinde devolope edilir. Devolopeden sonra 105°C'de asgari 2 saat plak kurutulur ve plak oda ısısına kadar soğutulur. Daha sonra renklendirme çözeltisine daldırılıp 105°C'de 20 dakika etüvde bırakılır. Plazmada bu solvent sistemine duyarlı çeşitli amino asidlere ait lekeler çıkacaktır. Standart glutamin lekesine göre, plazma glutaminine ait leke belirlenir.

Önce 413 nm dalga boyunda TLC-SCN'de plazma glutaminine ait alan değeri ölçülür. Glutamin % C (mg/100 ml) - TLC-SCN standart grafiği yardımıyla ölçülen alan değerine karşılık gelen plazma glutamin miktarı % mg olarak hesaplanır. Daha sonra TLC-SPK yöntem yapılır. Tüm işlemler asparajin standart grafiklerini çizme çalışmasında anlatılmış olduğu gibidir. 500 nm'de aynı plazmadaki glutamine ait lekenin kadmiyum asetat ile oluşturduğu pembe renkli kompleks yapının köre karşı optik dansitesi okunur. Bu optik dansite glutamin % C (mg/100 ml) - TLC-SPK standart grafiğinde yerine konarak karşılık gelen plazma glutamin miktarı % mg olarak hesaplanır.

III-8. ELDE EDİLEN SAYISAL VERİLERİN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMELERİ

Sayısal verilerin istatistik yönden değerlendirilmesinde ortalama değerler (\bar{X}), standart sapmalar (S), standart hatalar

($S\bar{x}$), varyasyon katsayıları (V) saptandı. Student's t testinin gruplama modeli uygulandı. Ortalama değerler aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Dağılımdaki herbir değer in ortalamaya göre ne uzaklıkta olduğunu, diğer bir deyimle, dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu göstermek için standart sapmalar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

Standart sapmanın ortalamaya göre yüzde ifadesi olan ve değerlerin: ortalamaya göre yüzde kaçlık bir değişim gösterdiğini belirten varyasyon katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$V = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Ortalamanın standart hatası, aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

İki gruba ait sayısal verilerin ortalamalarının mukayesesinde Student's t testinin gruplama modeli kullanıldı. Anlamlılık testlerinden biri olan t testinde aşağıdaki formül uygulandı:

$$t_{\text{örnek}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_k^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

(S_k^2 ortak varyans)

$$S_k^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) \cdot S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

İki değişkenin birbirlerine bağımlı olup olmadıkları korelasyon katsayısı ölçüm değeri ile saptanabilir, yani iki değişkenin ilişkili olup olmadığını ölçen bir katsayıdır. Korelasyon katsayısı " r " ile gösterilir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır :

$$r = \frac{\sum x.y - \frac{\sum x. \sum y}{n}}{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \cdot \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}$$

İki değişken arasında anlamlı bir ilişki var ise değişkenlerden biri kendi ölçüm değerleri cinsinden bir birim artıp azaldığında diğer değişken kendi ölçüm değerine göre ne kadar artacağını veya azalacağını belirten regresyon katsayısı ve doğru su aşağıdaki formüle göre hesaplanır :

$$b_1 = \frac{\sum x.y - \frac{\sum x. \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

$$Y = b_0 + b_1 X$$

regresyon doğru denk.

B Ö L Ü M IV

B U L G U L A R

Tablo 3'de asparajin, Tablo 4'de glutaminin normal grup kan plazmasındaki TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemlerince bulunan değerler verilmiştir. Bu tablolarda asparajin için TLC-SCN'ye göre değerler %1.05-1.375 mg arasında değişmekteyken TLC-SPK'ya göre %1.04-1.365 mg arasında değişmektedir. Glutaminin TLC-SCN'ye göre değerleri %5.3125 - 9.75 mg arasında değişirken TLC-SPK'ya göre %5.6875 -9.1875 mg arasında değişmektedir. Tablo 5 ve Tablo 6'da gut grubunun asparajin ve glutamin değerleri verilmiştir. Ayrıca bu iki tabloda hastalara ait serum ürik asit miktarları Bio-Med tıbbi tahlil laboratuvarlarından ürikaz yöntemine göre ölçülmüştür. Gutlu olgularda serum ürik asidine ait değerler %9.6-12.1 mg arasındadır. Gut grubu asparajin değerleri TLC-SCN'ye göre %1.14-1.36 mg arasında iken TLC-SPK'ya göre %1.1-1.325 değerleri arasındadır. Gut grubu glutamin değerleri TLC-SCN'ye göre %5.5-8.4375 mg , TLC-SPK'ya göre %5.500-8.375 mg arasında değişmektedir.

Tablo 7'de normal ve gut olgularında glutamin/asparajin oranı verilmektedir. TLC-SCN yöntemine göre normalde 6.233 olan oran gut olgularında 5.600, TLC-SPK yöntemine göre normalde 6.288 olan oran gut olgularında 5.518 olmaktadır.

Tablo 3. Normal grup plazma asparajin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemdeki sonuçları

| Sıra No. | Cins. | Yaş | Asn TLC Alan Değeri | Asn TLC % miligram | Asn SPK Optik Dansite | Asn SPK % miligram |
|----------|-------|-----|---------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | K | 32 | 43767 | 1.215 | 0.0480 | 1.20 |
| 2 | E | 40 | 40692 | 1.130 | 0.0440 | 1.10 |
| 3 | E | 27 | 43700 | 1.195 | 0.0440 | 1.15 |
| 4 | K | 18 | 47700 | 1.325 | 0.0500 | 1.25 |
| 5 | K | 19 | 44562 | 1.245 | 0.0480 | 1.20 |
| 6 | K | 70 | 40819 | 1.130 | 0.0440 | 1.10 |
| 7 | E | 34 | 44869 | 1.250 | 0.0480 | 1.20 |
| 8 | K | 20 | 48878 | 1.325 | 0.0500 | 1.25 |
| 9 | E | 60 | 38376 | 1.065 | 0.0420 | 1.05 |
| 10 | K | 29 | 45649 | 1.260 | 0.0500 | 1.25 |
| 11 | E | 35 | 44666 | 1.240 | 0.0480 | 1.20 |
| 12 | K | 40 | 43875 | 1.222 | 0.0485 | 1.20 |
| 13 | E | 43 | 45627 | 1.260 | 0.0500 | 1.25 |
| 14 | K | 27 | 47356 | 1.320 | 0.0515 | 1.29 |
| 15 | E | 57 | 37941 | 1.050 | 0.0415 | 1.04 |
| 16 | K | 27 | 47700 | 1.325 | 0.0520 | 1.30 |
| 17 | E | 34 | 44600 | 1.240 | 0.0480 | 1.20 |
| 18 | E | 40 | 45479 | 1.220 | 0.0480 | 1.21 |
| 19 | K | 59 | 40769 | 1.125 | 0.0440 | 1.10 |
| 20 | E | 45 | 46621 | 1.295 | 0.0500 | 1.25 |
| 21 | K | 34 | 45538 | 1.265 | 0.0500 | 1.24 |
| 22 | E | 17 | 46778 | 1.300 | 0.0515 | 1.29 |
| 23 | K | 00 | 38800 | 1.055 | 0.0420 | 1.05 |
| 24 | E | 43 | 45276 | 1.260 | 0.0500 | 1.25 |
| 25 | K | 51 | 45500 | 1.265 | 0.0490 | 1.20 |
| 26 | E | 21 | 49236 | 1.375 | 0.0520 | 1.30 |
| 27 | K | 22 | 47732 | 1.325 | 0.0520 | 1.30 |
| 28 | K | 26 | 45520 | 1.265 | 0.0500 | 1.24 |
| 29 | K | 30 | 45204 | 1.310 | 0.0500 | 1.25 |
| 30 | K | 57 | 38121 | 1.055 | 0.0420 | 1.05 |
| 31 | E | 65 | 38890 | 1.075 | 0.0425 | 1.065 |
| 32 | E | 18 | 49300 | 1.375 | 0.0570 | 1.365 |
| 33 | K | 32 | 45750 | 1.260 | 0.0500 | 1.250 |
| 34 | K | 27 | 47802 | 1.325 | 0.0520 | 1.30 |
| 35 | K | 25 | 48540 | 1.355 | 0.0520 | 1.30 |

$$\bar{X}=1.237\pm 0.0161(n=35)$$

$$S=0.0955$$

$$\bar{X}=1.206\pm 0.0147(n=35)$$

$$S=0.0873$$

Tablo 4. Normal grup plazma glutamin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemdeki sonuçları ve bu sonuçlar.ın istatistik değerlendirilmesi.

| rn. no | cins. | Yaş | Gln TLC Alan Değeri | Gln TLC % miligram | Gln SPK Ootik Dansite | Gln SPK % miligram |
|---------|-------|-----|---------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | K | 32 | 12457 | 7.6875 | 0.0385 | 7.6875 |
| 2 | E | 40 | 11154 | 6.9375 | 0.0340 | 6.8750 |
| 3 | E | 27 | 12850 | 7.8125 | 0.0380 | 7.6250 |
| 4 | K | 18 | 13615 | 8.4375 | 0.0410 | 8.3750 |
| 5 | K | 19 | 13003 | 7.9375 | 0.0390 | 7.7250 |
| 6 | K | 70 | 10946 | 6.8125 | 0.0340 | 6.8750 |
| 7 | E | 34 | 13000 | 7.9375 | 0.0390 | 7.7250 |
| 8 | K | 20 | 15722 | 9.7500 | 0.0450 | 9.1875 |
| 9 | E | 60 | 9999 | 6.2500 | 0.0300 | 6.1250 |
| 10 | K | 29 | 12167 | 7.5625 | 0.0360 | 7.3125 |
| 11 | E | 35 | 12999 | 7.9375 | 0.0390 | 7.7250 |
| 12 | K | 40 | 12409 | 7.5000 | 0.0370 | 7.5625 |
| 13 | E | 43 | 12900 | 7.9375 | 0.0390 | 7.3125 |
| 14 | K | 27 | 13471 | 8.4375 | 0.0410 | 8.3750 |
| 15 | E | 57 | 10750 | 6.6875 | 0.0320 | 6.5625 |
| 16 | K | 27 | 13615 | 8.4375 | 0.0410 | 8.3750 |
| 17 | E | 34 | 12477 | 7.5625 | 0.0370 | 7.5625 |
| 18 | E | 40 | 12127 | 7.5625 | 0.0360 | 7.3125 |
| 19 | K | 59 | 9911 | 6.1875 | 0.0300 | 6.1250 |
| 20 | E | 45 | 13109 | 8.1250 | 0.0400 | 8.1250 |
| 21 | K | 34 | 12250 | 7.5000 | 0.0370 | 7.6250 |
| 22 | E | 17 | 13667 | 8.2500 | 0.0400 | 8.1250 |
| 23 | K | 80 | 8530 | 5.3125 | 0.0280 | 5.6875 |
| 24 | E | 43 | 12677 | 7.6250 | 0.0380 | 7.6250 |
| 25 | K | 51 | 12956 | 7.8125 | 0.0380 | 7.6250 |
| 26 | E | 21 | 15515 | 9.6250 | 0.0450 | 9.1875 |
| 27 | K | 22 | 13150 | 8.0625 | 0.0400 | 8.1250 |
| 28 | K | 26 | 13067 | 8.0000 | 0.0385 | 7.8750 |
| 29 | K | 30 | 12585 | 7.8750 | 0.0370 | 7.5625 |
| 30 | K | 57 | 9096 | 5.6250 | 0.0270 | 5.5000 |
| 31 | E | 65 | 10126 | 6.3125 | 0.0320 | 6.5625 |
| 32 | E | 18 | 15158 | 9.3750 | 0.0450 | 9.1250 |
| 33 | K | 32 | 12580 | 7.8750 | 0.0380 | 7.7500 |
| 34 | K | 27 | 13917 | 8.6250 | 0.0410 | 8.3750 |
| 35 | K | 25 | 13830 | 8.5625 | 0.040 | 8.1250 |

$$\bar{X}=7.711\pm 0.167(n=35)$$

$$S=0.990$$

$$V=$$

$$\bar{X}=7.5835\pm 0.150(n=35)$$

$$S=0.889$$

$$V=$$

Tablo-5. Gut grubu plazma asparajin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemdeki sonuçları

| Orn. No | Yaş | Hasta Adı | Cins | rik Asit | Asn TLC Alan Değe. | Asn TLC % miligram | Asn SPK Ootik Dans. | Asn SPK % miligram |
|---------|-----|-----------|------|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 55 | D.K | E | 10.4 | 43527 | 1.210 | 0.048 | 1.200 |
| 2 | 50 | B.E | E | 9.8 | 40805 | 1.135 | 0.045 | 1.125 |
| 3 | 50 | S.S | E | 11.8 | 48872 | 1.360 | 0.048 | 1.200 |
| 4 | 47 | C.N | E | 9.9 | 41510 | 1.150 | 0.044 | 1.100 |
| 5 | 54 | H.Y | E | 11.9 | 47762 | 1.325 | 0.0525 | 1.315 |
| 6 | 52 | S.O | E | 9.6 | 42240 | 1.170 | 0.045 | 1.125 |
| 7 | 50 | E.O | E | 11.6 | 47990 | 1.330 | 0.053 | 1.325 |
| 8 | 55 | H.A | E | 11.8 | 46672 | 1.300 | 0.052 | 1.300 |
| 9 | 49 | N.A | E | 10.9 | 43229 | 1.195 | 0.0475 | 1.190 |
| 10 | 47 | F.S | E | 9.7 | 43207 | 1.195 | 0.0475 | 1.190 |
| 11 | 50 | I.B | E | 10.4 | 44098 | 1.225 | 0.0485 | 1.222 |
| 12 | 52 | R.A | E | 12.1 | 46673 | 1.295 | 0.051 | 1.275 |
| 13 | 60 | A.D | E | 11.6 | 48894 | 1.360 | 0.052 | 1.300 |
| 14 | 57 | M.A | E | 11.8 | 41214 | 1.140 | 0.045 | 1.125 |
| 15 | 42 | E.Y | E | 12.00 | 48621 | 1.350 | 0.053 | 1.325 |

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| $\bar{X}=1.249\pm 0.0219(n=15)$ | $\bar{X}=1.220\pm 0.022(n=15)$ |
| S=0.0848 | S=0.0857 |
| V=6.784 | V=7.024 |

Tablo 6 .Gut grubu plazma glutamin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemdeki sonuçları ve bu sonuçların istatistiki değerlendirme sonuçları verilmiştir.

| Orn. No | Yaş | Hasta Adı | Cins | Urik Asit | Gln TLC Alan Değeri | Gln TLC % miligram | Gln SPK Optik Dans. | Gln SPK % miligram |
|---------|-----|-----------|------|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 55 | D.K | E | 10.4 | 10004 | 6.1562 | 0.030 | 6.125 |
| 2 | 50 | B.E | E | 9.8 | 9105 | 5.5000 | 0.027 | 5.500 |
| 3 | 50 | S.S | E | 11.8 | 12099 | 7.3750 | 0.036 | 7.3437 |
| 4 | 47 | C.N | E | 9.9 | 9658 | 5.9062 | 0.026 | 5.6875 |
| 5 | 54 | H.Y | E | 11.9 | 13322 | 8.1875 | 0.040 | 8.1250 |
| 6 | 52 | S.O | E | 9.6 | 9772 | 6.3025 | 0.027 | 5.500 |
| 7 | 50 | E.O | E | 11.6 | 12083 | 7.3750 | 0.036 | 7.3437 |
| 8 | 55 | H.A | E | 11.8 | 12246 | 7.5312 | 0.037 | 7.500 |
| 9 | 49 | N.A | E | 10.9 | 10579 | 6.5312 | 0.032 | 6.5625 |
| 10 | 47 | F.S | E | 9.7 | 9343 | 5.7500 | 0.028 | 5.6712 |
| 11 | 50 | I.B | E | 10.4 | 10161 | 6.2187 | 0.030 | 6.125 |
| 12 | 52 | R.A | E | 12.1 | 13750 | 8.4375 | 0.040 | 8.125 |
| 13 | 50 | A.D | E | 11.6 | 12402 | 7.6562 | 0.037 | 7.500 |
| 14 | 57 | M.A | E | 11.8 | 12472 | 7.7187 | 0.027 | 5.500 |
| 15 | 42 | E.K | E | 12.0 | 13584 | 8.2812 | 0.041 | 8.375 |

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| $\bar{X}=6.995\pm 0.252(n=15)$ | $\bar{X}=6.732\pm 0.276(n=15)$ |
| $S=0.980$ | $S=1.0719$ |
| $V=14.138$ | $V=15.922$ |

Tablo 7. Normal grup ve gut olgularında glutamin ve asparajinin ortalama değerlerinin oranları.

| G R U P | $\frac{\text{Gln TLC-SCN } \% \text{ mg.}}{\text{Asn TLC-SCN } \% \text{ mg.}}$ | $\frac{\text{Gln TLC-SPK } \% \text{ mg.}}{\text{Asn TLC-SPK } \% \text{ mg.}}$ |
|---------|---|---|
| | N O R M A L | $\frac{7.711}{1.237} = 6.233$ |
| G U T | $\frac{6.995}{1.249} = 5.600$ | $\frac{6.732}{1.220} = 5.518$ |

Tablo 8. Normal ve gut grubu karşılaştırmalarının önem kontrolü Student's t testine göre hesaplanan t değerleri.

| N O R M A L G R U P | G U T G R U B U | trnek | p |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------|----------|
| Gln TLC-SCN ort. değ. (7.711) | Gln TLC-SCN ort. değ. (6.995) | 1.8866 | p > 0.2 |
| Gln TLC-SPK ort. değ. (7.5835) | Gln TLC-SPK ort. değ. (6.732) | 2.229 | p > 0.2 |
| Asn TLC-SCN ort. değ. (1.237) | Asn TLC-SCN ort. değ. (1.249) | 0.0270 | p > 0.01 |
| Asn TLC-SPK ort. değ. (1.206) | Asn TLC-SPK ort. değ. (1.220) | 0.0412 | p > 0.01 |

Normal grup ile gut grubu arasında yapılan Student's t testinde glutamin TLC-SCN t_{örnek} değeri 1.8866 ve glutamin TLC-SPK için t_{örnek} değeri 2.229' olarak bulunmuştur. Bu iki t_{örnek} değeri 0.2 olasılık ve 48 serbestlik derecesindeki t_{tablo} değeri olan 2.598'den küçük olduğundan , normal ve gut grupları ortalama değerleri arasındaki fark iki yöntemle göre anlamsızdır (p > 0.2, Tablo 8).

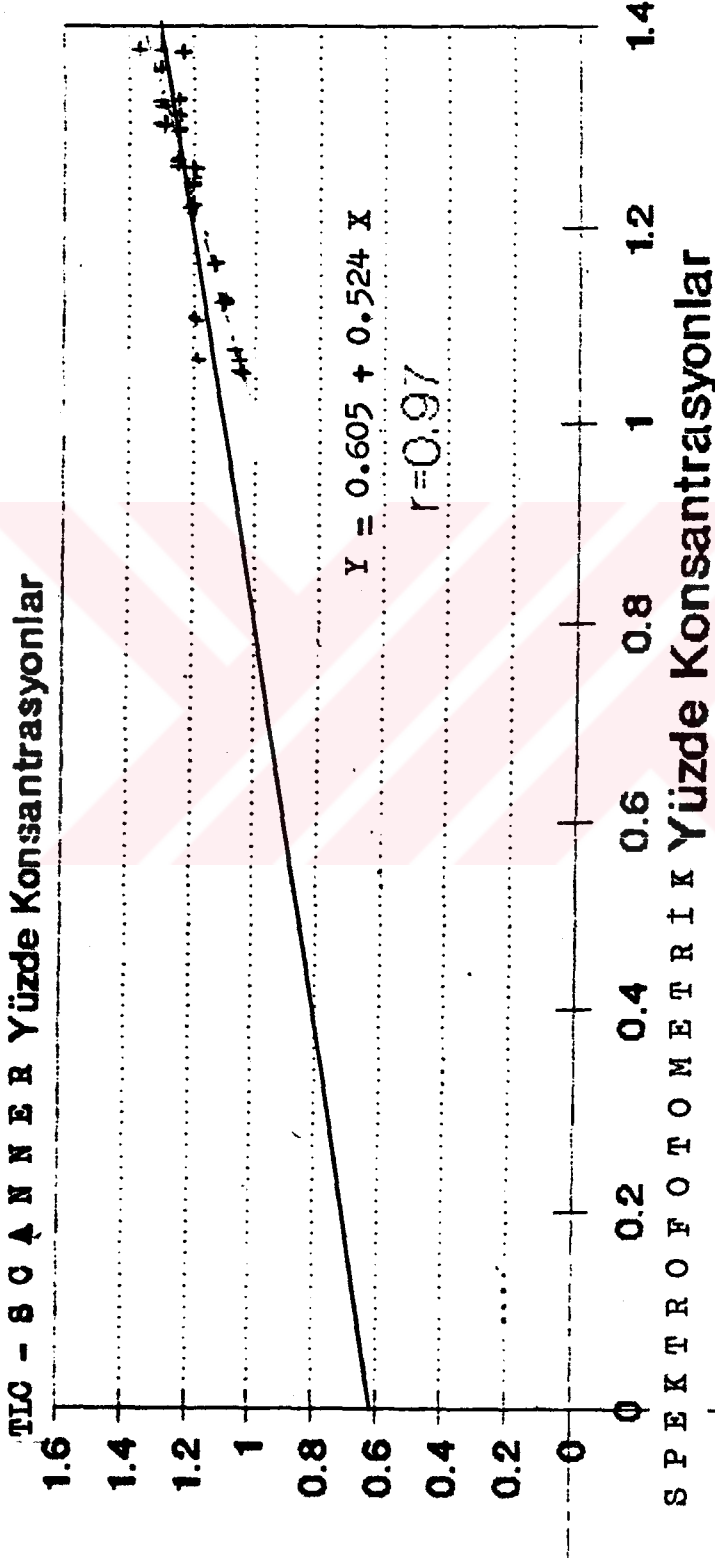
Normal grup ile gut grubu arasında yapılan Student's t testinde asparajin TLC-SCN için t_{örnek} değeri 0.0270 ve asparajin TLC-SPK için t_{örnek} değeri 0.0412 olarak bulunmuştur. Bu iki t_{örnek} değeri 0.01 olasılık ve 48 serbestlik derecesindeki t_{tablo} değeri olan 5.364'den küçük olduğundan normal ve gut grupları ortalama değerleri arasındaki fark iki yöntemle göre anlamsızdır (p > 0.01, Tablo 8).

Normal grupta asparajinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntem sonuçları arasındaki ilişki anlamlıdır (p < 0.01). Bu ilişkinin korelasyon katsayısı ve regresyon doğru grafiği Grafik V'de verilmiştir. Normal grupta glutaminin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntem sonuçları arasındaki ilişki anlamlıdır (p < 0.01). Bu ilişkinin korelasyon katsayısı ve regresyon doğru grafiği Grafik VI'da verilmiştir.

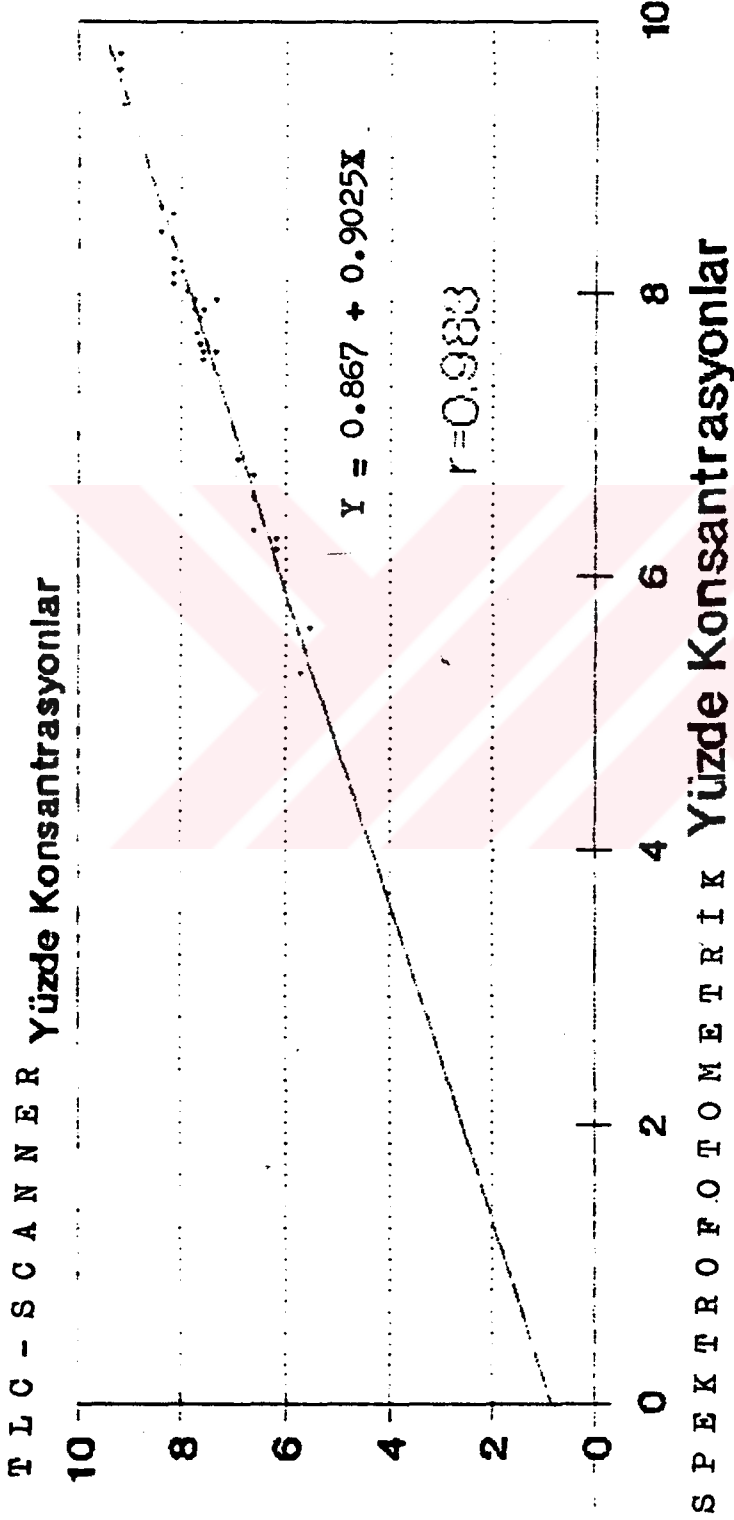
Selüloz MN300 TLC plağı kullanılarak oluşturulan plazma asparajin kromatogramı Resim 1'de verilmiştir.

Silikajel 60G TLC plağı kullanılarak oluşturulan plazma glutamin kromatogramı Resim 2'de verilmiştir.

Gut hastalarındaki glutamin miktarını gösteren , silikajel 60G plağında oluşturulan kromatogram Resim 3'de verilmiştir.



Grafik V: Asparajinin spektrofotometrik yöntemi ile TLC scannerdaki yüzde konsantrasyonların karşılaştırılması



Grafik VI:Glutaminin spektrofotometrik yöntem ile TLC scannerdaki yüzde konsantrasyonların karşılaştırılması



I

II

Resim 1. Normal grupta plazma-asparajin kromatogramı

Adsorban : Selüloz MN300

Belirteç : Ninhidrin - Aseton (% 0.5'lik)

Solvent Sistemi : Metanol - Piridin - Su
(80:4:20) (v/v)

I : Asparajin Standardı II : Örnek



I

II

Resim 2. Normal grupta plazma-glutamin kromatogramı

Adsorban : Silikajel 60G

Belirteç : Ninhidrin - Aseton (% 0.5'lik)

Solvent Sistemi : Isopropanol - % 10 Amonyak

(70:30) (v/v)

I : Glutamin Standardı

II : Örnek



Resim 3. Gut grubunda plazma-glutamin kromatogramı

Adsorban : Silikajel 60G

Belirteç : Ninhidrin - Aseton (% 0.5'lik)

Solvent Sistemi : İsoopropanol - %10 Amonyak

(70:30) (v/v)

I : Glutamin Standardı

II : Örnek

B Ö L Ü M V

T A R T I Ş M A ve S O N U Ç

Normal grup , Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğrenci ve çalışanlarından sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan kişilerden oluşturulmuştur. Gut grubu doktor kontrolü altında Bio-Med tıbbi tahlil laboratuvarında ürik asit ölçümleri sonucu kesin gut tanısı konmuş, önemli herhangi bir hastalığı bulunmayan (polistemia, nefrit, lösemi) ve henüz hiçbir ilaç kullanmayan hastalardan oluşturulmuştur. Çalışma materyali olan periferik kan bu iki gruptan sağlanmıştır.

Asparajin ve glutaminin miktar tayini çalışmalarında materyalin sağlandığı aynı günde, örnekler bekletilmeden başlanmıştır. Arta kalan plazma var ise -16°C 'de derin soğutucuda , gerekirse bir sonraki analize dek saklanmıştır. -20°C 'de kan plazmasının birkaç ay beklemesiyle asparajin ve glutamin kaybı minimumdur (35).

Asparajin ve özellikle glutamin kan plazmasında önemli miktarlarda bulunması, bazı patolojik durumlarda plazma düzeylerindeki değişimlerinden dolayı , pekçok çalışmada olduğu gibi bu ça-

lışmada da materyal olarak kan plazmasının seçilmesine neden olmuştur.

Kan plazmasının dilüsyonunu önlemek amacıyla katı sodyum sitrat kullanılmıştır ve herbir ml kan için 4 mg katı sodyum sitrat tüpe konmuştur.

Ekstraksiyon işleminde 44 nolu kaynak esas alınmıştır. Bu ekstraksiyon yolunda belirtilen plazma suyunun uçurulması için vakumlu desikatörde kuruluğa kadar bekletme işlemi hem zaman açısından hemde gerekli ekipmanların sağlanamamasından dolayı yapılamamıştır. Bu işlemin yerine , proteinleri denatüre eden aynı zamanda polisakkaritleri ortamdaki uzaklaştıran %1 hidroklorik asit içeren aseton ile plazma inkübasyona bırakılmış, bir seri santrifügasyon takiben 37°C'de hava akımlı etüvde aseton ile birlikte plazmadan gelen suyun uçurulmasında sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada eter ile ekstraksiyon süretiylede lipitlerin yanısıra inorganik ve organik maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ngo (33) , plazmanın ekstraksiyonu için protein denatürasyonunda %1'lik pikrik asit , Sauba (43) trikloroasetik asit ve lipitleri ortamdaki uzaklaştırmak içinde suyla doyurulmuş eter veya kloroform gibi solvanlar ekstraksiyonda kullanmışlardır.

Amino asitler üzerinde TLC çalışmalarının oldukça yoğun olduğu 1960'lı yıllarda aspartik asit ve glutamik asit üzerinde birçok TLC çalışmaları olmasına rağmen bunların amit türevleri olan asparajin ve glutamin üzerinde pek durulmamıştır. Bu yıllarda henüz pekçok kaynak tarafından asparajin ve glutamin birer aminoasit olarak görülmemektedir. Daha sonraları bu iki amino asidin değişik vücut doku ve sıvılardan TLC ile separasyonu için

bazı solvan sistemleri verilmesine rağmen her ikisi için geçerli TLC ile kombine çalışabilecek spektrofotometrik bir yöntem bulunamamıştır. Daha sonraki yıllardan günümüze dek biyokimyasal analiz tekniklerinin gelişmesiyle bu iki amino asidin miktar tayinleri için TLC'den çok gaz (8), HPLC (28), kolon (4) ve katyon değiştirici kromatografi (19) türleri ile kombine çalışan amino asid analizörleri, enzimatik metodların uygulanmasıyla spektrofotometrik (10) ve fluorometrik (31) yöntemleri ve kütle spektrometrisi (24), radyoaktif metodlar (1), spesifik filtrasyon metodu (54) ile iyon seçicili elektrodlar (33) gibi yüksek teknoloji gerektiren yöntemler uygulanmaya başlanmıştır. Biz bu çalışmada Esser (15) ile Voight'ın (47) çalışmalarını esas aldık. Bu iki çalışma glutamin ve bazı amino asidlerin TLC ile kombine spektrofotometrik bir yöntemle miktar tayinlerine olanak sağlamaktadır. Asparajin için de aynı metod uygulanmıştır. Ancak asparajin için seçilen solvan sistemi Wollenweber'in (55) çalışmasından alınmıştır.

Wollenweber (55) selüloz MN300 kromatografi plağı üzerinde plazma-asparajin seperasyonu için dokuz solvan sistemi önermiştir. Bu kaynaktan seçilen metanol - piridin- su (80:4:20) (v/v) solvan sistemi diğer solvan sistemlerine kıyasla çabuk ve oldukça iyi bir ayırma yapmıştır.

Voight (47) silikajel 60F kromatografi plağı üzerinde glutamin seperasyonu için bes solvan sistemi önermiştir. Bizim kullandığımız isopropanol- % 10 amonyak (70:30) (v/v) solvan sisteminde glutaminin ayırımı iyidir. R_f değeri bu solvan siste-

minde oldukça yüksek olup, diğer amino asitlerden iyi bir ayırım gösterir.

Amino asitlerin kimyasal yapıları ile kromatografik davranışları arasında bir korelasyon vardır. Örneğin amino asitlerin kimyasal yapılarındaki alifatik zincirin uzatılması veya moleküle aromatik bir halkanın girişi ile yapıdaki -OH gruplarının sayısının azalmasına neden olacağından çözünürlüğün azalıp, R_f değerinin büyümesi ile sonuçlanır (6). Asparajin ve glutaminin kimyasal yapıları gözönüne alınırsa glutaminin yapısında bir metil grubu daha fazladır. ve glutaminin R_f değeri asparajinin R_f değerinden bu yüzden büyüktür (4 .nolu sayfada görüldüğü gibi).

Tüm amino asitler suda çözünme özelliğine sahiptirler, ancak bazı amino asitler diğerlerine nazaran daha az çözünür. Bir amino asidin hidrokarbon zinciri ne kadar kısa ise çözünürlükleri o kadar çok , dolayısıyla polariteleride o kadar büyüktür. Bu sebepten asparajin amino asidi glutamin amino asidine kıyasla daha polar , yani daha çok suda çözünme özelliğine sahipken, glutamin daha az polar olup daha az suda çözünme özelliğine sahiptir. Buna göre asparajinin separasyonunda kullanılan solvan sistemini oluşturan çözenlerin polariteleri de oldukça büyüktür. Yani kuvvetli polar özellik taşıyan asparajinin separasyonu için oldukça polar olan solvan sistemi kullanılmıştır. Asparajin separasyonunda kullanılan selüloz MN300 plağı hidrofilik özellikte olup β - 1,4 glikozidik bağlanmalar ile birçok sayıda sellobios yapısı içerir. Bu hidrofilik özellik çok sayıdaki -OH grubundan kaynaklanır. Bu yüzden selüloz tozu asparajin gibi polar maddelerin separasyonu için çok uygundur. Selüloz hem su hemde alkol gibi düşük moleküler ağılıktaki solvanlar ile sellobios ü-

niteleri içinde amino asitler ile H^+ bağları oluşturarak bu maddeleri polarite büyüklüklerine göre separe eder (44). Dolayısıyla asparajinin plazmadan separasyonu için selüloz MN300 plağı kullanılmıştır. Glutaminin separasyonu için kullanılan solvan sistemi asparajin için kullanılan solvan sisteminden daha az polardır. Silikajel de glutamin gibi çok fazla polar olmayan amino asitlerin separasyonu için iyi sonuçlar verir. Silikajel , monosilik asit moleküllerinin polimerizasyonu ile oluşmuştur ve fazla sayıda -OH grubu taşır. Bu yüzden çok fazla polar olmayan glutamin için silikajel 60G adsorban olarak seçilmiştir (44). Buna göre asparajin için adsorban olarak selüloz MN300 , solvan sistemi olarak metanol-piridin-su (80:4:20) (v/v) ve glutamin için adsorban olarak silikajel 60G , solvan sistemi olarak isopropanol- %10 amonyak (70:30) (v/v) kullanılmıştır.

Asparajin ve glutaminin polariteleri arasında çok önemli bir fark yoktur. Bu nedenle aynı adsorban içeren TLC plağında , aynı solvan sistemi içinde bu iki aminoasidin R_f değerleri birbirine çok yakın çıktığı için sağlıklı bir separasyon yapılamamıştır. Örneğin silikajel plaklarında butanol- asetik asit-su (4:1:5) (v/v) içeren solvan sisteminde asparajinin R_f değeri 14, glutaminin R_f değeri 15'dir(44).

Asparajin ve glutaminin çift dimensiyonlu kromatografi uygulamaları için çok standart koşullar (ısı,nem,basınç) gerektirdiğinden uygulanamamıştır (2,3,4,6,10,13,34,35,47,55).

Plazmada bulunan asparajin ve glutaminin separasyonunda bu amino asitlere ait lekeyi belirlemek amacıyla tatbik edilen standart plazmada bulunabilecek düzeyden ne daha fazla nede daha az olmalıdır. Böylece leke büyüklüklerinin karşılaştırılması i-

le o örnekte bulunabilecek madde konsantrasyonu hakkında fikir edinilebilir ve plazmada o amino aside ait lekenin belirlenmesi daha sağlıklı olur (14)

Amino asidlere ait lekeleri ortaya çıkarmak için 10 nolu kaynakta belirtilen yol izlenmiştir. Plaklara renklendirme reaktifine daldırılarak lekeler renklendirilmiştir. Püskürtme süreti ile hazırlanan her bir plaktaki aynı konsantrasyonlardaki amino asid lekelerinde homojen bir renklenme eldeedilememiştir. Bir plakta amino asid standart lekelerine ait TLC-SCN değerleri yüksek iken aynı miktarlarda amino asid standardı tatbik edilmiş bir başka plaktaki lekeler düşük okunabilmektedir. Ayrıca aynı plak üzerinde dahi bir lekenin homojen olarak renklenmemesinden dolayı TLC-SCN tek bir leke için iki veya daha fazla değer okunmaktadır. Bunu ortadan kaldırmak için plakları renklendirme çözeltilisine otuz saniye gibi kısa bir an daldırıp çıkarılmıştır. Renklendirme çözeltilisi 100 ml'lik hacimlerde hazırlanıp, kollidin konmadan buzdolabında 1 ay süreyle saklanabilmektedir (51).

Plaktan separe edilmiş amino asidlerin renklendirme çözeltilisine daldırma aşamasında , amino asidlerin çözünerek kaybı söz konusu değildir. Eğer amino asidler renklendirme çözeltilisine geçselerdi , etüvde kurutma sonunda hiçbir amino asid lekesinin oluşmaması gerekirdi. Ayrıca glutamin ve asparajinin asetonda çözünümüne uğramadığı belirtilmiştir (53).

Glutaminin separasyonu için kullanılan solvan sisteminde amonyak vardır. Amonyakın plaktan tamamen uçurulabilmesi için etüvde asgari 105 °C'de 2 saat kurutulması gerekir. Aksi takdirde plaktan tamamen uçurulmayan amonyak renklendirme aşamasında ninhidrin ile reaksiyona girerek tüm plak sarı renge boyanmaktadır

(47). Bu durum hem TLC-SCN hemde TLC-SPK yöntem ile miktar tayinini güçleştirmektedir.

Kollidin çözeltisi , suda çözünen kadmiyum komplekslerinin oluşumuna kadar lekelerin nemden korunması amacıyla kullanılmaktadır. Kollidin ince bir film şeridi halinde plağı sararak lekeyi laboratuvar ortamından gelen neme karşı korur (6,47,55).

Gerek standart grafik çizme çalışmalarında gerekse plazmada glutamin ve asparajine ait lekelerin TLC-SPK yönteme ait miktar tayini çalışmalarında lekeler bir spatül yardımıyla kazındı. Renkli kompleks oluşumu için kadmiyum asetat ile inkübasyona bırakıldı. Optik dansite ölçümü için oluşan renkli kompleks 10 ml ye dilüe edildi. Amino asid-ninhidrin- kadmiyum kompleksinin suda çözünme özelliğinden dolayı dilüsyon metanol ile yapılmıştır (17). Amino asidler kadmiyumdan başka mangan ve demir ilede kompleks yapabilirler (50) .

Hem asparajinin hem glutaminin artan konsantrasyonlarda TLC'ye uygulanan miktarlarının TLC-SCN ve TLC-SPK'ya göre ölçülen değerler arasında birer standart grafik çizimi yapılmıştır. TLC-SCN için alan değeri - %C (%mg), TLC-SPK için optik dansite - %C (%mg) arasında çizilen bu standart grafikler plazma örneklerinde bulunan glutamin ve asparajin miktarlarının belirlenmesinde kullanılmışlardır.

Bu araştırmada uygulamaya çalıştığımız TLC-SPK yöntem için gerekli tüm ekipman ve materyal hemen hemen tüm araştırma laboratuvarlarında bulunur ve diğer yöntemlere kıyasla çabuk ve ucuzdur. Standart grafiğin çizilmesinden sonra glutamin için tüm analiz zamanı 10, asparajin için 7 saattir. Bir plağa bir çok plazma tatbiki ve bir tanka iki plak konulması ile çok sayıda örnek ça-

lışılması mümkündür. Diğer çalışmalarda tek bir örneğin çalışılma süreleri incelendiğinde , katyondeğiştirici kromatografide (19) 21 saat, kağıt kromatografisinde (13) 18 saat süre gerekmektedir. Bu iki amino asidin plazma miktarı tayininde kütle spektrometrisinde (24) 19 ml , iyon değiştirici kromatografi için (34) 10 ml gibi büyük miktarlarda plazma gerektirirken, bizim çalışmamızda 1.5 ml plazma yeterli olmaktadır.

Asparajin ve glutaminin kandan tayininde TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemleri güvenilir yöntemlerdir. Çalışmamızda bu açıkça görülmektedir. Bu iki yöntemin esası , TLC-SCN'de renkli amino asid-ninhidrin kompleksinin , TLC-SPK'da amino asid - ninhidrin - kadmiumdan oluşmuş renkli kompleks yapısının maksimum absorban gösterdiği dalga boyundaki renk şiddetinin ölçüm esasına dayanmaktadır. TLC-SCN bu ölçüm alan değeri şeklinde ölçülürken TLC-SPK'da optik dansite şeklinde ölçülür(her iki yöntemde Lambert-Beer yasasına göre çalışmaktadır). Aynı kişinin kan plazması üzerinde yapılan glutamin TLC-SCN sonuçları ile TLC-SPK yöntem sonuçları ($p < 0.01$) ve asparajin TLC-SCN sonuçları ile TLC-SPK yöntem sonuçları ($p < 0.01$) istatistiksel olarak, bir şekilde yakın çıkmasının nedeni bu olabilir.

Normal grupta iki yönteme göre bulunan asparajin ve glutamin düzeylerinin kıyaslaması yapılmıştır. Plazma glutamin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemlerinin birbirlerine göre kıyaslaması ve plazma asparajin değerlerinin TLC-SCN ve TLC-SPK yöntemlerinin birbirlerine göre kıyaslaması için korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Her iki amino asid için korelasyon katsayısı ($r_{Gln} = 0.98$ ve $r_{Asn} = 0.97$) 1'e çok yakın olduğundan , iki yöntem sonuçları arasında kuvvetli bir ilişkinin varlığı a-

aktır ($p < 0.01$). İstatistiksel açıdan anlamlı olan bu ilişkinin yapısını açıklayan regresyon doğru denklemi ve grafikleri Grafik V ve VI'da verilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında normal bir insanın plazma glutamin düzeyi kolon kromatografisine göre % 6-10 mg , diğer bir kolon kromatografisi yöntemine göre de % 5.6-9.8 mg olarak verilmiştir (21,50). Asparajin için normal kan plazma düzeyi kolon kromatografisi yöntemine göre % 1-1.4 mg arasında verilmiştir (50). Bizim bulgularımıza göre TLC-SCN'deki plazma glutamin düzeyi %5.31-9.75 mg, plazma asparajin düzeyi %1.05-1.375 mg olarak bulunmuştur. Bu yöntem sonuçları her iki amino asid için literatürlere uygundur. TLC - SPK'da plazma glutamin düzeyi %5.6875-9.1875 mg, asparajin düzeyi %1.04 - 1.365 mg olarak bulunmuştur. Bu yöntemin sonuçları da her iki amino asid için literatürlere uygundur.

Tablo 5 ve tablo 6'da verilen gutlu hastalara ait serum ürik asit düzeyleri ürikaz yöntemine göre ölçülmüştür. Serum ürik asit düzeyi %9.7 ila %12.1 arasında değişen hiçbir önemli hastalığı bulunmayan primer gutlu hastalardır.

Primer gutlu hastalarda glutaminaz I ve glutamat dehidrojenaz eksikliği karaciğer ve böbrekte glutamin sentezinin artmasına neden olmaktadır. De novo pürin biyosentezinin reaksiyon oranının düzenlenmesinde belirleyici tek amino asid substratı olan glutamin kan dolaşımına verilmeksizin derhal pürin biyosentezine katılarak dolaylı yoldan ürik asit oluşumunu artırdığı bilinmektedir. Dokularda artmış olan glutaminin plazma düzeyine etkisi yoktur (21,56,57).

1950'lerde Örstrem tarafından gutlu kişilerde düşük plazma glutamin seviyelerinin bulunduğu Gutman (21) tarafından bildirilmiştir. 1955 'de Wyngarden ve Segal tarafından da

primer gutlu kişilerde plazma-glutamin düzeylerinin normal sınırlar içerisinde olduğu gösterilmiştir. Buna göre primer gutlular da plazma glutamin düzeyi % 8.4-8.6 mg , normal kişilerde % 8.9-9.5 mg olarak verilmiştir (56). 1969 yılında yapılan bir çalışmada, primer gutlu kişilerde plazma glutamin düzeyi ortalama %7.8 mg (%6.4-9.7mg) , normal grupta ise ortalama %8.2 mg (%6.3-10.4 mg) bulunmuştur (57). 1974 yılında Wyngarden tarafından enzimatik bir yöntemin kullanımıyla normal ve gutlu kişilerin plazma glutamin düzeyi 0.5-0.7 mM/L düzeylerinde bulunmuştur (56). 1973 yılında Gutman ve Fan Yu tarafından kolon kromatografisi yöntemi ile çalışılarak normal kişilerdeki plazma glutamin düzeyi 500 ± 78 mikromol/L (= %7.317 \pm 1.14 mg) gutlu kişilerde 480 ± 80 mikromol/L (= %7.02 \pm 1.17 mg) olarak verilmiştir (21). Bizim çalışmalarımıza göre TLC-SCN'de normal grup plazma -glutamin ortalaması %7.711 mg (% 5.3125 - 9.75 mg) , primer gutlu olgularda %6.995 mg (% 5.5-8.4375 mg) olarak bulunmuştur. TLC-SPK yöntemine göre normal grupta %7.5835 mg (% 5.6875 - 9.1875mg) , primer gutlu olgularda %6.732 mg (%4.99 - 8.125 mg) dir. Bulgularımız yukarıda saydığımız literatür değerleri ile uygunluk göstermektedir.

Fan Yu (57) yaptığı bir çalışmada normal ve gut olgularındaki plazma - glutamin düzeylerini bir enzimatik yöntem bir de amino asid analizör kullanarak ölçmüştür. Her iki yöntemde de normal kişilere kıyasla primer gutlu olguların glutamin düzeyinde % 10-15 bir azalma gözlenmiştir (57). Bizim çalıştığımız TLC-SCN'deki normal ve primer gut grubunun plazma -glutamin değerleri kıyaslandığında %11'lik, TLC-SPK'da ise %12.7'lik bir azalma olduğu bulunmuştur. Ancak bu azalmalar istatistikî açıdan anlam-

ı değildir ($p > 0.2$).

Tablo 7'de her iki yöntemle göre bulunmuş asparajin ve glutamin değerlerinin oranları gösterilmiştir. Kolon kromatografisi ile yapılan bir çalışmada normal grupta glutamin/ asparajin oranını 4-32.9 olarak bulunmuştur ve bazı patolojik olgularda bu oran değişmektedir (39). Buna göre çalışmamızda normal grupta TLC-SCN'ye göre glutamin/asparajin oranı 6.233 , TLC-SPK'da 6.288 dir. Gut grubunda TLC-SCN'ye göre glutamin/asparajin oranı .600 , TLC-SPK'ya göre de 5.518 olarak bulunmuştur. Bu oranlar literatürde verilen normal sınırlar içerisinde dir.

TLC-SCN'ye göre normal grupta ortalama %7.711 mg (%5.3125-9.75 mg), gut grubunda ortalama %6.995 mg (%5.5,9.1875 mg) plazma glutamin düzeyi bulunmuştur. Bu değer normal sınırlar içinde olup istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark yoktur. ($p > 0.2$), Tablo 8).

TLC-SPK'ya göre normal grupta ortalama %7.5835 mg (%5.6875-9.1875 mg) gut grubunda %6.732 mg (%4.990-8.125 mg) plazma glutamin düzeyi olarak bulunmuştur. Bu değer normal sınırlar içinde olup istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.2$).

TLC-SCN'ye göre normal grupta ortalama %1.237 mg (%1.05 - 1.375 mg) , gut grubunda %1.249 mg plazma asparajin düzeyi bulunmuştur. İki grup arasında asparajin düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.01$), Tablo 8)

TLC-SPK'ya göre normal grupta ortalama %1.206 mg (% 1.04-1.365 mg) , gut grubunda % 1.220 mg (% 1.1-1.325 mg) plazma asparajin düzeyi bulunmuştur. İki grup arasında plazma asparajin düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.01$, Tablo 8).

Çalışmalarımıza göre, normale kıyasla primer gutlu olgular-
da her iki yönteme göre glutamin ve asparajin tayini, primer gut
teşhisinde bir parametre olacak durumda gözükmemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada kan plazmasındaki asparajin ve
glutamin analizinde kullanılabilecek TLC ile kombine TLC-SCN ve
TLC-SPK yöntemleri verilmiştir. Bu yöntemler araştırmalar için
kaynak oluşturacak nitelikte gözükmemektedir.

Ö Z E T

Bu araştırmada kan plazmasındaki glutamin ve asparajin amino asidlerinin analizinde kullanılabilecek , ince tabaka kromatografisi ile kombine spektrofotometrik bir yöntem verilmiştir. Ayrıca bu yöntem sonuçları ile TLC-SCN'de bulunan sonuçlar mukayese edilmiştir.

Bu iki yöntem için 35 normal ve 15 primer gut hastasının kanı alınıp, plazmaları ayrılmıştır. Ekstraksiyondan sonra ince tabaka kromatografisi ile separe edilmiş ve asparajin ve glutaminin TLC -SCN'de ve TLC-SPK yöntemlerince miktar tayinlerine gidilmiştir.

Normal kan plazma örneklerinin , her iki yöntemdeki asparajin ve glutamin değerleri literatür değerleri ile uygunluk göstermiştir. Primer gut hastalarında plazmadaki asparajin ve glutamin düzeyleri ile normal grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (glutamin için $p > 0.2$ ve asparajin için $p > 0.01$).

S U M M A R Y

In this research, a spectrophotometric procedure combined with thin layer chromatography was described for analysis of asparagine and glutamine from human blood plasma. Furthermore the results obtained by this procedure were compared with the results measured by TLC-Scanner.

Blood samples were collected from 35 healthy volunteer controls and 15 gout patients for both procedures and the plasma was separated by centrifugation. Asparagine and glutamine were separated by thin layer chromatography after extraction procedure and determined quantitatively by spectrophotometric procedure and TLC-Scanner.

The results obtained by spectrophotometric procedure and TLC-Scanner for normal controls were consistent with the reported results in literature. The plasma glutamine and the plasma asparagine levels of primary gout patients weren't significantly differences than the levels of normal controls (for glutamine $p > 0.2$, for asparagine $p > 0.01$).

K I S A L T M A L A R

| | |
|---------|-------------------------------------|
| TLC | -İnce Tabaka Kromatografisi |
| TLC-SCN | -TLC-Scanner Aleti |
| SPK | -Spektrofotometrik Yöntem |
| TLC-SPK | -TLC ile kombine çalışılmış SPK |
| Asn | -Asparajin |
| Gln | -Glutamin |
| Glu | -Glutamat |
| AMP | -Adenozinmonofosfat |
| ADP | -Adenozindifosfat |
| ATP | -Adenozintrifosfat |
| GMP | -Guanozinmonofosfat |
| IMP | -İnozinmonofosfat |
| GGluk | -Glukoz |
| KC | -Keton Cisimleri |
| YA | -Yağ Asidleri |
| TG | -Trigliserid |
| ala | -Alanin |
| prot | -Protein |
| NAD | -Nikotinamidadenindinükleotit |
| NADP | -Nikotinamidadenindinükleotitfosfat |
| PRPP | -Fosforibozil pirofosfat |
| PEP | -Fosfoenolpirüvat |
| PEPCK | -Fosfoenolpirüvatkarboksikinaaz |

K A Y N A K L A R

1. Abdelal, A.T., Ingraham, J.L.: A sensitive radioactive method for determination of glutamine. Anal. Biochem., 69:652-654 1975
2. Arx, E., Neher, R.: Eine multidimensionale technik zur chromatographischen identifizierung von aminosäuren. J. Chromatogr. 12:329-341, 1963.
3. Baron, N., Economidis, J.: Thin layer chromatography for amino acids and sugars. N. Path., 16:484-487, 1963.
4. Benson, J.V., Manuel, J.G., Patterson, J.A.: Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamine and asparagine. Anal. Biochem., 18:228-240, 1967.
5. Bhagavon, N.V. : Biochemistry A Comprehensive Revview., J.B. Lippincott Comp., New York, 1974.
6. Bujard, E.L., Mauron, J.: A two-dimensional separation of acid neutral and basic amino acids by thin layer chromatography on cellulose . J. Chromatogr., 21:19-26, 1966.

7. Cersosimo, E., Williams, P., Geer, R., Lairmore, T., Ghishan F., Abumrad, N., : Importance of ammonium in regulating hepatic glutamine synthesis during fasting. *Am. J. Physiol.*, 257: 514-519, 1989.
8. Collins, F.S., Summer, G.K. : Determination of glutamine and glutamic acid in biological fluids by gas chromatography. *J. Chromatogr.* , 145:456-463, 1978.
9. Coon, C., Balling, R. : Asparagine and glutamine metabolism in chicks. *Poult. Sci.*, 63(4): 717-729, 1984.
10. Cooney, D., Davis, R. : A spectrophotometric method for the simultaneous measurement of L-glutamine and asparagine in biological materials. *Anal. Biochem.*, 40:312-326, 1971.
11. Darmaun, D., Matthews, D.E., Bier, D.M. : Glutamine and glutamate kinetics in humans. *Am. J. Physiol.*, 251(E):117-126 1986.
12. De La Llosasa, P., Tertrin, C., Jutisz, M. : Séparation des acides aminés par chromatographie en couche mince de diéthyl-cellulose. *J. Chromatogr.*, 14:136-139, 1964.
13. Edwards, C., Gadsden, E., Carter, L.P., Edwards, G.A.: Paper chromatography of amino acids and other organic compounds in selected solvents. *J. Chromatogr.* , 2:188-198, 1958.
14. Ergenç, N., Gürsoy, A., Ateş, Ö. : İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini. İstanbul Üniv. Yayınları, 3. Baskı, İstanbul, 1984.
15. Esser, K. : Ein dünnschichtchromatographisches verfahren zur quantitativen bestimmung von aminosäuren und aminozuckern im mikromassstab. *J. Chromatogr.* 18:414-416, 1965.

16. Fong, W.F., Law, C.L. : Possible role of membrane Na^+/H^+ anti-
port in ornithine decarboxylase induction by L-asparagine.
Biochem. Biophys. Res. Com., 155:937-942, 1988.
17. Gauthier, B., Marechal, M.C. : Détermination des acides ami-
nes par complexometrie cuivrique. Annales. Pharm. Franç.,
20:156-162, 1962.
18. Ghishan, F.K., Arab, N., Bulus, N., Said, H., Pietsch, J., Abumrad,
N. : Glutamine transport by human intestinal basolateral mem-
brane vesicle. Am. J. Clin. Nutr., 51:612-616, 1990.
19. Gross, S., Maskaleris, M.L. : Improved cation-exchange sepe-
ration of asparagine and glutamine in the presence of other
amino acids. Clin. Chem., 22:1233, 1976.
20. Gutman, A.B., Yü, T. : An abnormality of glutamine metabolism
in primary gout. Am. J. Med., 35:820-831, 1963.
21. Gutman, A.B., Yü, T. : Hyperglutamatemia in primary gout.
Am. J. Med., 54: 713-724, 1973.
22. Hammarqvist, F., Wernerman, J., Rustom, A., Von Der Decken,
A., Vinnars, E. : Addition of glutamine to total parenteral nut-
rition after elective abdominal surgery spares free glutami-
ne in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balan-
ce. Ann. Surg., 209:455-461, 1989.
23. Helton, W.S., Smith, R.J., Rounds, J., Wilmore, D.W. : Gluta-
mine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during e-
lemental feeding. J. Surg. Res., 48:297-303, 1990.
24. Jahoor, F., Jackson, A.A., Golden, H.N. : A method for
isolation of the amide nitrogen of glutamine from biological
samples for mass spectrometry. Anal. Biochem., 121:349-355,
1982.

- - -
25. Kafkewitz, D., Bendich, A., : Enzyme - induced asparagine and glutamine depletion and immun system . function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37:1025-1030, 1983.
 26. Kitoh, T., Kurbota, M., Takimota, T., Hashimoto, H. : Metabo - lic basis for differantial glutamine requirements of human leukemia cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 143(1) : 150-153, 1990.
 27. Lanctin, H., Quarcoo, E.T., Brosnan, J.T. : Acute regulation of renal glutamine synthesis by pH in rat and guinea pig. *Contrib. Nephrol.*, 47: 186-190, 1985.
 28. Lavi, L.E., Holcenberg, J.S. : Sensitive analysis of asparagi- ne and glutamine in physiological fluids and cells by precol- umn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed- phase high -performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 377:155-163, 1986.
 29. Manchester, K.L., : Glutamine and protein turnover . *Trend. Bio- chem. Sci.*, 14:362-363, 1989.
 30. Moraga, D.A., MacPhee-Quiggley, K.M., Keefer, J.F., Schuster, S.M. : Asparagine catabolism in rat liver mitochondria . *Arch. Biochem. Biophys.*, 268:314-326, 1989.
 31. Nahorski, S.R. : Fluorometric measurement of glutamine and asparagine using enzymic methods . *Anal. Biochem.*, 42: 136-142, 1971.
 32. Newsholme , E.A., Leech, A.R. : *Biochemistry For The Medical Sciences* . John Wiley and Sons Comp., fifth edition, London, 1989.
 33. Ngo, T.T. : Reagentless Determination of L-asparagine and L-arginine via the combined use of immobilized enzymes and an ion - selective electrode . *Can. J. Biochem.*, 54:62-65

34. Oreskes, I., Cantor, F., Kupfer, S., : Separation of glutamine and asparagine ion-exchange chromatography with temperature programming. *Anal. Chem.*, 37:1720-1723,1965.
35. Pataki, G. : Einfluss der schichtqualität auf die dünn-schichtchromatographische trennung von aminosäuren . *J. Chromatogr.*, 17: 580-584,1965.
36. Perry, T.L., Wright, J.M., Hansen, S. : Hyperasparaginemia in a schizophrenic patient. *Biol, Psych.*, 18:89-97,1983.
37. Phromphetcharat, V., Welbourne, T.C. : Renal glutamine extraction and gut/liver interaction in glutamine homeostasis. *Contrib. Nephrol.*, 47:9-14, 1985.
38. Rawn, J.D. : International Edition Biochemistry. Carolina Biological Supply Comp. USA , 1989.
39. Salleh, M., Ardawi, M., : Glutamine and keton-body metabolism in the gut of streptozocin-diabetic rats. *Biochem.J.* , 249: 565-572, 1988.
40. Saxena, K.N., Gandhi, J.R., : Separation and identification of aminoacids by two dimensional paper chromatography. *J. Chromatogr.*, 8: 544-546, 1962.
41. Scott, J.T. : Gut. *Klinik Romatoloji*, Kemal Matbaası A.Ş. 3. Baskı, Adana, Çevirenler: Akoğlu T., Akoğlu, E.,1978.
42. Shimadzu High -Speed Thin Layer Chromato Scanner Model CS-920 Kullanım Kılavuzu.
43. Souba, W.W., Herskowitz, K., Klimberg , V. S. : The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Annals. Surgery.* , 211: 543-549, 1990.
44. Stahl, E. : Thin Layer Chromatography. Springer - Verlag Comp., second edition, Newyork, 1969.

45. Steib, A., Rendon, A., Mark, J., Borg, J. : Periferantial glutamine uptake in rat brain synaptic mitochondria. Febs Letters , 207:(1) : 63-68, 1986.
46. Strzelecki, T., Rogulski, J., Angielski, S. : The purine nucleotide cycle and ammonia formation from glutamine by rat kidney slices. Biochem. J., 212: 705-711, 1983
47. Voight, S., Solle, M., Konitzer, K. : Dünnschichtchromatographiche Abtrennung von γ -aminobuttersäure aus hirnextrakten. J. Chromatogr., 17:180-182, 1965.
48. Ward, H.K., Thanki, C.M., Bradford, H.F. : Glutamine and glucose as precursors of transmitter aminoacids -exvivo studies. J. Neurochem., 40(3): 855-860, 1983.
49. Welbourne ,T.C., Childress, D., Givens , G. : Renal regulation of inter organ glutamine flow in metabolic acidosis. Am. J. Physiol., 251: 859-866, 1986.
50. West, E.S., Todd, W.R., Mason , H.S., Bruggen, J.T., : Text Book of Biochemistry , MacMillan Comp. , fourth edition, New York , 1963.
51. White, H.H. : Separation of aminoacids in physiological fluids by two dimensional thin layer chromatography. Clinica. Chimica. Acta., 21: 297-302 , 1968.
52. Willis , R.C. , Seegmiller , J.E. : A filtration assay specific for the determination of small quantities of L-glutamine . Anal. Biochem., 72: 66-77, 1976.
53. Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., Otterbein, E.S.; The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals , Drugs and Biologicals, tenth edition, New York , 1983.

54. Windmueller , H.G. , Spaeth, A.E. : Respiratory fuels and nitrogen metabolism invivo in small intestine . J. Biol.Chem. 255 :107- 112, 1980.
55. Wollenweber , P. : Dünnschicht-Chromatographische trenungen von aminosäuren an cellulose - schichten . J. Chromatogr. 9: 369-371, 1962.
56. Wyngaarden, J.B. : Metabolic defects of primary hyperuricemia and gout.Am. J. Med., 56:651-664, 1974.
57. Yü, T.F. , Adler, M., Bobrow, E., Gutman, A.B. : Plasma and urinary aminoacids in primary gout, with special reference to glutamine . , J. Clin, Invest., 48: 885-894, 1969.



Ö Z G E Ç M İ Ş

Kayseri'nin Pırarbaşı ilçesinde 1967 yılında doğdum. İlk-
öğrenimimi Ankara'da , orta öğrenimimi İzmir'de tamamladım.
1984 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesini kazandım.
Buradan 1989 yılında mezun oldum. 1990 yılında aynı fakültenin
Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında yük-
sek lisans öğrenimime başladım. Bekarım.

T A B L O ve Ő E K İ L

L İ S T E S İ

| | <u>Sayfa</u> | | <u>Sayfa</u> |
|-------------|--------------|-----------|--------------|
| Tablo 1. | 34 | Şekil 1. | 4 |
| Tablo 2. | 36 | Şekil 2. | 6 |
| Tablo 3. | 61 | Şekil 3. | 7 |
| Tablo 4. | 62 | Şekil 4. | 9 |
| Tablo 5. | 63 | Şekil 5. | 11 |
| Tablo 6. | 64 | Şekil 6. | 14 |
| Tablo 7. | 65 | Şekil 7. | 21 |
| Tablo 8. | 65 | Şekil 8. | 22 |
| Grafik I. | 51 | Şekil 9. | 25 |
| Grafik II. | 52 | Şekil 10. | 26 |
| Grafik III. | 53 | Şekil 11. | 27 |
| Grafik IV. | 54 | Şekil 12. | 28 |
| Grafik V. | 67 | Şekil 13. | 29 |
| Grafik VI. | 68 | Şekil 14. | 31 |
| Resim 1. | 69 | Şekil 15. | 31 |
| Resim 2. | 70 | Şekil 16. | 32 |
| Resim 3. | 71 | Şekil 17. | 37 |