

**T.C**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**CİGLİTAZONUN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ VE**  
**KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Muharrem TOPAL**

**TRABZON, 2009**

**T.C**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**CİGLİTAZONUN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ VE**  
**KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Muharrem TOPAL**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29.06.2009**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 15.09.2009**

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Ahmet ALVER**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**Jüri Üyesi : Doç.Dr. İlknur TOSUN**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**EYLÜL, 2009**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi olarak yaptığım bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı öncelikle danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ALVER olmak üzere bilgilerinden yararlandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Doç. Dr. S. Caner KARAHAN, Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül Vanizör KURAL ve G6-PD enziminin teminindeki yardımlarından dolayı Atatürk Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, çalışmalarımnda benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Diler US başta olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Biyokimya Anabilim Dalındaki bütün arkadaşlarıma, ayrıca beni bu günlere getiren benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Eylül, 2009

MUHARREM TOPAL

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>I</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>II</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>VI</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. PPAR (Peroksizom Proliferatörince Aktive edilen Reseptör)	<b>3</b>
2.1.1 PPAR $\gamma$ ve Thiazolidinedion'lar	<b>3</b>
2.1.2. Ciglitazone	<b>7</b>
2.2. Karbonik Anhidraz	<b>8</b>
2.2.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	<b>8</b>
2.2.2. Karbonik Anhidraz II (CA II)	<b>10</b>
2.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	<b>12</b>
2.3. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	<b>13</b>
2.3.1. G6-PD'ın Klinik Önemi	<b>15</b>
2.3.2. G6-PD Enzim Eksikliğinin Diğer Etkileri	<b>15</b>

2.3.3. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz İnhibitöleri	16
<b>3. MATERYAL ve METOD</b>	<b>17</b>
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	18
3.2. Metodlar	20
3.2.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini	20
3.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Enzim Aktivitesi Üzerine Ciglitazone'nun Etkisi	20
3.2.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini	22
3.2.2.1. Karbonik Anhidraz Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Ciglitazone'nun Etkisi	22
3.2.3. G6-PD Enzim Aktivitesi Tayini	24
<b>4. BULGULAR</b>	<b>26</b>
4.1. CA II Hidrataz Aktivitesi sonuçları	26
4.2. CA II Esteraz Aktivitesi sonuçları	28
4.3. G6-PD Enzim Aktivitesi Sonuçları	30
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>32</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>36</b>

6.1. Sonuçlar	36
6.2. Öneriler	36
<b>ÖZET</b>	<b>37</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
<b>Tablo 1.</b>	Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri, sulfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri	<b>10</b>
<b>Tablo 2.</b>	Memeli karbonik anhidraz II izoenzimlerinin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi	<b>12</b>
<b>Tablo 3.</b>	Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	<b>17</b>
<b>Tablo 4.</b>	Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri	<b>18</b>
<b>Tablo 5.</b>	Deneylerde Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	<b>19</b>
<b>Tablo 6.</b>	Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri	<b>21</b>
<b>Tablo 7.</b>	Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri	<b>23</b>
<b>Tablo 8.</b>	G6-PD aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri	<b>25</b>
<b>Tablo 9.</b>	Ciglitazone'nun CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları	<b>27</b>
<b>Tablo 10.</b>	Asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları	<b>27</b>
<b>Tablo 11.</b>	Ciglitazone'nun CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları	<b>28</b>
<b>Tablo 12.</b>	Asetazolamidin CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları	<b>29</b>
<b>Tablo 13.</b>	Ciglitazone'nun G6-PD aktivitesi inhibisyon oranları	<b>31</b>
<b>Tablo 14.</b>	Vancomycin'in G6-PD aktivitesi inhibisyon oranları	<b>31</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

		<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b>	PPA- $\gamma$ 'nın gen ekspresyonunu düzenleme mekanizması	<b>4</b>
<b>Şekil 2.</b>	PPAR- $\gamma$ aktivasyonu ve etkileri	<b>5</b>
<b>Şekil 3.</b>	Ciglitazone'nun molekül yapısı	<b>8</b>
<b>Şekil 4.</b>	CA II'nin katalizlediği CO <sub>2</sub> hidrasyon reaksiyonunun mekanizması	<b>11</b>
<b>Şekil 5.</b>	Pentoz fosfat metabolik yolu	<b>14</b>
<b>Şekil 6.</b>	Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>26</b>
<b>Şekil 7.</b>	Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>27</b>
<b>Şekil 8.</b>	Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>28</b>
<b>Şekil 9.</b>	Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>29</b>
<b>Şekil 10.</b>	Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak G6-PD aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>30</b>
<b>Şekil 11.</b>	Vancomycin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak G6-PD aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	<b>31</b>



**KISALTMALAR**

<b>CA</b>	Karbonik Anhidraz
<b>G6PD</b>	Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
<b>CZ</b>	Ciglitazone
<b>PPAR</b>	Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive edilen Reseptörler
<b>NADP</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>G6P</b>	Glukoz 6 Fosfat
<b>Tris</b>	Trihidroksimetilaminometan
<b>OD</b>	Optik dansite
<b>CARP</b>	Karbonik Anhidraz Benzeri Protein
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>EC</b>	Enzim Kodu
<b>IC<sub>50</sub></b>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>CAİ</b>	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
<b>RXR</b>	Retinoid X Reseptörü
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Van</b>	Vancomycin
<b>Ast</b>	Asetazolamid
<b>E</b>	Enzim
<b>TZD</b>	Thiazolidinedione

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

PPAR (Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Reseptörler) Nükleer hormon reseptör süper ailesine ait hücre içi transkripsiyon faktörleridir(1). Fizyolojik ya da farmakolojik ligandlarla aktivasyonları sonucu özel DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlerler. PPAR'nin üç tipi bilinmektedir. Bunlar  $\alpha$ ,  $\gamma$  ve  $\beta$ 'dir. PPAR  $\gamma$  ciglitazone reseptörüdür. Yağ ve glukoz metabolizmasını düzenlenmesinde rol alır. Diabet tedavisinde birçok insülin hassasiyetini artıran ilaç PPAR  $\gamma$  'yı hedef alıp, pankreasta insülin sekresyonunu artırmadan serum glukoz düzeyini düşürür(2). PPAR  $\gamma$ , obezite, diabet, ateroskleroz ve kanser gibi bir çok hastalığın patolojisi ile ilişkilidir(3).

Karbonik Anhidrazlar (CA, E.C 4.2.1.1, Karbonat hidrolizaz) aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu ihtiva eden monomerik bir protein olup, mikroorganizmalardan yüksek yapıllı hayvanlara kadar dağılımı olan bir enzimdir. Organizmada birçok önemli rollere sahiptir. Temel olarak  $CO_2$ 'nin katalitik hidrasyonu ve  $HCO_3^-$  nin dehidrasyonundan sorumludur(4). Bugüne kadar omurgalıların farklı organ ve dokularında 16 izoenzimi belirlenmiştir(5). Bu izoenzimler membranlarda iyon transportu, beyin omurilik sıvısının sentez ve reabsorpsiyonu, gastrik mukoza hücrelerinden HCl salgılanması, aköz hümör ( göz sıvısı) salgılanması, asit-baz dengesinin sağlanması, kardiyovasküler tonusun regülasyonu, sindirim gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alırlar(30).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) (D-glukoz-6-fosfat; NADP+ oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir(6). G-6-PD çoğunlukla sitoplazmada ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de

bulunmaktadır . Hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki fonksiyonu vardır(7). Elde edilen indirgen güç ile eritrosit membran yapısı ve diğer proteinlerin oksidasyonun engellenmesinde kullanılmaktadır. Eritrosit fonksiyonlarının devamlılığında önemli yeri olan G-6-PD inhibisyonu yapan bir çok maddenin anemiye sebep olduğu gösterilmiştir(8).

Ciglitazone (5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy) benzyl]-thiazolidine-2,4-dione) thiazolidinedione sınıfına ait hipoglisemik bir bileşiktir(9). Selektif ve etkili bir PPAR  $\gamma$  ligandıdır. Güçlü antidiabetik etkilerine rağmen anemiye sebep olmasından dolayı ilaç olarak kullanılmamaktadır(10). Anemi oluşturma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ciglitazone'un enzim aktiviteleri üzerine etkisini gösteren çalışmalar sınırlıdır. . Bu çalışmada ciglitazone'un eritrosit fonksiyonlarının ve bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli olan G-6-PD ve karbonik anhidraz II enzim aktivitelerine olan etkileri in vitro olarak incelenecektir.

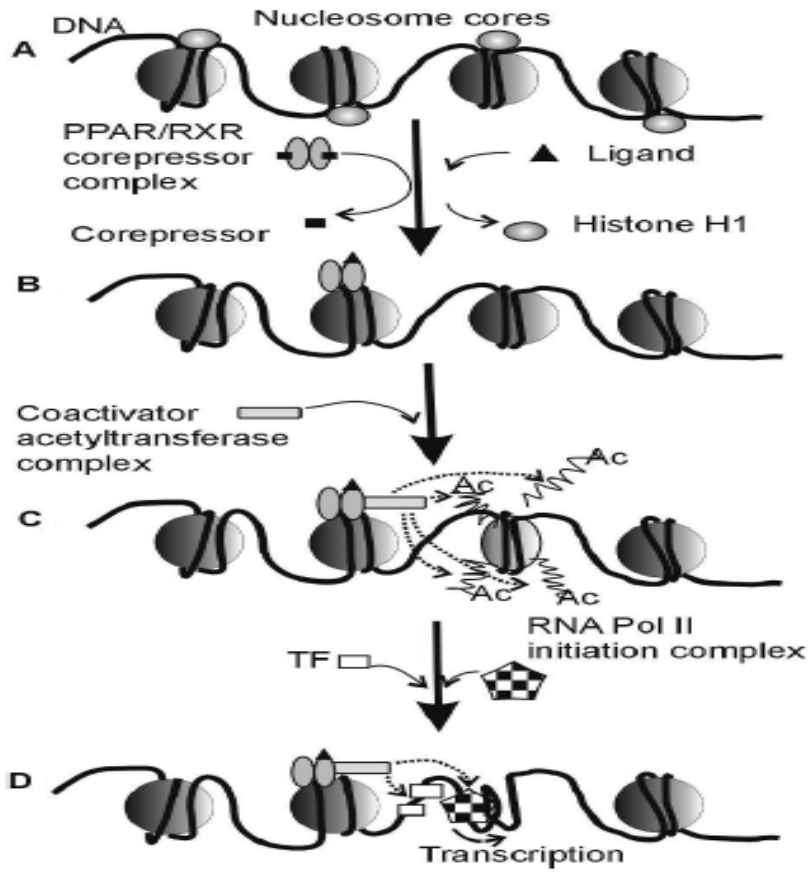
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. PPARs (Peroksizom Proliferatörlerince Aktive edilen Reseptörler)

İlk olarak 1990 yılında rodentlerde keşfedilmiş olan PPAR'lar nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir ve ligand bağlanmasına yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenlerler(1). Birçok yağ asidi ve prostoglandinler PPAR için endojen ligand görevi yapar. PPAR'ler lipoprotein ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde, inflamatuvar cevapta glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde ve hücre farklılaşmasında görev alırlar. PPAR'ların tanımlanmış üç grubu vardır. Bunlar PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$  ve PPAR  $\gamma$  'dır. PPAR  $\alpha$  karaciğer böbrek, iskelet kası, kalp ve damar duvar hücrelerinde ağırlıklı olarak bulunur. PPAR  $\gamma$  asıl olarak yağ dokusunda bulunur. Ancak pankreatik beta hücreleri, vasküler endotel ve makrofajlarda da bulunduğu gösterilmiştir. PPAR  $\alpha$ 'nın yoğun olarak bulunduğu dokularda düşük düzeyde bulunur. PPAR  $\beta$  genel bir dağılıma sahiptir ve tüm dokularda bulunur(2).

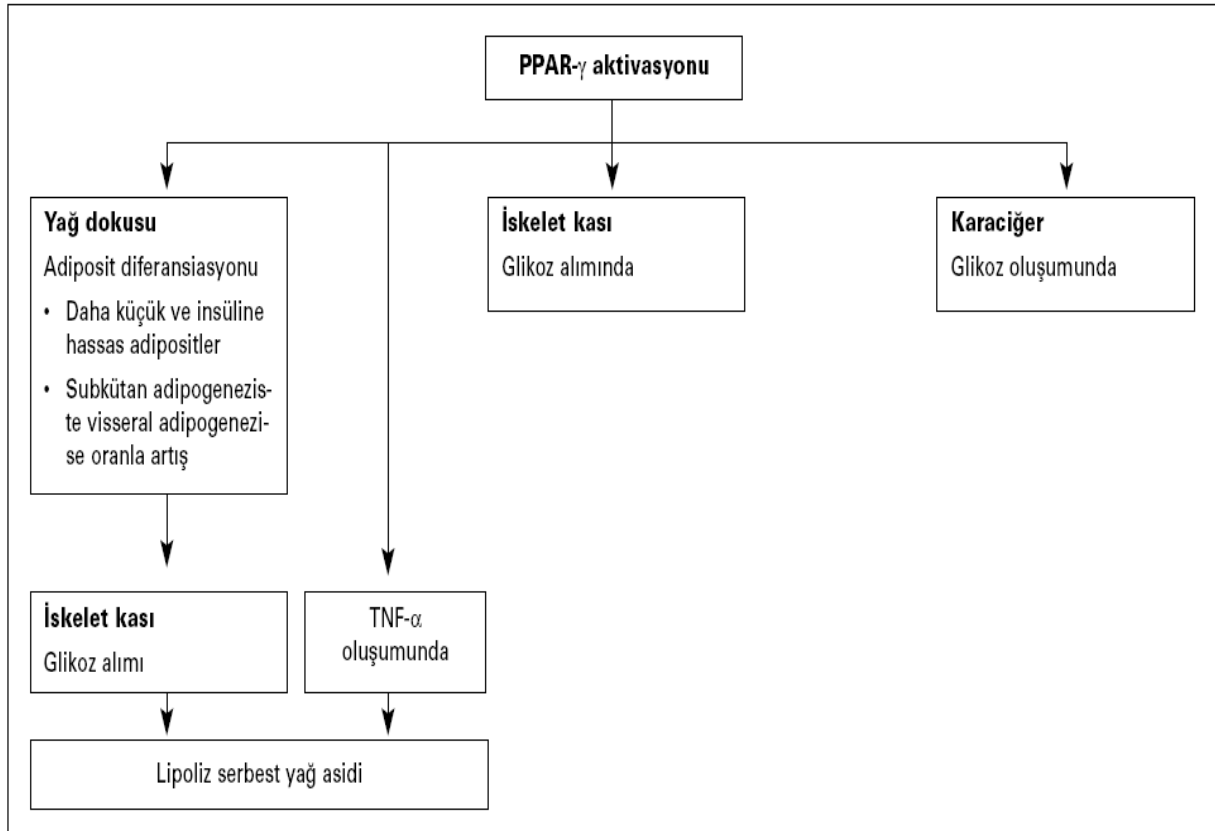
#### 2.1.1. PPAR $\gamma$ ve Thiazolidindiyon'lar

PPAR  $\gamma$ 'nın PPAR  $\gamma$ 1 ve PPAR  $\gamma$ 2 olmak üzere iki izoformu vardır. PPAR  $\gamma$ 1 en çok yağ dokusunda bulunmakla beraber pankreas ve makrofajlar gibi diğer dokulardada bulunur. PPAR  $\gamma$ 2 ise sadece yağ dokusunda sentez edilen bir proteindir. PPAR  $\gamma$  reseptörleri retinoid X reseptörleri (RXR) ile heterodimer oluştururlar(2). Bu heterodimer hedef gen bölgesinde bulunan promotördeki PPAR cevap elementine bağlanır. Ligand yokken PPAR ve RXR bir multiprotein korepresörle baskılanmıştır. Bu korepresör histon deasetilasyon aktivitesini baskılayarak gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Uygun bir ligand resöptöre bağlandığında korepresör kompleksten ayrılır ve histon deasetilasyonu başlayarak gen ekspresyonu başlar(3).



**Şekil 1.** PPAR- $\gamma$ 'nın gen ekspresyonunu düzenleme mekanizması.

PPAR  $\gamma$  yağ asitleri, protaglandin J ve sentetik ligandı olan thiazolidinediyonlar (TZD) tarafından aktive edilir. PPAR  $\gamma$  yağ asidi alınımı ve depolanmasıyla birlikte adiposit diferansiyasyonu ve proliferasyonu için gereklidir(11). Thiazolidinediyonlar küçük adipositleri ve subkutan yağ dokusu kütlesini artırdığı hayvan modellerinde gösterilmiştir. PPAR  $\gamma$  nın metabolik etkileri Şekil 2'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.** PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ve etkileri.

Thiazolidinedion'lar yeni sınıf oral hipoglisemik ajanlardır(12). TZD'lerin hipoglisemik etkisi insülin sensitivitesini artırarak periferik dokuların glukoz kullanımını arttırmak yoluyla olmaktadır. Etki mekanizması tam olarak anlaşılmasa da genel olarak kabul gören hipotez; TZD'lerin PPAR  $\gamma$ 'ya bağlanarak insülin duyarlılığını değiştirdiği şeklindedir. Adipoz dokuda serbest yağ asidi depolanmasını artırarak karaciğer, iskelet kası ve pankreatik beta hücrelerini lipotoksiteden korurlar. Diğer yandan adipoz dokulardan adiponektin salınımını artırarak karaciğerde indirekt olarak insülin duyarlaştırıcı etki gösterirler. TZD'ler klinik olarak tip 2 DM olan hastalarda insülin hassasiyetini düzeltmek amacıyla kullanılmaktadır (13). Metabolik etkileri aşağıda özetlenmiştir.

**1) Glukoz kontrolü:** Açlık ve tokluk plazma glukozunu düşürdükleri birçok çalışmada gösterilmiş olup HbA1c seviyelerini %0,5-1,5 oranında azaltmaktadırlar (14,15).

**2) İnsülin direnci/hiperinsülinemi:** Plazma glukozunu düşürmeleri yanında, TZD'ler aynı zamanda dolaşımdaki insülin seviyesini düşürür ya da glisemik kontrol için gerekli olan insülin seviyelerini azaltır. İnsülin rezistansındaki azalma periferik dokuların glikoz kullanımını artırır ve bazı özel durumlarda karaciğer bazal glikoz üretimini azaltır (16,17).

**3) Dislipidemi:** TZD'ler ile yapılan birçok çalışmada bu ilaçların HDL seviyelerini % 5 ile % 15 oranında arttırdıkları ancak bu artışın sadece HDL3 subfraksiyonunda olduğu görülmüştür. Genel olarak TZD'ler dolaşımdaki serbest yağ asitlerini azaltırlar ve bu etkinin insülin rezistansını kırmaya yönelik mekanizmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir (18).

**4) Hipertansiyon:** TZD sınıfı ilaçlar kullanılarak yapılan birçok çalışmada gerek hipertansif gerekse normotansif tip 2 diyabetiklerde kan basıncında düşme gözlemlenmiştir. Bu düşüş 3 mmHg ile 9 mmHg ortalama arteriyel basınç düzeylerindedir (19).

**5) Mikroalbüminüri:** TZD sınıfı ilaçlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, tip 2 diyabeti ve mikroalbüminüri olanlarda üriner mikroalbümin/kreatinin oranlarında %60 lara varan düşüşler görülmüş olup bu etkinin plazma glukoz seviyelerinden ve kan basıncı etkisinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (20,21).

**6) Yağ dokusu dağılımı:** TZD sınıfı ilaçlar kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda bu ajanın selektif olarak visceral yağ dokusunu azaltıp, periferik subkutan yağ dokusunu arttırdığı ve bu sayede total yağ dokusunu arttırdığı gösterilmiştir (22,23).

**7) Pankreas beta hücrelerinin insülin salgılaması:** Bozulmuş açlık glukozu ve tip 2 diyabeti olan hastalarda TZD kullanımıyla beta hücre sekresyon kapasitesinde hem kısa hem de uzun vadede artış olduğuna ilişkin artan sayıda kanıtlar bulunmaktadır. Mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, son dönemlerde yapılan bir çalışmada insülin adacık hücrelerinde PPAR  $\gamma$  reseptörlerinin çok sayıda eksprese edildiği gösterilmiştir(24).

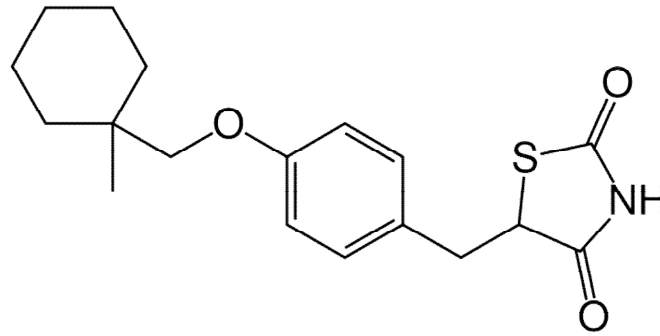
Yukarıda bahsedilen etkilerinin yanı sıra, TZD'lerin ciddi yan etkileri de bulunmaktadır. 1997 yılında piyasaya sürülen tiroglitazon 2000 yılında hepatotoksik etkilerinden dolayı piyasadan çekilmiştir. 1999 yılında iki yeni PPAR agonisti, resiglitazon ve pioglitazon Amerika Birleşik Devletlerinde piyasaya sürülmüştür. Bu ilaçların daha düşük hepatotoksik etkilerine rağmen homodilüsyon, anemi, kilo alma, ödem ve artmış kalp yetmezliği riski gibi yan etkileri vardır. Son olarak, 2007 yılında, Food and Drug Administration (FDA) tip 2 diyabet tedavisinde resiglitazon kullanımında placebo, metmorfin veya sülfonilure kullanımına göre daha yüksek oranda miyokardial iskemi riski olduğunu bildirmiştir (25).

### **2.1.2. Ciglitazone**

Ciglitazone (5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy) benzyl]-thiazolidine-2,4-dione) thiazolidinedione sınıfına ait antidiabetik bir ajandır(9). PPAR  $\gamma$ 'nın ligand bağlayıcı bölgesine bağlanan etkili ve selektif bir bileşiktir. 1982 yılında Takada Ltd tarafından hipolipidemik ilaç geliştirme çalışmaları sırasında hipoglisemik etkisi bulunmuştur. KK tipi farelerde 100 mg/kg dozda 4 gün süre ile verilmesi glukoz seviyelerinde %43 lük bir azalmaya sebep olmuştur. Ciglitazonun kimyasal yapısı referans alınarak çeşitli ve daha güçlü antidiabetik ilaçlar geliştirilmiştir. Özellikle molekülün kuyruk kısımları değiştirilerek yeni moleküller oluşturulmuştur. Ciglitazone ilk keşfedilen TZD olmasına rağmen yan etkileri ve antidiabetik etkinliğini daha sonradan geliştirilen TZD lerden düşük olması sebebiyle ticari olarak kullanıma girmemiştir. Ancak, TZD



grubu ilaçların etkinliğinin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde referans olarak birçok araştırmada kullanılmıştır. Son dönemlerde, özellikle kanser hücrelerinde apoptosisi uyararak sitotoksik etki göstermesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (26).

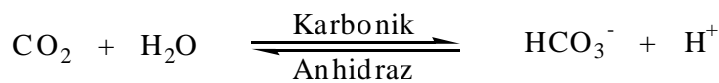


**Şekil 3.** Ciglitazone'nun molekül yapısı.

## 2.2. Karbonik Anhidraz

### 2.2.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

İlk defa memelilerin eritrositlerinden 1933 yılında (30) saflaştırılan, karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) CO<sub>2</sub> 'in hidrasyonu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ın dehidrasyonundan sorumlu olan bir enzimdir(4). Aşağıdaki reaksiyonu dönüşümlü olarak katalizlemektedir.



Bu reaksiyonla beraber; CO<sub>2</sub> taşınması, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dokular ve akciğerler arasında metabolize olmasında, pH homeostazisinde, doku ve organlardaki elektrolit

sekresyonu, birçok biyosentez reaksiyonunda (glukoneogenez, lipogenez, üre döngüsü vs.), kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, ve daha birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol almaktadır (27,28).

CA yukarıdaki reaksiyonun dışında karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve piruvatın hidrolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi bugüne kadar gösterilememiştir (27).

CA'lar birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanan ve çinko ( $Zn^{2+}$ ) içeren monomerik yapılı metaloenzimlerdir. Bugüne kadar dört farklı çeşidi karakterize edilmiştir. Bunlar  $\alpha$ -CA (omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında),  $\beta$ -CA (çoğunlukla bakteriler, algler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında),  $\gamma$ -CA (temel olarak archealarda),  $\delta$ -CA ise (bazı deniz diatomlarında) bulunur(29).

Memelilerde doku dağılımı ve hücre içi yerleşimi farklı olan onaltı ayrı  $\alpha$ -CA izoenzimi ve CA benzeri protein (CARP) bulunmuştur. (Tablo 1).

**Tablo 1.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri, sulfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri(5).

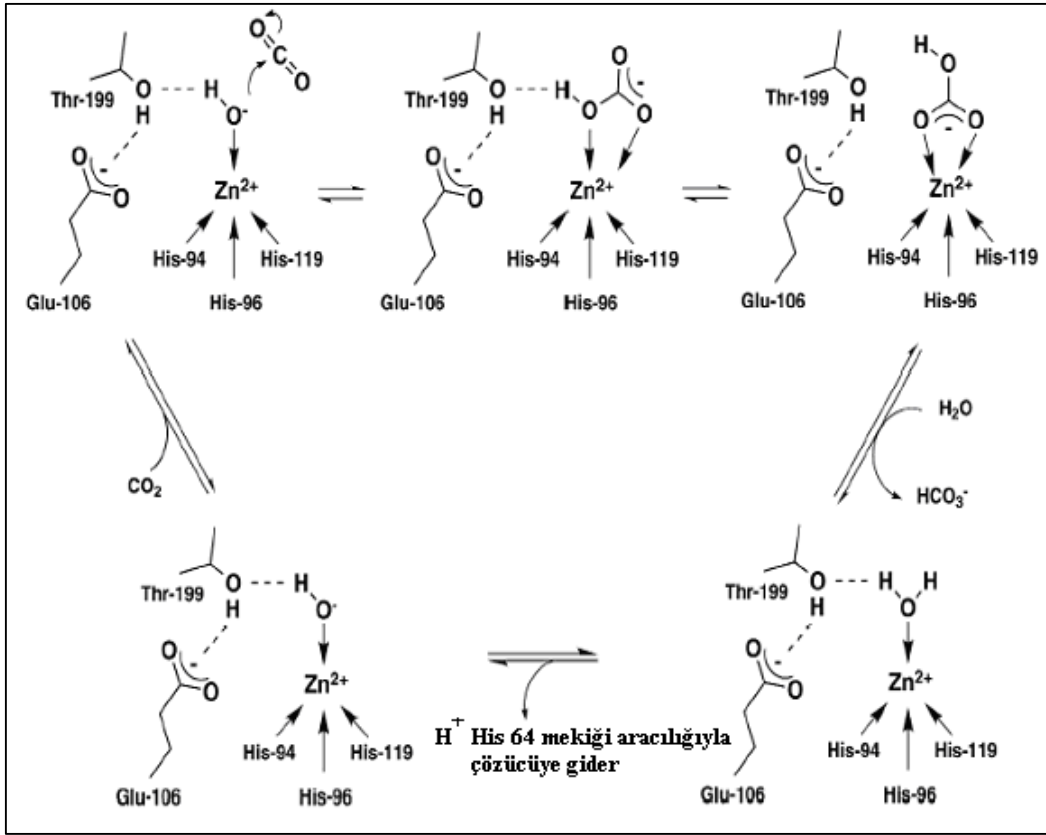
İzoenzim	Katalitik aktivite (hidrataz)	Sülfonamide İlgisi	Hücre İçi Yerleşim
CA I	Düşük	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Düşük/Orta dereceli*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta dereceli*	Yüksek	Tükürük ve sütte
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP VIII	Yok	**	Sitozol
CA IX	Yüksek	Yüksek	Plazma membranı
CARP X	Yok	**	Salgılanır
CARP XI	Yok	**	Salgılanır
CA XII	Düşük	Çok yüksek	Plazma membranı
CA XIII	Orta dereceli	Orta –Yüksek	Sitozol
CA XIV	Orta dereceli	Yüksek	Plazma membranı
CA XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

\*pH 7,4’de düşük, pH : 8,2 ve üzerinde orta dereceli

\*\*Doğal CARP ( CA related protein) izozimleri Zn<sup>2+</sup> içermemektedir. Bu nedenle sulfonamidlere olan afiniteleri ölçülmemiştir.

### 2.2.2.Karbonik Anhidraz II (CA II)

CA II, hemen hemen organizmadaki tüm hücre tiplerinin sitozolünde bulunan, maksimum CO<sub>2</sub> hidrasyonu turnover sayısına sahip olan (1.10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>) ve en geniş doku dağılımlı izoenzimdir (29). CA II’nin katalizlediği genel reaksiyon mekanizması Şekil 4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.** CA II'nin katalizlediği CO<sub>2</sub> hidrasyon reaksiyonunun mekanizması (29).

CA II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epiteliumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur. Bu hücre tiplerinde CA II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA II asit-baz homeostazı için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H<sup>+</sup> salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından H<sup>+</sup> salgısına katkıda bulunur (30). CA II pankreas sıvısı için HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> temin eder. Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır(31). CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tubüllerde CO<sub>2</sub> değişimine katkıda bulunur (32). Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Tablo 2'de gösterilmiştir .

**Tablo 2.** Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (33).

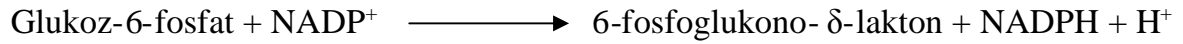
Doku dağılımı	İşlevsel rolleri
❖ Yemek borusu (özefagus) ve larinks epiteli	❖ Mideden yemek borusu ve daha yukarı bölgelere bağlı asiditeyi engeller
❖ Kemik osteoklast hücreleri	❖ Kemik resorpsiyonu
❖ Göz	❖ Aköz hümörün üretimi
❖ Testis	❖ Sperm hareketliliği
❖ Böbrek	❖ İdrar asidifikasyonu
❖ Beyin	❖ BOS salgısı
❖ Akciğer	❖ Gaz değişimi
❖ Eritrositler	❖ Gaz değişimi
❖ Gastrointestinal epiteli	❖ $H^+$ salgısı, $HCO_3^-$ salgısı

### 2.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (CAİ)

CA, aktif bölgesinde bulunan çinko iyonuna bağlanan iyon ve moleküller tarafından inhibe edilmektedir. Sülfonamid türevleri olan asetazolamid, klorozamid, dorzolamid ve brinzolamidler CA'nın kendine özgü güçlü inhibitörleridir. (34). Halojenürler, siyanür ve tiyosiyanoür gibi mononegatif çözücüler ise daha gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon oluşmasını sağlarlar. Bu inhibitörlere en dayanıklı izoenzim CA-III'dür. CAİ iki değişik formu vardır.(35). Sistemik etkili olanlar, epilepsi tedavisinde kullanılan asetazolamid gibi. Topikal etkili olanlar, glokom tedavisinde kullanılan dorzolamid ve brinzolamid gibi sistemik yan etkileri daha az olan inhibitörlerdir (36).

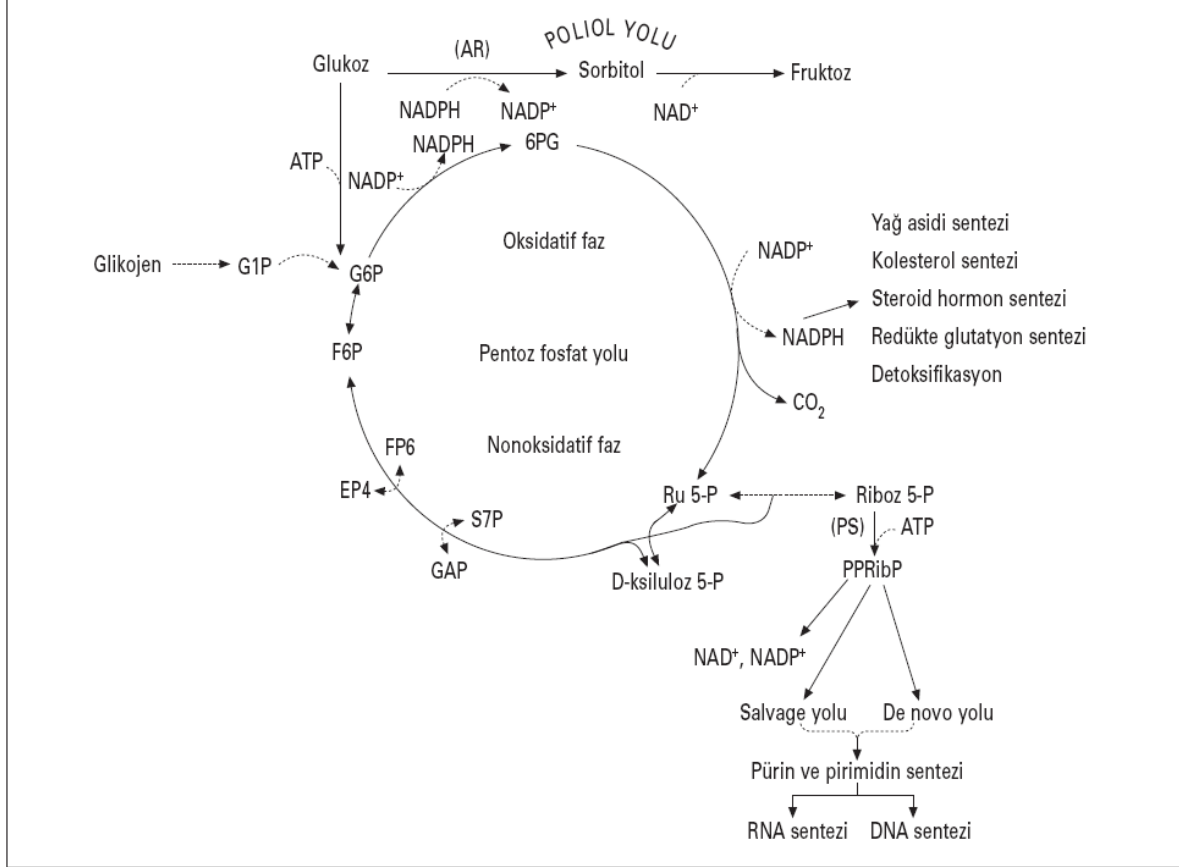
### 2.3. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) (D-glukoz-6-fosfat; NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir(6). G6PD çoğunlukla sitoplazmada ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunmaktadır (44). Birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan G6PD enzimi aşağıdaki tepkimeyi katalizler .



Enzimin doğal substratı glukoz-6-fosfattır (G-6-P). Ancak 2-deoksiglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-fosfat, mannoz-6fosfat, 3-oksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarını da belli oranlarda kullanabilmektedir. G6PD ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, DG6P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir(39).

Pentoz fosfat yolunun hücrede, nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki fonksiyonu vardır(37). Ayrıca bu yolla, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz 4-fosfat, bakteri hücre duvarının bir bileşeni sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbonhidratlar sentezlenmektedir(38). Pentoz fosfat metabolik yolu ve diğer sentez yolları ile bağlantısı Şekil 5'de gösterilmiştir.



**Şekil 5.** Pentoz fosfat metabolik yolu (39).

NADPH hücrede yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksidlerin indirgenmesinde görev alır (40). Eritrositlerde pentoz fosfat yolu okside glutatyonun indirgenmesi için gerekli NADPH'yı sağlar. Redükte glutatyon (GSH) ve GSH bağımlı enzimler hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) korur (41). Fagositlerde oksijen tüketimi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu fazla olduğundan pentoz fosfat yolunun aktivitesi de yüksektir. Ksenobiyotikler, glutatyon peroksidaz, sitokrom p450 detoksifikasyon sistemleri ile NADPH kullanılarak metabolize edilir (42).

### 2.3.1. G6PD'ın Klinik Önemi

G6-PD eksikliği yaygın olarak Afrika ve Asya'nın tropikal ve subtropikal bölgeleri, Orta Doğu ve Akdenizin bazı bölgelerinde görülen yaklaşık olarak 400 milyondan fazla sayıda insanı etkileyen bir enzim hastalığıdır (43). G6-PD eksikliği, keşfinden sonraki ilk 10 yılda daha çok klinik olarak incelenmiş, daha sonraki yıllarda ise enzimin çeşitli varyantları araştırılmaya başlanmıştır. Son 10 yılda ise enzim eksikliğine neden olan çeşitli mutasyonlar DNA düzeyinde incelenmektedir (45).

G6-PD enzimini kodlayan gen 13 ekzon ve 12 intron bölgesinden oluşur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bu gen bölgesinde 100 farklı nokta mutasyonu tanımlanmış ve 400'den fazla anormal varyant klinik olarak saptanmıştır (46,47). Bu mutasyonlar çoğunlukla enzimin substrat bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitleri etkilemekte ve enzimin aktivite göstermesi için gereken protein katlanmalarına ve dimerizasyonuna engel olmaktadır(48). G6-PD eksikliğinin en önemli belirtileri neonatal sarılık, favizm ve hemolitik anemidir. Enzimin şiddetli eksikliğinde ise kronik nonsferositik anemi görülmektedir (47).

### 2.3.2. G6PD Enzim Eksikliğinin Diğer Etkileri

G6-PD eksikliğinin hücrede oksidatif stresin artmasına, aynı zamanda NO üretiminin azalmasına neden olarak hipertansiyon, diabetes mellitus ve ateroskleroz gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (49). Hücrede oksidatif hasarların neden olduğu yaşlanma ve kanser gibi hastalıklar da G6-PD eksikliğinin bir sonucu olarak düşünülmektedir (50). Enzim eksikliği görülen hastalarda kalp ameliyatlarından sonra daha uzun ventilasyon süresi, şiddetli "hipoksi, artan hemoliz gözlenmekte ve daha fazla kan nakline ihtiyaç duyulmaktadır(51). Bakteriyel ve viral infeksiyonlar oksidatif metabolitleri üretmesinden dolayı hemolize neden olmaktadır. Hepatit A ve hepatit E'li hastalarda enzim eksikliğinin şiddetli hemoliz meydana getirdiği belirtilmiştir(52).



#### **2.3.4. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz İnhibitöleri**

G6-PD ile yapılan kinetik çalışmalarda enzim aktivitesini etkilediği bazı ara bileşiklerden, metal iyonlarından ve bazı ilaçlardan etkilendiği tesbit edilmiştir. Kadmiyum ve kadmiyum klorürün yapılan çalışmalarda G6-PD aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. İnsan eritrosit G6-PD enzim aktivitesi üzerine amoksisilin sodyum, penisilin G sodyum ve bu tür antibiyotikler üzerine in vitro etkisi araştırılmış inhibisyon yapıcı oldukları gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli antipiretik ve analjezik maddelerde G6PD enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Sığır eritrositlerinden saflaştırılan G6-PD enzimi üzerine ATP, ADP, NADPH ve NADH'ın etkileri incelenmiş sonuç olarak ADP, NADPH ve NADH yarışmalı inhibisyon, ATP'nin ise yarışmasız inhibisyon yaptığı gösterilmiştir (53).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile Tablo 3'te listelenmiştir.

**Tablo 3.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

<b>Kullanılan Malzemeler</b>	<b>Cihaz, Alet ve Marka / Model</b>
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
Etüv	Gallenkamp
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 10-100 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 50-200 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 1-5 mL	Eppendorf
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Soğutucu	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU530, UV /VIS
Vorteks	Nüve, NM 110

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarınm saflık düzeyleri Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Deneyleerde kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı</b>
<b>Asetazolamid</b>	Sigma, A6011
<b>Glukoz 6-Fosfat (G6P)</b>	Sigma, Lot 67h7005
<b>Magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)</b>	Sigma, Ürün kodu: M 9272
<b>Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NADP)</b>	Sigma, Lot 18H7040
<b>Dimetil sülfoksit (DMSO)</b>	Sigma
<b>Tris(hidroksimetilaminometan)</b>	Merck, K3528987
<b>p-nitrofenil aseatat</b>	Sigma, Lot 023K2604
<b>HEPES</b>	Sigma, Ürün kodu: A 5888
<b>Karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>)</b>	Ticari olarak elde edilmiştir.
<b>Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)</b>	Eritrositlerden saflaştırılmış
<b>Sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	Carlo-Erba, %96, (d=1.84 g/ml) no: 306657
<b>Sodyum hidroksit (NaOH)</b>	Merck, > % 99 (6462)
<b>Hidroklorik asit (HCl)</b>	Carlo Erba, % 37, d=1.186 (7647-01-0)
<b>Ciglitazone</b>	Sigma, Lot 035K1026 >=% 99
<b>Vancomycin</b>	Sigma
<b>Sodyum klorür (NaCl)</b>	Merck, % 99.5-100.5 (1.06400.1000)
<b>İnsan Karbonik Anhidraz II (CA II)</b>	Sigma, Lot 078K6276 Eritrositlerden saflaştırılmış

Deneylerde kullanılan çözeltiler ve bunların hazırlanışlarıyla ve hangi amaçla kullanıldıkları liste halinde Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

<b>Çözelti</b>	<b>Hazırlanışı ve Kullanıldığı Yer</b>
<b>1 M NaOH</b>	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
<b>1 M HCl</b>	13M stok HCl'den 7,7 mL alındı 80 mL saf suda biraz karıştırıldıktan sonra son hacim 100 mL tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
<b>1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	18M stok H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 'den 5,5 mL alındı 80 mL saf suda biraz karıştırıldıktan sonra son hacim 100 mL tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
<b>33 mM G6P</b>	931 mg glukoz 6 fosfat kolay oksitlendiği için hızlı bir şekilde tartılıp 100 mL saf suda çözüldü. G6-PD aktivite tayininde kullanıldı.
<b>0,63 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,28 g MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O tartılıp ve 100 mL saf suda çözüldü. G6-PD aktivite tayininde kullanıldı.
<b>0,5 M Tris-HCl tamponu</b>	6,05 g Tris bazı tartılıp 80 mL saf suda çözüldü ve pH=7,5 olana kadar HCl ilave edildi son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı. G6-PD aktivite tayininde kullanıldı.
<b>3,8 mM NADP</b>	0,29 g NADP (sodyum tuzlu) tartılıp ve 100 mL saf suda çözüldü. G6-PD aktivite tayininde kullanıldı.
<b>Doygun CO<sub>2</sub> Substrat çözeltisi</b>	100 mL saf su içeren bir erlen CO <sub>2</sub> gazı ile 30 dk boyunca doyurularak hazırlandı. Karbonik anhidrazın aktivite ölçümü için kullanıldı.
<b>HEPES Tamponu</b>	6,51 g HEPES tartılıp 850 mL saf suda çözüldü. pH=8,8 olana kadar 1 M HCl ile titre edildi ve son hacim 1000 mL tamamlandı. Karbonik anhidrazın aktivitesi için kullanıldı.
<b>Ciglitazone (15 mM)</b>	5 mg'lık stok ciglitazone 1 mL %100'lük DMSO'da çözüldü. Seyreltmeler % 10 luk DMSO ile yapıldı.
<b>0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> Tamponu</b>	6,057g Tris yaklaşık 900 mL deiyonize suda çözülerek 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile pH=7,00' a ayarlandı. Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde kullanıldı.
<b>3 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi</b>	27,2 mg p-nitrofenil asetat 1mL asetonda çözüldükten sonra karışmakta olan 49 mL deiyonize suya eklendi. Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde substrat olarak kullanıldı ve çalışma günü taze olarak hazırlandı.
<b>1mM asetazolamid çözeltisi</b>	0,0111 g asetazolamid tartıldı 7,5mL %10'lük DMSO ile çözüldü ve tamponla beraber son hacim 50 mL tamamlandı. CA II aktivitesini inhibe etmek için kullanıldı.
<b>0,07 mM Vancomycin</b>	10 mg vancomycin %10 DMSO içeren Tris-HCl de çözüldü. G6-PD inhibe etmek için kullanıldı.

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson metodu ile ölçüldü (34). 2,6 mL HEPES tamponunun (pH=8,80) üzerine 0,1 mL enzim ve kör olarak 0,1 mL % 10'luk DMSO (Ciglitazone DMSO da çözüldüğü için) konuldu. Daha sonra substrat olarak doygun haldeki CO<sub>2</sub> çözeltisinden 2,2 mL ilave edildi. Oluşan CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8,20'den 7,00'e düşüşü pH metre ile takip edildi ve geçen süre ölçüldü. Her bir ölçüm üç defa tekrarlanıp ortalama değerler bulundu. Enzim birimi, enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyonu süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlendi.

$$\text{Wilbur-Anderson Unit (E.U)} = (t_0 - t_c) / t_c$$

Burada ;

EU : Enzim ünitesi

t<sub>0</sub> : Enzimsiz denemede ölçülen süre

t<sub>c</sub> : Enzim varlığında ölçülen süre

#### 3.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Üzerine Ciglitazone Etkisi

Ciglitazonun CA II hidrataz aktivitesi üzerine etkisi incelemek için deney tüplerine 2,6 mL HEPES tamponu (pH=8,80), 0,1 mL CA II ve 0,1 mL 0,04 mM, 0,02 mM, ve 0,01 mM ciglitazone ilave edildi. On dakika inkübasyondan sonra üzerine 2,2 mL substrat çözeltisi (doygun CO<sub>2</sub>) eklendi. pH'nın 8,20 den 7,00 düşüşü pH metre ile takip edilirdi ve geçen süre ölçüldü. Aynı işlemler CA II inhibitörü olan asetazolamid



### 3.2.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini

CA esteraz aktivitesi Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen karbonik anhidrazın *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenol ve asetata hidrolizlemesi esasına dayanan metod ile ölçüldü(37). Oluşan *p*-nitrofenolün absorbansı 348 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek CA aktivitesi tayin edildi. Reaksiyon denklemi şu şekildedir:



CA II aktivitesi tayin işlemleri için; önce, her bir CA II toplam esteraz aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla, deney tüplerine 1,2 mL Tris-SO<sub>4</sub> tamponu, 0,3 mL CA II ve 0,3 mL su konularak oda sıcaklığında iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 1,2 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edildi ve karışım 3mL hacimli spektrofotometre küvetine alınarak hemen 348 nm’de 3 dakika boyunca absorbansı okundu. Başlangıçta ve 3 dakika sonunda okunan absorbanslar arası fark esteraz aktivitesi olarak belirlendi. Her bir deney üç kez tekrarlandı.

#### 3.2.2.1. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Üzerine Ciglitazonun Etkisi

Ciglitazonun CA II esteraz aktivitesi üzerine etkisi incelemek için, deney tüplerine 1.2 mL Tris-sülfat tamponu, 0,3 mL CA II ve 10µL 0,05 mM, 0,025 mM ve 0,0125 mM ciglitazone ilave edildi. Bu karışım on dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra üzerine 1,2 mL substrat çözeltisi eklendi ve küvet hacmi 3 ml olana kadar saf su ilave edilerek hemen 348 nm’de 3 dakika absorbansları okundu. Aynı deneyler CA II inhibitörü olan asetazolamid içinde uygulandı. 1,2 mL Tris-sülfat tamponuna, 0,3 mL CA II ve 10µL, 0,0033 mM, 0,0016 mM ve 0,0008 mM asetazolamid ilave edilerek aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir ölçüm 3 defa tekrarlandı. İlk aşamada bulunan esteraz aktivitesi değerinden ikinci aşamada bulunan değer çıkarılarak inhibisyon miktarları belirlendi. Esteraz aktivitesi için gerekli reaktifler ve hacimleri Tablo 7’de verilmiştir.





### 3.2.3. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesi Tayini

G6-PD enzim aktivitesi Beutler yöntemine göre ölçüldü(54). Yöntem, glukoz 6 fosfatın G6-PD varlığında 6-fosfoglukolaktona dönüşmesi ve bu dönüşüm sırasında indirgenen NADP'nin 340nm'deki absorbans değişikliğinin 37°C'de belirli bir süre (4 dak) takip edilmesi esasına dayanmaktadır. Ölçüm için gerekli reaktifler ve İnhibitörler hacimleri ile birlikte Tablo 8'de verilmiştir. Burada kullanılan ciglitazone stoktan (15 mM) yola çıkılarak %10 DMSO içeren Tris tamponu ile 100 kat seyreltilerek hazırlandı(0,15mM). Üç farklı konsantrasyonda çalışıldı. Bunlar sırasıyla 0,15 mM, 0,075 mM ve 0,0375 mM olarak belirlendi. Aynı işlemler G6-PD inhibitörü olan vancomycin ile 0,07 mM, 0,035 mM ve 0,017 mM konsantrasyonunda da gerçekleştirildi ve aşağıdaki formül kullanılarak enzim aktivitesi (U/L) hesaplandı.

$$A = \Delta A / 6,22 \times V_T / V_E$$

$$A = \text{Litre başına enzim ünitesi(EU/L)}$$

$$OD = 340 \text{ nm'de optik dansitenin değişimi}$$

$$V_T = \text{Toplam küvet hacmi}$$

$$V_E = \text{Enzim çözeltisinin hacmi}$$

6,22= 1 cm'lik küvet yolunda 1m M NADPH'm oluşturduğu absorbans degeri(milimolar ekstinksiyon katsayısı)

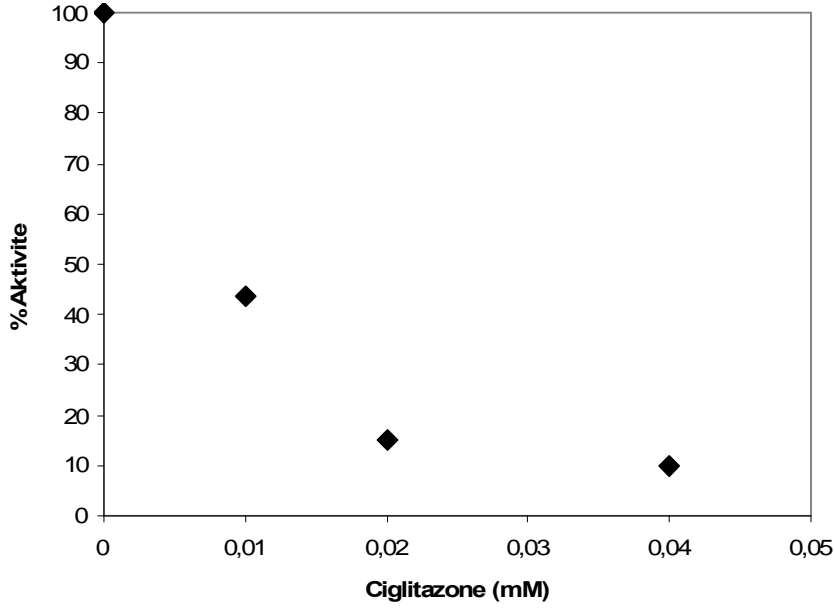
Her bir ölçüm 3 kez tekrar edildi ve ilk inhibitörsüz ortamda elde edilen aktivitelere inhibitör varlığında ölçülen aktiviteler çıkarılarak inhibisyon miktarları belirlendi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. CA II Hidrataz Aktivitesi sonuçları

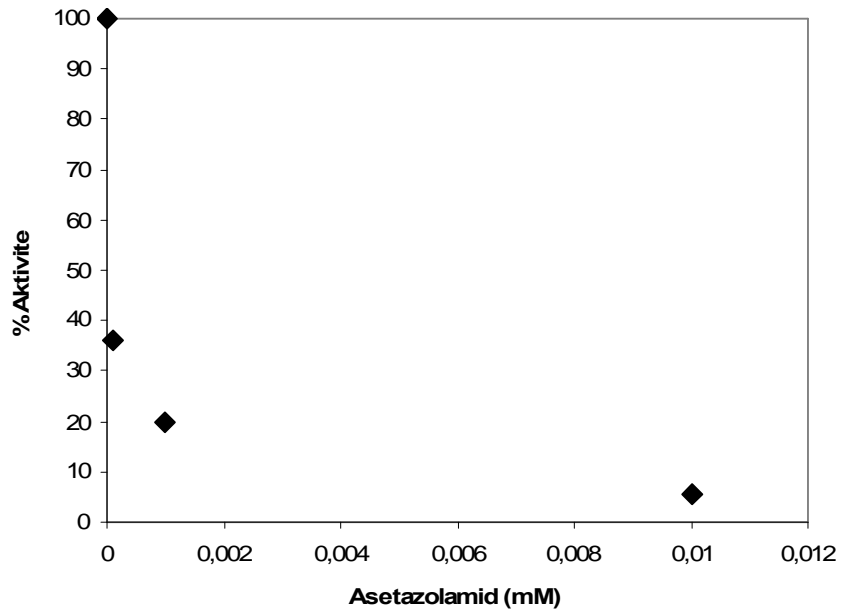
Ciglitazone ve asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi üzerine in vitro etkisi farklı konsantrasyonlarda inhibitör çözeltisinin kullanılarak belirlendi. Yapılan deneyler sonuçunda, ciglitazonun hidrataz aktivitesini inhibe ettiği gözlendi. Deneylerin doğruluğunu test etmek için kullanılan asetazolamidle mukayese edildiğinde ciglitazonun daha zayıf bir inhibisyona sebep olduğu gözlendi. Elde edilen inhibisyon grafikleri ve  $IC_{50}$  değerleri Şekil 6 ve Şekil 7' de, oranları Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 6. Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ( $IC_{50} = 0,0063$  mM).

**Tablo 9.** Ciglitazonun CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları.

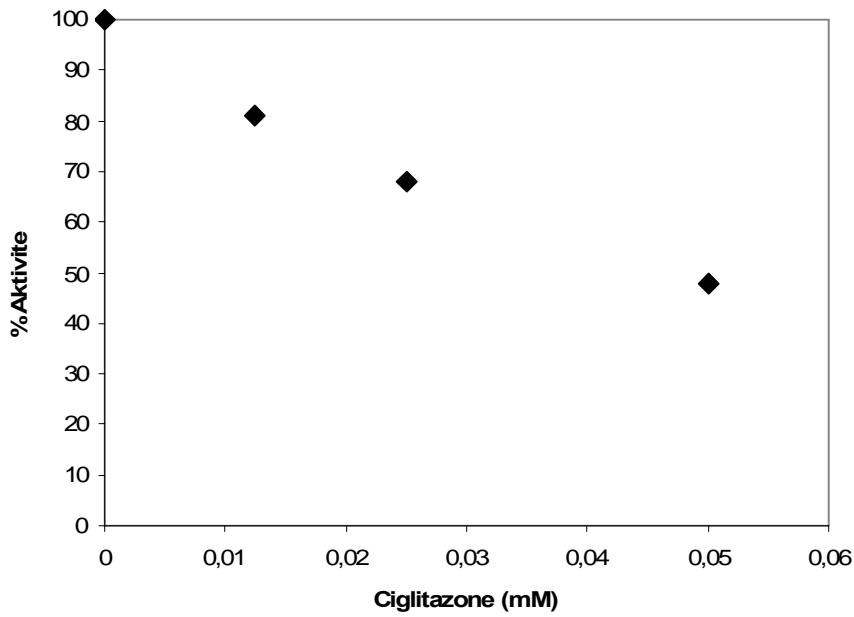
Ciglitazone (mM)	Enzim Ünitesi(EÜ) n = 3	% Aktivite
0	3,6 ± 0,158	100
0,01	1,58 ± 0,092	43,8
0,02	0,54 ± 0,031	15
0,04	0,44 ± 0,021	12

**Şekil 7.** Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik (  $IC_{50} = 0,00044$  mM ).**Tablo 10.** Asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları

Asetazolamid (mM)	Enzim Ünitesi(EÜ) n = 3	% Aktivite
0	3,6 ± 0,129	100
0,0001	1,28 ± 0,079	36
0,001	0,714 ± 0,054	19,8
0,01	0,20 ± 0,012	5,6

#### 4.2. CA II Esteraz Aktivitesi sonuçları

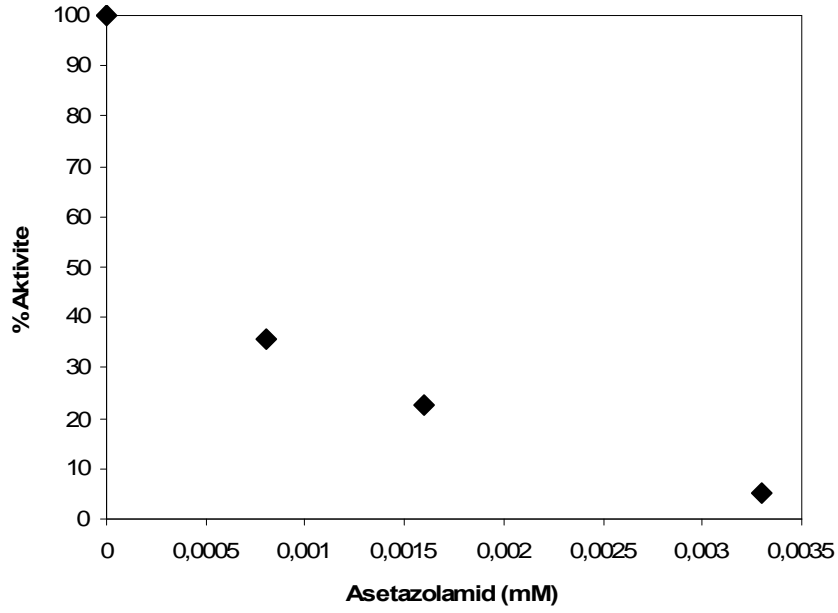
Ciglitazonun CA II esteraz aktivitesi üzerine in vitro etkisi farklı konsantrasyonlarda ciglitazone çözeltisinin belirli hacimlerinde ilave edilmesiyle belirlendi. Ciglitazonun esteraz aktivitesini hidrataz aktivitesine oranla daha az inhibe ettiği gözlemlendi. Sonuçlar, Şekil 8 ve Şekil 9'daki % Aktivite-[Ciglitazone] grafiğinde ve inhibisyon oranları olarak Tablo 11 ve Tablo 12 de gösterilmiştir.



**Şekil 8.** Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ( $IC_{50} = 0,047$  mM).

**Tablo 11.** Ciglitazonun CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları.

Ciglitazone (mM)	Absorbans(348nm) n=3	% Aktivite
0	$0,378 \pm 0,002$	100
0,0125	$0,306 \pm 0,005$	81
0,025	$0,257 \pm 0,007$	68
0,05	$0,181 \pm 0,002$	48



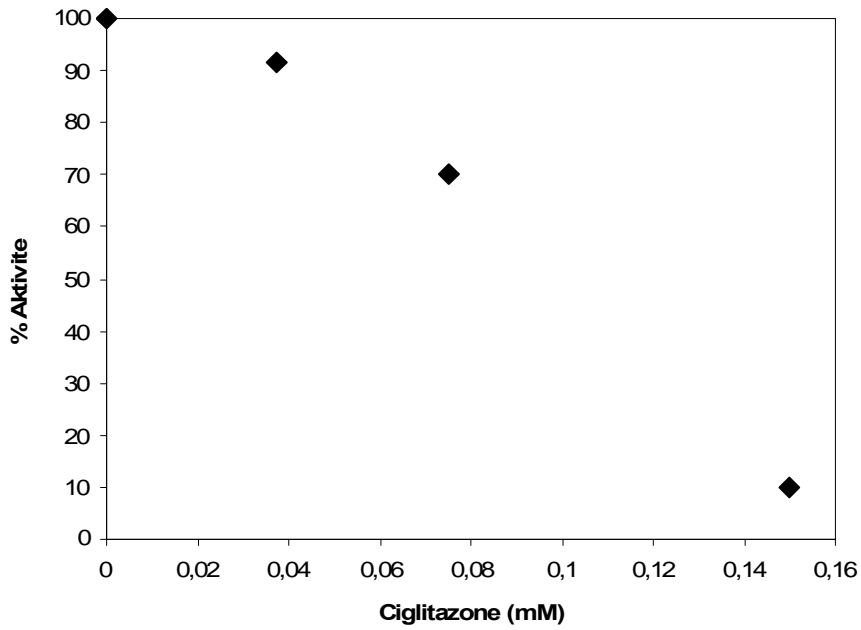
**Şekil 9.** Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ( $IC_{50} = 0,00064$  mM).

**Tablo 12.** Asetazolamidin CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları

Asetazolamid (mM)	Absorbans (348nm) n = 3	% Aktivite
0	$0,378 \pm 0,005$	100
0,0008	$0,128 \pm 0,003$	35,8
0,0016	$0,089 \pm 0,0026$	22,6
0,0033	$0,020 \pm 0,0014$	5,2

### 4.3. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Sonuçları

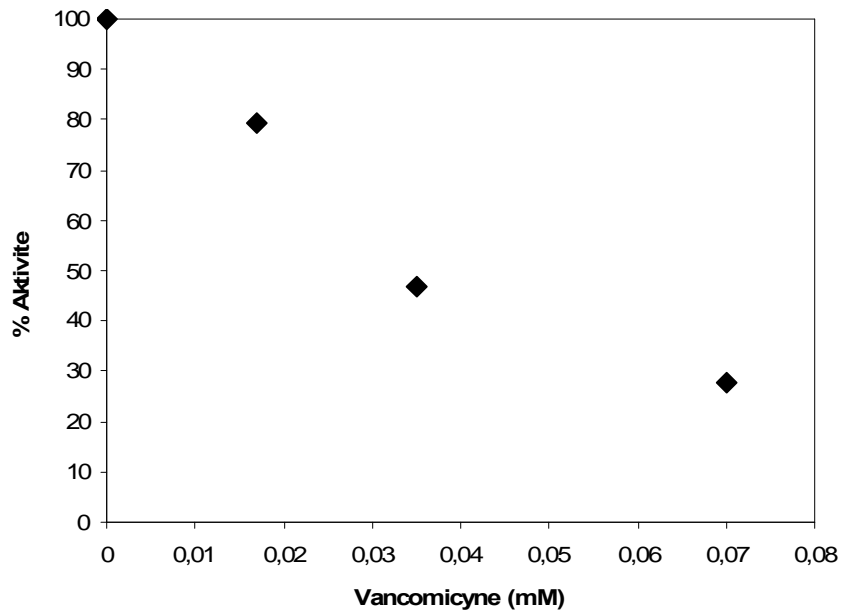
Ciglitazonun G6-PD enzim aktivitesi üzerine in vitro etkisi farklı konsantrasyonlarda ciglitazone çözeltisinin belirli hacimlerinde deney ortamına ilave edilmesiyle belirlendi. Daha önceki çalışmalarda enzimi inhibe ettiği gösterilen vancomycin kontrol olarak ve ciglitazone'nin etkinliğini mukayese etmek için kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan ciglitazone'nin vancomycin'den daha zayıf bir inhibisyon oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 10 ve Şekil 11'de aktivasyon grafikleri, Tablo 13 ve Tablo 14'de inhibisyon oranları verilmiştir.



**Şekil 10.** Ciglitazone konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak G6-PD aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ( $IC_{50} = 0,067$  mM).

**Tablo 13.** Ciglitazonun G6-PD aktivitesi inhibisyon oranları

Ciglitazone (mM)	Enzim Aktivitesi(EU/L) n=3	% Aktivite
0	220 ± 5,541	100
0,0375	201 ± 7,402	96,2
0,075	155 ± 5,495	70
0,15	20 ± 2,270	9,8

**Şekil 11.** Vancomycin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak G6-PD aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ( $IC_{50} = 0,037$  mM).**Tablo 14.** Vancomycinin G6-PD aktivitesi inhibisyon oranları

Vancomicycn (mM)	Enzim Aktivitesi(EU/L)n=3	% Aktivite
0	220 ± 4,11	100
0,07	175 ± 3,09	79,5
0,035	103 ± 1,84	46,8
0,017	61 ± 0,78	27,7



## 5. TARTIŞMA

TZD grubu ilaçlar hipoglisemik etkilerinden dolayı insulin dirençli ve tip 2 DM tedavisinde kullanılan bileşiklerdir. Etki mekanizmaları tam anlaşılmamış olmakla birlikte etkinliklerini PPAR  $\gamma$  üzerinden çeşitli enzimlerin gen ekspresyonlarını düzenleyerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Bu ilaçların piyasa sürülmesi ile birlikte insan sağlığı üzerindeki olumsuz yan etkileri bildirilmiş ve ticari olarak piyasa sürülen ilk TZD olan tiroglitazon hepatotoksik etkisinden dolayı piyasadan çekilmiştir. Pioglitazon ve resiglitazon gibi yeni nesil TZD ler diabet tedavisinde kullanılmakla beraber, daha yüksek oranda miyokardial iskemi oluşturma riski olduğu FDA tarafından bildirilmiştir. Bilinen bu yan etkinin yanı sıra bu grup ilaçların homodilüsyon, anemi, kilo alma, ödem gibi yan etkileri de vardır (2,3,25).

CZ, 1982 yılında Takada Ltd tarafından hipolipidemik ilaç araştırmaları sırasında tesadüfen hipoglisemik etkisi bulunmuş bir bileşiktir. CZ ilk keşfedilen TZD olmasına rağmen yan etkileri ve antidiabetik etkinliğini daha sonradan geliştirilen TZD lerden düşük olması sebebiyle ticari olarak kullanıma girmemiştir. Ancak, TZD grubu ilaçların etkinliğinin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde referans olarak birçok araştırmada kullanılmıştır (25).

CZ nin anemi yapıcı özelliklerinin araştırılmasında, özellikle kemik iliğinde kan üretiminin gen seviyesinde baskılanmasını inceleyen çalışmalar yapılmış ancak bu ilaçların kemik iliği üzerine etkiliğini gösteren bir sonuca ulaşılammıştır. Yapılan çalışmalar TZD lerin gen ekspresyonunu etkileyerek değiştirebileceği metabolik süreçler üzerine yoğunlaşmış ancak, bugüne kadar bu ilaçların kendi kimyasal yapılarına özgü enzim inhibisyon ya da aktivasyon çalışmaları yapılmamıştır. CZ ve prostaglandin J nin eritrosit ölümü (eryptosis) üzerine etkilerini inceleyen bir araştırmada, CZ uygulanan grupta eritrosit içi  $Ca^{2+}$  miktarının arttığı ve bununda hücre

ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. Ancak, bu hücrelerde çekirdek olmadığı için eritrosit bütünlüğünde önemli bazı metabolik yolların CZ tarafından PPAR  $\gamma$  bağımsız olarak etkilendiği ileri sürülmüştür (55). Eritrositler çekirdeklerinin olmamasından dolayı buldukları ortamdaki değişikliklere gen seviyesinde cevap veremezler. Enzim aktivitelerini etkileyen bileşikler eritrositlerin fonksiyonlarını yerine getirmesinde ve hücre bütünlüğünün korunmasında problemlere sebep olurlar. Bu tez çalışmasında eritrosit yapı ve fonksiyonlarının korunmasında önemli olan CA II ve G6PD enzimleri üzerine bir TZD olan CZ nin etkileri incelenmiştir. Eritrositlerde yer alan bu iki enzim, eritrositlerin canlılığının sürdürülmesi için hayati öneme sahip oldukları için seçilmiştir.

Bileşiklerin inhibisyon etkisini tespit etmek için  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerlerinden yararlanılmaktadır.  $K_i$  değeri daha hassas olmakla beraber,  $IC_{50}$  değeri hesaplamasındaki kolaylıktan dolayı inhibisyon etkinliğinin karşılaştırılmasında pratikte daha sık kullanılmaktadır. CZ nin insan eritrositlerinden saflaştırılmış CA II nin hem esteraz hem de hidrataz aktivitelerini üzerine olan etkisi Şekil 6, Şekil 8 ve Tablo 9, Tablo 11 gösterilmiştir. CZ her iki aktiviteyi de inhibe etmiştir. Hidrataz aktivitesi üzerine olan inhibisyonu ( $IC_{50} = 0,0063$  mM) esteraz aktivitesi üzerine olan inhibisyonundan ( $IC_{50} = 0,047$  mM) daha kuvvetlidir. CA inhibisyon çalışmalarının çoğunda inhibitörlerin etkinlikleri güçlü bir CA inhibitörü olan astazolamid ile karşılaştırılmaktadır. CZ asetazolmid ile karşılaştırıldığında CA II nin hidrataz aktivitesi inhibisyonu için 10 kat (asetazolamid için  $IC_{50} = 0,00044$  mM), esteraz aktivitesi inhibisyonu için ise yaklaşık 100 kat (asetazolamid için  $IC_{50} = 0,00064$  mM) daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 7 ve Şekil 9). CA nın bugüne kadar tanımlanan fonksiyonlarının tamamı hidrataz aktivitesi ile ilgilidir. Dolayısıyla, CZ nin yaptığı inhibisyon CA II nin fonksiyonlarını değerlendirilmesinde önemli olabilir. CA II eritrositlerde  $CO_2$  in  $HCO_3^-$  dönüşüp taşınması ve akciğerlerde atılmasının yanı sıra çeşitli membran proteinleri ile birleşerek yaptığı metabolonlarla eritrosit membranlarından iyon geçişini ve asit-baz dengesini düzenlemektedir (28). Bu fonksiyonların inhibe olması eritrositlerin fonksiyonlarını yerine getirilmesini ve hücre

bütünlüğünü bozar. Ayrıca, Asetazolamidin alveolar ventilasyonu bozulmuş olanlarda, pulmoner tıkanması ya da amfizemi olan hastalarda ciddi anlamda metabolik asidozu ağırlaştırdığı bilinmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda CZ nin de dahil olduğu TZD grubu ilaçların bu hastalarda kullanımında ya da sistematik olarak asetazolamid kullanımı (diüretik olarak) sırasında bu ilaçla birlikte kullanımında metabolik asidoz bakımından dikkatli olunmalıdır. Ancak, CA inhibisyonuna sebep olan birçok bileşiğin hücre membranlarından difüzyonu arasında ciddi farklılıklar bulunmaktadır (36). Her ne kadar CZ, CA II inhibisyonuna sebep oluyorsa da, bu bileşiğin eritrosit membranlarından difüzyon yeteneğini ve tedavi dozunun CA II inhibisyonu üzerindeki etkinliğini araştıran çalışmalarla elde ettiğimiz sonuçlar desteklenmelidir.

CA nin esteraz aktivitesi ölçümü, fizyolojik bir önemi olmamasına rağmen, hem spektrofotometrik bir yöntem olması hem de tekrarlanabilirliğinin iyi olması nedeniyle bir çok kinetik çalışmada araştırmacılar tarafından tercih edilen bir yöntem olmuştur (33). Bu çalışmada, CZ nin CA II nin esteraz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak elde edilen  $IC_{50}$  değerleri bir birinden yaklaşık 10 kat farklıdır (hidrataz aktivitesi için  $IC_{50} = 0,0063$  mM, esteraz aktivitesi için  $IC_{50} = 0,047$  mM). Bu sonuç her iki aktivitenin de reaksiyon mekanizmalarının ve substrat bağlama bölgelerinin farklı olmasına bağlanabilir.

CZ nin insan eritrositlerinden saflaştırılan G6-PD enzimini üzerine etkileriyle ilgili sonuçlar Şekil 10 ve Tablo 13’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre CZ, G6-PD aktivitesini inhibe etmiştir. Daha önceki çalışmalarda G6-PD yi inhibe ettiği gösterilen vancomycin ile ilgili sonuçlar Şekil 11 ve Tablo 14’ de verilmiştir. Vancomycin ( $IC_{50} = 0,037$  mM) ile mukayese edildiğinde CZ nin ( $IC_{50} = 0,067$  mM) daha zayıf bir inhibitör olduğu görülmektedir. G6-PD eksikliği dünya üzerinde en sık rastlanan enzim eksikliğidir. Bu enzim eksikliğine bağlı olarak görülen belirtilerden biride hemolitik anemidir. G6-PD eritrositlerde indirgen güç olarak kullanılan NADPH ın tek kaynağıdır. NADPH eritrosit membran bütünlüğünün ve fonksiyonlarını korunmasında oldukça önemlidir. NADPH miktarındaki azalma eritrositleri daha frajil hale

getirmekte ve anemiye yatkınlık meydana gelmektedir (51). G6-PD eksikliği olguların çoğunda mutlak bir enzim eksikliği yerini, belirli bir oranda aktivitesini kaybetmiş mutan enzim vardır. Enzim eksikliği genellikle dışarıdan alınan yabancı maddelerin aktivitesi düşük olan enzimi daha da inhibe etmesi ile görülmektedir. Özellikle antibiyotikler, anti-malaria ilaçları, antipiretikler ve fava bitkisinin yenilmesi ile G6-PD eksikliğine bağlı bulgular ciddi olarak kendini göstermektedir (53). Bu yüzden ilaç olarak kullanılan maddelerin G6PD üzerine etkilerinin araştırılması bu enzim eksikliği olan kişilerde ilgili ilaçların kullanımının düzenlenmesinde önemlidir. CZ nin G6PD üzerine yaptığı inhibisyonun anemi oluşturmadaki etkinliği önemli bir bulgu olmakla beraber daha önceden bahsettiğimiz gibi CZ nin ilaç olarak kullanılmıyor olması sonuçların pratikte uygulanması yönünden sıkıntılıdır. Ancak, bu sonuçlar TZD grubu ilaçların kullanımında gözlenen anemi için hedef bir enzim ortaya koyması bakımından önemlidir. Piyasada kullanılan farklı TZD lerin G6-PD üzerine inhibisyon etkileri ve doza bağımlı ozmotik frajilite çalışmaları yapılması ile elde ettiğimiz bu sonuçlar desteklenmelidir.

Sonuç olarak, CZ nin eritrosit fonksiyon ve bütünlüğünden sorumlu olan CA G6-PD üzerine inhibe edici bir özelliğinin olduğuna ve TZD grubu ilaçların kullanımında gözlenen aneminin bu enzimlerin inhibisyonuna bağlı olabileceğine ancak, elde edilen bu verilerin eritrositler üzerinde yapılacak osmatik frajilite ve in vivo deneylerle desteklenmesi gerektiği kanaatine varıldı.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Ciglitazone'nun insan karbonik anhidraz II (CA II) enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ile insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Ciglitazone CA II'nin hidrataz aktivitesini azalttığını, dolayısıyla, bu enzim üzerine inhibisyon etki gösterdiği bulunmuştur.

2. Ciglitazone hCA II'nin esteraz aktivitesini azalttığını, dolayısıyla, bu enzim üzerine inhibisyon etki gösterdiği bulunmuştur.

3. Ciglitazone insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesini azalttığı, dolayısıyla, bu enzim üzerinde de inhibisyon etki yarattığı bulunmuştur.

### 6.2.Öneriler

1. Ciglitazone dışındaki diğer tiazolidinediyon grubu maddelerin üzerine bu enzimlerin etkisi incelenebilir.

2. Ciglitazone'nun benzer şartlarda in vivo olarak ta etkisi aynı enzimlerle araştırılabilir.

## 7. ÖZET

### **Ciglitazonun Glukoz 6-Fosfat Fehidrojenaz ve Karbonik Anhidraz II enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi**

Ciglitazone (CZ) thiazolidinedione (TZD) sınıfına ait hipoglisemik bir bileşiktir. Diğer TZD grubu ilaçlar gibi CZ de anemiye sebep olmaktadır. Bu çalışmada ciglitazonun eritrosit fonksiyonlarının ve bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli olan Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6-PD) ve Karbonik Anhidraz II (CA II) enzim aktivitelerine olan etkileri in vitro olarak incelendi.

Aktivite ölçümleri saf olarak temin edilen insan eritrosit karbonik anhidraz II ve Glukoz 6 Fosfat dehidrogenaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirildi. Karbonik Anhidraz için hem esteraz hem de hidrataz aktiviteleri ölçüldü

Aktivite ölçümleri sonucunda, CZ nin CA II aktivitesini ve G6-PD aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi ve bu enzim inhibisyonlarının CZ nin anemi oluşturma mekanizmalarında önemli olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler:Karbonik Anhidraz II, Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz, Ciglitazone, PPAR  $\gamma$

## **8. SUMMARY**

### **Investigation of the effects of Ciglitazone on enzyme activities of glucose 6 phosphate dehydrogenase and carbonic anhydrase II**

Ciglitazone is a hypoglycemic compound belonging to thiazolidinediones class. It also causes anemia like other thiazolidinediones. In this study, effects of ciglitazone on in vitro activities of carbonic anhydrase and glucose 6 phosphate dehydrogenase which have significant roles in maintaining the erythrocyte function and integrity were investigated.

The activity measurements were performed by using pure human erythrocyte carbonic anhydrase II and glucose 6 phosphate dehydrogenase. Both hydratase and esterase activities were determined for carbonic anhydrase II.

After the activity measurements, it was seen that ciglitazone inhibited both carbonic anhydrase and glucose 6 phosphate dehydrogenase activities and it was concluded these enzyme inhibitions may be important to explain the mechanism of anemia caused by ciglitazone

Key words: carbonic anhydrase II, glucose 6 phosphate dehydrogenase, ciglitazone, PPAR  $\gamma$

## 9. KAYNAKLAR

1. Dubois M., Pattou F., Kerr-Conte J., et al.: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR  $\gamma$ ) in normal human pancreatic islet cells, *Diabetologia* 2000; 43:1165-1169.
2. Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., et al.: PPAR  $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein, *Journal of American Diabetes Association* 2001; 50:2094-2099
3. Maren, T.H.: Carbonic Anhydrase, Physiology and Inhibition, *Physiological Reviews* , 1967;47: 595-781.
4. Supuran, C.T., Scozzafava A.: Carbonic Anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007; 15:4336-4350.
5. Mehta A., Mason PJ., Vulliamy TJ.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillière's Best Practice & Research, Clinical Haematology* 2000; 13:21-38.
6. Krebs HA., Eggleston LV.: The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver. In: Weber G (ed). *Advances in Enzyme Regulation*. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1978; 12:421-33.
7. Wood T.: Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms, *Cell Biochemistry and Function*1986; 4:235-40.
8. Pershadsingh HA., Szollosi J., Benson S., Hyun WC., Feuerstein BG., Kurtz TW.: Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism, *Hypertension* 21 (6 Pt 2): June 1993; 1020-3.
9. Hulin B., McCarthy PA., Gibbs EM.: The ciglitazone family of antidiabetic agents, *Current Pharmaceutical Design* 2: 1996; 85-102.



10. Miyazaki Y., Glass L., Triplitt C., et al.: Effect of rosiglitazone on glucose and nonesterified fatty acid metabolism in Type 2 diabetic patients, *Diabetologia* 2001; 44:2210-2219
11. Day C.: Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs, *Diabetic Medicine* 1999; 16:179-192
12. Law RE., Meehan WP., Xi XP., et al.: Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia, *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98:1897–1905
13. Gregory A., Knock, Santosh K., Mishra, Philip I.: Aaronson Differential effects of insulin-sensitizers troglitazone and rosiglitazone on ion currents in rat vascular myocytes, *European Journal of Pharmacology* 1999; 368:103–109.
14. Schoonjans K., Auwerx J.: Thiazolidinediones: an update, *Lancet* 2000; 355:1008-1010.
15. DeFronzo R.: Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus, *Annals of Internal Medicine* 1999; 131:281-303.
16. Defronzo R.: Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus (Letter), *Annals of Internal Medicine* 2000; 133:73-74.
17. Kumar S., Boulton AJM., Beck-Nielsen H., Berthezene F., Muggeo M., Persson B., Spinass GA., Donoghue S., Lettis S., Stewart-Long P.: Troglitazone, an insulin action enhancer, improves metabolic control in NIDDM patients, *Diabetologia* 1996; 39:701-709.
18. Inzucchi SE., Maggs DG., Spollett GR., Page SL., Rife FS., Walton V., Shulman GI.: Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus, *The New England Journal of Medicine* 1998; 338:867-872.
19. Ogihara T., Rakugi H., Ikegami H., Mikami H., Masuo K.: Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives, *American Journal of Hypertension* 1995; 8:316-320

20. Ghazzi MN., Perez JE., Antonucci TK., Driscoll JH., Huang SM., Faja BW., Whitcomb RW.: Cardiac and glyceimic benefits of troglitazone treatment in NIDDM. the Troglitazone Study Group, *Diabetes* 1997; 46:433-439.
21. Claudi T., Starkie M., Frith L., et al.: Troglitazone improves cardiovascular risk profile comparedwith glibencamide, *Diabetic Medicine* 1997; 14(suppl 4):530
22. Imano E., Kanda T., Nakatani Y., Nishida T., Arai K., Motomura M., Kajimoto Y., Yamasaki Y., Hori M.: Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy, *Diabetes Care* 1998; 21:2135-2139.
23. Kelly IE., Han TS., Walsh K., Lean ME.: Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 1999; 22:288-293.
24. Cavaghan MK., Ehrmann DA., Byrne MN., Polonsky KS.: Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves  $\beta$ -cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance, *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:530-537.
25. Viljoen A., Sinclair A., Safety and efficacy of rosiglitazone in the elderly diabetic patient, *Vascular Health and Risk Management* 2009; 5 389-395
26. Bermand Hulin., Peter A., Mc Carthy and e.Micheal Cibss., The Glitazone family of antidiabetic Agents , *Current Pharmaceutical Design.*, Volume .2., Number . 1 , February 1996; 85-102
27. Pocker, Y.: Molecular Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel Inhibitors. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botre, F., Storey, B. T., Gros, G., (Eds.) Wienheim, VCH Pulishers, pp 1991; 75-85.
28. Careter, M.J.: Carbonic Anhydrase: Isoenzymes Properties, Distrubition and Functional Significore, *Biological Review*, 1972; 42:462-475,
29. Robyt, J.F., White, B.J.: *Biochemical Techniques Theory and Practise*, Press Inc., 1990; s.95

30. Sly, S.W., Hu, Y.P.: Human Carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Review of Biochemistry* 1995; 64: 375-401,
31. Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F.: The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion, *Experimental Eye Research* 1983; 33: 457.
32. Epstein, D.L., Grant, W.M.: Carbonic Anhydrase Inhibitors Side Effects; Serum Chemical Analysis, *Archives of Ophthalmology* 1977; 85:1387,.
33. Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C.: Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2004,19:199-229,
34. Wilbur, K.M., Anderson, N.G.: Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase, *Journal of Biological Chemistry* 1948; 76: 146.
35. Maren, C.H.: Simplified Micromethod for the Determination of Carbonic Anhydrase and its Inhibitors, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1960;130:26.
36. Conroy, C.W., Maren T.H.: The Determination of Osteopetrotic Phenotypes by Selective Inactivation of Red Cell Carbonic Anhydrase Isoenzymes, *Clinica Chimica Acta* 1985; 15:3347.
37. Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T.: Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C, *The Journal of Biological Chemistry* 1967;12 (18):4221-29.
38. Koester, M.K., Pullan, L.M., Noltmann, E.A.: The p-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1981; 211 (2):632-42.
39. Tandoğan B. Tez danışmanı: Doç. Dr. N. Nuray Ulusu. Kuzu böbrek korteksinden, glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2004.

40. Nelson DL., Cox MM.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. USA: Worth Publishers 2000; 743-4.
41. Siems WG., Sommerburg O., Grune T.: Erythrocyte free radical and energy metabolism, *Clinical Nephrology* 2000; 53(Suppl 1):9-17.
42. Hollenberg PF.: Mechanisms of cytochrome p-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism, *The FASEB Journal* 1992; 6: 686-94.
43. Leninger AL., Nelson DL., Cox MM., *Principles of Biochemistry*. 3rd Ed., New York : Worth Publishers 2000; 783-5.
44. Fiorelli G., Montemuros F., Cappellini M.: Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with G6PD variants, *Baillière's Clinical Haematology* 2000; 13:39-55.
45. Beutler E.: Study of G-6-PD history and molecular biology, *American Journal of Hematology* 1993; 42:53- 8.
46. Cheney CA., Lee A.: Sequence of human G-6-PD cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome (yac), *Genomics* 1991; 10:79-86.
47. Salvati AM., Maffi D., Caprari P., Pasquino MT., Caforio MP., Tarzia A.: Glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency and hereditary hemolytic anemia, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 1999; 35:193-203.
48. Gomez-Gallego F., Garrido-Pertierra A., Mason PJ., Bautista JM.: Unproductive folding of the human G6PD-deficient variant A-, *The FASEB Journal* 1996; 10:153-8.
49. Gaskin RS., Estwick D., Peddi R.: G-6-PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethnicity & Disease* 2001; 11:749-54.
50. Ann-Joy C., Daniel TC., Lai-Chu S.: Poor prognosis in nasopharyngeal cancer patients with low G6PD activity, *Japanese Journal of Cancer Research* 2001; 92:576-81.

51. Gerrah R., Shargal Y., Elami A.: Impaired oxygenation and increased hemolysis after cardiopulmonary bypass in patients with G6PD deficiency, *The Annals of Thoracic Surgery* 2003; 76:523-7.
52. Abid S., Khan AH.: Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E, *The American Journal of Gastroenterology* 2002; 97:1544-7.
53. Altıkat, S., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H.: purification of glucose 6 phosphate dehydrogenase from Buffalo(*Babalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetics properties, *Protein Expression and Purification*, 2003; 29:304-310.
54. Beutler E. *Red cell metabolism: A manual of Biochemical Methods*, 3rd Ed, Orlando: Grune & Stratton Inc, 1984; : 68-71.
55. Nieomoeller, O.M., Mahmud, H., Föller, M., Wieder, T., Lang, F.: Ciglitazone and 15d-PGJ2 induced suicidal erythrocyte death, *Cellular Physiology and biochemistry*, 2008; 22: 237-244,

## ÖZGEÇMİŞ

Trabzon'da 18.12.1982 tarihinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2002 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2006 yılında bu bölümden onur öğrencisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen bu anabilim dalında yüksek lisans öğrencisi olarak çalışmaktadır.

Muharrem TOPAL