



**NADPH - NADP⁺ KULLANAN BAZI ENZİMLERİN
KEÇİ KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN VE KİMYASALLARIN
İNİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Muhammet Serhat ÖZASLAN

Doktora Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

2018

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**NADPH - NADP⁺ KULLANAN BAZI ENZİMLERİN KEÇİ
KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI
İLAÇLARIN VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Muhammet Serhat ÖZASLAN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

NADPH/ NADP⁺ KULLANAN BAZI ENZİMLERİN KEÇİ KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Muhammet Serhat ÖZASLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 11/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı - Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza

Üye : Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 17.../05/2018 tarih ve 20.../23..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet KARAKAN

Fen Bilimleri Enstitüsü
Prof. Dr. Cavit ÖZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

NADPH - NADP⁺ KULLANAN BAZI ENZİMLERİN KEÇİ KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN VE KİMYASALLARIN İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muhammet Serhat ÖZASLAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

Bu çalışmada keçi karaciğer dokusundan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografi kullanılarak tek basamakda saflaştırıldı. Enzimlerin saflık dereceleri ve alt birimlerinin molekül kütleleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gösterildi. Alt molekül kütleleri GR için 61,3 kDa, 6PGD için 51,4 kDa ve G6PD için 63,1 kDa olarak bulundu. Jel Filtrasyon kromatografisi ile doğal hallerinin molekül kütleleri de sırasıyla 125,89 kDa, 100,02 kDa ve 63,09 kDa olarak belirlendi. Kinetik çalışmalar neticesinde, enzimler için optimum pH, iyonik şiddet, stabil pH, optimum sıcaklık ve substratlar için K_M ve V_{max} değerleri tespit edildi. Bunlara ilaveten, küçük baş hayvanlarda kullanılan Amoksisilin, Ampisilin, Neomisin, Oksitetrasiklin, Penisilin G, Sülfadimidin ve Tilozin gibi bazı ilaçların söz konusu enzim aktiviteleri üzerinde *in vitro* olarak belirlendi ve K_i değerleri $0,08 \pm 0,03$; $15,24 \pm 2,97$ mM aralığında inhibe etkileri hesaplandı.

2018, 145 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Glutatyon redüktaz, Saflaştırma, Karakterizasyon, İnhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYMES USING NADP⁺ - NADPH FROM GOAT LIVER AND INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS OF SOME DRUGS AND CHEMICALS

Muhammet Serhat ÖZASLAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

Glutathione reductase (GR), 6- phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) were purified separately in the single step from goat liver using 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. The purity of the enzymes was showed by SDS–PAGE analysis. The subunit molecular weights was found 61.3 kDa for GR, 51.4 kDa for 6PGD and 63.1 kDa for G6PD by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the molecular weights of the enzymes were found as 125.89 , 100.02 and 63.09 kDa by Sephadex G-100 gel filtration chromatography, respectively Kinetic properties of enzymes including, optimum temperature, optimum pH, stable pH, optimum ionic strength, K_M and V_{max} values were evaluated for each enzyme The enzymes were inhibited by Amoxicillin, Ampicilin, Neomycin, Oxytetracycline, Penicillin G, Sulfadimidine and Tylosin as in vitro with K_i values in the range of 0.08 ± 0.03 ; 15.24 ± 2.97 mM.

2018, 145 page

Keywords: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase, Glutathion reductase, Purification, Characterization, İnhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hořđörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez danışmanım ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOğLU'na teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN, Sayın Prof. Dr Orhan ERDOğAN, Prof. Dr Hasan ÖZDEMİR ve Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nihat AKBULUT'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Biyokimya Anabilim dalı araştırma laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Yeliz DEMİR'e, Sayın Hatice Esra ASLAN'a, Sayın Uzman Songül BAYRAK'a Öđr. Gör. Ođuzhan ÖZAKIN'a, Dr. Arř. Gör Pınar GÜLLER'e ve Dr. Arř. Gör. Mine AKSOY'a, Dr. Öđr. Üyesi Uđur GÜLLER'e ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümünde alışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı babam Erdal ÖZASLAN'a, annem Rabia ÖZASLAN'a, abim Uğur ÖZASLAN'a merhum kardeşim Abdulkadir ÖZASLAN'a ve nişanlım Sayın Merve BÜYÜKAYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

M. Serhat ÖZASLAN

Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pentoz Fosfat Yolu	4
1.2. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	7
1.3. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi.....	10
1.4. Glutasyon	11
1.5. Glutasyon redüktaz Enzimi.....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	22
2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	22
2.2. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz	27
2.3. Glutasyon Redüktaz	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	45
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	45
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	46
3.1.3.a. Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti	46
3.1.3.b. Aktivite ölçümünde gerekli olan çözeltiler:	46
3.1.3.c. Afinite kromatografisi kolonu için gerekli olan çözeltiler:	47
3.1.3.d. Elektroforez için gerekli olan çözeltiler:	48
3.1.3.e. Protein tayini için gerekli olan çözeltiler (Bradford yöntemi)	49
3.1.3.f. Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon:	49
3.1.3.g. İlaç ve kimyasal maddelerin stok çözeltileri	49
3.2. Yöntem	50

3.2.1. Keçi karaciğer dokusundan enzimlerin saflaştırılması çalışmaları	50
3.2.1.a. Homojenatin hazırlanması	50
3.2.1.b. 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	50
3.2.1.c. SDS-PAGE ile enzimlerin saflığının kontrolü	51
3.2.1.d. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması ve enzimlerin molekül kütlelerinin belirlenmesi	52
3.2.1.e. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi	54
3.2.1.f. Kantitatif protein tayini	56
3.2.3. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan Enzimlerin Karakterizasyon ve Kinetik Çalışmaları	57
3.2.3.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum pH'larının belirlenmesine yönelik çalışmalar	57
3.2.3.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum iyonik şiddetlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	57
3.2.3.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum sıcaklıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar	57
3.2.3.d. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için stabil pH'larının bulunmasına yönelik çalışmalar	57
3.2.3.e. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	58
3.2.4. İlaçların enzimler üzerinde inhibisyon etkisinin belirlenmesi	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	60
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	60
4.2. Afinite kromatografisi sonuçları	60
4.3. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan G6PD ve 6PGD Enzimlerinin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü	63
4.4. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü	64
4.5. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD enzimlerinin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlelerinin belirlenmesi sonuçları	64
4.6. Jel filtrasyon kromatografisi ile keçi karaciğer G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin tabii molekül kütlesi tayinini sonuçları	66

4.7. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.....	68
4.7.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	68
4.7.1.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	68
4.7.1.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	70
4.7.1.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	72
4.7.2. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum iyonik şiddet bulunmasına yönelik sonuçlar	74
4.7.2.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	74
4.7.2.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	75
4.7.2.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	76
4.7.3. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum sıcaklık bulunmasına yönelik sonuçlar.....	78
4.7.3.a Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	78
4.7.3.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	79
4.7.3.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	80
4.7.4. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	81
4.7.4.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar	81
4.7.4.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar	84

4.7.4.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar	86
4.7.5. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için kinetik çalışmalara yönelik sonuçlar	89
4.7.5.a NADP ⁺ ve G6P substratları için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	89
4.7.5.b NADP ⁺ ve 6PGA substratları için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	91
4.7.5.c NADPH ve GSSG substratları için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	93
4.8. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR Enzimleri Üzerine Bazı İlaç Etken Maddelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Kinetik Çalışmaların Sonuçları	97
4.8.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR Enzimleri Üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaç etken maddeleri için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları	97
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	122
KAYNAKLAR	134
ÖZGEÇMİŞ	146

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

6PGA	: 6-Fosfoglukonat
6PGD	: 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
aa	: Aminoasit
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: ‘‘Bovine’’ (sığıır) serum albumin
cDNA	: Komplamenter DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
DTT	: Ditiotreitol
E.C.	: Enzim komisyon numarası
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
G6PD	: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
K _i	: İnhibisyon katsayısı
K _M	: Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu subsrat konsantrasyonu
PFY	: Pentoz fosfat yolu
MK	: Molekül kütlesi
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi

PER	: Amonyum per sülfat
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
V_{\max}	: Maksimum hız



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. PFY'nin oksidatif bölümü	6
Şekil 1.2. PFY'nin oksidatif olmayan bölümü.....	7
Şekil 1.3. Glukoz 6-fosfat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon	8
Şekil 1.4. Glutatyonun sentezi, geri kazanımı ve kullanımı	13
Şekil 1.5. Okside glutatyonun yapısı, GSSG	14
Şekil 1.6. Redükte glutatyonun yapısı, GSH	14
Şekil 1.7. Ampisilin sodyumun yapısı	16
Şekil 1.8. Amoksisilinin yapısı	17
Şekil 1.9. Penisilin G'nin yapısı	18
Şekil 1.10. Oksitetrasiklinin yapısı	18
Şekil 1.11. Neomisin sülfatın yapısı	19
Şekil 1.12. Sülfadimidinin yapısı.....	20
Şekil 1.13. Tilozinin yapısı	21
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	60
Şekil 4.2. Keçi karaciğer G6PD enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği.....	61
Şekil 4.3. Keçi karaciğer 6PGA enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinit kolonundan elüsyon grafiği.....	61
Şekil 4.4. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği.....	62
Şekil 4.5. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden saflaştırılan G6PD ve 6PGD enzimlerinin SDS- PAGE ile saflık kontrolü *1. kuyu: standart proteinler 2. kuyu afinite kolonundan elüe edilen G6PD enzimi 3. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen 6PGD enzimi.	63
Şekil 4.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden saflaştırılan GR enziminin SDS- PAGE ile saflık kontrolü *1. kuyu: standart proteinler 2. kuyu afinite kolonundan elüe edilen GR enzimi.	64

Şekil 4.7. G6PD ve 6PGD enzimleri için SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - log M_A grafiği	65
Şekil 4.8. GR enzimi için SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - log M_A grafiği.....	65
Şekil 4.9. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbands değerleri	66
Şekil 4.10. Jel filtrasyon kolonundan alınan enzimlerinin elüsyon grafiği	67
Şekil 4.11. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen K_{av} - log M_A grafiği.....	67
Şekil 4.12. Keçi karaciğer G6PD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	70
Şekil 4.13. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	72
Şekil 4.14. Keçi karaciğer GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	74
Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	75
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	76
Şekil 4.17. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	77
Şekil 4.18. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik	79
Şekil 4.19. Keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik.	80
Şekil 4.20. Keçi karaciğer GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik	81
Şekil 4.21. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	82
Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	83
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	85

Şekil 4.24. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	86
Şekil 4.25. Değişik pH'lardaki KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	87
Şekil 4.26. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	88
Şekil 4.27. G6P için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	90
Şekil 4.28. G6P için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	90
Şekil 4.29. 6PGD için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	92
Şekil 4.30. 6PGA için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	93
Şekil 4.31. GR için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	94
Şekil 4.32. GR için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.....	95
Şekil 4.33. Keçi karaciğerinden G6PDenzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	98
Şekil 4.34. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	98
Şekil 4.35. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	99
Şekil 4.36. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi.....	99
Şekil 4.37. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi.....	100
Şekil 4.38. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	100
Şekil 4.39. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	101
Şekil 4.40. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	101
Şekil 4.41. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	102
Şekil 4.42. Ampisilin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi.....	102
Şekil 4.43. Ampisilin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi.....	103
Şekil 4.44. Ampisilin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	103
Şekil 4.45. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	104

Şekil 4.46. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	104
Şekil 4.47. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	105
Şekil 4.48. Neomisin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi	105
Şekil 4.49. Neomisin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.50. Neomisin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	106
Şekil 4.51. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	107
Şekil 4.52. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	107
Şekil 4.53. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	108
Şekil 4.54. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi	108
Şekil 4.55. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi	109
Şekil 4.56. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	109
Şekil 4.57. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	110
Şekil 4.58. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	110
Şekil 4.59. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	111
Şekil 4.60. Penisilin-G ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi	111
Şekil 4.61. Penisilin-G ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi	112
Şekil 4.62. Penisilin-G ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	112
Şekil 4.63. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	113
Şekil 4.64. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	113
Şekil 4.65. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	114
Şekil 4.66. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi.....	114

Şekil 4.67. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi.....	115
Şekil 4.68. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi	115
Şekil 4.69. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	116
Şekil 4.70. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	116
Şekil 4.71. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik	117
Şekil 4.72. Tilozin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.73. Tilozin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi	118
Şekil 4.74. Tilozin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı türlere ait G6PD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı	23
Çizelge 2.2. Farklı türlere ait G6PD enziminin bazı kinetik özellikleri	24
Çizelge 2.3. Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı	29
Çizelge 2.4. Farklı türlere ait 6PGD enziminin bazı kinetik özellikleri	29
Çizelge 2.5. Farklı türlere ait GR enziminin bazı kinetik özellikleri.....	35
Çizelge 3.1. Elektroforez jellerinin hazırlanması	52
Çizelge 3.2. G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği	54
Çizelge 3.3. 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği	54
Çizelge 3.4. GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği.....	55
Çizelge 4.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları	62
Çizelge 4.2. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları	62
Çizelge 4.3. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin saflaştırılması basamakları.....	63
Çizelge 4.4. Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE ve Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen molekül kütleleri ve alt birimleri.....	68
Çizelge 4.5. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	69
Çizelge 4.6. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	69
Çizelge 4.7. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	71
Çizelge 4.8. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	71

Çizelge 4.9. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	73
Çizelge 4.10. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	73
Çizelge 4.11. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	75
Çizelge 4.12. Keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	76
Çizelge 4.13. Keçi karaciğer GR enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	77
Çizelge 4.14. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları	78
Çizelge 4.15. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları	79
Çizelge 4.16. Keçi karaciğer GR enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları	80
Çizelge 4.17. Keçi karaciğer G6PD enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	82
Çizelge 4.18. Keçi karaciğer G6PD enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	83
Çizelge 4.19. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	84
Çizelge 4.20. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	85
Çizelge 4.21. Keçi karaciğer GR enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	87
Çizelge 4.22. Keçi karaciğer GR enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	88
Çizelge 4.23. Keçi karaciğer dokusu G6PD enziminin NADP^+ substratı için K_M ve V_{\max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.....	89

Çizelge 4.24. Keçi karaciğer dokusu G6PD enziminin G6P substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	90
Çizelge 4.25. Keçi karaciğer dokusu 6PGD enziminin NADP ⁺ substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	91
Çizelge 4.26. Keçi karaciğer dokusu 6PGD enziminin 6PGA substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	92
Çizelge 4.27. Keçi karaciğer dokusu GR enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	94
Çizelge 4.28. Keçi karaciğer dokusu GR enziminin GSSG substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	94
Çizelge 4.29. Keçi karaciğer G6PD enzimi için karakterizasyon sonuçları	95
Çizelge 4.30. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için karakterizasyon sonuçları	96
Çizelge 4.31. Keçi karaciğer GR enzimi için karakterizasyon sonuçları	96
Çizelge 4.32. Keçi karaciğer G6PD enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	119
Çizelge 4.33. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	120
Çizelge 4.34. Keçi karaciğer GR enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	121
Çizelge 5.1. G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için karakterizasyon toplu sonuçları	132

1. GİRİŞ

Canlılığın sürdürülmesinin iki temel koşulundan biri kimyasal reaksiyonların yüksek seçicilik ve verimle biyolojik ortamda kataliz edilebilmesidir. Biyolojik katalizörlerden ilk olarak 18. yy'in sonlarında etin sindirimi üzerine yapılmış olan çalışmalarda bahsedilmiş, daha sonra 19. yy'de tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşüm çalışmaları ile sürdürülmüştür (Lehninger *et al.* 2005; Gürdöl ve Ademoğlu 2010). 1835 yılında Jöns Jacob Berzelius, katalizörleri kimyasal tepkimeleri daha hızlı ve daha aktif hale getiren maddeler olarak tanımlanmıştır (Ann-Sofie 2002).

1850'de maya hücresi tarafından şekerin alkole dönüşme fermantasyonun maya hücrelerinde bulunan etmenlerinin etkisiyle meydana geldiğini savunan Louis Pasteur araştırmasında, "Ferment" diye adlandırdığı bu etmenlerin sadece canlı organizmalar tarafından işlev gördüğünü düşünüyordu. "wikt:enzim" terimini ilk defa 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne kullandı. Sonraki yıllarda ise enzim terimi canlı olmayan bileşikler (örneğin pepsin) için kullanılırken, canlı yapılar tarafından üretilen kimyasal aktiviteler için de "ferment" terimi kullanılmıştır. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner mayanın şekeri alkole fermente ettiğini ve fermantasyonunun hücreden uzaklaştırılmasıyla fonksiyona devam eden moleküller tarafından yürütüldüğünü keşfetti (Lehninger *et al.* 2005). Sakkaroz şekerinin fermantasyonuna sebep olan enzime "zimnaz" ismi verildi (Nobel Lecture 1907). 1907'de Buchner "biyokimya çalışmaları ve hücresiz fermantasyonun keşfi için" Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü.

Enzim niteliğiyle ilgi yapılan ilk araştırmalara göre çoğu enzim etkinliği proteinlerle ilişkiliydi. Ancak Nobel ödüllü Richard Willstätter'in da aralarında bulunduğu bazı bilimciler proteinlerin enzimlerin birer taşıyıcısı olduğunu ve bunun yanında proteinlerin kendi kendilerine kataliz yapmaktan yoksun olduklarını savunmuşlardır. Lakin, James B. Sumner ilk olarak 1926'da üreaz enziminin, daha sonra 1937'de de katalaz enziminin saf protein yapısında olduklarını gösterdi ve bu enzimleri kristalleştirdi. Stanley ve Northrop sindirim enzimlerinden "kimotripsin" ve "tripsin" ile ilgili yaptıkları araştırmalar neticesinde saf enzimlerin protein yapısında olduklarını kesin olarak gösterdi. Bu

çalışmalarından dolayı bu üç bilim adamı 1946'da Nobel Kimya Ödülüne layık görüldüler(Nobel Lecture 1946).

Enzimler için X-ışını kristalografisi araştırmaları ilk olarak David Chilton Phillips öncülüğünde bir grup araştırmacı tarafından 1965'de "lizozim" için gerçekleştirildi (Blake *et al.* 1965). Yapılan bu araştırma enzimlerin atomik düzeyde nasıl çalıştığının anlaşılmasının başlangıcı kabul edilmiştir.

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve özgünlükleridir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç tutulduğunda bütün enzimler protein yapısındadır. Bu yüzden enzimin yapısındaki proteinin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapısının korunması enzimin aktivitesi açısından çok önemlidir. Eğer enzim denatüre olursa ya da aminoasitlerine kadar parçalanırsa aktivitesini kaybeder (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimlerin katalizleme güçleri 'turnover sayısı' ile ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bazen enzimler, katalizleme işini kendi başlarına yapabilirler. Bazen ise 'kofaktör' denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör, bir metal iyonu olabildiği gibi 'koenzim' denilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazı durumda da aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine 'holoenzim' adı verilir. Kofaktörsüz proteine 'apoprotein', enzime ise 'apoenzim' denilmektedir. Apoenzim, katalitik olarak inaktiftir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler protein yapısında olduğundan proteinlerin bütün özelliklerine sahiptirler. Enzimler büyük molekül yapısında olup kolodyum zarlarından geçemezler ve ısı ile kolaylıkla denatüre olmalarının yanında ortamın alkali veya asit oluşuna karşı da duyarlıdır. 0°C ile 40°C arasında sıcaklık yükselmesi, enzimin etki hızını artırmaktadır.

Ancak bu sıcaklıkların üzerinde denatürasyon görülür (Gözükara 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Benzer türdeki reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim hep bir çeşit veya aynı tür benzer reaksiyonları katalizler.
4. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
5. Enzimler reaksiyonun kısa sürede dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler hem canlı hem de cansız ortamda da görev yapabilirler.

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlıdırlar ve kendiliklerinden kolayca reaksiyon vermezler. Bu yüzden bir hücrede oluşabilecek olan tüm kimyasal tepkimeler enzimler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir yani kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Enzimler DNA tarafından şifrelendiği ve protein yapısında olduğu için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimlerin etki ettiği maddeler substrat olarak adlandırılır. Substratlar ürüne dönüştükten sonra ürün ve enzim ayrılır. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarına ilaveten hücrede metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenlerler (Dawn *et al.* 1996). Günümüzde 2000'den fazla farklı enzim bilinmektedir. Enzimlerin hem reaksiyon spesifikliğini hem de substrat spesifikliğini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtir. Sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıftaki sırasını gösterir. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir (Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

1.1. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu bazen fosfoglukonat oksidatif yolu, pentoz yan yolu veya heksoz monofosfat yolu olarak da isimlendirilebilir. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur (Agrios 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Pentoz fosfat yolunun (PFY) mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunduğu gösterilmiştir (Levy 1979). PFY’da bulunan enzimler tüm dokularda, çoğunlukla sitozol olmak üzere; endoplazmik retikulum, peroksizom, kloroplast, lizozom ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunmaktadır (Levy 1979; Schnarrenberger *et al.* 1995). PFY, yağ asidi ve steroid sentezinin yoğun olduğu böbrek üstü bezi, süt veren meme dokusu, adipoz dokusunda, adrenal korteks ve karaciğerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Ayrıca; akciğer, beyin, böbrek, bağırsak mukozasında da oldukça aktiftir. Yağ sentezinin düşük olduğu kas gibi dokularda PFY’nun aktivitesi düşüktür (Cabezas *et al.* 1999). Pentoz fosfat metabolik yolu eritrosit ve beyin hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için tek oksidatif yoldur (Thomas and Gilham 1983). Pentoz fosfat metabolik yolu, glikoliz yoluna bir alternatif yol olarak düşünülse de her iki yolun hücredeki fonksiyonları ve hücredeki ihtiyaç alanları farklıdır. Glikoliz, daha çok Krebs döngüsü ile birlikte hücre içi enerji gereksiniminin giderilmesinden sorumludur (Krebs and Eggleston 1978). Bununla birlikte pentoz fosfat metabolik yolu iki özgül işlevi yerine getiren iki farklı evreden oluşur. Birinci evre, oksidatif ve geri dönüşümsüz evredir; G6P’yi pentoz fosfat’a ve CO₂’e çevirirken NADP⁺’nin NADPH’a indirgenmesini sağlar. İkinci evre, oksidatif olmayan geri dönüşümlü evredir; pentoz fosfatları glikolitik ara ürünlere dönüşmesini sağlar (Nelson and Cox 2004). PFY’deki reaksiyonların hızı ve yönü, döngüdeki ara ürünlere olan gereksinime bağlı olarak değişiklik gösterir (Berg *et al.* 2006). PFY’nin bir diğer işlevi, RNA ve DNA’nın sentezlenmesi için gerekli olan riboz-5-fosfat’ı sağlar. Hızlı çoğalan tümör hücrelerinde PFY’nun hızı yüksektir. Ayrıca, vitamin ve aromatik amino asit sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat, bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi karbohidratlar da bu metabolik yol

ile sentezlenir. NADPH indirgeyici güç formunda kimyasal enerji taşır ve anabolik tepkimelerde indirgeyici olarak kullanılır (Nelson and Cox 2004).

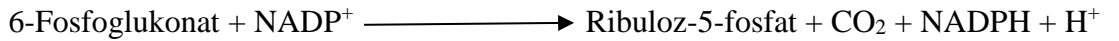
PFY iki evreden oluşur (Nelson and Cox 2004) :

a. Oksidatif evre:

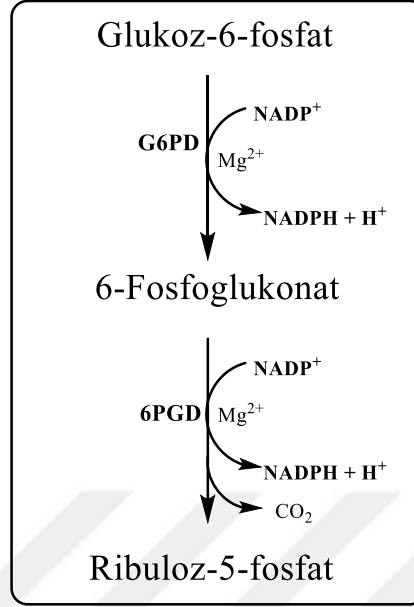
PFY'nun oksidatif evresi G6P'nin dehidrogenasyonu ile başlar. Reaksiyon G6PD enzimiyle katalizlenir ve NADP⁺ indirgenerek NADPH oluşturulur. G6PD, PFY oksidatif evresinde yer alan ilk ve hız-kısıtlayıcı bir enzim olup, G6P'nin 6-fosfoglukonolaktona



dönüşümünü katalizler (Nelson and Cox 2004). Bu tepkimede oluşan 6-fosfoglukonolakton, hızlı ve geri-dönüşümsüz olarak özgül bir laktonaz ile 6-fosfoglukonata dönüşür. Takip eden tepkime ise 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6-PGD) tarafından katalizlenir (Murray *et al.* 2003).



Tepkimelerde kullanılan NADP⁺, proton ve elektron alıcısıdır ve sonuç olarak iki mol NADPH sentezlenir. Sentezlenen ketopentoz olan ribuloz-5-P'nin bir kısmı fosfopentoz epimeraz ile ksiloz-5-fosfat'a dönüşürken bir kısmı da, fosfopentoz izomeraz enzimi ile bir aldoz izomeri olan riboz-5-fosfat'a dönüşür. Bazı dokularda PFY bu noktada son bulur (Nelson and Cox 2004) ve toplam tepkime aşağıda gösterildiği gibidir;

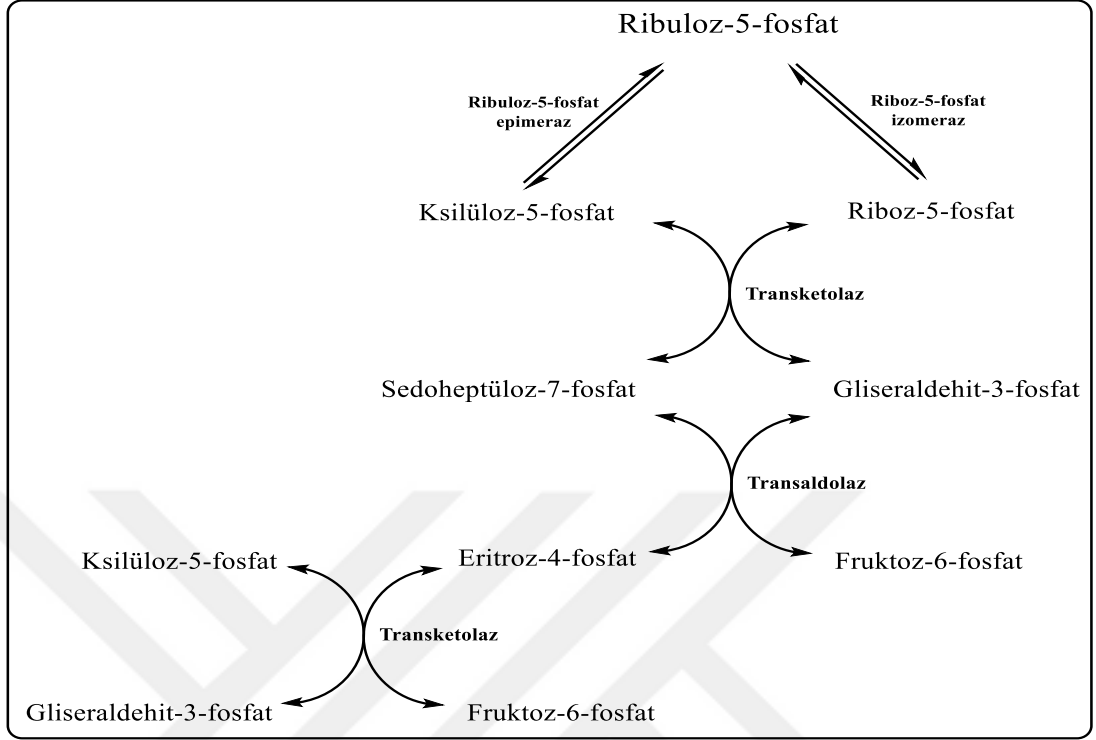


Şekil 1.1. PFY'nin oksidatif bölümü

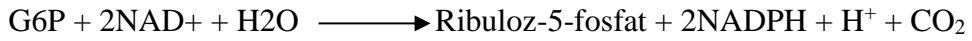
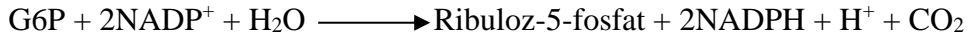
Bazı dokularda ise PFY bu noktada sonlanmaz ve oksidatif olmayan tepkimelerde şeker fosfatlar sentezlenir.

b. Oksidatif Olmayan Evre:

Oksidatif olmayan evrede 3, 4, 5, 6 ve 7 karbonlu şeker fosfatları sentezlenir. PFY'nin bu evresinde oksidatif faz ile oluşan ribuloz-5-fosfat, riboz-5-fosfat izomeraz enzimi ile riboz-5-fosfat'a izomerize olur. Aynı zamanda ribuloz-5-fosfat epimeraz enzimiyle de ksiluloz-5-fosfat'a geri dönüşümlü olarak epimerize olur. Riboz-5-fosfat, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin içeriğine katılır (Nelson and Cox 2004). PFY'de oksidatif evrenin aktivitesi her zaman oksidatif olmayan evrenin aktivitesinden daha yüksektir. Çünkü NADPH'a duyulan gereksinim, riboz-5-fosfata duyulan gereksinimden fazladır (Cabezas 1999). Oksidatif olmayan kademedeki tepkimeler tersinirdir. Bu sayede heksoz fosfatlar ve pentoz fosfatlar birbirine dönüştürülür. Böylece canlılar, NADPH ve pentoz gereksinimlerini karşılamış olur ve PFY tepkimeleriyle glikoliz ara bileşikleri de sentezlenmiş olur (Şekil 2.2).

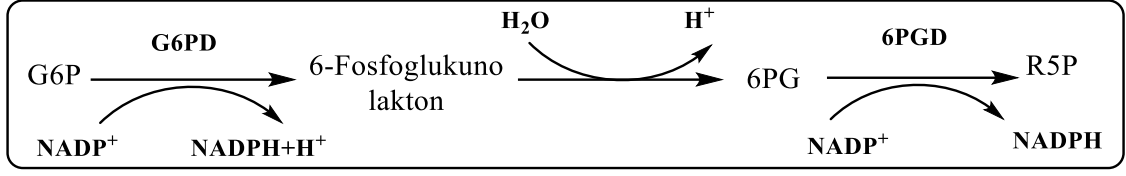


Şekil 1.2. PFY'nin oksidatif olmayan bölümü



1.2. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) özgün olarak NADP^+ 'nin koenzim olarak kullanıldığı bir reaksiyon ile glukoz 6-fosfatı, 6-fosfoglukonata tersinmez olarak okside eder. Pentoz fosfat yolu primer olarak glukoz 6-fosfat dehidrogenaz basamağında düzenlenir (Champe and Harvey 2007).



Şekil 1.3.Glukoz 6-fosfat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi, mayalarda (Noltmann *et al.* 1961), tek hücrelilerde (Ibraheem *et al.* 2005), bitkilerde (Gossling 1979) ve hayvansal dokularda (Ulus and Tandogan 2006) bulunur. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz monomeri yaklaşık 515 aminoasidden oluşur, mikrobiyal türlerde molekül kütlesi 50-60 kDa, memelilerde ise 58-67 kDa arasında değişiklik göstermektedir (Levy 1979).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi, birbirlerine benzeyen ve birden fazla monomeren oluşan kompleks bir moleküldür. G6PD' nin, aktivite gösterebilmesi için en az iki monomeren oluşması gerekmektedir. Bu enzimin monomerleri tek başına aktivite göstermezken, monomerlerin birleşmesi sonucunda enzim aktif formunu kazanır (Wrigley *et al.* 1972). G6PD enziminin alt birimleri protein derişimine, iyonik kuvvete ve ortamın pH'sına bağlı olarak değişik yapılar da bulunur (Yoshida 1966).

Enzim aktif olarak genellikle dimeriktir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, NADP⁺, NADPH ve H⁺ konsantrasyonu, iyonik kuvvet ve yüksek pH gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek iyonik şiddet ve yüksek pH değerleri enzimin dimer forma dönüşmesine neden olurken; tersine, düşük pH, düşük iyonik şiddet ve ortamda Mg²⁺ ve Mn²⁺ gibi iki değerlikli katyonların bulunması durumunda tetramer yapının oluştuğu belirtilmiştir (Levy 1979). Buna ek olarak, G6PD enziminin Ph:6,0 altında tetramer formu baskın halde iken, pH:8,0 üzerinde dimer yapının baskın olduğu belirtilmiştir (Au *et al.* 2000). Glukoz-6-fosfat ve NADPH , G6PD enzimini inaktif haldeki monomer yapıya dönüştürürken, sülfhidril grubu ve NADP⁺'nin varlığı enzimi aktif dimer yapıya dönüştürmektedir.

G6PD'ın yapısında G6P'ın enzime bağlanma bölgesinde, enzimin reaksiyonu

katalizlemesinde ve nükleotidin (NADP⁺'nin) bağlanması 9 adet aminoasit kalıntısının bulunduğu belirtilmiştir (Camardella *et al.* 1988; Lee and Levy 1992; Jeffery *et al.* 1993). 1994 yılında *L. Mesenteroides*'ten elde edilen G6PD enziminin dimer yapıda olduğu ve her bir alt biriminde bir tane aktif bölge içerdiği belirtilmiştir (Rowland *et al.* 1994). 1999-2000 yıllarında ise insandan saflaştırılan bu enzimin tetramer yapıda olduğu gösterilmiştir (Au *et al.* 2000).

Bakteri ve insan G6PD enziminin dimer yapısında bulunan 57 aminoasit kalıntısının 31 tanesi hidrofobik karakterdedir. İnsan G6PD enziminin her alt biriminde enzimin kararlılığının sağlanması için gerekli olan NADP⁺ molekülü bulunmaktadır. Bu NADP⁺ molekülüne 'Yapısal NADP⁺' denilmektedir. Enzimin yapısında enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan 'Koenzim NADP⁺ molekülü de vardır. Bu NADP⁺ molekülünün, enzimdeki dinükleotid bağlama bölgesinde bulunan 41. aminoasit olan glisin ve 42. aminoasit olan aspartik asit ile etkileşime girdiği tahmin edilmektedir. "Yapısal NADP⁺" deki adenin molekülünün Tirozin503 ve Arginin487 arasında; nikotinamid molekülünün ise Triptofan509 ile Tirozin401 arasında enzime bağlandığı düşünülmektedir. "Yapısal NADP⁺" molekülündeki 2'-fosfat grubu, Lizin238, Arginin357, Lizin366 ve Arginin487 ile hidrojen bağı oluştururken, bisfosfat grubu Arginin370 ile etkileşim halindedir. Nikotinamid molekülündeki amid grubu ise Arginin393 ve Aspartikasit421 ile etkileşim içindedir. Bütün bu etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, "Yapısal NADP⁺" nin ortamdan ayrılması durumunda enzimdeki alt birimlerin hepsinde yapısal bütünlüğün bozulabileceği düşünülmektedir (Mason *et al.* 2007).

G6PD eksikliğinde, oksidan ajanların detoksifiye edilmemesi sonucu oluşan, hemolitik anemi ile karakterize genetik bir hastalık görülmektedir. G6PD eksikliği, insanlarda en sık görülen ve hastalığa neden olan bir enzim anomolisidir ve dünyada 200 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Bu eksiklik, en fazla OrtaDoğu'da, tropikal Afrika ve Asya'da ve Akdeniz Bölgesi'nde görülür. Bu X kromozomuna bağlı enzim eksikliği G6PD'yi kodlayan gendeki 400'den fazla farklı mutasyonun neden olduğu bir grup eksikliklerdir. Bu mutasyonların sadece bazıları klinik bulgulara neden olur. G6PD eksikliği olan kişilerin

çoğunun hayat süreleri kronik hemolizden kaynaklanan komplikasyonlar nedeniyle kısalmır. G6PD eksikliğinin bu olumsuz etkisi yaşamdaki bir avantaj ile dengelenmiştir. Bu da mutasyonlu kadın taşıyıcılarda, falsiparum sıtma'ya karşı direncin artmış olmasıdır. G6PD aktivitesinin azalması, hücrenin NADPH oluşturma yeteneğini bozar. NADPH ise redükte glutatyon havuzunun sürdürülmesi için mutlaka gereklidir. Bunun sonucunda, hücre içinde oluşan serbest radikallerin ve peroksitlerin hücresel detoksifikasyonlarında azalma olur. Glutatyon, hemoglobin dâhil, proteinlerin sülfidril gruplarının redükte durumda kalmalarına da yardımcıdır. Bu sülfhidril grupların oksidasyonu sonucunda denatüre proteinler oluşur. Bunlar da çözünmez kütleler oluşturarak eritrositlerin membranlarına tutunurlar. Membran proteinlerinin daha ileri oksidasyonu ile eritrositler rijit ve deforme edilemez hale gelirler. Böylece eritrositler dolaşımdan, karaciğer ve dalak makrofajları tarafından uzaklaştırılırlar. G6PD eksikliği kişinin tüm hücrelerinde olmasına rağmen eritrositlerde daha ağır seyredir. Çünkü eritrositlerde NADPH üreten tek yol pentoz fosfat yoludur. Diğer dokular glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için alternatif NADPH üretim kaynaklarına sahiptir (Champe and Harvey 2007).

1.3. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD, E.C.1.1.1.44) enzimi, heksoz monofosfat yan yolu olarak da bilinen pentoz fosfat metabolik yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizleyen önemli bir enzimdir ve bu tepkime sonucu D-ribuloz-5-fosfat, CO₂, NADPH ve H⁺ oluşur (Tandogan ve Ulusu 2005). (Şekil 1.3.)

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz'ın defektif varyantları, ilk olarak 1964 yılında Brewer ve Dern tarafından, siyah bir Amerikan ailesinde tanımlanmış ancak fertlerde hemolitik anemi saptanılmamıştır. Enzim eksikliği sonucu oluşan kronik hemolitik anemi vakaları ise daha sonraki yıllarda rapor edilmiştir (Corrons *et al.* 1996; Caprarri 2001). Enzim eksikliği hücrede 6-fosfoglukonat'ın birikmesine, fosfoglukoz izomerazın ve glukoz metabolizmasının tümüyle inhibe olmasına bağlı olarak toksik etki yaratmaktadır. Bu nedenle kemoterapilerde hedef enzim olarak yararlanılabilir. Pentoz fosfat yolunun ilk

enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)'ın, insan eritositlerini *Plasmodium falciparum* enfeksiyonuna karşı koruduğu bilinmektedir (Barrett 1997). Aynı şekilde eritrosit 6PGD'si ve fosfoglukomutaz gibi enzimlerin değişik fenotiplerinin malaraya karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Bayoumi *et al.* 1986).

6PGD enziminin birbirinden bağımsız iki eşit koenzim bağlanma bölgesi vardır. Bir alt birimden ayrılan NADPH, diğer alt birime bağlanır. Bu durum, her iki alt birimde konformasyonel bir değişikliğe sebep olur (Hanau *et al.* 1992). Her alt birimde katalitik aktivite (Weisz *et al.* 1985) için gerekli olan iki reaktif tiyol grubu vardır. Alt birimlerde bulunan tiyol gruplarının NADPH ve 6-PG tarafından korunduğu bildirilmektedir. Tiyol gruplarının yavaş reaksiyonu denatürasyona sebep olarak protein yapısını değiştirebilmektedir (Silverberg and Dalziel 1973).

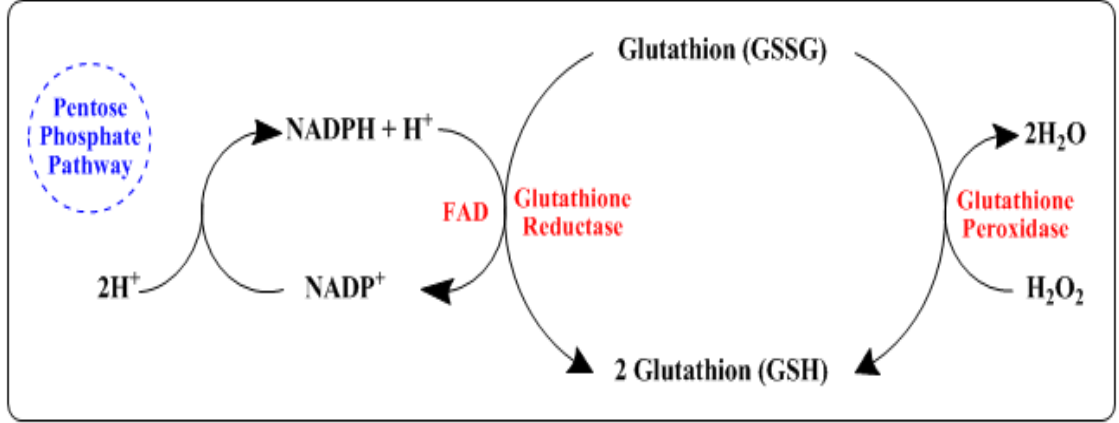
6-Fosfoglukonat dehidrogenazın aminoasit dizisi 20 farklı türde belirlenmiş; iki tür için kısmi aminoasit dizisi ortaya çıkarılmıştır (Dohnalek *et al.* 1998). 6PGD enziminin 400 aminositte oluştuğu tesbit edilmiştir (Hutchison *et al.* 1984). *Drosophila melanogaster*'de enzim 481 aminoasitten, kuzu karaciğerinde ise 482 aminoasitten oluştuğu ifade edilmiştir (Bergamini *et al.* 1995). 6PGD, her mol enzim başına sadece 4 sülfidril grubu içermekte ve yapısında disülfid bağı bulunmamaktadır. Enzimin yapısında histidin, lizin, arginin, aspartik asit, serin, treonin, prolin, glisin, alanin, valin, tirozin, izolösin, glutamik asit, fenilalanin, triptofan aminoasitlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Sosa-Saavedra *et al.* 2001; Silverberg and Dalziel 1973).

1.4. Glutasyon

Enzimatik olmayan savunma sisteminin bir parçası olan glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Glutasyon, ilk olarak 1888 yılında maya hücresinde tanımlanmıştır, 1921'de Hopkins tarafından saflaştırılarak kristallendirilmiştir ve bugünkü ismi verilmiştir (Zubay 1988; Açıkan 1990). Glutasyon, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonlar γ -glutamil sistenil sentetaz. (γ -GSS)

ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri tarafından katalizlenir (Richman and Meister 1975; Toribio *et al.* 1996; Misra and Griffith 1998).

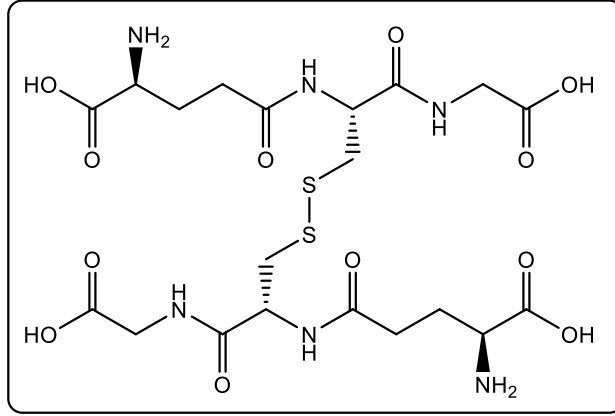
GSH sistemi antioksidan savunma sistemi, ksenubiyotik metabolizması ve epigenetik DNA metilasyonunun kesişme noktasıdır. Sistein rezidüsünü yükseltgeyen GSH, Reaktif oksijen türleri'ni tutarak antioksidan olarak görev yapar. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form) (NADPH) gerekli reaksiyonla GR vasıtasıyla GSH'ın oksidasyonu ile tekrar GSH'a dönüşebilen glutatyon disülfid (GSSG) oluşur. Hücre dışı boşluktaki GSH γ -glutamil transferaz aktivitesiyle sistein rezidüsünü kaybeder ve sistein GSH sentezinde kullanılmak üzere tekrar sitoplazmaya girer (Şekil 1.1). GSH/GSSG oranı sıklıkla hücre içi redoks durumunun indikatörü olarak kullanılır. Ancak GSH ve GSSG'nin konsantrasyonlarının direkt ölçümüyle redoks potansiyeli (Eh) hesaplamak için Nernst eşitliği kullanılabilir (Schafer and Buettner 2001; Jones 2002; Jones 2006; Hansen *et al.* 2006). Daha önce belirtildiğine göre yüksek negatif Eh değeri (oldukça yüksek indirgenmiş redoks durumu) hücre çoğalmasıyla bağlantılıdır ve düşük negatif Eh değeri (oldukça yüksek yükseltgenmiş redoks durumu) farklılaşma ve apoptozle bağlantılıdır (Smith *et al.* 2000; Schafer and Buettner 2001; Jones 2002). Ayrıca GSH, glutatyon peroksidaz, glutaredoksin ve glutatyon S-transferaz gibi GSH kullanan antioksidan enzimler için kofaktör olarak da görev yapar (Şekil 1.1). Ek olarak GSH protein fonksiyonlarını S-tiyolasyon veya S-glutatiyonilasyon ve protein disülfid karışımının dönüşümlü oluşum (protein-SSG) vasıtasıyla ayarlayabilir (Mieyal *et al.* 2008). Embriyonik gelişmeler için önemli içerik ile diğer bir süreç GSH ve epigenik programlama arasındaki etkileşimlerdir. GSH'daki sistein rezidüsü DNA ve histonların metilasyonu için bir kofaktör olarak görev yapan S-adenozilmetiyoninin sentezi için kullanılan aynı homosistein havuzundan sentezlenir (Hitchler and Domann 2007).



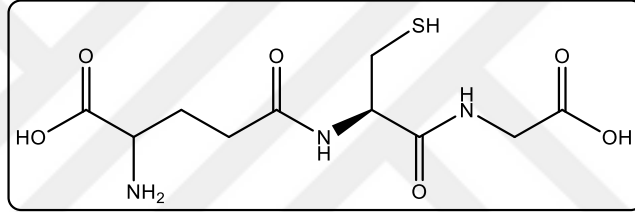
Şekil 1.4. Glutatyonun sentezi, geri kazanımı ve kullanımını (Liang *et al.* 2011)

Glutatyonun tiyol grupları potansiyel indirgeyici ajandır. Önemli bir antioksidan olarak GSH çeşitli elektofilik bileşiklerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda rol alır. Detoksifikasyona ek olarak GSH gliksalaz sistem, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesi, tiyosülfid değişim reaksiyonları ile protein ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi diğer hücrel reaksiyonlarda da görev alır (Mullineaux and Creissen 1997).

Glutatyon hücrede indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) olarak bulunur (şekil 1.2 ve 1.3). Hücrede optimum GSH/GSSG oranını sağlamak hayatta kalmak için son derece önemlidir. GSH eksikliği hücreyi oksidatif hasar riskine sokar. GSH dengesizliği durumunda kanser, nörodejeneratif bozukluklar, kistik fibrozis, HIV ve yaşlanma gibi patolojik bozukluklara rastlanabilir (Townsend *et al.* 2003). Yüksek GSSG konsantrasyonu protein sentezini de içeren birçok önemli enzimatik yolu inhibe eder (Kondo *et al.* 1980; Deneke and Fanburg 1989; Vijayalingam *et al.* 1996; Akerlund *et al.* 1997; Jenner and Olanow 1998). Glutatyonun hücre dışı (ekstraselüler) konsantrasyonu yaklaşık 2-20 $\mu\text{mol/l}$ 'dür (plazmada). Hücrel redoks durumunun bir belirteci olan $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$ oranı normal fizyolojik koşullarda 10'dan büyüktür (Griffith 1999). GSH/GSSG hücrenin antioksidatif kapasitesini belirleyen önemli bir redoks çiftidir. Ancak bu değer $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ve tiyoredoksin_{ind}/tiyoredoksin_{yük.} gibi diğer redoks çiftlerinden etkilenebilir (Jones 2002).



Şekil 1.5. Okside glutatyonun yapısı, GSSG



Şekil 1.6. Redükte glutatyonun yapısı, GSH

1.5. Glutatyon redüktaz Enzimi

GR enzimi (E.C.1.8.1.7) ilk defa 1951'de tanımlanmıştır. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler.



Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın düşmesi halinde eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2012). Glutatyon peroksidaz enziminin katalizlediği, özellikle hidroperoksitlerin detoksifikasyonu diğer bazı bileşiklerin indirgenmesi sonucu GSSG oluştuğu için glutatyon redüktaz hücre içi glutatyon indirgeme olayında merkezi bir role

sahiptir. Glutasyon redüktaz, GSH/GSSG oranını yükselterek hücre içi –SH/–SS- oranını korur (Toribio 1996).

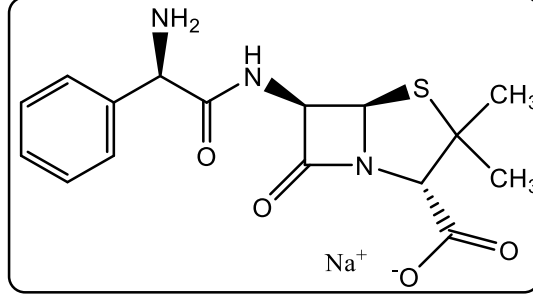
Glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bu reaksiyonda kullanılan NADPH'in kaynağı; NADP⁺ bağımlı malat dehidrogenaz (eritrositler hariç) ve pentoz fosfat yoludur (Harvey *et al.* 2007). NADPH, indirgeyici biyosentez olaylarında yaygın bir şekilde kullanılan ve pentoz fosfat yolunun önemli bir ürünüdür. Ayrıca, oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında temel teşkil etmektedir (Levy 1979).

İndirgenmiş glutasyon (GSH), ilaç ve detoksifikasyonu ve hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması reaksiyonlarında önemli bir role sahiptir. Bu rol özellikle karaciğerde çok önemlidir. Çünkü detoksifikasyon olayı karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemin işleyişinde oksijen molekülüne yeterli miktarda elektron aktarılmazsa süperoksit radikali (O₂⁻) veya peroksit (H₂O₂) oluşur. Hücrede bu zararlı iyonları zararsız hale getirecek sistem mevcuttur. Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri, hücrede oksidatif strese sebep olan süperoksit radikali ve peroksitin suya dönüşmesine sebep olarak hücre membranı proteinlerinin hasar görmesini önlerler. Bu enzimlerin fonksiyonu askorbik asit, indirgenmiş glutasyon (GSH) ve K vitamini tarafından güçlendirilir. Glutasyon redüktaz klinik kimyada karaciğer ve kanser hastalıklarının belirlenmesinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin çözümünde ve bazı genetik eksikliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Beutler 1984).

1) Ampisilin Sodyum

Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan ampisilin penisilinin yarı sentetik bir türevidir. Kimyasal formülü C₁₆H₁₈N₃NaO₄S olan bileşiğin molekül ağırlığı 371,387 g/mol'dür. Ampisilin, bakteri hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'lere) bağlanıp bakteri hücre duvarı sentezinin son aşaması olan üçüncü aşamayı inhibe eder. Ampisilin, penisilin olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Yapısında üç adet halkalı yapı bulunmaktadır. Molekül yapısı olarak aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir. Bu bileşik yapısal olarak 2. pozisyonda iki metil grubu

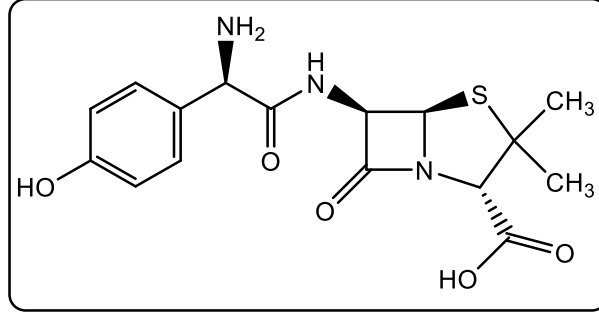
taşıyan bir penam halkası ve 6. pozisyonda bir amid grubu ile karakterize edilen penisilin çekirdek yapısı bulundurmaktadır (Anonymous 2018).



Şekil 1.7. Ampisilin sodyumun yapısı

2) Amoksisilin

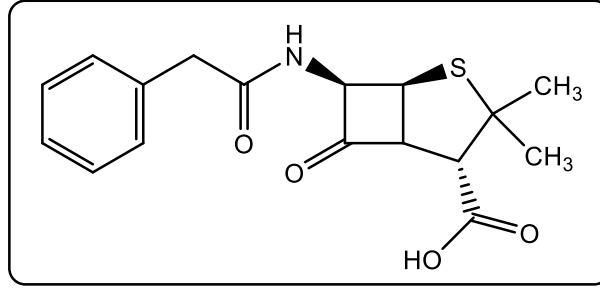
Ampisilin'e benzer yapıdaki geniş spektrumlu bir yarı sentetik antibiyotiktir. Amoksisilin beta-laktamaz parçalanmaya duyarlıdır. Kimyasal formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 365.404 g/mol, erime noktası $194^{\circ}C$ ve suda çözünürlüğü 3430 mg/L'dir. Amoksisilin, bakteri hücre duvarında bulunan penisilin bağlama proteini 1A'ya (PBP-1A) bağlanır. Penisilinler, laktam halkasını açarak penisiline duyarlı transpeptidaz C-terminal domainini açılattırır. Bu enzimin inaktivasyonu, iki doğrusal peptidoglikan dizisinin bir çapraz bağının oluşmasını engeller ve bakteri hücre duvarı sentezinin üçüncü ve son aşamasını inhibe eder. Amoksisilin, penisilinler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Molekül yapısı olarak aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir. Bu bileşik, yapısal olarak 2. pozisyonda iki metil grubu taşıyan bir penam halkası, benzen halkasına bağlı bir hidroksil grubu ve 6. pozisyonda bir amid grubu ile karakterize edilen penisilin çekirdek yapısı bulundurmaktadır (Anonymous 2018).



Şekil 1.8. Amoksisilinin yapısı

3) Penisilin G

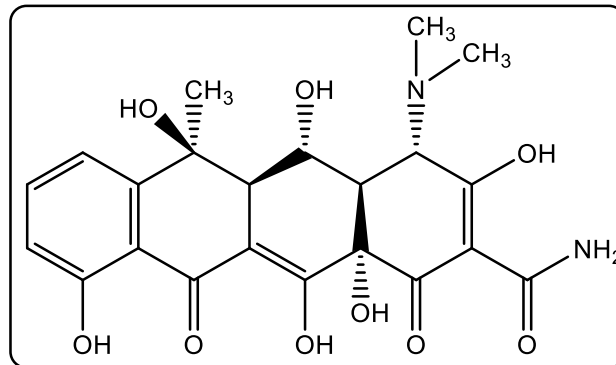
Penisilin G (benzilpenisilin), duyarlı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan dar spektrumlu antibiyotiktir. Kimyasal formülü $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 334,39 r/mol, erime noktası 214-217 °C ve suda çözünürlüğü 210 mg/L'dir. Penisilin G bazı durumlarda duyarlı organizmalara karşı profilaktik olarak kullanılabilir. Doğal penisilinler, *Streptococcus pneumoniae*, A, B, C ve G streptokoklar, nonenterokoksik D grubu streptokoklar, viridans grubu streptokoklar ve penisilinaz üretmeyen stafilokoklar gibi duyarlı gram pozitif aerobik organizmaların neden olduğu birkaç enfeksiyon için seçilecek ilaçlardır. Doğal penisilinler aynı zamanda *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium difteri* ve *Erysipelothrix rhusiopathiae* gibi duyarlı gram pozitif aerobik basillere karşı birinci veya ikinci basamak ajanlar olarak da kullanılabilir. Doğal penisilinler gram negatif organizmalara karşı sınırlı etkinliğe sahiptir; Bununla birlikte, bazı durumlarda *Neisseria meningitidis* ve *Pasteurella*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Genelde anaerobik enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmazlar. Dayanıklılık kalıpları, yatkınlık ve tedavi esasları bölgeler arasında değişir. Bakteriyel hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'ler) bağlanarak, penisilin G, bakteri hücre duvar sentezinin üçüncü ve son aşamasını engeller. Bu bileşik, dipeptitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, bir peptid bağı ile katılan tam olarak iki amino asit dizisini içeren organik bileşiklerdir (Anonymous 2018).



Şekil 1.9. Penisilin G'nin yapısı

4) Oksitetrasiklin

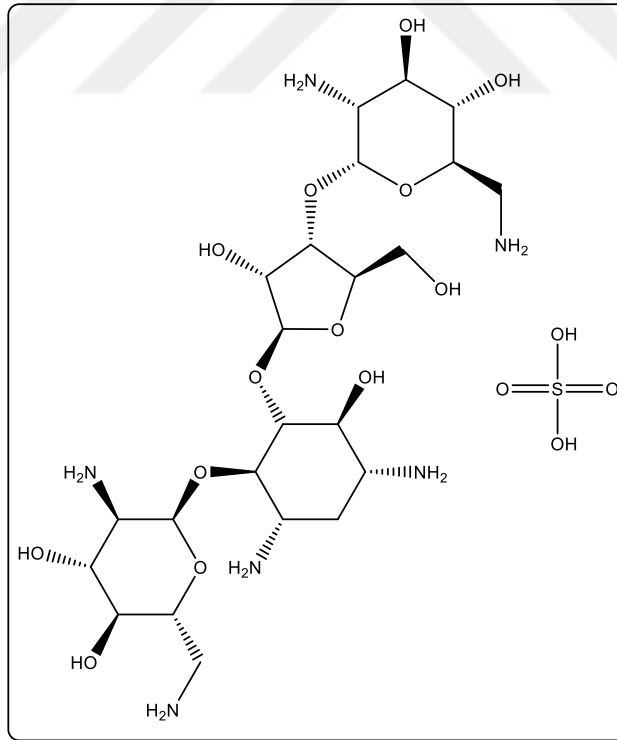
Oksitetrasiklin, *Actinomycete streptomyces rimosus*'tan izole edilmiş ve çok çeşitli klinik koşullarda kullanılan bir tetrasiklin analogudur. Kimyasal formülü $C_{22}H_{24}N_2O_9$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 460,434 g/mol, erime noktası $184,5^{\circ}C$ ve suda çözünürlüğü 313 g/L'dir. Oksitetrasiklin, translasyonu inhibe ederek hücre büyümesini engeller. 30S ribozomal alt-birimine bağlanır ve amino-açıl tRNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanmasını önler. Oksitetrasiklin, lipofiliktir ve kolaylıkla hücre zarı içinden geçebilir veya bakteri zarındaki porin kanalları yoluyla pasif olarak difüze olur. Bu bileşik, tetrasiklinler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, birçok hidroksi ve diğer gruplarla süstitüe edilmiş bir oktahidrotetrasen-2-karboksamid iskeletine sahip poliketidlerdir. Aromatik homopolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



Şekil 1.10. Oksitetrasiklinin yapısı

5) Neomisin Sülfat

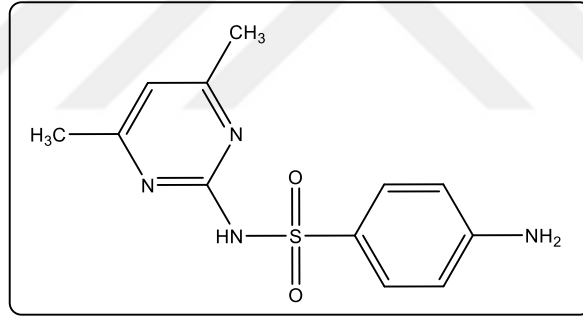
Neomisin, *Streptomyces fradiae* tarafından üretilen bir neomisin bileşenidir. Neomisin duyarlı organizmaların 30S ribozomuna bağlanan bir bakterisit aminoglikozid antibiyotiktir. Kimyasal formülü $C_{23}H_{48}N_6O_{17}S$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 712,722 gr/mol ve suda çözünürlüğü 6 mg/mL'dir. Bağlanma, mRNA bağlama ve alıcı tRNA bölgelerini interfere eder ve fonksiyonel olmayan veya toksik peptitlerin üretilmesine neden olur. Neomisin gibi aminoglikozitler "geri dönüşümsüz" spesifik 30S altbirim proteinlerine ve 16S rRNA'ya bağlanır. Özellikle neomisin, 16S rRNA'nın dört nükleotidinde ve protein S12'nin tek bir amino asidine bağlanır. Bu, başlatma kompleksine müdahale, mRNA'nın yanlış okunması, dolayısıyla yanlış amino asitlerin polipeptide sokulmasıyla işlevsiz veya toksik peptidlere ve polizomların işlevsiz olmayan monozomlara ayrılmasına yol açar (Anonymous 2018).



Şekil 1.11. Neomisin sülfatın yapısı

6) Sülfadimidin

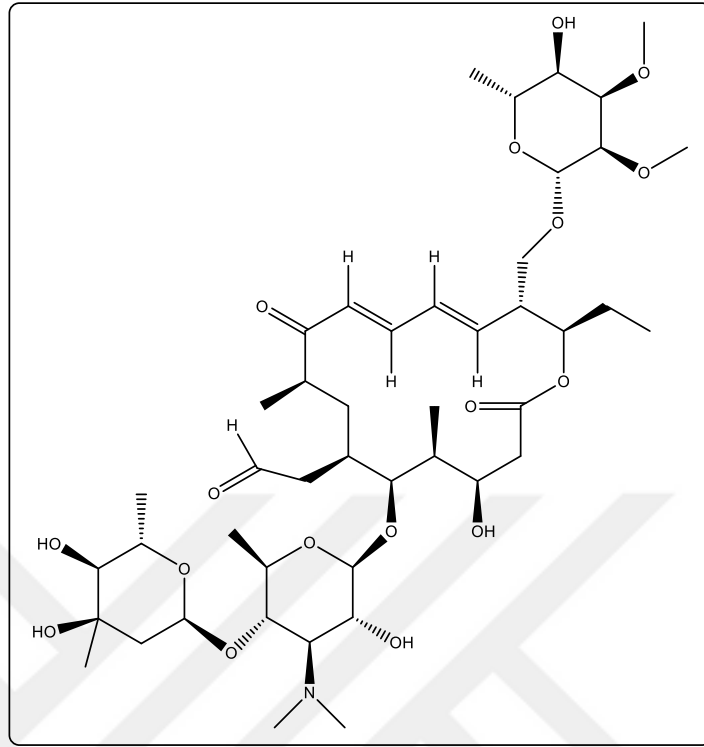
Bir sülfanilamid anti-enfektif ajandır. Diğer sülfonamidlere benzer bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahiptir. Kimyasal formülü $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 278,33 g/mol, erime noktası $198,5^{\circ}C$ ve suda çözünürlüğü 1500 mg/L'dir. Sülfonamidler, tetrahidrofolik asit (THF) sentezinin bir ara maddesi olan dihidrofolat sentetaza bağlanmak üzere PABA ile yarışarak pteridin ve p-aminobenzoik asidin (PABA) dihidropteroik aside enzimatik olarak dönüşmesini engeller. THF, pürinlerin ve dTMP'nin sentezi için gereklidir ve sentezinin engellenmesi bakteriyel büyümeyi engeller. Bu bileşik, aminobenzensulfonamidler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, benzen halkasına bağlanmış bir amin grubuna sahip bir benzensülfonamid kısmı içeren organik bileşiklerdir (Anonymous 2018).



Şekil 1.12. Sülfadimidinin yapısı

7) Tilozin

Kimyasal formülü $C_{46}H_{77}NO_{17}$ olan bileşiğin molekül ağırlığı 916,112 g/mol'dür. Tilozin, *Streptomyces fradiae* tarafından, poliketid metabolizması ve üç deoksiheksozşekerin sentezi yoluyla üretilir (Anonymous 2018).



Şekil 1.13. Tilozinin yapısı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzimler farklı kromatografik yöntemlerle birçok biyolojik kaynaktan saflaştırılmış, optimum pH, stabil pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, molekül kütlesi ve alt birimlerinin tespiti, amino asit bileşimi ve farklı genetik varyantlarının belirlenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır. Enzim substratlarının K_M ve V_{max} değerleri ile ürünlerin K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Biyolojik moleküller, iyonlar ve ilaçların enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır (Erat 2004). Üç enzim de en verimli ve en hızlı bir şekilde 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. G6PD, 6PGD ve GR aynı kolondan ayrı ayrı saflaştırılmıştır.

2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (EC.1.1.1.49) enzimi, pentoz fosfat yolunun ilk ve kilit enzimidir. Bu enzim bakteri, protozoa, mantar, sinek, balık, memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur (Cacciaputi and Lessie 1977; Deutsch 1983; Fickenscher and Scheibe 1986; Dikmen ve Yuregir 1989; Ninfali *et al.* 1990; Reuter 1990; Cristina *et al.* 1990; Walter *et al.* 1994; Aksoy 1997).

Glukoz 6-fosfat bileşiği, G6PD enzimi ve $NADP^+$ varlığında, 6-fosfoglukonat bileşiğine dönüştürülür. Reaksiyon sonucunda birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşmaktadır. Bu enzim hayvan dokularında, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Levy 1979). Enzim yeşil bitkilerin sitozol ve kloroplastlarında bulunurken, hayvan dokularının da sitozol ve mitokondrilerinde bulunur (Oeser *et al.* 1973; Ozols 1993).

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

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

Enzim aktifliğini genellikle dimerik yapıda göstermektedir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, NADP⁺, NADPH, enzim konsantrasyonu gibi faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olmaktadır (Levy 1979).

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

Enzim kaynağı	Molekül kütleleri (kDa)	Kaynak
Alabalık eritrositi	66	Çiftci <i>et al.</i> 2004
Buffalo eritrositi	64	Çiftci <i>et al.</i> 2003
Kaz eritrositi	143	Beydemir <i>et al.</i> 2003
Köpek karaciğeri	52,5	Özer <i>et al.</i> 2002
Sığır lensi	69	Ulus <i>et al.</i> 1999
Mikroorganizmalar	50-60	Levy 1979
Memelilerde	58-67	Levy 1979
Tavsan karaciğeri	90	Ozols 1993
Fare karaciğeri	121	David <i>et al.</i> 1977
Sıçan karaciğeri	130	David <i>et al.</i> 1977
Sıçan meme bezleri	120	David <i>et al.</i> 1977
Sıçan eritrositler	131	David <i>et al.</i> 1977
Domuz karaciğeri	133	David <i>et al.</i> 1977
Sığır eritrositi	114	David <i>et al.</i> 1977
İnsan karaciğeri	118	David <i>et al.</i> 1977

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

9,0, buffalo eritrositinde 9,0, gökkuşuğu alabalık eritrositinde 8,9 olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2004).

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

Enzim substratı olan NADP⁺ ve G6P için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Katalizlenen reaksiyonun ürünü olan NADPH için K_i değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Farklı türlere ait G6PD enziminin bazı kinetik özellikleri

Enzim kaynağı	Substratlar				Kaynak
	NADP ⁺		G6P		
	K _M (mM)	V _{max} (EÜ/mL)	K _M (mM)	V _{max} (EÜ/mL)	
Koyun karaciğeri	0,0194	0,0223	0,176	0,0179	Türkoğlu <i>et al.</i> 2003
Kaz eritrositi	0,0074	0,286	0,0243	0,28	Beydemir <i>et al.</i> 2003
Tavuk eritrositi	0,0496	0,24	0,171	0,0643	Yılmaz <i>et al.</i> 2002
Gökkuşuğu Alabalığı Eritrositi	0,166	0,275	0,50	1,352	Çiftci <i>et al.</i> 2004
Buffalo eritrositi	0,87	7,96	0,106	1,13	Çiftci <i>et al.</i> 2004

Enzim birçok kaynaktan farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. İlk olarak 1965 yılında Yoshida tarafından saflaştırılmıştır. DEAE selüloz, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, Sephadex G-200 ve hidroksiapatit kolonları enzim saflaştırmasında sıklıkla kullanılmıştır. (Scott and Tatum 1971; Kanji *et al.* 1976). Ayrıca Cibacron blue F3G-A Sephadex, Procion Red HE-3B-Sepharose, Procion Yellow HE-3G, Matrex gel Orange B, dye ligand afinite kolonu ve metal afinite kromatografisi olarak nikel-şelat kolonu kullanılarak da G6PD enzimini saflaştırılmıştır (Hey and Dean 1983; Johansson and Joelsson 1987; Reuter *et al.* 1990; Iyer *et al.* 2002). Bugün enzimi en kısa zamanda ve en

iyi verimle saflaştırmak için en çok kullanılan 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ilk kez De Flora ve arkadaşları tarafından kullanılmış (Levy 1979) ve daha sonraları modifiye edilerek birçok dokudan bu yöntemle enzim saflaştırılmıştır.

Tedavi ve diğer amaçlar için kullanılan birçok ilacın organizma üzerinde yan etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (Hochster *et al.* 1972). Hatta bunların çok ciddi rahatsızlıklarla sonuçlandığı belirtilmiştir (Çiftçi *et al.* 2000). İlaçların enzim inhibisyonu ile ilgili birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmıştır. William ve arkadaşları, G6PD enzim eksikliği olan şahısların eritrositlerinin asetanilid, metilenblue, naliksüksinat, neptolan, niridazol, nitrofurantion, pamaquin, pentaquin, fenilhidrazin, primaquin, sulfasitamid, sulfapiridin, tolvidinblue, sulfometokzol, tiyozolsulfon, trinitro toluen gibi ilaç ve kimyasallardan dolayı hemoliz olduğunu tespit etmişlerdir (Williams *et al.* 1986). Çiftçi ve arkadaşları (2000) yaptıkları *in vitro* çalışmada sodyum seftizoksim, sodyum ampisilin, sodyum sefuroksim, sodyum sefozolin, sodyum sulperazon, streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve netilmisin sülfat enzimi inhibe ettiği, *in vivo* çalışmada da sodyum sefuroksimin rat eritrositlerinde inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir. *In vitro* olarak insan eritrositinde, *in vivo* olarak da sıçan eritrositlerinde metamizol ve magnezyum sülfatın inhibisyon etkisi belirtilmiştir (Çiftçi *et al.* 2001) Koyun karaciğeri üzerine yapılan *in vitro* çalışmada penisillin, sulbaktam, sefozilin, and amikasin inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Çiftçi *et al.* 2002). Bazı sülfanamid türevlerinin enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Bülbül ve Erat 2008). Gökkuşluğu alabalık eritrositleri üzerine yapılan çalışmada tiamfenikol, amikasin, gentamisin ve netilmisin ilaçlarının inhibisyon etkisini belirtilmiştir (Erdoğan *et al.* 2004). Beydemir 2002 yılında koyun eritrositlerinde yaptığı bir çalışmada gentamisin, amikasin ve penisilinin inhibisyon etkisini rapor etmiştir.

G6PD enzimi aktivitesi değişikliğine dokusal farklılıkların etkisi yanında enzimin biyokimyasal ve genetik yapısındaki değişiklikler de etki etmektedir (Luzatto and Battistuzzi 1985; Cappellini *et al.* 1993). Bu yapısal değişiklikler sonucu oluşan aktivite düşüklüğü ile birlikte ortaya çıkan durum G6PD enzim eksikliği adı altında incelenmiştir (Aksoy 1997).

Dünyada G6PD enzimi eksikliğinden yaklaşık 400 milyon insan etkilenmektedir. Bu enzimin bugüne kadar dünyada yaklaşık 400, Türkiye’de ise 20 ye yakın varyantı tespit edilmiştir. Türkiye’deki varyantlarının büyük bir kısmı Çukurova ile Antalya bölgesinde bulunmuştur (Aksoy 1997).

1926 yılında sıtma tedavisinde kullanılmaya başlanan pamaquin, bazı hastalarda birkaç gün sonra ciddi belirtiler ortaya çıkarmıştır. İdrar siyaha dönüşmüş, sarılıkla beraber kan hemoglobin seviyesi aniden düşmüştü. Bu vakalar alyuvarların büyük ölçüde tahribatından dolayı ölümle sonuçlanmıştır (Keha ve Kufrevioğlu 2012). Kırmızı kan hücreleri aerobik glikoliz lezyonlarına karşı çok duyarlıdır. Yine sıtma tedavisinde kullanılan bir ilaç olan primaquine konsantrasyonuna bağımlı değişimi bulunmuştur (Telefoncu ve Telefoncu 1989).

Mikami *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) inhibitörleri olarak *Rhodometaceae* yosunundan bromofenol, n-butil 2,3-dibromo-4,5-dihidroksibenzil eter ve bilinen bromofenollerini izole etmişlerdir. Bunların arasında, bromofenol dimerleri *Leuconostoc mesenteroides* ve *Saccharomyces*'e karşı daha güçlü inhibitör etkisi göstermiştir. *S. cerevisiae* G6PDs incelenen bromofenoller arasında *L. mesenteroides* G6PD'ye karşı diarilmetan-tipi dimerlerden daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Diğer monomerlere göre dibenzil eter tipi dimerlerden daha düşük IC₅₀ değerleri vardır. Fakat *S. cerevisiae* G6PD'ye karşı diarilmetan tipi dimerlerin inhibitör aktiviteleri dibenzil eter tipi dimerlerin özellikle 3-bromo-2- (2,3-dibromo-4,5-dihidroksibenzil) -4,5- dihidroksibenzil metil eter, *L. mesenteroides* G6PD ile karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* G6PD'yi seçici olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Diğer bir çalışmada metoksiizobutilisonitril (MIBI), dietilen triamin pentaasetik asidin DTPA, dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ve metilendifosfonat (MDP) insan eritrositi Glikoz 6-fosfat dehidrojenaz (hG6PD) aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, hG6PD 2',5'ADP sefaro-4B afinite jel kromatografisi yardımıyla % 51.43 verimle 557 kat saflaştırılmıştır. MIBI, DTPA, DMSA ve MDP'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.056, 0.172, 0.274 ve 0.175 mM olarak bulunmuştur (Şahin *et al.* 2016).

Veysel et al. (2015) yaptığı bir çalışmada gökkuşuğu alabalık karaciğerinden 2',5'-ADP-sefaro-4B afinite kromatografisi kullanılarak G6PD enzimi % 77 verim ile 1444 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve optimal şartlar belirlenmiştir. Enzim üzerine bazı iyonların inhibisyon etkisi incelenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, G6PD enziminin sıçan eritrositinden 2',5'-ADP-sefaro-4B afinite kromatografisi kullanılarak 13.7 EU / mg spesifik aktivite %67,7 verimle 155,6 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE ile kontrol edilmiş belirlenmiştir. Alt birimlerinin molekül kütlesi yaklaşık olarak 56.5 kDa olarak belirlenmiştir. Bazı iyonların inhibisyon etkisi incelenmiştir. Daha sonra bazı metal iyonlarının enzimin aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemek için IC50 ve Ki grafikleri çizilip inhibisyon tipleri belirlenmiştir (Temel and Koçyiğit 2017).

2.2. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz 6PGD (E.C.1.1.1.44) NADP⁺ varlığında 6-fosfoglukonat bileşimini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimidir. Reaksiyon sonucu birçok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzimin önemi NADP⁺'yı NADPH'a indirgemesinden kaynaklanmaktadır. Birçok mikroorganizmada glukoz ve glukonat katabolik enzimi olarak görev alır (Yoshida *et al.* 1997). Enzim, glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentozfosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemlidir (Del Mar *et al.* 1986).

Enzimin eksikliğinde hemolitik anemi, retikulosit sayısında eksiklik, sarılık ve episodemik hemolitik olaylar tespit edilmiştir. Enzimin eksikliği ile beraber piruvat kinaz aktivitesi artmakta ve GSH seviyesinde ise azalma gözlenmektedir. Bu durum eritrositlerin ömürlerini kısaltmaktadır.

Yapılan bir çalışmada glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz ve glutatyon redüktazın sıçan kalbinden karakterizasyon ve saflaştırılması amaçlanmıştır.

Enzimlerin saflaştırılması 2', 5'-ADP sefaroze 4B afinite kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Saflaştırılan enzimlerin alt birim ve doğal molekül ağırlıkları SDS-PAGE ve jel filtrasyonu ile analiz edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için optimum sıcaklık, pH, kararlı pH ve tuz konsantrasyonu gibi özellikler belirleyen deneyler yapılmıştır, furosemid, digoksin ve dopamin ilaçlarının inhibitör etkileri araştırılmıştır. Her enzim için substratların ve koenzimlerin K_M ve V_{max} değerleri ile ürün inhibisyonu tipleri ve K_i değerleri belirlenmiştir. Elde edilen K_i ve IC_{50} değerlerine göre, furosemid, digoksin ve dopamin, milimolar seviyesinde konsantrasyonlar da enzim aktiviteleri üzerine inhibitör etkileri göstermiştir (Adem 2016).

Enzimin koenzim spesifikliği; spesifik olarak NAD^+ kullananlar, spesifik olarak $NADP^+$ kullananlar, spesifik olmayanlar olmak üzere üç farklı şekilde belirlenmiştir (Ohara *et al.* 2004). Koenzim kullanımı türe göre değişmekle beraber memeliler ve mayalar genelde $NADP^+$ spesifik, bakterilerde hem $NADP^+$ hem de NAD^+ spesifikliği belirlenmiştir.

6-fosfoglukanat dehidrogenazın molekül kütlesi kaynağına göre 80-152 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 33-55 kDa arasında değişmektedir. Bazı canlılarda homodimer, bazılarında homotetramer bir yapıya sahiptir. İnsanda homodimer bir yapıya sahip enzimin alt biriminin molekül kütlesi 53 kDa olduğu deneysel verilerle gösterilmiştir (Adem 2006).

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

Enzim kaynağı	Molekül Kütleleri (kDa)	Alt birim molekül kütleleri ve yapısı (kDa)	Kaynak
Koyun karaciğeri	94	47 homodimer	Betts and Mayer 1975
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	120	52,5 homodimer	Bianchi and Bertrand 2001
<i>Leuconostoc lactis</i> SHO-54	140	32,8, tetramer	Ohara <i>et al.</i> 2004
İnsan	106	53 homodimer	Pearse and Rosemeyer 1975
Sıçan karaciğeri	102	52 homodimer	Proscal and Holten 1972
<i>Drosophila melanogaster</i>	105	53 homodimer	Williamson <i>et al.</i> 1980
<i>Schizosaccorharomyces Pombe</i>	152	38 homotetramer	Tsai and Chen 1998

Türüne göre değişmekle beraber enzimin optimum pH aralığı 5,5-9,6 aralığında değişmektedir. Enzim aktivitesinin pH 7,6-9,2 aralığında arttığı, 9,3'ten sonra ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Barengi *et al.* 1987). Enzimin doğal halinin optimum pH insan beyninde 8,6 (Weisz *et al.* 1985), sıçan eritrositlerinde 7,0 (Beydemir vd 2003) ve sıçan böbrek korteksinde 8,0 (Corpas *et al.* 1995) olarak belirlenmiştir.

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

Enzim kaynağı	Substratlar				Kaynak
	NADP ⁺		6PGA		
	K _M (mM)	V _{max} (EÜ/mL)	K _M (mM)	V _{max} (EÜ/mL)	
Tavuk karaciğeri	0,621	0,027	0,0343	0,0317	Erat 2005
Sıçan eritrositi	0,059	0,063	0,194	0,054	Beydemir <i>et al.</i> 2004
Sıçan incebağırsak	0,053	-	0,595	-	Ceyhan <i>et al.</i> 2005
Sıçan böbrek	0,056	-	0,049	-	Corpas <i>et al.</i> 1995
Sıçan karaciğer	0,258	-	0,157	-	Corpas <i>et al.</i> 1995

G6PD ve 6PGD beraber olarak 2' 5'-ADP Sepharose 4B afinite ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kolonlar kullanılarak saflaştırılmışlardır. Enzimler iyon değişim kolonundan tuz gradienti oluşturularak elüe edilmişlerdir (Ulus *et al.* 1999). Enzim; amonyum sülfat çöktürmesi, yüksek hızda santrifüj, DE-52 kolonu, SP-Sephadex, DEAE selüloz, CM-selüloz, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, hidroksiapatit ve NADP⁺-Sepharose, 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi, NADP⁺-Agaroz vb. yöntemlerle saflaştırılmıştır (Hanau *et al.* 1992).

ATP'nin 6-PG'a karşı yarışmalı (Moritz *et al.* 2000), NADP⁺ karşı yarışmasız (Cottreau *et al.* 1975) inhibisyonu gözlenmesine karşın, *in vitro* şartlarda ATP enzimi inhibe etmesine rağmen *in vivo* şartlarda ATP'nin %80-90'ı Mg⁺² ile kompleks oluşturduğundan dolayı inhibisyonu zayıflar (Moritz *et al.* 2000). Fruktoz-1,6-bisfosfatın ve eritroz 4-P'nin *Leuconostoc lactis* 6PGD enzimini yarışmalı olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu türde 1'er mM ATP, ADP, AMP, NADP⁺, NADPH, asetilCoA, okzalasetat, glukoz-1-P, fosfoenolpruvat ve glukoz-6P'in inhibisyon yaptığı gözlenmemiştir (Ohara *et al.* 2004).

Bazı metal iyonlarının potansiyel inhibitor olduğu belirtilmiş ve Roark and Brown (1996) tarafından Zn²⁺, Cu²⁺ ve Cd²⁺ inhibisyonları tespit edilmiştir (Sawa *et al.* 1985). Asetat ve sodyum asetat inhibisyon etkisi göstermediği için diğer anyonların etkileri incelenirken sabit iyonik kuvvet oluşturmakta kullanılabilir (Proscal and Holten 1972). Ayrıca enzim düşük Mg⁺² konsantrasyonunda aktive, yüksek Mg⁺² konsantrasyonunda ise inhibisyona uğramaktadır (Veronese *et al.* 1974).

Enzimin ürün inhibisyonu çalışmalarında NADPH ve ribuloz-5-fosfatın etkisi araştırılmış ve NADPH'in NADP⁺ bağlanmasını yarışmalı, 6-PG'nin bağlanmasını yarışmasız olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Kato *et al.* 1979). Ribuloz-5-fosfatın ise hem 6-PG hem de NADP⁺ bağlanmasını yarışmasız olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Fruktoz- 6-bisfosfatın koyun karaciğerinde 6-PG'ye karşı yarışmalı, NADP⁺ ye karşı yarışmasız inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Dyson and D'Orazio 1971). Bazı türlerde okzalasetat, glukoz-6P, okzalat, fruktoz-6-P, fruktoz-1-P, glukoz-1,6 bisfosfat, P_i, Pi, Phi (fosfanat), sitrat ve sülfatın inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Beitner and Nordenberg 1979).

Sıçan eritrositlerinde $2,500 \pm 0,866$ mM, $0,052 \pm 0,007$ mM, ve $0,070 \pm 0,007$ mM konsantrasyonlarında ATP, NADPH ve NADH için inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Çiftci vd 2002).

Eritrosit 6PGD'si üzerinde yapılan çalışmalarda metiergobazin maleat, piroksikam, tenoksikam, tiyokolsikosid, menadion sodyum bisülfid, fluorourasil, sisplatin ketoprofenin enzimi inhibe ettiği, adrenalin, midazolam, fentanil, deksametazonna bisülfid, pentoksifilin de enzim üzerinde etkisiz olduğu belirtilmiştir (Akyuz 2004; Ozabacıgil 2005). İnsan eritrositi üzerindeki çalışmalarında; amikasin, ampisilin, sefepim HCl, netilmisin, gentamisin sulfat, isepamisin, kloramfenikol, lavoflaksasin, ofloksasin, penisilin, seftazidim pentahidrat, siprofloksasin ve sefotaksim sodyum teikoplanin enzimi inhibe ettiği, sefazolin sodyumun aktive ettiği, sefriakson, meropenem, streptomisin sulfatin etkisiz olduğu belirtilmiştir (Akyuz 2004; Ozabacıgil 2005). Sıçan eritrositlerinde yaptıkları enzimin çalışmalarında amikasin, ampisilin ve netilmisin sulfat'ın enzimi inhibe ettiğini ve metamizol'un enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir (Çiftci *et al.* 2002). Sıçan eritrositlerinde melatonin hormonunun enzimi inhibe ettiği ayrıca tespit edilmiştir (Gulcin and Beydemir 2004).

2.3. Glutasyon Redüktaz

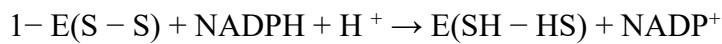
Glutasyon redüktaz (Glutasyon; NADP^+ oksidoredüktaz, E.C.1.8.1.7. GR) flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim glutasyon disülfidi (GSSG) indirgenmiş glutatyona (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin;GSH)'a NADPH yada NADH'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak indirgenmesini katalizler (Müller 1992; Gül *et al.* 2000).

Glutasyon redüktaz, glutasyon disülfidini sülfhidril formuna (GSH) NADPH bağımlı mekanizma ile indirgeyen hücresel antioksidan sisteminin çok önemli bir enzimidir. Enzim 1935 yılından itibaren birçok hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmış; yapısı, kinetik mekanizması ve moleküler özellikleri tanımlanmaya çalışılmıştır. Kinetik mekanizması sıralı ping-pong/sıralı hibrit modele uygundur. GR

prostatik grup olarak iki FAD molekülü taşıyan homodimerik flavoproteindir ve FAD grupları NADPH ile indirgenir. Dimerik enzimin yaklaşık mol kütlesi 100-120 kDa arasında değişir. GR'nin stabilitesi çeşitli organizmalarda incelenmiş ve ısıya dayanıklı bir enzim olduğu bulunmuştur (Tandoğan ve Ulusu 2005).

GR'nin farklı kaynaklardaki mol kütlesi 70-140 kDa arasında değişir. Enzimin genellikle birbirinin aynı olan iki alt birimden oluştuğu ve her bir alt birimine bir FAD'nin bağlandığı tespit edilmiştir. İnsan eritrosit glutatyon redüktaz enziminin yaklaşık 132 kDa olduğu belirlenmiştir (Douglas 1987). İnsan glutatyon redüktaz enzimi 478 amino asitten oluşmuştur. İnsan GR enziminin, birbirinden ayrılması çok zor olan, mitokondrial ve sitoplazmik iki formu vardır. Bu iki izoenzim çekirdekte tek genden kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda insan ve fare genlerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Hem insan hem de fare glutatyon redüktaz geninde 13 tane ekzon bölgesi olduğu belirlenmiş 3' ve 5' uçlarında ufak birkaç bölge hariç genin tamamının yapısı belirlenmiştir (George and Franke 1976; Tutic *et al.* 1990; Tamura *et al.* 1996; Becker *et al.* 1998; Kelner and Montoya 2000).

Glutatyon redüktaz, okside glutatyonu indirgenmiş hale dönüştürürken, NADPH'dan gelen elektronlar okside glutatyonun disülfür bağına direkt olarak aktarılmaz. Önce FAD'ye aktarılır daha sonra alt birimdeki iki sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne transfer etmek suretiyle okside glutatyonla aktarılmış olur. Her bir alt birim üç tane yapısal alan içerir. Bunlar FAD bağlayıcı alan, NADPH bağlayıcı alan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve NADP⁺ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara da benzer. FAD ve NADP⁺ izoalloksazin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde aralarında bağlanırlar. Okside glutatyon için bağlayıcı alan, bir alt birimin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği bilinmektedir. Reaksiyonun aşağıdaki gibi iki basamakta gerçekleştiği önerilmektedir (Siegel *et al.* 1998; Patel *et al.* 1998; Iribarne *et al.* 2000).



İlk yarı reaksiyonda, NADPH tarafından enzimin indirgenmesi sağlanır ve kararlı bir hal olan E(SH)₂ formu oluşur. İkinci yarı reaksiyonda ise GSSG, E(SH)₂ tarafından indirgenerek iki mol GSH oluşur (Siegel et al. 1998).

Enzimin katalitik mekanizmasında amino asit kalıntıları da görev yapar. GSSG'nin bağlandığı bölgede Tyr114 ve NADPH bağlama bölgelerinde ise Tyr197 amino asitleri bulunmaktadır. İnsan glutatyon redüktazındaki bu bölgeler, diğer türlerden elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında oldukça spesifik bölgelerdir. Tyr197 yüksek ökaryotlardan elde edilen bütün glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktazlarda bulunur. Tyr114 ve Tyr197 enzim-substrat kompleksinin x-ray difraksiyon analizlerinde substrat aktif bölgeye bağlandığı zaman değişikliğe uğradığı belirlenmiştir. Enzim üzerinde Tyr197 yan zinciri flavin halkasının üzerine dikey konumda bulunur. Bu düzenlenmenin çözücülerin girişini engelleyerek enzimi koruduğu düşünülmektedir. NADPH ile bağlanma Tyr197'nin ana zincire doğru hareket etmesine ve OH grubunun 6,4 Å hareketinden dolayı Cα-Cβ bağlarının çevresinde dönmeye sebep olur. Enzim NADPH kompleksinde flavin, nikotinamid ve Tyr197 halkalarının hemen hemen paralel olduğu belirlenmiştir. İnsan GR'sinin spektroskopik, kinetik ve katalitik nitelikleriyle ilgili yapılan bir çalışmada aktif bölgelerdeki Tyr114 ve Tyr197 amino asitleri Leu ve Ser aminoasitleriyle yerleri değiştirildiğinde enzimin kinetik özelliklerinin büyük ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak aktif bölgedeki amino asitlerin aromatikliğinin enzimin kinetik özelliklerini etkilediği belirlenmiştir (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin kendi substratı olan NADPH'a ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. GR'nin katalizlediği reaksiyon dönüşümlüdür. Fakat reaksiyonun ters yönde ilerlemesi için ortamda yüksek konsantrasyonda GSH ve NADP⁺ olmalıdır. *In vitro* şartlarda NADH az bir afinite ile elektron ve proton sağlayıcı olarak kullanılabilirse de NADPH fizyolojik şartlarda aktiviteyi sağlayan tek koenzimdir. Fizyolojik şartlarda reaksiyon esas olarak tek yönlüdür ve GR bu yolla hücre içerisinde GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlar (Douglas 1987; Açıkan 1990). GR enziminin aktivite ölçümü ya karışımdaki NADPH'ın azalması ya da GSH'ın oluşması esasına dayanarak yapılmaktadır. NADPH'ın oranının azalmasına dayanan ölçüm 340 nm'de spektrofotometrik olarak

takip edilerek aktivite belirlenir. GSH oluşumuna dayanan yöntemlerde ise 5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) kullanılır ve 412 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilir (Carlberg and Mannervik 1985; Toribio *et al.* 1996).

Enzimin aktivitesi ölçülürken GSSG, NADPH, uygun pH'daki uygun tampon ve genelde 1/20 oranında hemolizat veya homojenat kullanılmaktadır. NADH'ın K_M değeri, NADPH'ın K_M değerinden 17 kat daha büyük olduğundan NADPH'ı kullanmak tercih edilmektedir. Substrat olarak GSSG dışında CoASSG, CySSCy ve GSSO₃H molekülleri de kullanılabilir. Bazı yayınlarda ölçüm ortamına EDTA ve FAD'de katılmaktadır. Aktivite ölçüm ortamına son eklenen madde bazı yayınlarda NADPH, bazılarında ise enzim örneğidir. Enzim için aktivite birimi 1 μ mol NADPH'ın yükseltgenmesine sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Le Trang *et al.* 1983; McCallum and Barrett 1995; Lamotte *et al.* 2000).

Glutatyon redüktaz enzimi domuz eritrositi, sığır eritrositi, sıçan karaciğeri, sığır karaciğeri, koyun beyni, koyun karaciğeri gibi memeli kaynaklardan, mantar, siyanobakteri gibi mikroorganizmalardan ve buğday, mısır, bezelye ve ıspanak gibi bitkisel kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1975; Worthington 1975; Boggaram *et al.* 1979; Carlberg and Mannervik 1981; Acan ve Tezcan 1989; McCallum and Barrett 1995; Jiang *et al.* 1995; Mullineaux *et al.* 1996; Patel *et al.* 1998; Lamotte *et al.* 2000; Erat *et al.* 2003; Ulusu 2005).

GR enziminin saflaştırılması çalışmalarında çoğunlukla kromatografi tekniklerden yararlanılmış ve birçok kromatografi tekniği kullanılmıştır. Saflaştırmada kullanılan kromatografik teknikler başta afinite olmak üzere; iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir (Brodellius *et al.* 1974; Mannervik *et al.* 1976).

Sığır karaciğerinden GR enzimi 2',5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ve DEAE-Sepharose iyon değişim kromatografisi kullanılarak iki kromatografik basamakta 5456 kat ve %38,4 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sığır karaciğer GR enziminin

optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur. Enzimin mol kütlesi SDS-PAGE ile 55 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin kinetik özelliklerine yönelik çalışmanın sonucunda ise NADPH için K_M değeri 0,063±0,008 mM, GSSG için K_M değeri 0,154±0,015 mM olarak bulunmuştur. GR enziminin ürün inhibisyonu incelenmiş ve sonucunda NADP⁺'nin K_i sabiti 0,043±0,003, GSH'ın K_i sabiti ise 8,506±0,563 olarak bulunmuştur. NADP⁺'nin inhibisyon türü yarışmalı, GSH'ın inhibisyon türü yarışmasız olarak tespit edilmiştir (Ulus ve Tandoğan 2007).

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden GR enzimi 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ve Sephadex G-200 jel kromatografisi kullanılarak 1654 kat %41 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin optimal şartları incelenmiş ve optimum pH 8,0, optimum iyonik şiddet 50 mM Tris/HCl, optimum sıcaklık 10°C ve stabil pH ise 8,0 olarak bulunmuştur. Gökkuşığı alabalık karaciğeri GR enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucunda ise GSSG için K_M değerinin 0,025 mM, V_{max} değerinin 0,089 EU/mL, NADPH için K_M değerinin 0,055 mM ve V_{max} değerinin 0,143 EU/mL olduğu bulunmuştur. Böylece enzimin GSSG'ye olan afinitesinin NADPH'a olandan daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimin mol kütlesi SDS-PAGE ile 52 kDa olarak, jel filtrasyon kromatografisi ile ise yaklaşık 105 kDa olarak hesaplanmıştır (Tekman *et al.* 2008).

Çizelge 2.5. Farklı türlere ait GR enziminin bazı kinetik özellikleri

Enzim kaynağı	Substratlar				Kaynak
	GSSG		NADPH		
	K_M (mM)	V_{max} (EU/mL)	K_M (mM)	V_{max} (EU/mL)	
Balık karaciğeri	0,025	0,098	0,055	0,143	Tekman <i>et al.</i> 2008
Sığır eritrosit	0,149	0,676	0,071	0,093	Erat 2002
Koyun karaciğer	0,023	0,255	0,025	0,266	Ulus <i>et al.</i> 2005
Sığır karaciğer	0,154	-	0,063	-	Ulus and Tandoğan 2007

Yapılan başka bir çalışmada glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi ve GR enzimi insan eritrositlerinden 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanılarak tek kademedede saflaştırılmıştır. Kolondan önce G6PD 9150 kat ve %43 verimle daha sonra GR enzimi 8600 kat ve %26 verimle gradientli elüsyonla saflaştırılmıştır (Erat 2004).

Fare karaciğerinden GR enzimi 8-amino-2'-fosfo-adenozin difosfoadenozin ve N6-adenozin 2',5'-bisfosfat-Sephazokullanılarak birbirini izleyen iki afinite kromatografisi tekniği kullanılarak %66 verimle 4700 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin mol kütlesi 105 kDa olarak bulunmuştur. Alt biriminin mol kütlesi ise 55 kDa olarak tahmin edilmiştir. İzoelektrik fokuslama sonucunda saf enzimin izoelektrik pH'sı $6,46 \pm 0,36$ olarak tespit edilmiştir. Enzimin kinetik özelliklerine yönelik çalışmanın sonucunda ise NADPH için K_M değeri 0,0059 mM, GSSG için K_M değeri 0,107 mM olarak bulunmuştur. NADP⁺'nin inhibisyon türü lineer yarışmalı, GSH'ın inhibisyon türü yarışmasız olarak tespit edilmiştir (López-Barea and Lee 1979).

GR-I ve GR-II olarak belirlenmiş iki glutasyon redüktaz sığır siliyer cisimden DEAE agarose iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. GR-I'in mol kütlesi jel filtrasyon ile yaklaşık 140 kD olduğu ve iki alt birimden oluştuğu bulunmuştur. Öte yandan GR-II'in 670 kDa'den daha büyük mol kütlesiyle agregat olarak oluştuğu görülmüştür. GR-I'in alt biriminin yaklaşık 45 kDa olduğu SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. GR-I'in izoelektrik pH'sının 5,8 GR-II'nin izoelektrik pH'sının 6,4 olduğu belirlenmiştir. NADPH için K_M değerleri GR-I enzimi için 0,022 mM, GR-II enzimi için 0,084 mM olduğu, GSSG substratı için K_M değeri ise GR-I enzimi için 0,011 mM, GR-II enzimi için 0,098 mM olduğu bulunmuştur (May and Hitoshi 1997).

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enzimlerinin aktif formlarının dimer oldukları belirlenmiştir. Tetramer yapıda enzim olduğu da bilinmektedir, fakat bu yapı aktif olmayan ya da daha az aktif formdur. İnsan eritrosit GR enziminin yüksek NADPH konsantrasyonunda inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu durum dimer yapıdaki enzimin tetramer yapıya dönüşmesiyle açıklanmaktadır (Rendon *et al.* 1986).

Buzağı karaciğerinden saflaştırılan enzimin PAGE'de yürütülmesi sonucu büyük bir bant ve onu takip eden küçük bir bant olduğu belirlenmiştir. Küçük bandın disülfür bağlarının oluşturduğu agregasyondan (kümelenme) kaynaklandığı düşünülmüştür. 0,2 M GSH ile ön inkübasyona tabi tutulduğunda küçük band gözlenmemiştir. Bu çalışmada ultrasantrifüj ile enzimin mol kütesinin 100 kDa iki alt birimli, prostetik grup 1FAD/alt birim, izoelektrik pH'sı 6,1, K_M değeri GSSG için $101 \pm 7 \mu M$, NADPH için $21 \pm 1 \mu M$, optimum pH=7,0 olarak belirlenmiştir ve bu enzimin amino asit dizilimi de belirlenmiştir. Buzağı karaciğerinden elde edilen GR, domuz ve insan eritrositinden elde edilen enzim ile kinetik ve elektroforetik özellikleri açısından benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1981).

İlaçların ve bazı iyonların GR enzimi üzerinde inhibitör etkisi araştırılmıştır. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GR enzimi ile yapılan *in vitro* çalışmalar incelendiğinde streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin, ampisilin, linkomisin, klindamisin, amoksisilin, amikasin sülfat ve metamizol sodyum ilaçlarının GR enzimini aktive ettiği, metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum, sülfanilasetamid, sülfanilamid, seftriakson sodyum, rifamisin SV sülfat, vankomisin HCl, kloramfenikol sodyumsüksinat, sefuroksim sodyum, imipenem, seftazidim pentahidrat, ornidazol, asetilsalisilikasit, klaridromisin, lornoksikam, ketoprofen, diklofenak sodyum, tenoksikam, meloksikam, feniramidol HCl ve gadopentetik asit ilaçlarının ise inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir (Erat 2002; Şentürk 2006; Karaman *et al.* 2012). Ofloksasin, levofloksasin, sefsazolin ve sefepim antibiyotiklerinin tavuk karaciğerinden saflaştırılan GR enzimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Demir *et al.* 2006). Koyun karaciğerinde ofloksasin, levofloksasin, sefepim ve sefezolinin GR enzim aktivitesini inhibe ettiğini, thiamphenicol ve gentamisin ise enzim aktivitesini çok az inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Erat and Çiftci 2003).

Sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur;

furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin ilaçları akciğer dokusu G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini inhibe etmiştir. Kotininin yüksek konsantrasyonlarda G6PD ve 6PGD enzimlerini aktive ederken, GR enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerin aktivitesi üzerine de digoksin, dopamin, furosemidin inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının inhibisyon etkisi gözlenmemiş. Levofloksasin ilacının her iki dokudaki üç enzimin aktiviteleri üzerinde *in vivo* etkisi araştırılmış ve ilacın enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkisi tespit edilmemiştir. Furosemidin kalpte üç enzim üzerinde *in vivo* olarak etkisi gözlenmezken, akciğerde G6PD enzimini aktive ettiği, GR enzimini inhibe ettiği, 6PGD enzimi üzerinde de herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir (Adem 2011).

Görüldüğü gibi enzimler ilaç ve çeşitli kimyasal maddelerden etkilenmektedirler. Bazı maddeler enzimleri inhibe ederken bazıları aktive eder. Bazılarının da enzim aktiviteleri üzerinde etkileri yoktur. Bazı aktivatör ve inhibitör maddeler aynı zamanda ilaç olarak da kullanılmaktadır. Ancak günümüzde çokça kullanılan antibiyotiklerin genlerin ekspresyonu üzerine etkileri fazla araştırılmamıştır. Örneğin yaptığımız literatür taramalarında gentamisin (aminoglikozid grubu), amoksisilin (penisilin grubu) ve sefazolin sodyum (sefalosporin grubu) antibiyotiklerinin G6PD, 6PGD ve GR gibi önemli enzimlerin ekspresyonu üzerine etkileri çalışılmamıştır (Sertie *et al.* 1996; Kola and Hertzog 1997; Kayaalp 2002; Cankaya *et al.* 2007). Ancak özellikle kalıtsal genetik bozukluklar gibi bazı hastalıklarda dokudaki bir veya daha fazla enzimin eksikliği veya tam yokluğu söz konusu olabilir; anormal şartlar, spesifik bir enzimin aşırı aktivitesi nedeniyle oluşmuş olabilir. Bu nedenle kan plazmasındaki, eritrositlerdeki veya doku örneklerindeki belli enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesi, hastalıkların tanısı için önemlidir (Lehninger *et al.* 2007).

Oksidatif stresin plankton (*Tigriopus japonicus*) GR'ı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, numuneler H₂O₂, ağır metal ve farklı tuzluluk seviyelerine maruz bırakılmıştır. Oksidatif stres ile alakalı GR geni klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. T.J GR cDNA sının 458 amino asidi kodlayan “open reading frame” içeren 1526 bp'den

oluştugu ve enzimin molekül kütesinin 49,6 kDa olduğu bulunmuştur. T.J. GR'sinin kurbağa (*Xenopus laevis*) ve flarial parazit (*Onchocerca volvulus*) GR'si ile büyük benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. FAD bağlanma bölgesi, piridin nükleotid-disülfid oksido redüktaz birinci sınıf aktif bölgesi ve NADPH bağlanma motifi gibi spesifik motifin T.J. GR'nin anlamlı amino asit sekansında korunduğunu tespit edilmiştir (Seo *et al.* 2006).

Yapılan bir çalışmada; nikotin ve nikotin+E vitamininin sıçanların kas, kalp, akciğer, testis, böbrek, mide, beyin ve karaciğer dokularında GR aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiştir. Nikotin (0,5 mg/kg; ip) karaciğer, akciğer, kalp, mide, böbrek ve testiste sırasıyla ~ %61,5; ~ %65; ~ %70,5; ~ %72,5; ~ %64 ve ~ %71,5 oranında GR'yi inhibe etmiştir. Beyinde ise ~ %11,8 aktivasyon etkisi göstermiştir. E vitamini desteği GR aktivitesindeki nikotin kaynaklı inhibisyonu testis dokusu hariç diğer dokularda engellemiştir. *İn vitro* çalışmalarda ise *in vivo* çalışmalara paralel sonuçlar görülmüş, karaciğer, akciğer, kalp, mide, böbrek ve testiste nikotinin inhibisyon etkisi görülmüş, nikotin+E vitamini birlikte incelendiğinde testis hariç diğer dokularda inhibisyon etkisi ortadan kalkmıştır (Erat *et al.* 2007).

Yapılan bir başka çalışmada gruplara ayrılan sıçanlara ginseng (100 mg/kg), sisplatin (7,5 mg/kg) ve ginseng+sisplatin (100 mg/kg, 7,5 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmış, alınan böbrek dokularında GST, CAT, SOD ve GPx aktiviteleri ölçülmüştür. Sisplatin uygulanan grupta söz konusu enzimlerin aktiviteleri azalmış. Sisplatinle birlikte ginseng uygulanan grupta böbreğin oksidatif stresten korunduğu GST, CAT, SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı görülmüştür (Yousef and Hussien 2015).

Yapılan bir başka çalışmada su perilerine asetonda çözülen malatyon (0,5; 0,75; 1; 4 µg/µL) ve klorpirfost (0,08; 0,12; 0,16 ve 0,28 µg/µL) uygulanmıştır. Klorpirfost uygulanan gruplarda glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri değişmemiş, malatyon uygulanan gruplarda ise GPx aktivitesi azalmış, GST aktivitesi artmıştır. Her iki kimyasalın uygulandığı gruplarda GR aktivitesi azalmıştır (Wu *et al.* 2011).

İnsan hepatoma hücreleri (HepG2 hücreleri) %5'lik (v:v) ısı-inaktive fetal sığır serumla, 100 µg/mL streptomisin ve 100 unit/mL penisilin ile desteklenmiş Dulbecco modifiye Eogle ortamında büyütülmüştür. Hidrojenperoksit kaynaklı apoptotik süreç boyunca GSSG içeriği ve GR aktivitesindeki değişiklikleri tespit etmek için HepG2 hücreleri 24 saat boyunca 0,5 mM hidrojenperoksit ile inkübe edilmiştir. GSH/GSSG oranı 24 saat inkübasyonda önemli derecede azalmıştır. Benzer şekilde HepG2 hücrelerinin GR aktivitesi hidrojenperoksit kaynaklı apoptozis süresince önemli ölçüde azalmıştır. GR aktivitesindeki azalışın hidrojenperoksit maruz kalan HepG2 hücrelerinin yarı kantitatif RT-PCR ile belirlenmiş GR mRNA seviyesindeki azalıştan kaynaklandığı bulunmuştur. Bu sonuçlar hidrojenperoksit kaynaklı oksidatif stresin HepG2 hücrelerinin GR aktivitesini mRNA düzeyinde aşağı doğru düzenlediğini ve bunun sonucunda apoptotik süreçte hücrede GSSG birikimi gerçekleştiğini göstermiştir (Kim *et al.* 2010).

Budak *et al.* (2014a)'ün yaptıkları bir çalışmada sıçanların içme suyuna $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,87;3;30 ve 300 ppm konsantrasyonunda) karıştırmış 100. gün sonunda sıçanların karaciğerlerinden hazırlanan homojenatlarda GPx, GST ve GR enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Tüm gruplar kontrol gruplarıyla kıyaslandığında 0,87 ppm konsantrasyonunda her üç enzimin de aktivitesinin karaciğerde önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Dört farklı demir konsantrasyonunda da mRNA seviyeleri incelenmiş, GST ve GR'nin mRNA seviyesinin değişmediği, GPx'in ise baskılandığı görülmüştür.

Yapılan bir deneyde 4 gruba ayrılan wistar sıçanlara nikotin, nikotin+hcG ve nikotin+taurin uygulanmıştır. Alınan testis dokularında nikotin uygulanan grupta kontrolle kıyaslanınca antioksidan enzimler olan GPx, GR, GST, G6PD ve γ -GT aktivitelerine bakılmıştır. Söz konusu enzimlerin tümünün aktivitesinin önemli ölçüde azaldıkları görülmüştür ($p < 0,05$). Nikotin ile birlikte taurin verilen grupta ise kontrolle kıyaslandığında enzim aktivitelerinin korunduğu görülmüştür (Jana *et al.* 2010).

Yapılan bir başka çalışmada 20-24 g ağırlığındaki albino erkek fareler kullanılmış. T-2 toksin 1 mL DMSO'da çözülmüş ve ihtiyaç duyulan konsantrasyona PBS tamponuyla seyreltilmiştir. Farelere T-2 toksin 1LD50 (5,61 µg/kg vücut ağırlığı) ve 2LD50 (11,2

$\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı) olmak üzere iki farklı dozda i.p. olarak 7 gün boyunca enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna ise sadece PBS verilmiştir. Farelerin sakrifiye edilmesinden sonra alınan karaciğer dokularında GR, GST, GPx, SOD, CAT aktivitesi, GSH miktarı ve söz konusu enzimler için Real-Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. GSH seviyesine bakıldığında 1LD50 dozunda GSH seviyesinde artış, 2LD50 dozunda ise önemli azalış görülmüştür. Her iki dozda da kontrolle kıyaslandığında GR aktivitesinde bir değişiklik görülmemiştir. GPx ve CAT aktiviteleri her iki dozda da artmış, i SOD aktivitesi ise 1LD50 dozunda değişmezken 2LD50 dozunda önemli ölçüde azalmıştır. Enzimlerin gen ekspresyon profilini bakıldığında şu sonuçlar görülmüştür; 1LD50 dozunun aksine, 2LD50 dozajında Gpx, Gst, Gr, Cat ve Sod'un gen ekspresyon seviyeleri baskılanmış, azalmıştır (Chaudhari *et al.* 2009).

Yapılan bir çalışmada ağırlığı 180-210 g arasında değişen sıçanlara ısı ile inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* mineral yağda %0,5'lik konsantrasyonda hazırlanarak arka ayaklarından enjekte edilmiştir. 21. gün sonunda karakteristik lezyon görülen sıçanlar deneyler için seçilmiştir. Kontrol grubuna ise sadece mineral yağ enjekte edilmiştir. Sıçanlardan alınan karaciğer dokuları antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve glutatyon miktarı ölçülmek üzere muhafaza edilmiş, uygulama grubu kontrolle kıyaslandığında SOD ve GR aktivitelerinde değişiklik görülmezken, CAT ve GPx aktivitelerinde düşüş G6PD aktivitesinde ise önemli ölçüde artış görülmüştür. Glutatyon tayini yapıldığında ise GSH içeriğinin azalması ve GSSG içeriğinin artması sonucu GSH/GSSG oranının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Comar *et al.* 2013).

Yapılan bir çalışmada farelere asitleştirilmiş (0,2 M HCl ile pH:4,0) fizyolojik serum, kontrol grubuna ise sadece fizyolojik serum verilmiştir. Karaciğer dokuları alınarak antioksidan enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Karaciğer GSH miktarlarının yaşa bağımlı olup olmadığı araştırılmak için genç fareler ve yeni süttten kesilmiş farelerde GSH ve GSSG tayini yapılmıştır. Sonuçlara göre GSH miktarı genç farelerde yeni süttten kesilenlere göre oldukça düşük bulunmuş ($p<0,001$), ancak GSSG miktarlarında önemli değişiklik görülmemiştir. Sonuçlar genç farelerde yeni süttten kesilenlere göre GR aktivitesinin önemli ölçüde yüksek olduğunu ($p<0,001$) göstermiştir. Ayrıca Western

Blot sonuçlarına göre de GR proteininin miktarı genç farelerde çok yüksek çıkmıştır. Ancak gen ekspresyon analizinde Gr geninin ekspresyonunda önemli bir değişiklik görülmemiştir (Liang *et al.* 2011). Sonuçlara göre 24 saat tuzlu çözelti ile muamele sonucunda karaciğer GSH miktarı yeni süttten kesilen farelerde önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,01$). Ancak genç farelerde GSH miktarı azalmıştır ($p<0,01$) ve bu yeni süttten kesilen farelere kıyasla önemli ölçüde yüksektir ($p<0,001$). 24 saat uygulamanın sonucunda GSSG miktarı ise genç farelerde daha yüksektir ($p<0,01$). GR aktivitesine bakıldığında ise kontrol grubuyla kıyaslandığında 24 saat uygulamadan sonra yeni süttten kesilen grupta ($p<0,05$) ve genç farelerde ($p<0,001$) GR aktivitesi artmıştır. Dahası GR aktivitesi yeni süttten kesilen farelere kıyasla her zaman diliminde önemli ölçüde yüksektir ($p<0,05$ 0.saat; $p<0,01$ 8. Saat; $p<0,001$ 24.saat). Tüm bu sonuçlardan genç farelerin tuzlu çözeltinin toksik metabolitlerine karşı antioksidan enzimler üretebildiği, ancak yeni süttten kesilen farelerin doğuştan antioksidan enzim aktivitelere bağlı olarak uygun tepki gösteremedikleri ve bu durumun genç farelerde de şiddetli karaciğer hasarına neden olabildiği düşünülmektedir (Liang *et al.* 2011).

Ullah *et al.* 2015 yaptıkları bir çalışmada endosülfanın güney Asya sazanının beyin, solungaç, karaciğer ve kas dokularında antioksidan enzimlerin aktivitesini incelemişlerdir. Endosülfan LD50 (toksik maddenin %50 öldürücü dozu) seviyesinde 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimlerinde balıkların sularına katılarak verilmiştir. Endosülfan uygulanan balıkların incelenen tüm dokularında zamanla orantılı olarak GR, GST, CAT ve GPx aktivitesinin ve GSH seviyelerinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür ($p<0,05$).

Yapılan bir başka çalışmada sıçanlara içme sularına katılarak 0,87; 3; 30; 300 ppm konsantrasyonlarında demir 4 ay boyunca verilmiştir. Uygulama sonunda böbrek dokularında G6PD, 6PGD, GR, GST ve GPx aktivitelere ve gen ekspresyonlarına ve GSH seviyesine bakılmıştır. GSH seviyesinin demirin tüm konsantrasyonlarında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Gen ekspresyonu sonuçlarına bakıldığında G6PD, 6PGD ve GPx'in 0,87 ppm demir konsantrasyonunda ekspresyonunun arttığı görülmüştür.

G6PD'nin ve GST'nin diğerkonsantrasyonlarda ekspresyonu değişmezken, 6PGD ve GPx ekspresyonu baskılanmıştır. GR'nin ekspresyonunda önemli bir değişiklik görülmezken, GR aktivitesinin tüm konsantrasyonlarda azaldığı görülmüştür. 6PGD'nin aktivitesinin hiçbir demir konsantrasyonunda değişmediğı, GPx aktivitesinin arttığı, G6PD ve GST aktivitesinin ise azaldığı görülmüştür. Aktivite ölçümlerinin sonucunda ekspresyon analizi ile koordineli bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Budak *et al.* 2014b).

Bansal *et al.* 2005'un yaptıkları çalışmada Wistar albino sıçanlara N-nitrosodietilamin (NDEA), NDEA+E vitamini ve E vitamini (200 mg/kg vücut ağırlığı) i.p. olarak 7, 14 ve 21 gün boyunca uygulanmıştır. Uygulama sonrasına karaciğersüperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), GPx, GR ve GST aktiviteleri ölçülmüştür. SOD aktivitesinin NDEA, NDEA+E vitamini ve E vitamini uygulanan gruplarda önemli bir değişiklik göstermediğı bulunmuştur. CAT aktivitesinin NDEA uygulanan tüm gruplarda azaldığı ancak NDEA+E vitamini uygulanan gruplarda 14. ve 21. gün sonunda aktivitenin korunduğı görülmüştür. GPx ve GST aktivitesinin ise hem NDEA uygulanan tüm gruplarda hem de NDEA+E vitamini uygulanan tüm gruplarda arttığı görülmüştür. GR aktivitesi NDEA uygulanan gruplarda 14. ve 21. gün sonunda azaldığı, NDEA+E vitamini uygulanan gruplarda ise aktivitesinin korunduğı rapor edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada sıçanlara CCl₄ 0,064 mL/100 g dozlarında uygulanmıştır. 12, 36, 70, 96, 110 ve 125 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve karaciğerdokuları toplanmıştır. GPx ve GR enzimlerinin aktiviteleri, gen ve protein ekspresyonları ölçülmüştür. Sonuçlara göre GPx ve GR aktivitesinde maksimum artışın 96 saatlik uygulama sonucu olduğu rapor edilmiştir. GPx'in spesifik aktivitesinin 96 saat sonunda kontrolle kıyasla 2,5 kat arttığı, GR'nin aktivitesinin ise 2,1 kat arttığı görülmüştür. Gen ekspresyon analizinde ise 96 saat uygulama sonunda Gr geninin ekspresyonun 3 kat artarken GPx geninin ekspresyonunu 2,5 kat arttığı bulunmuştur. Western Blot analizi sonucuna göre ise hepatik GPx ve Gr proteinlerinin ekspresyonu CCl₄ uygulaması sonucunda önemli ölçüde artmıştır (p<0,05) (Iskusnykh *et al.* 2013).

Ray *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada sıçanlardan kolagenaz sindirim metoduyla hepatositleri izole etmişler ve %10'luk fetal sığır serumla destekli kültür ortamına aktarmışlardır. Kültür ortamına aktarılan hepatositler 1, 2, 4 ve 6 saat boyunca 37°C'de 10 µM As₂O₃ ile muamele edilmiştir. GR aktivitesi ölçüldüğünde As₂O₃ uygulaması ile GR aktivitesinde önemli azalış görülmüştür (p<0,05). Ayrıca GSSG ve NADPH için K_M ve V_{max} değerlerinde kontrolle kıyaslandığında azalış görülmüştür. Ekspresyon analizi yapıldığında ise GR'nin 1 saat arsenik uygulamasıyla gen ekspresyonunun indüklendiği ve giderek önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Yaptığımız bu çalışmada küçükbaş hayvanlar üzerinde kullanılan ilaçların, keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerine kinetik özellikleri ve bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarına göre yukarıda bahsi geçen enzimler üzerine ilaçların çalışmamıza özgün bir değeri katmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullandığımız standart serum albümin, TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin), NADPH (β -nikotinamid adenin dinükleotidfosfat) (Na tuzu) (NADP^+), Coomassie Brilliant Blue G-250, okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), glukoz 6-fosfat (mono Na tuzu) ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; trikloroasetik asit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, sodyum hidroksit, potasyum klorür, hidroklorik asit, asetik asit, sodyum klorür, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, gliserin, potasyum asetat, etanol, potasyum klorür, metanol, sodyum asetat, izopropanol E. Merck AG'den; akrilamid, brom timol mavisi, N,N'-metilen bisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex-G100 ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B ise Pharmacia'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında gerekli olan alet ve cihazlardan aşağıda sıralanmıştır.

Spektrofotometre	: Beckman Coulter
pH metre	: Thermo Orion Star 211
Elektroforez tankı	: BIO RAD (Dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Afinite kolonu	: (1x10), Sigma (ABD) soğutmalı ve kapalı sistem oluşturucu
Karıştırıcı (Vorteks)	: IKA
Hassas terazi	: Gec avery
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Otomatik pipet	: Eppendorf

Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Wisestir WSH 20-A
Saf su cihazı	: Direct-Q 8UV
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: MS mojour sciense
Buzdolapları	: İndesit
Derin dondurucu (-80°C)	: Thermo Medical Freezer 8800 Series

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çalışmalarımızdaki çözeltileri hazırlamak için saf su kullanıldı.

3.1.3.a. Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti

1. 1mM EDTA + 2 mM DDT+20 mM Tris/HCl (pH= 7,5) : 1,3 g Tris-HCl, 0,037 g DDT, 0,146 g EDTA alınarak bir miktar saf suda çözüldü. pH'sı 0,1 M HCl ile ayarlandı. Hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Aktivite ölçümünde gerekli olan çözeltiler:

1. 1 M Tris/HCl + 5 mM EDTA (pH= 8,0): 0,121 g (5 mmol) Tris ve 0,058 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 95 mL destile suda çözüldürüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH 8,0 yapıldı. Toplam hacim su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. 6 mM 6PGA: 0,091 g (0,3 mmol) 6PGA alınıp bir miktar suda çözüldü. Son hacmi 50 mL olana kadar saf su ilave edildi.
3. 0,1 M MgCl₂: 0,47575 g (5 mmol) alınıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 50 mL olana kadar saf su ilave edildi.
4. 6 mM G6P: 0,091 g (0,3 mmol) G6P alınıp bir miktar suda çözüldü. Son hacmi 50 mL olana kadar saf su ilave edildi.

5. 2 mM NADP⁺ Çözeltisi için: 0,153 g NADP⁺ (0,1 mmol) tartılarak bir miktar saf suda çözündürüldü. Son hacmi 1 L olana kadar saf su ilave edildi.

6. 2 mM NADPH Çözeltisi için: 16,6 mg NADPH ($9,9 \times 10^{-3}$ mmol) alınarak hacmi suyla 10 mL'ye tamamlandı.

7. 20 mM GSSG Çözeltisi: 123,76 mg GSSG (0,1 mmol) tartılarak bir miktar saf suda çözündü. Son hacmi 10 mL olana kadar saf su ilave edildi.

3.1.3.c. Afinite kromatografisi kolonu için gerekli olan çözeltiler:

1. 50 mM KH₂PO₄ + 1 mM DTT + 1 mM EDTA, pH=7,3 (Afinite kolonun paketlenebilmesi, dengelenebilmesi ve yıkanabilmesi için gerekli olan tampon): 0,292 g EDTA, 6,8 g KH₂PO₄ ve 0,152 g DTT alındı 950 mL saf suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

2. 1 mM EDTA + 1mM DTT + 50 mM KH₂PO₄ + 80 mM KCl + pH=7,3 (Kolonun yıkanması için kullanılan tampon): 0,292 g EDTA, 0,152 g DTT, 6,8 g KH₂PO₄ ve 0,298 KCl alınarak 950 mL suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

3. 0,1 M M K-fosfat /0,1 K-asetat, pH=7,65 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 3.tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 mL destile suda çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

4. 10 mM EDTA + 0,5 mM NADP⁺ + 80 mM KCl + 80 mM KH₂PO₄ (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,242g EDTA, 1,088 g KH₂PO₄, 0,6 KCl ve 0,381 g NADP⁺ karışımı 90 mL suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

5. 10 mM EDTA + 80 mM KCl + 80 mM K-fosfat + 2 mM NADP⁺ (Numune tatbikinden sonra afinite kolonuna tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için gerekli tampon): 1,088 g potasyum fosfat, 0,242 g EDTA, 0,6 KCl ve 0,382 g NADP⁺ karışımı 90 mL suda çözüldü pH'sı 0,1 M KOH ile 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

6. 50 mM potasyum fosfat + 1 mM EDTA + 1 mM GSH + 0,5 mM NADPH (Afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin afinite kolonundan elüsyonu için kullanılan tampon): 0,7 g K-fosfat, 0,032 g EDTA, 0,06 g GSH, 0,040 g NADPH karışımı 90 mL saf suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH ile pH metrede 7,3'e ayarlandıktan sonra toplam son hacmi 100 mL olana kadar saf su ilave edildi.

7. 0,5 M NaCl + 0,1 M Na-asetat (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 8,2 g Na-asetat (50 mmol) ve 29,2 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandı ve son hacmi 1 L olana kadar saf su ilave edildi.

8. 0,5 M NaCl + 0,1 M Tris (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için) 12,1 g Tris ve 29,2 g NaCl bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı 0,1 M HCl ile 8,5'e ayarlandı. Daha sonra hacim suyla 1 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d Elektroforez için gerekli olan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl (pH= 6,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCl ile yapıldıktan sonra son hacmi 100 mL olana kadar saf su ilave edildi.

2. 1 M Tris-HCl (pH= 8,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCl ile yapıldıktan sonra son hacmi 100 mL olana kadar saf su ilave edildi.

3. %0,8 Bisakrilamid - %30 Akrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid alınarak son hacmi 50 mL olana kadar saf su ilave edildi.

4. %10'lük amonyum persülfat çözeltisi: Amonyum persülfattan 1 g tartılarak son hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

5. %10'lük SDS: SDS'den 1 g tartılarak son hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 3 g Tris (12,5 mmol) ve 15 g glisin (0,1 mol) tartılarak 900 mL saf suda çözüldü %10'lük SDS'den 10 mL ilave edildi, pH 0,1 M HCl ile 8,3'e ayarlandı ve toplam son hacmi 1 L olana kadar saf su ilave edildi.

7. Numune tamponu: 0,5 mL %10'lük SDS'den, 1 mL%100'lük gliserinden 1 mL 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak saf suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampon kullanılmadan önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptolanol eklendi.

8. Sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 10 mL asetik asit 50 mL metanol ve 40 mL su içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 10 mL asetik asit 50 mL metanol, ve 40 mL su karıştırılarak elde edildi.

3.1.3.e. Protein tayini için gerekli olan çözeltiler (Bradford yöntemi)

1. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 50 mL %95'lik etanolde içerisine 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesi ilave edilerek çözüldü. Daha sonra çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit eklendi. Çözeltinin son hacmi 1 L olana kadar saf su ilave edildi.

3.1.3.f. Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon:

1. 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (pH:7,5) (kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve standartların çözülmesi için kullanılan tampon): 6,055 g Tris, 7,45 g KCl alınarak 900 ml saf suda çözüldü. pH 7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.g. İlaç ve kimyasal maddelerin stok çözeltileri

Amoksisilin: 150 mg amoksisilin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Ampisilin: 100 mg ampisilin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Tilozin: 50 mg tilozin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Oksitetrasiklin: 200 mg oksitetrasiklin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Neomisin: 500 mg neomisin bir miktar saf suda çözüp hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

Sülfadimidin: 160 mg sülfadimidin bir miktar saf su ile çözümlenip hacmi saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Penisilin G: 200 mg penisilin G saf su ile 1 mL hacme ulaşıldı

3.2. Yöntem

3.2.1. Keçi karaciğer dokusundan enzimlerin saflaştırılması çalışmaları

3.2.1.a. Homojenatın hazırlanması

Keçi karaciğer dokuları önce küçük parçalara bölünerek havan içine alındı ve üzerine sıvı azot dökülerek un görünümü haline gelinceye kadar öğütüldü. Ağırlığının 3 katı kadar homojenat tamponuyla muamele edilip 4°C'de 13000xg'de 60 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı alındı.

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

10 mL'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak bir behere alındı. Jel materyali katı maddelerin uzaklaştırılması için yaklaşık 500 mL saf su ile birkaç kez yıkandı. Jel yıkama esnasında şişirilmiş oldu. Şişirilen jelin havası su trombu yardımıyla alındı ve paketleme tamponu eklenerek jel süspanse edildi. Süspanse edilen jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona dikkatli bir şekilde paketlenildi. Jel kolon içinde çöktükten sonra peristaltik pompa kullanarak önce yıkama sonra da dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelendiği, 280 nm'de eluat ile tamponun absorbanslarının veya pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylelikle afinite kolonu hazırlandı. 3.2.1.a. kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP Sepharose-4B- afinite kolonuna aktarıldı. Enzim çözeltisinin hepsi kolondan geçtikten sonra saflaştırma işlemine yıkama işlemiyle devam edildi. Yıkama işleminden sonra bir süre

kolondan dengeleme tamponu geçirildi ve bu tampon kolondan geçerken toplanan elüatlardan spektrofotometrede absorbans değeri körle eşit olduğu zaman dengeleme işleminin bittiği anlaşıldı. Kolonun yıkanması bittikten sonra; sırayla G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin elüsyon çözeltileri geçirildi ve enzimler 1,5 mL'lik tüplere toplandı. Her bir tüpteki enzimlerin aktivitelerine bakılarak enzim ünitesi-tüp sayısı grafiği hazırlandı (Danner *et al.* 1977; Boggaram *et al.* 1979; Carlbeg and Mannervik 1981). Afinite sonrası enzim örneklerinin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı.

3.2.1.c. SDS-PAGE ile enzimlerin saflığının kontrolü

Saflaştırılan enzim, Laemmlı metodu uygulanarak %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı (Laemmlı 1970). Böylece enzimin saflık derecesi kontrol edilmiş olundu. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi;

Elektroforezde kullanılan camlar başta su ile daha sonrada alkol ile temiz bir şekilde yıkandı. Elektroforez camları üst üste getirildi ve özel kısıkaçlarla sabitleştirildi. Kısıkaçlarla sabitlenen camlar plakalar, sızdırmayı engelleyen sünger bulunduran jel hazırlama standına yerleştirildi. Öncelikle ayırma jeli çözeltisi hazırlandı ve plakaların arasında kalan boşluğa dikkatli bir şekilde 0,6 cm kalana kadar dolduruldu. Plakalar arasındaki jelin donması için kısa bir süre beklenildi. Ayırma jelinin donduğundan emin olduktan sonra yığma jeli hazırlandı ve donan ayırma jelinin üstüne pipetle dikkatli bir şekilde dolduruldu. Numuneleri yüklemek için kuyucukların oluşması nedeniyle elektroforez için özel taraklar cam plakalara dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yığma jeli de donduktan sonra taraklar dikkatli bir biçimde kuyucukları bozmadan yavaşça çıkartıldı. Tutuculardan çıkarılan içinde jel bulunan cam plakalar elektroforez tankına özel cam plaka tutuculara sabitlendi ve bu da tanka yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu.

100 µL enzim örneği, 100 µL numune tamponu, 100 µL gliserolden oluşan enzim numunesi 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu numuneler ve standart protein dikkatli bir şekilde jeldeki kuyucuklara 10 µL yüklendi.

Elektroforez tankı kapatıldı. 30 dk 80 voltta jel yürütüldü. Daha sonra akım 120 volt'a getirildi ve boya jelden akana kadar jel yürütüldü. Numunelerin yürümesinin takibi, numune tamponunda bulunan brom timol mavisi reaktifi ile yapıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra akım kesildi. Plakalar arasında bulunan jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel derhal sabitleştirme çözeltisine alındı. 20 dakika sabitleştirme çözeltisinde shaker ile karıştırılan jel, 20 dk sonunda sabitleştirme çözeltisinden çıkarıldı ve boyama çözeltisine alındı. Jel, 1 gece çalkalayıcıda çalkalandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra boya çözeltisinden çıkarılan jel son olarak yıkama çözeltisine alındı. Jelin rengi açılıp, protein bantları jelde iyice belirgin olana kadar jel shaker ile çalkalandı. Yıkama işlemi ardından görüntüleme cihazına alınan jelin fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.1. Elektroforez jellerinin hazırlanması

Yığıma jeli	Ayırma jeli
5 mL 1 M Tris-HCl pH:8,8	0,41 mL 1 M Tris-HCl pH:6,8
6,53 mL %30'luk akrilamid- %0,8 bisakrilamid	0,8 mL %30'luk Akrilamid- %0,8 bisakrilamid
0,2 mL % 10'lik SDS	0,03 mL % 10'lik SDS
0,13 mL %5'lik TEMED	0,03 mL %10'lik TEMED
1 mL saf su	2,45 mL saf su
0,2 mL %10'luk PER	0,07 mL %5'lik PER

3.2.1.d. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması ve enzimlerin molekül kütlelerinin belirlenmesi

Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimler molekül büyüklüğüne göre ayrılırlar. Ayırma işlemi proteinlerin kolon dolgu maddesi olan reçine porlarının içinden farklı hızlarla geçmesi esasına dayanır. Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimlerin elektroforezde yürütülmesi ile tek bantlar elde edildi. Bu enzimlerin doğal yapıları ve molekül büyüklüklerinin belirlenmesi için jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanıldı. Sephadex G-150 kolon materyali olarak kullanıldı. 5 g kolon materyali tartıldı ve 200 mL saf suya eklendi. 4 saat 90°C'de bekletildi ve jelin şişmesi sağlandı. Şişirilen polimer

materyalde bulunan hava kabarcıkları su trombu yardımıyla giderildi. Şişirilen ve havası uzaklaştırılan jel pH'sı 7,5 olan 0,05 Tris-HCl ve 0,1 M KCl tamponu ile doldurulan kolona dikkatli bir şekilde paketlenildi. Daha sonra kolon yine aynı dengeleme tamponu kullanılarak dengelendi. Peristaltik pompa kullanarak kolonun akış hızı 15 mL/saat'e ayarlandı. Kolonun dengelenmesi üstten verilen tamponla alttan alınan tampon çözeltinin 280 nm'de absorpsiyonu ve pH değerinin aynı olmasıyla anlaşıldı. Kolona numune tatbiki 1,9 mL protein çözeltisine 0,1 mL de gliserol eklenerek yapıldı. Tatbik edilen numune emildikten sonra üzerine pipetle dikkatli bir şekilde yürütme tamponu eklendi. Protein tatbik edilmesiyle 0,5 mL'lik hacimlerle kolondan elüsyonlar alındı. Her bir numune kolondan geçirildikten sonra kolon dengelenerek bir sonraki numune geçirildi. Enzimler kolondan elüe edilirken 280 nm'de NADP⁺ proteinlerin absorpsiyonunu maskeleyiği için 340 nm'de aktivite ölçümleriyle elüsyon takip edildi.

Molekül kütlelerinin hesaplanmasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. Kolon dengelendikten sonra kolonun void hacminin (V_0) belirlenmesi için blue dekstran geçirildi.
2. Devamında molekül kütleleri belli standartlar molekül kütleleri birbirine uzak olanlar ikişerli olarak kolona tatbik edildi. Her bir numune için elüsyon hacmi (V_e) belirlendi.
3. Standartlar kolondan geçirildikten sonra molekül kütlelerini bilmediğimiz protein çözeltileri kolona tatbik edip aynı şekilde elüsyonlar alındı ve V_e değerleri belirlendi.
4. Standartların ve numunelerin K_{av} değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.
5. Değerler hesaplandıktan sonra $\log M_K - K_{av}$ değerleri grafiği çizildi. Elde edilen grafikteki formülden K_{av} değerleri belirlenen proteinlerin molekül kütleleri hesaplandı. K_{av} değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

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

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

3.2.1.e. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi için aktivite ölçümü 37°C'de spektrofotometrik olarak Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu yöntemin esası; glukoz 6-fosfat varlığında NADP⁺'nin indirgenmesiyle oluşan NADPH'nin 340 nm'de absorbanı vermesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı (Beutler 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µL)	Hacim (µL)
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA 0,1 M MgCl₂ (pH= 8)	200	200
2 mM NADP⁺	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	40	40
10 dakika inkübasyon		
G6P	-	100

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu metod 6-fosfoglukonat varlığında 340 nm'de NADP⁺'nin indirgenmesiyle oluşan NADPH'nin absorbanı vermesi esasına dayanır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı (Beutler 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µL)	Hacim (µL)
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA 0,1 M MgCl₂ (pH=8,0)	200	200
2 mM NADP⁺	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	40	40
10 dakika inkübasyon		
6PGA	-	100

Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde spektrofotometrik metod kullanıldı. Carlberg and Mannervik'in tanımladığı gibi 1 mL'lik küvetlerle yapıldı. Bu metod GSSG varlığında 340 nm'de NADPH'ın yükseltgenmesinden dolayı azalan NADPH'ın absorbans vermesi esasına dayanır. 1 dakikalık zaman aralıklarında absorbans azalışı kaydedildi. Küvet içeriği Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µL)	Hacim (µL)
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA 0,1 M MgCl₂ (pH=8,0)	200	200
2 mM NADP⁺	100	100
20 mM GSSG	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	-	30

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

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

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.1.f. Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein miktarı tayini Bradford (1976) metodu ile gerçekleştirildi. Homojenatta ve saflaştırılan enzimde bulunan protein miktarı tayin edildi. Coomassie Brilliant Blue G-250 bu teknikte boya olarak kullanılan bir reaktiftir. Bu reaktif yapısında negatif yük bulundurur. Protein ise bulundurduğu pozitif yükten kaynaklı olarak boyanın negatif yüküne bağlanır. Boyanın 465 nm’de kırmızı ve 595 nm’de mavi olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Proteinin boyaya bağlanması ile kırmızı form mavi forma dönüşür. Tekniğin hassasiyeti çok küçük (1-100 µg) seviyelerdedir. Mevcut reaksiyon büyük oranda tekrarlanabilmekte ve hızlı bir şekilde vuku bulmaktadır.

Protein tayini için uygulanan prosedür şu şekildedir;

- a) 1 mL’de 1 mg protein bulduran BSA çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu.
- b) Tüplerin hacimleri saf su kullanarak 100 µL tamamlandı ve her bir tüpe 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- c) 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden 595 nm’de 3 ml’lik küvetlerde köre karşı absorbans bakıldı.
- d) Sonuçta elde edilen absorbans değerlerine karşı gelen µg protein miktarları ile standart bir grafik çizildi.
- e) 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans bakıldı. Yapılan işlem güvenilirlik açısından 3 kez tekrarlandı ve bu 3 ölçümün aritmetik ortalaması alınarak önceden çizilen standart grafik yardımıyla homojenatta ve saflaştırılan enzimde bulunan protein miktarları tayin edildi.

3.2.3. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan Enzimlerin Karakterizasyon ve Kinetik Çalışmaları

3.2.3.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum pH'larının belirlenmesine yönelik çalışmalar

Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5,0-8,0 aralığında değişen K-fosfat ve 7,0-9,0 arasında değişen Tris-HCl tamponları kullanıldı. Daha sonra uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi bakıldı.

3.2.3.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum iyonik şiddetlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla 1 mM EDTA içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 mM Tris/HCl (pH:8,0) sırayla aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.3.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum sıcaklıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar

Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C - 70°C arasında 10°C artan aralıklarla enzimin aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.3.d. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için stabil pH'larının bulunmasına yönelik çalışmalar

Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin stabil kaldığı pH'yı belirlemek için pH'ları 5,0-8,0 aralığında değişen fosfat tamponu ve pH'ları 7,0-9,0

aralığında değişen Tris-HCl tamponlarından yararlanıldı. Bu pH'lardaki tamponların 1 mL'sine 1 mL enzim karıştırılarak +4°C'de konuldu ve 24 saat arayla toplamda 5 gün boyunca enzimin aktivite ölçümlerinde stabil olduğu pH belirlendi.

3.2.3.e. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Enzimi için;

Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD enziminin G6P ve $NADP^+$ substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit G6P konsantrasyonunda $NADP^+$ nin beş farklı konsantrasyonlarıyla aktivite bakıldı. Sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak $NADP^+$ için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde $NADP^+$ 'nin sabit konsantrasyonunda G6P'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve G6P için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

6-Fosfoglukonat Dehidroenaz Enzimi için;

Keçi karaciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin 6PGA ve $NADP^+$ substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit 6PGA konsantrasyonunda $NADP^+$ nin beş farklı konsantrasyonlarıyla aktivite bakıldı. Sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak $NADP^+$ için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde $NADP^+$ nin sabit konsantrasyonunda 6PGA'nın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve 6PGA için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

Glutasyon Redüktaz Enzimi için;

Keçi karaciğerinden saflaştırılan GR enziminin GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH'cın beş farklı konsantrasyonlarıyla aktivite bakıldı. Sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH in sabit konsantrasyonunda GSSG' in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.2.4. İlaçların enzimler üzerinde inhibisyon etkisinin belirlenmesi

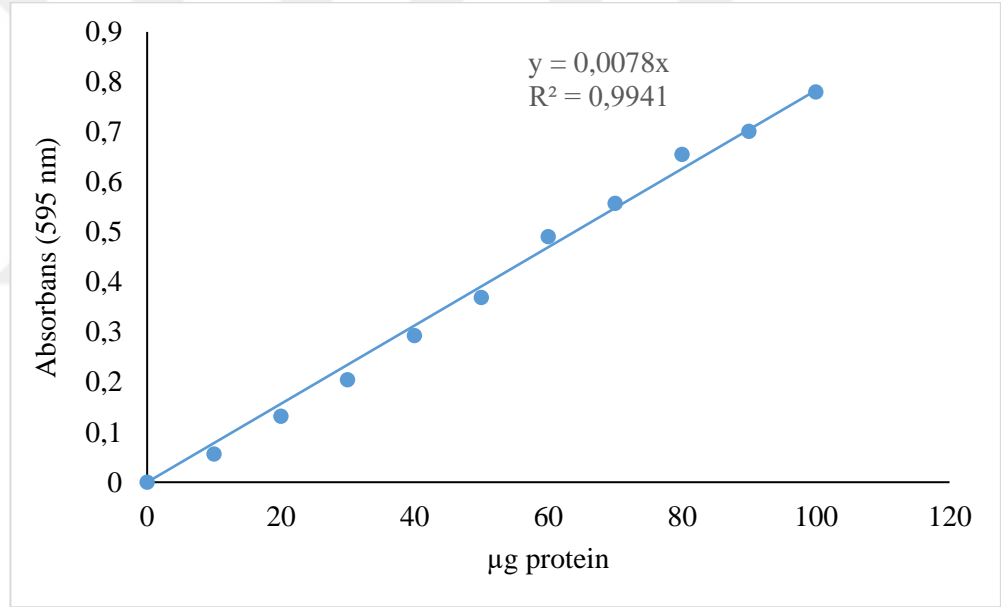
Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarla oluşan ürünlerin, enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini belirlemek için 5 farklı ürün konsantrasyonu ile aktivite üzerindeki etkisine bakıldı. Oluşan değerlerle % aktivite-ürün konsantrasyonu grafiği çizildi.

Grafik yardımıyla enzim aktivitesini %50 düşüren konsantrasyon değeri belirlendi. İnhibisyon şeklini ve K_i sabitini belirlemek amacıyla 5 farklı substrat konsantrasyonunda ilaçların 3 sabit konsantrasyonu ile aktivite bakıldı. Sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerin yardımıyla inhibisyon türü ve K_i sabitleri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Homojenat, ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.

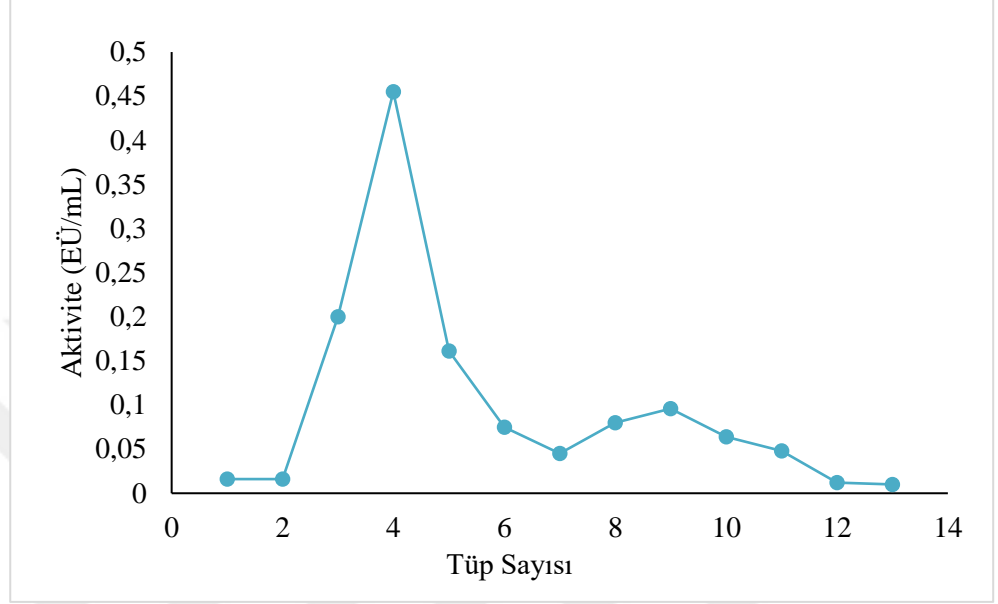


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

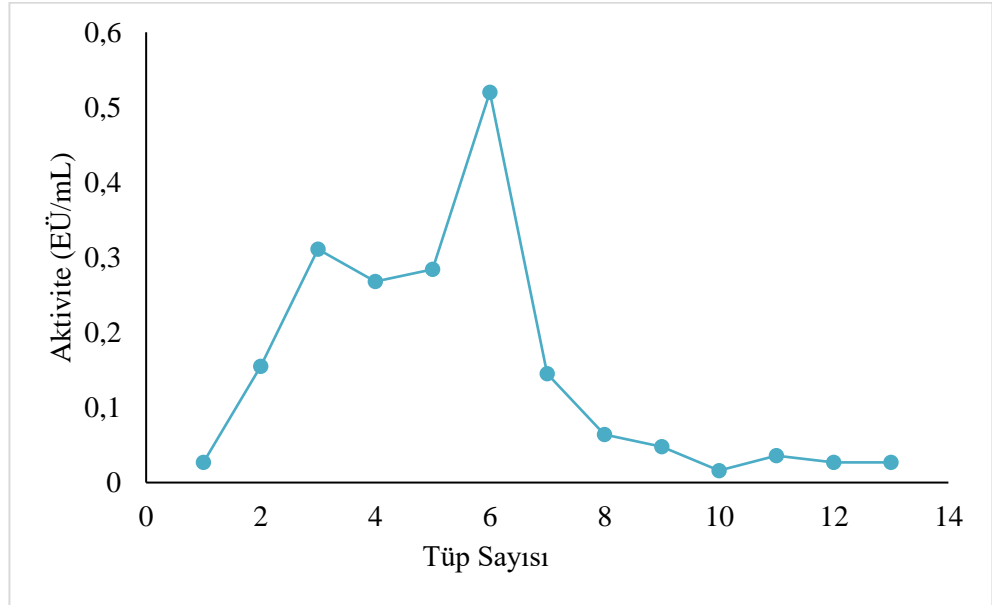
4.2. Afinite kromatografisi sonuçları

Hazırlanan homojenat süzüldükten sonra 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra sırasıyla G6PD, 6PGD ve GR elüsyon çözeltileri ile elüsyon yapıldı. Elüatlar ependorf tüplerine 1,5 ml'lik hacimlerle alındı. Elüatlarda 340 nm'de enzim aktiviteleri ölçüldü ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi.

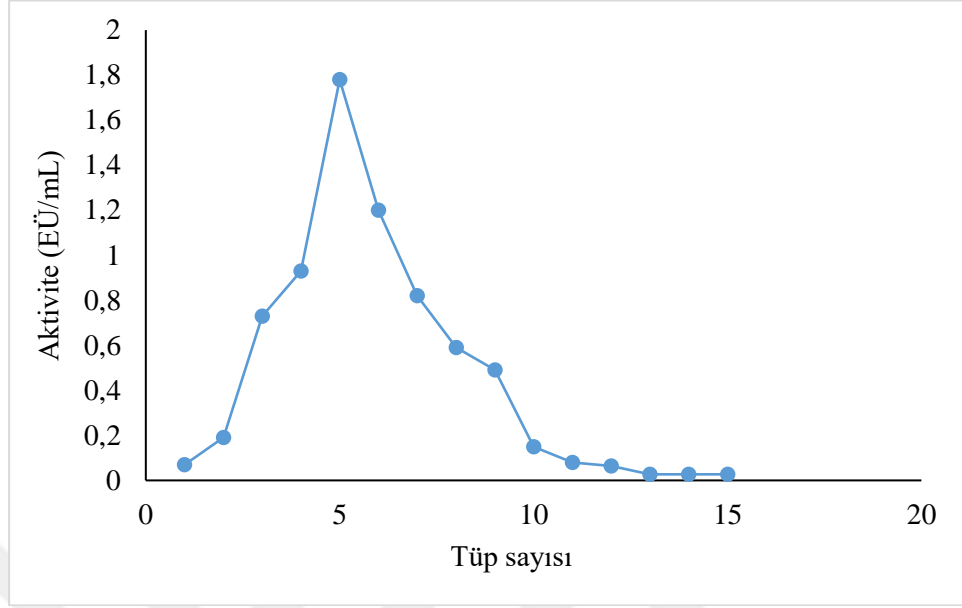
Enzim ünitesi-tüp afinite sayısı grafikleri Şekil 4.2.a, Şekil 4.2.b ve Şekil 4.2.c'de verilmiştir. Saflaştırma basamakları ve saflaştırma değerleri çizelgeler halinde verilmiştir.



Şekil 4.2. Keçi karaciğer G6PD enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği



Şekil 4.3. Keçi karaciğer 6PGA enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği



Şekil 4.4. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği

Çizelge 4.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

Numune türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homejenat	0,250	15	135,70	2035,5	3,75	0,0018	100	1
Afinite kromatografisi	0,456	1,5	0,06	0,0945	0,68	7,1960	18,13	3997,65

Çizelge 4.2. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları

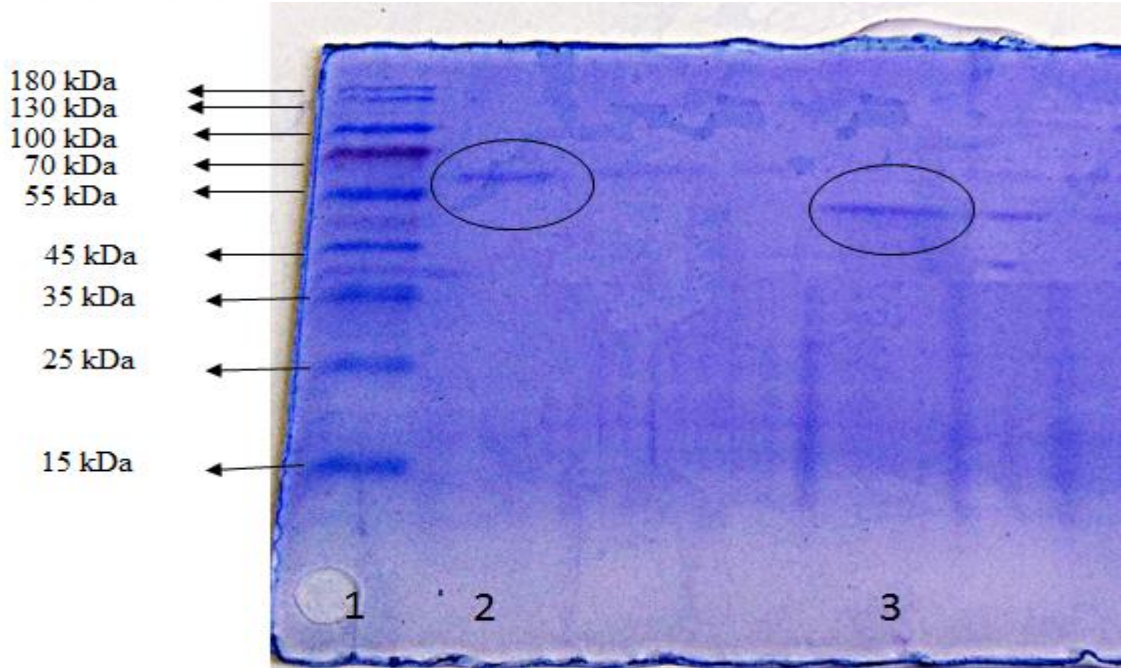
Numune türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,380	15	135,70	2035,50	5,70	0,0028	100	1
Afinite kromatografisi	0,520	1,5	0,025	0,038	0,78	20,8	13,68	7428,57

Çizelge 4.3. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin saflaştırılması basamakları

Numune türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,39	15	13,97	209,55	5,85	0,02	100	1
Afinite kromatografisi	1,78	3	0,029	0,08	5,34	61,38	91,28	2192,14

4.3. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan G6PD ve 6PGD Enzimlerinin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

Keçi Karaciğerinden elde edilen G6PD ve 6PGD enzimlerinin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3'te gösterildi.

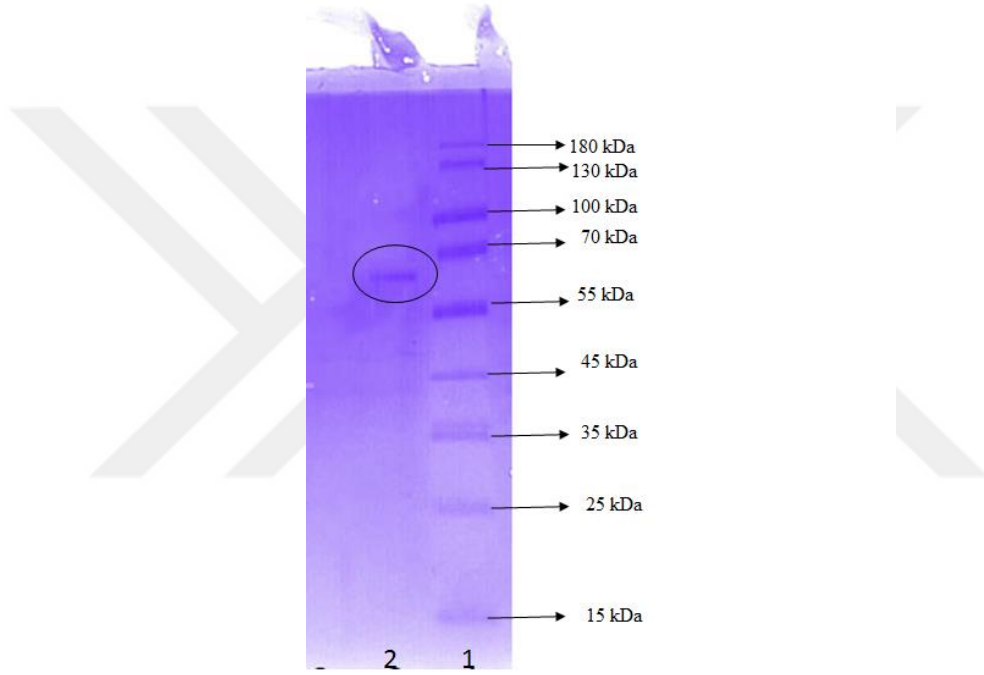


Şekil 4.5. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden saflaştırılan G6PD ve 6PGD enzimlerinin SDS- PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu: standart proteinler 2. kuyu afinite kolonundan elüe edilen G6PD enzimi 3. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen 6PGD enzimi.

4.4. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

Keçi Karaciğerinden elde edilen GR enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.4'te gösterildi.



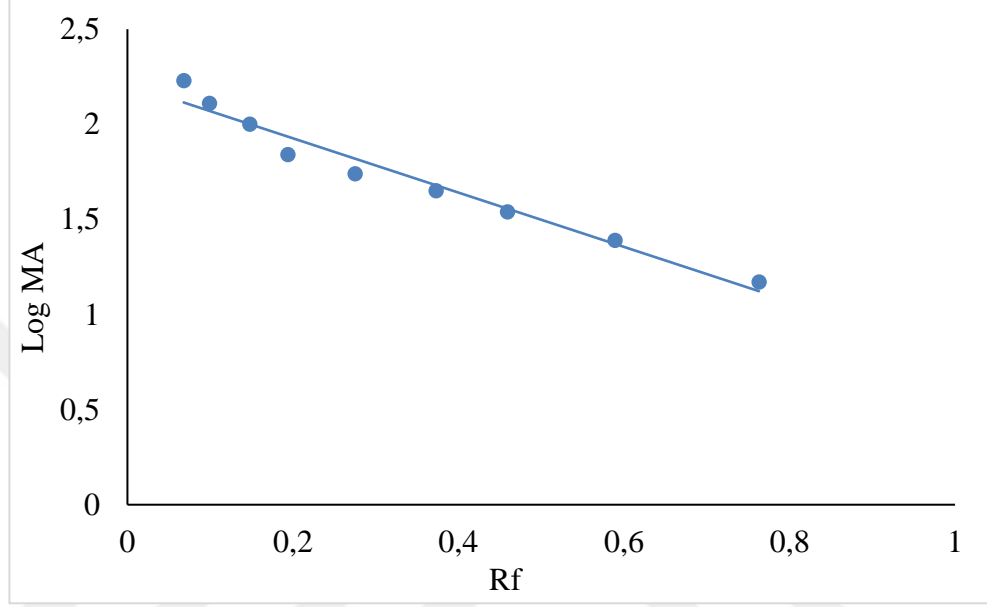
Şekil 4.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden saflaştırılan GR enziminin SDS- PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu: standart proteinler 2. kuyu afinite kolonundan elüe edilen GR enzimi.

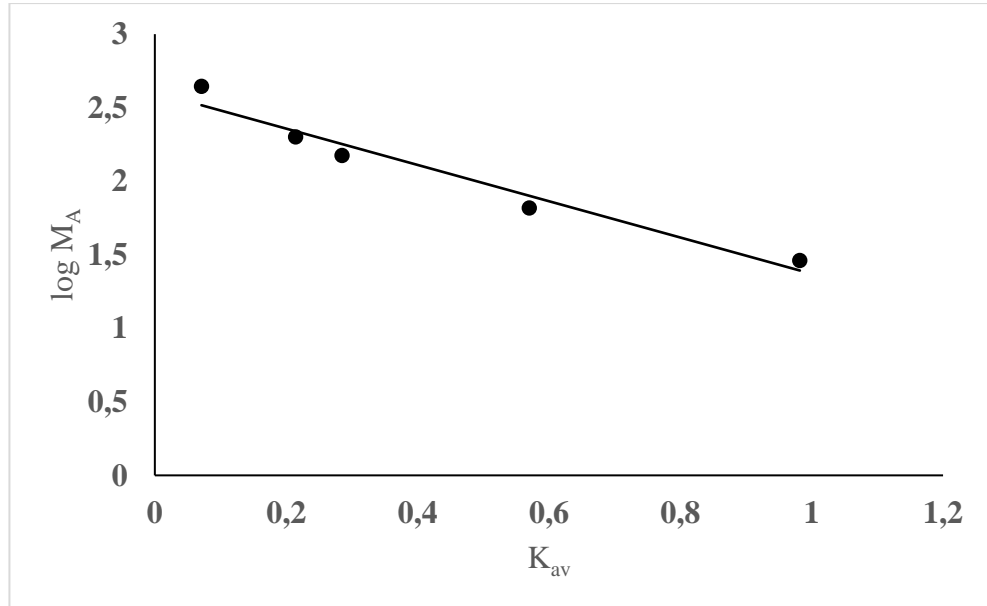
4.5. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD enzimlerinin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları

Afinite kolonundan alınan enzimler SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra fotoğrafları çekildi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Standart proteinlerin ve enzimlerin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Enzimler için R_f değerleri-log M_A grafiği çizildi (Şekil 4.5.a ve Şekil 4.5.b). Grafikten faydalanarak keçi karaciğer G6PD enziminin

monomer olduğu bulundu. keçi karaciğer 6PGD dimer olduğu bulundu. Keçi Karaciğer GR dimer olduğu bulundu. Molekül ağırlıkları ise yaklaşık G6PD için 63,1 kDa, 6PGD için 51,4 kDa, GR için 61,3 kDa olarak hesaplandı.



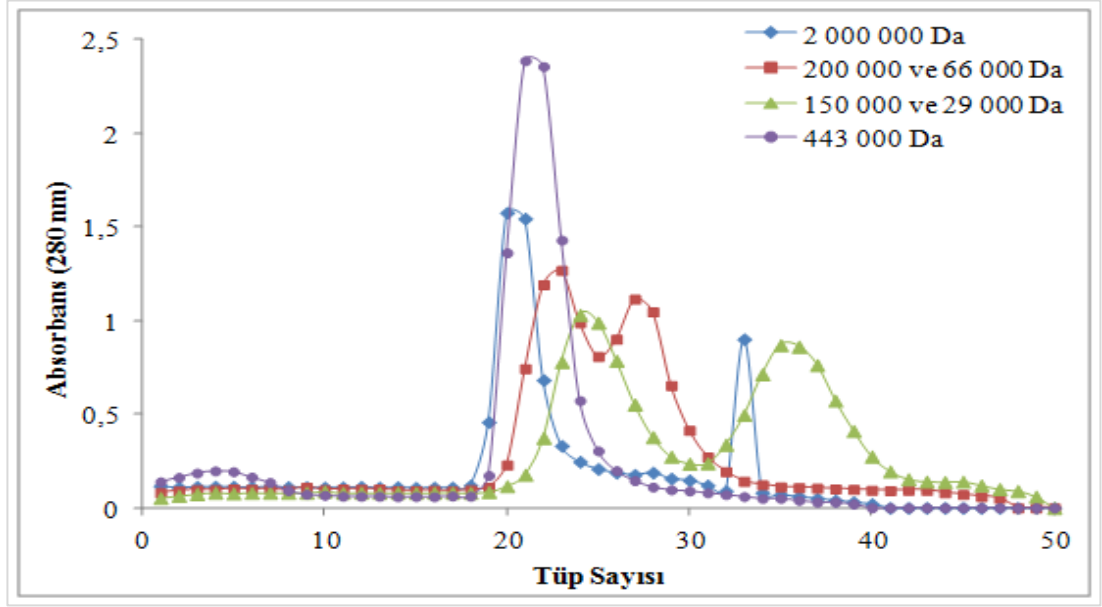
Şekil 4.7. G6PD ve 6PGD enzimleri için SDS-PAGE sonucu çizilen R_f- log M_A grafiği



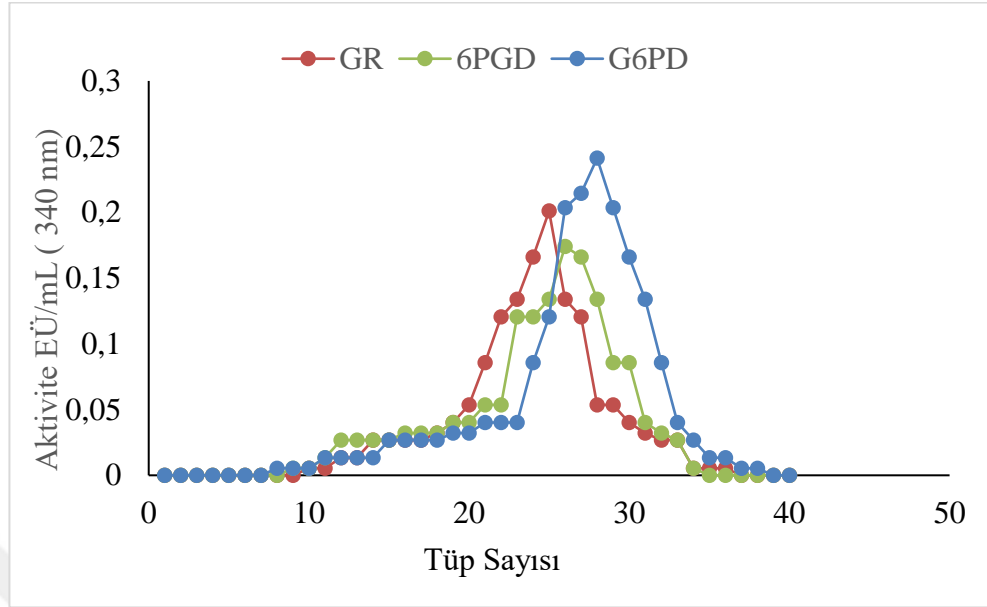
Şekil 4.8. GR enzimi için SDS-PAGE sonucu çizilen R_f- log M_A grafiği

4.6. Jel filtrasyon kromatografisi ile keçi karaciğer G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin tabii molekül kütlesi tayinini sonuçları

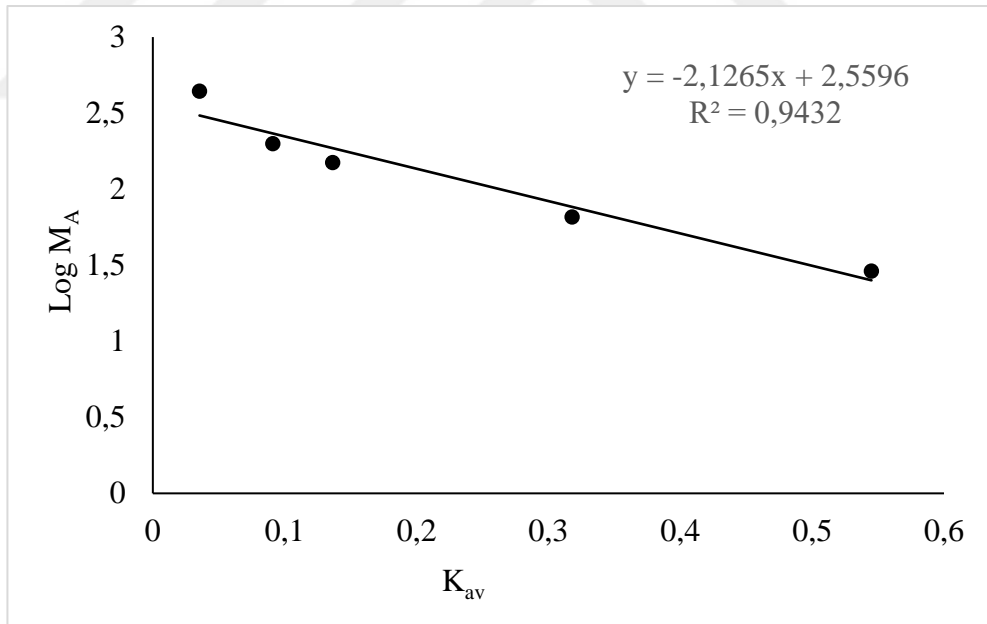
Enzimin molekül ağırlığını bulmak için, jel filtrasyon kolonundan önce blue dekstran sonra standart proteinler daha sonra ise afinite kolonundan elüe edilen en yüksek aktiviteli tüp Bölüm 3.3.1.d’de anlatıldığı şekilde geçirildi. Elüe edilen numunelerde 280 nm’de absorbands ölçümü yapılarak Şekil 4.6’deki grafik çizildi. Standart proteinler için K_{av} değerleri hesaplandı ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.8’deki K_{av} -log M_A grafiği çizildi. G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin elüsyon işleminden sonra tüp sayısına karşı 340 nm’de aktivite değerleri grafiği çizildi.



Şekil 4.9. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm’deki absorbands değerleri



Şekil 4.10. Jel filtrasyon kolonundan alınan enzimlerinin elüsyon grafiği



Şekil 4.11. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen K_{av} - $\log M_A$ grafiği

Çizelge 4.4. Keçi karaciğerinden saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin SDS-PAGE ve Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen molekül kütleleri ve alt birimleri

Enzimler	K_{av}	Molekül ağırlığı	Alt Birimler
G6PD	0,35	63,09	Monomer
6PGD	0,25	100,02	Homodimer
GR	0,2	125,89	Homodimer

4.7. Keçi Karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları

4.7.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

4.7.1.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

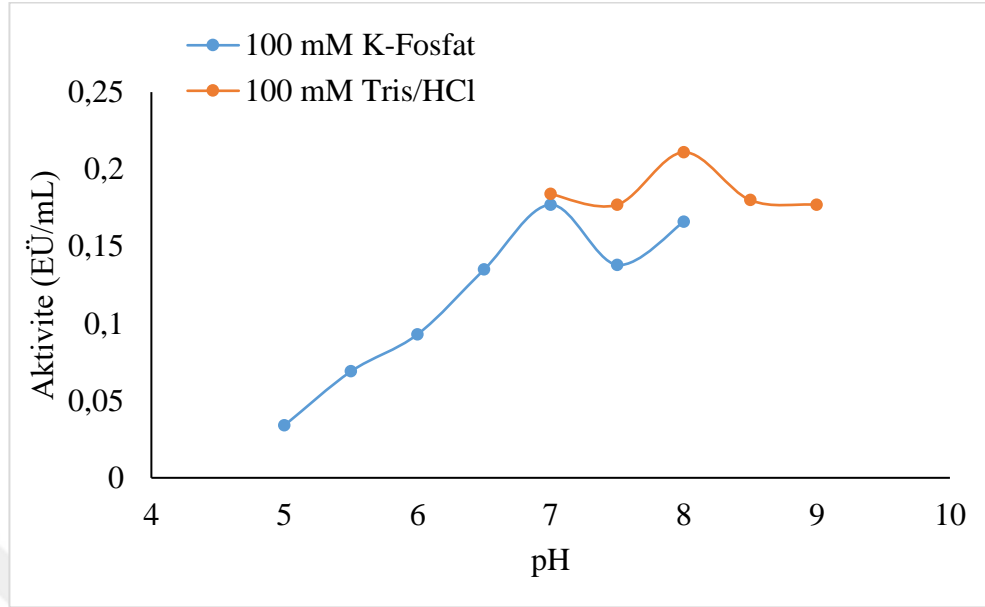
Keçi karaciğer G6PD enzimi optimum pH'sı bölüm 3.2.3.a' da anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,0-9,0 aralığında 100 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi (Çizelge 4.5-4.6) ve optimum pH grafiği çizildi (Şekil 4.9). Keçi karaciğer G6PD enzimi için optimum pH, 100 mM Tris-HCl pH=8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,034
5,5	0,069
6,0	0,093
6,5	0,135
7,0	0,177
7,5	0,138
8,0	0,166

Çizelge 4.6. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,184
7,5	0,177
8,0	0,211
8,5	0,180
9,0	0,177



Şekil 4.12. Keçi karaciğer G6PD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

4.7.1.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

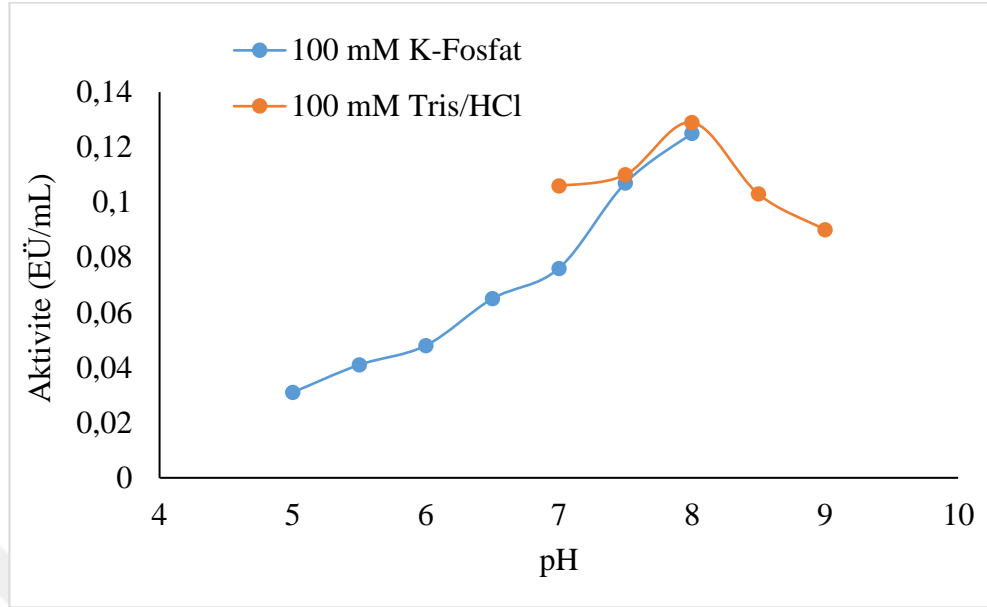
Keçi karaciğer 6PGD enzimi optimum pH'sı bölüm 3.2.3.a' da anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,0-9,0 aralığında 100 mM Tris/HCl ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi (Çizelge 4.7-4.8) ve optimum pH grafiği çizildi (Şekil 4.10). Keçi karaciğer 6PGD enzimi için optimum pH, 100 mM Tris-HCl pH=8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.7. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,031
5,5	0,041
6,0	0,048
6,5	0,065
7,0	0,076
7,5	0,107
8,0	0,125

Çizelge 4.8. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,106
7,5	0,110
8,0	0,129
8,5	0,103
9,0	0,090



Şekil 4.13. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

4.7.1.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

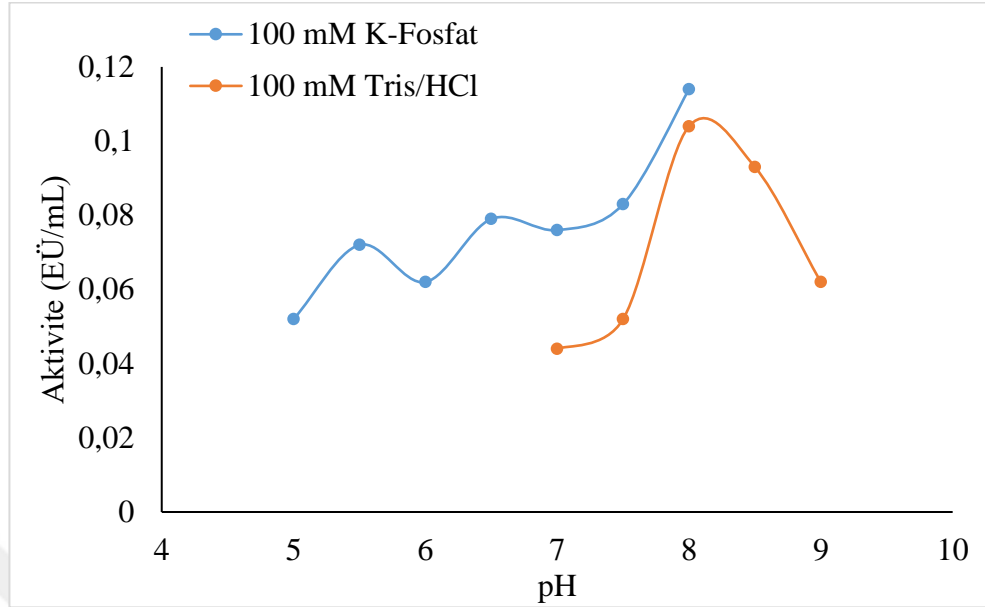
Keçi karaciğer GR enzimi optimum pH'sı bölüm 3.2.3.a' da anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,0-9,0 aralığında 100 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi (Çizelge 4.9-4.10) ve optimum pH grafiği çizildi (Şekil 4.11). Keçi karaciğer GR enzimi için optimum pH, 100 mM Tris-HCl pH=8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.9. 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,052
5,5	0,072
6,0	0,062
6,5	0,079
7,0	0,076
7,5	0,083
8,0	0,114

Çizelge 4.10. 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,044
7,5	0,052
8,0	0,104
8,5	0,093
9,0	0,062



Şekil 4.14. Keçi karaciğer GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

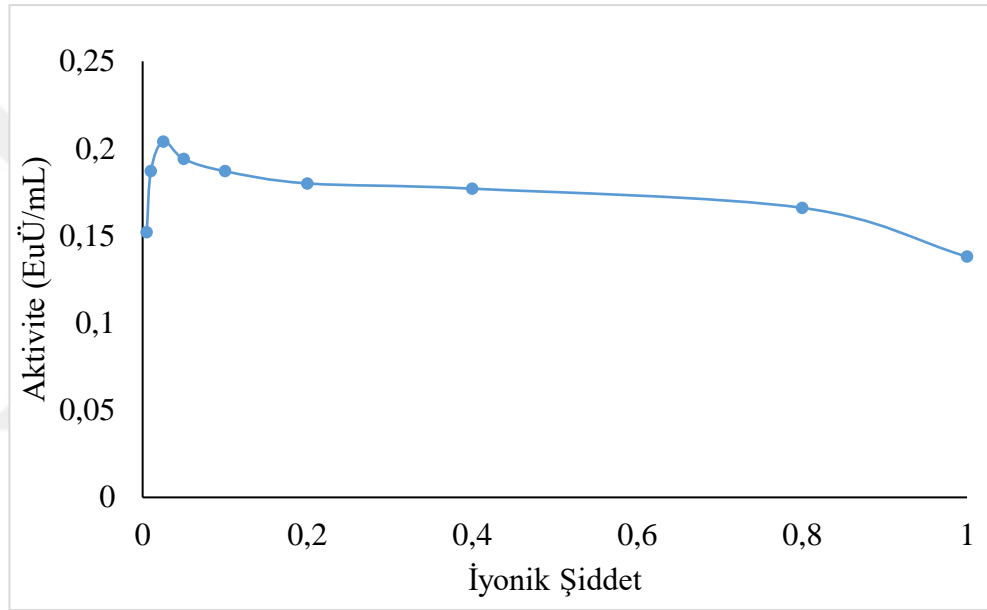
4.7.2. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum iyonik şiddet bulunmasına yönelik sonuçlar

4.7.2.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer G6PD enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddet belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris tamponunun optimal pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.3.b.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Tris/HCl konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Tris/HCl konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu G6PD enzimi için optimum iyonik şiddet 0,025 M Tris/HCl pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Tris/HCl] (M)	1	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Aktivite (EÜ/mL)	0,138	0,166	0,177	0,180	1,187	0,194	0,204	0,187	0,152



Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

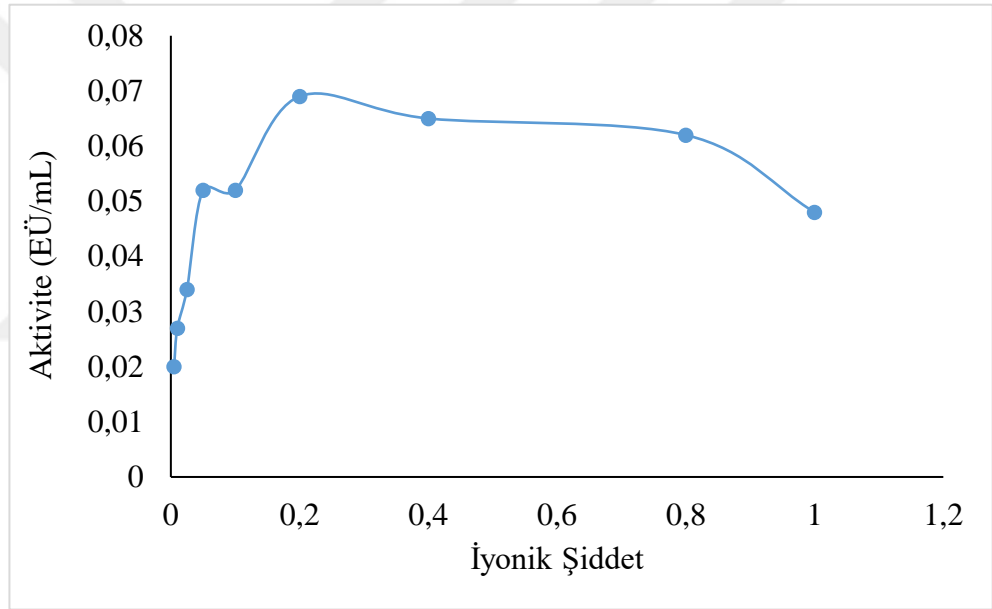
4.7.2.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer 6PGD enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris tamponunun optimal pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.3.b.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Tris/HCl konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Tris/HCl konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu

6PGD enzimi için optimum iyonik şiddetin 0,02 M Tris/HCl pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Tris/HCl] (M)	1	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Aktivite (EÜ/mL)	0,048	0,062	0,065	0,069	0,052	0,052	0,034	0,027	0,020



Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

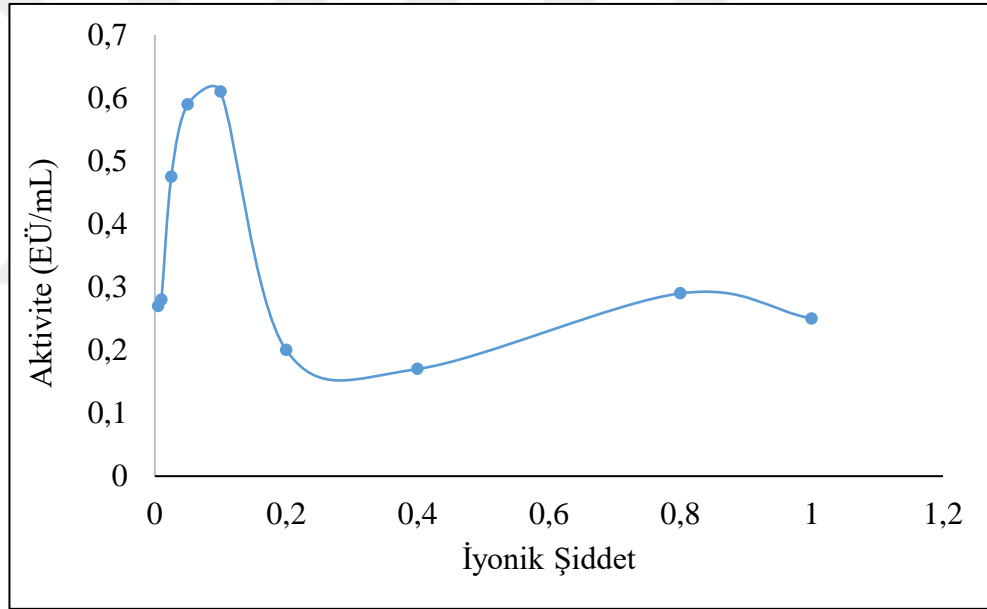
4.7.2.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer GR enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris tamponunun optimal pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.3.b.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Tris/HCl konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Tris/HCl konsantrasyonu ile

aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan alışmalar sonucu GR enzimi için optimum iyonik şiddetin 0,05 M Tris/HCl pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi (şekil 4.14 ve izelge 4.13).

Çizelge 4.13. Keçi karaciğer GR enziminin optimum iyonik şiddeti için Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite olum sonuçları

[Tris/HCl] (M)	1	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Aktivite (EÜ/mL)	0,25	0,29	0,17	0,20	0,61	0,59	0,47	0,28	0,27



şekil 4.17. Değişik konsantrasyonlardaki Tris/HCl tamponu kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

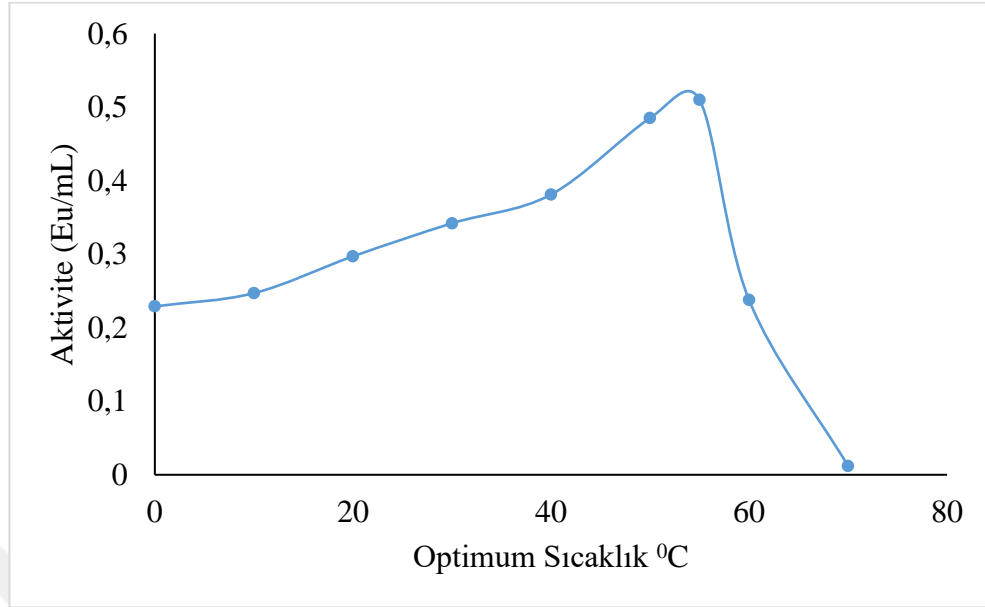
4.7.3. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için optimum sıcaklık bulunmasına yönelik sonuçlar

4.7.3.a Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer G6PD enzimi için optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip (pH 8,0 100 mM) Tris/HCl tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.3.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.15'de ve Çizelge 4.14'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 55°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.14. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	55	60	70
Aktivite (EÜ/mL)	0,229	0,247	0,237	0,342	0,381	0,485	0,510	0,238	0,012



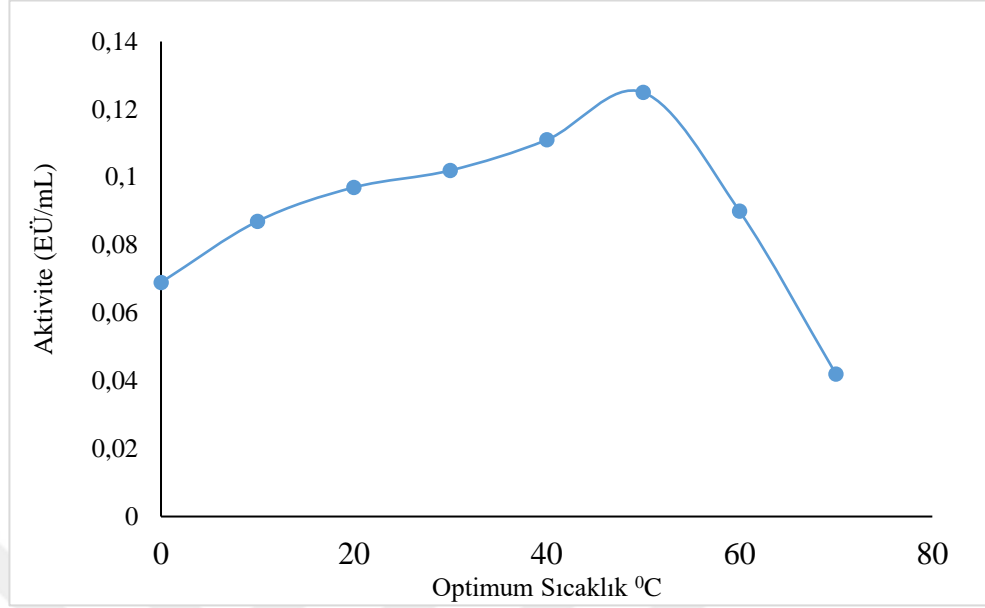
Şekil 4.18. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik

4.7.3.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer 6PGD enzimi için optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip (pH 8,0 100 mM) Tris/HCl tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.3.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen eğriler Şekil 4,16'da ve Çizelge 4.15'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 60 °C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.15. Keçi karaciğer G6PD enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
Aktivite (EÜ/mL)	0,069	0,087	0,097	0,102	0,111	0,125	0,090	0,042



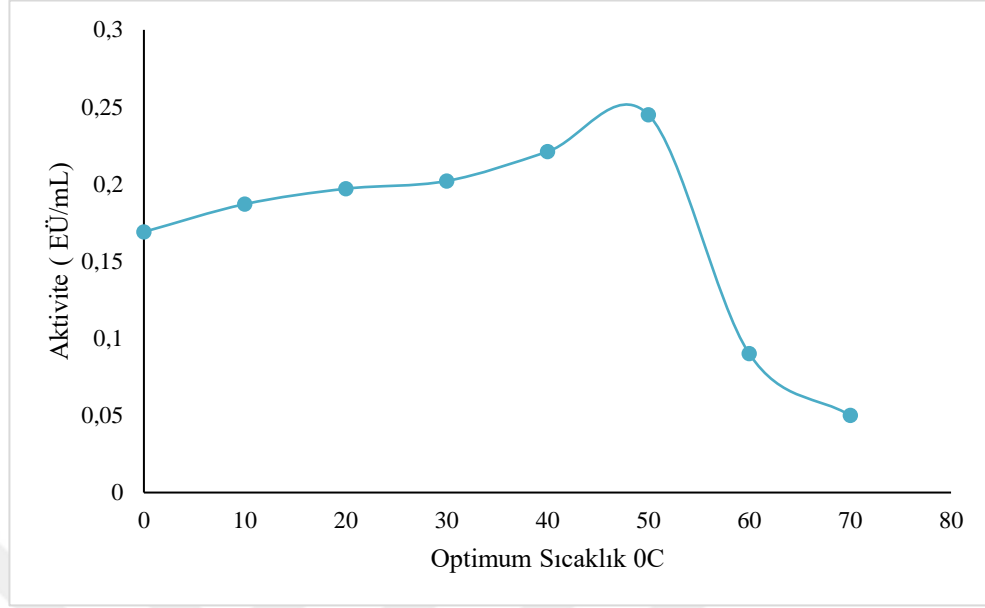
Şekil 4.19. Keçi karaciğer 6PGD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik.

4.7.3.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer GR enzimi için optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip (pH 8,0 100 mM) Tris/HCl tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.3.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.17'de ve Çizelge 4.16'da gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50 °C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.16. Keçi karaciğer GR enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
Aktivite (EÜ/mL)	0,169	0,187	0,197	0,202	0,221	0,245	0,090	0,050



Şekil 4.20. Keçi karaciğer GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik

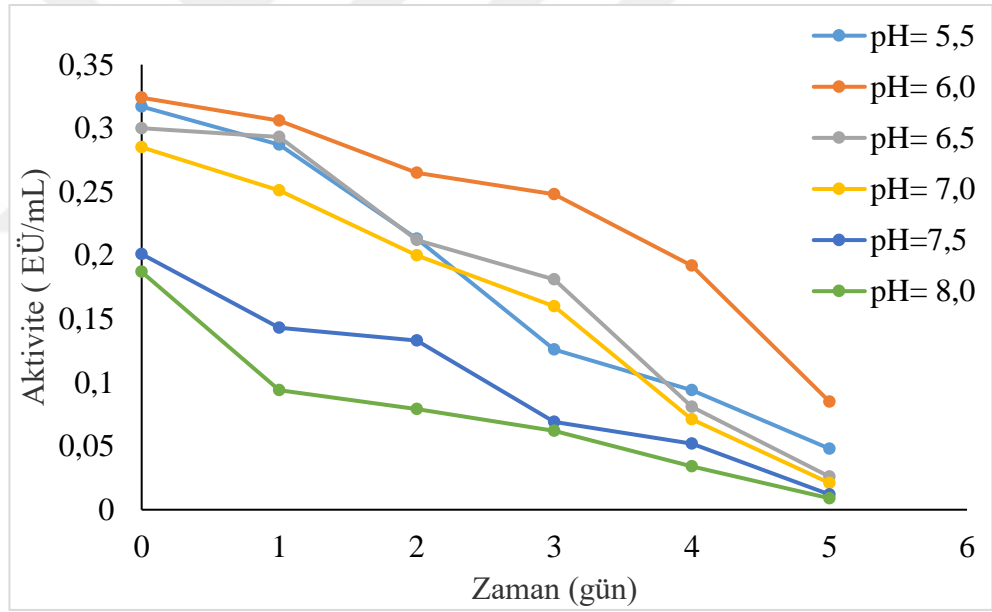
4.7.4. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

4.7.4.a. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Keçi karaciğeri G6PD enziminin stabil pH'sı bölüm 3.2.3.d'de anlatıldığı şekilde; pH'ları 7,0-9,0 aralığında değişen 100 mM Tris/HCl ve pH'ları 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4,18-4.19 ve Çizelge 4.17- 4.18). Keçi karaciğer G6PD enzimi için stabil pH, 100 mM fosfat tamponunda pH 6,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.17. Keçi karaciğer G6PD enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

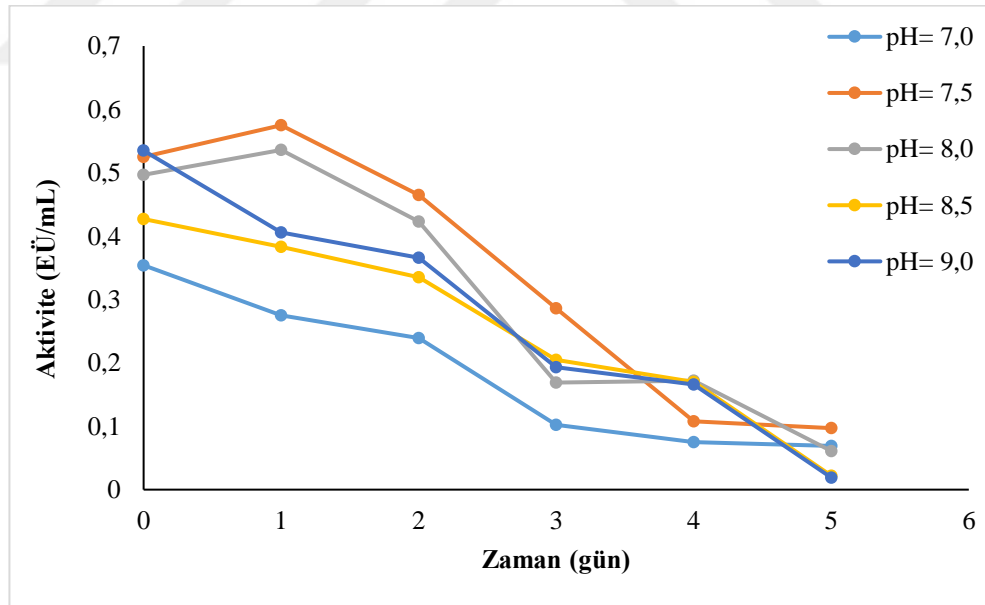
Gün	Aktivite (EÜ/mL) (pH=5,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=6,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=6,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=8,0)
0	0,317	0,324	0,300	0,285	0,201	0,187
1	0,287	0,306	0,293	0,251	0,143	0,094
2	0,213	0,265	0,212	0,200	0,133	0,079
3	0,126	0,248	0,181	0,160	0,069	0,062
4	0,094	0,192	0,081	0,071	0,052	0,034
5	0,357	0,208	0,163	0,041	0,052	0,009



Şekil 4.21. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

Çizelge 4.18. Keçi karaciğer G6PD enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

Gün	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=8,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=8,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=9,0)
0	0,354	0,525	0,497	0,427	0,535
1	0,275	0,575	0,536	0,383	0,756
2	0,239	0,465	0,423	0,335	0,666
3	0,102	0,286	0,169	0,205	0,326
4	0,075	0,108	0,172	0,170	0,166
5	0,069	0,097	0,061	0,022	0,019



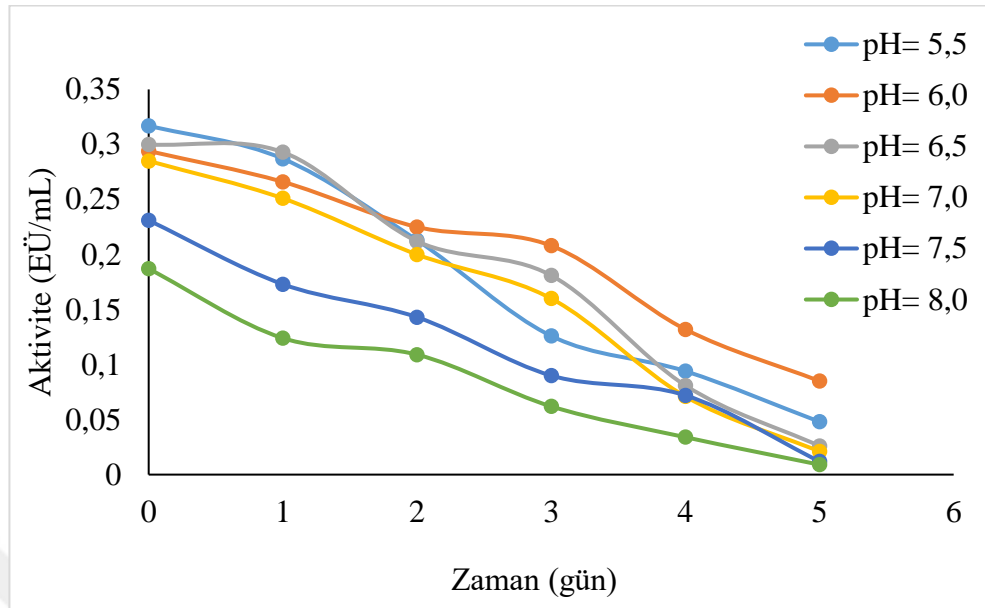
Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer G6PD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

4.7.4.b. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Keçi karaciğeri 6PGD enziminin stabil pH'sı 3.2.3.d'de anlatıldığı şekilde; pH'ları 7,0-9,0 aralığında değişen 100 mM Tris/HCl ve pH'ları 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.20-4.21 ve Çizelge 4.19- 4.20). Keçi karaciğer G6PD enzimi için stabil pH, 100 mM fosfat tamponunda pH 7,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.19. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

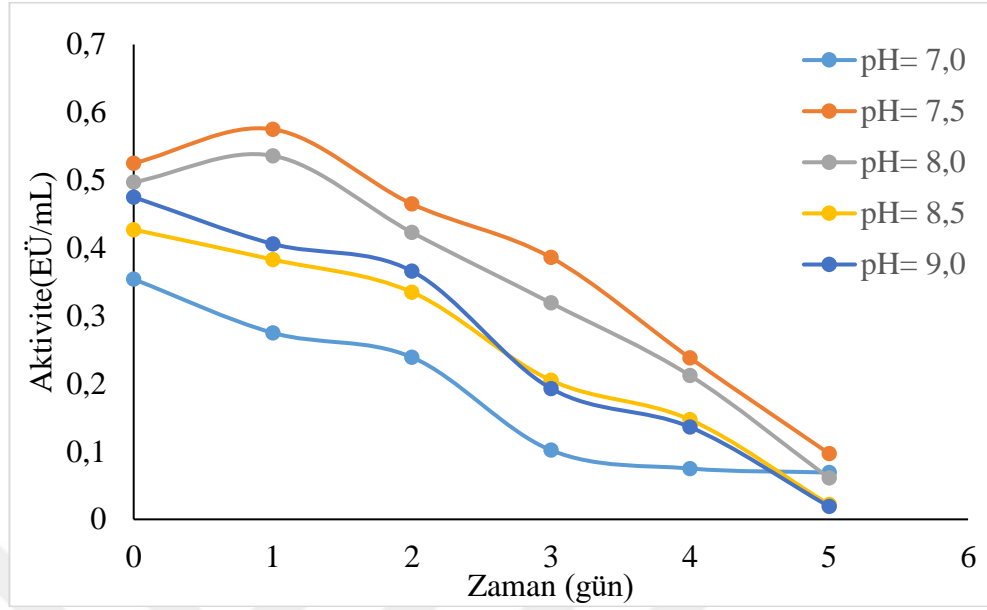
Gün	Aktivite (EÜ/ml) (pH=5,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=6,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=6,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=8,0)
0	0,317	0,294	0,300	0,285	0,231	0,187
1	0,287	0,266	0,293	0,251	0,173	0,124
2	0,213	0,225	0,212	0,200	0,143	0,109
3	0,126	0,208	0,181	0,160	0,090	0,062
4	0,094	0,132	0,081	0,071	0,072	0,034
5	0,048	0,085	0,026	0,021	0,012	0,009



Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

Çizelge 4.20. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

Gün	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=8,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=8,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=9,0)
0	0,354	0,497	0,525	0,427	0,475
1	0,275	0,536	0,575	0,383	0,406
2	0,239	0,423	0,465	0,335	0,366
3	0,102	0,319	0,386	0,205	0,193
4	0,075	0,212	0,238	0,147	0,136
5	0,069	0,061	0,097	0,022	0,019



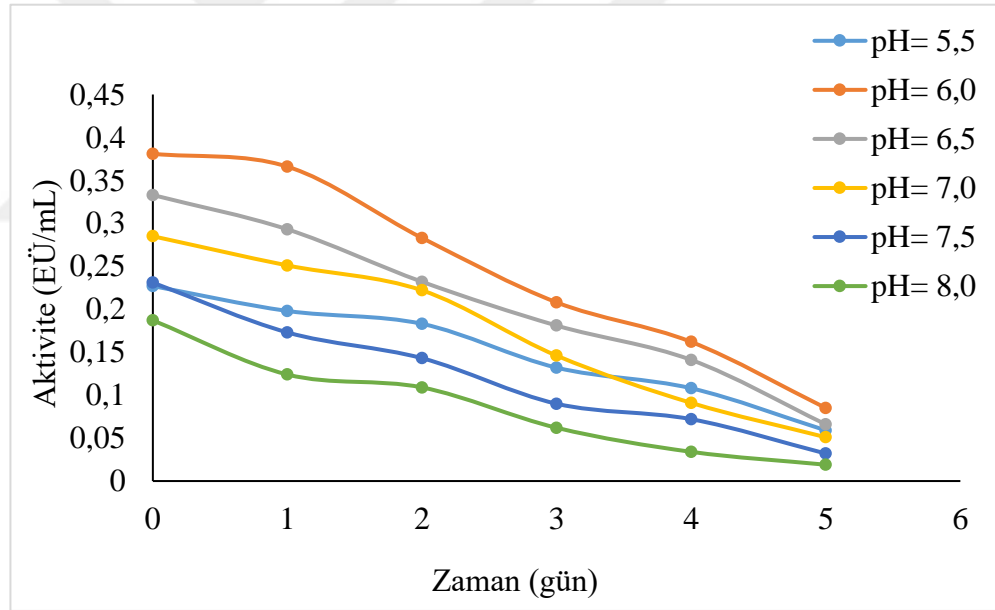
Şekil 4.24. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer 6PGD enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

4.7.4.c. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Keçi karaciğeri GR enziminin stabil pH'sı 3.2.3.d'de anlatıldığı şekilde; pH'ları 7,0-9,0 aralığında değişen 100 mM Tris-HCl ve pH'ları 5,0-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.22-4.23 ve Çizelge 4.21- 4.22). Keçi karaciğeri GR enzimi için stabil pH, 100 mM fosfat tamponunda pH 7,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.21. Keçi karaciğer GR enzimi için 100 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

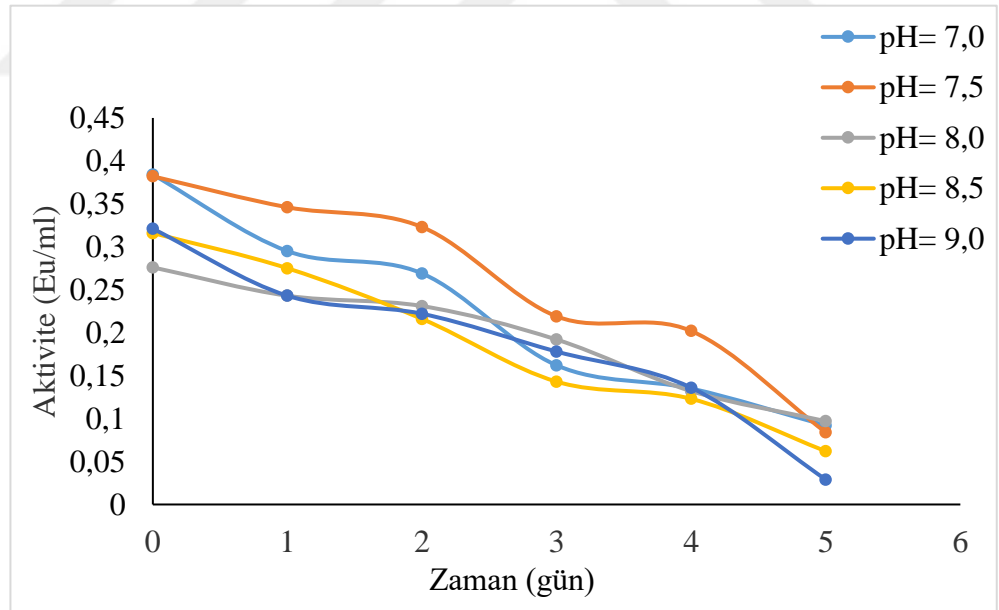
Gün	Aktivite (EÜ/ml) (pH=5,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=6,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=6,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/ml) (pH=8,0)
0	0,227	0,381	0,333	0,285	0,231	0,187
1	0,198	0,366	0,293	0,251	0,173	0,124
2	0,183	0,283	0,232	0,222	0,143	0,109
3	0,132	0,208	0,181	0,146	0,090	0,062
4	0,108	0,162	0,141	0,091	0,072	0,034
5	0,059	0,085	0,066	0,051	0,032	0,019



Şekil 4.25. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

Çizelge 4.22. Keçi karaciğer GR enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları

Gün	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=7,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=8,0)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=8,5)	Aktivite (EÜ/mL) (pH=9,0)
0	0,384	0,382	0,276	0,316	0,321
1	0,295	0,346	0,243	0,275	0,243
2	0,269	0,323	0,231	0,216	0,222
3	0,162	0,219	0,192	0,143	0,178
4	0,135	0,202	0,132	0,123	0,136
5	0,092	0,084	0,097	0,062	0,029



Şekil 4.26. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak keçi karaciğer GR enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği

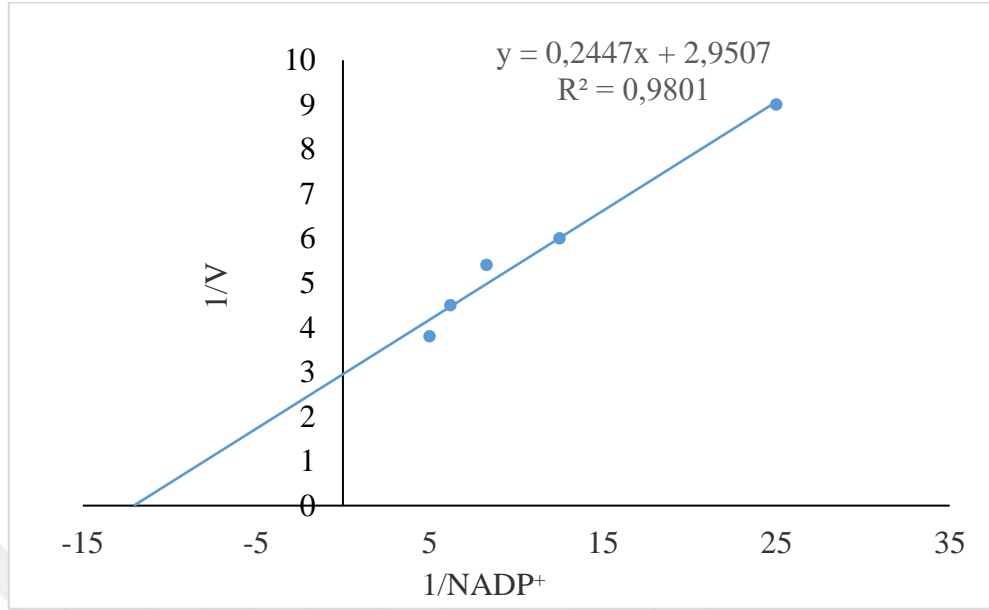
4.7.5. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için kinetik çalışmalara yönelik sonuçlar

4.7.5.a NADP⁺ ve G6P substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer G6PD enziminin NADP⁺ ve G6P substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.2.3.e’de anlatıldığı gibi sabit G6P konsantrasyonunda NADP⁺ nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle 1/[NADP⁺]-1/V Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADP⁺ için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADP⁺ nin sabit konsantrasyonunda G6P’in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak 1/[G6P]-1/V Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve G6P için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADP⁺ için K_M değeri 0,08 mM ve V_{max} değeri 1,02 EÜ/ml olarak; G6P için ise, K_M değeri 0,09 mM ve V_{max} değeri 0,4 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.23-4.24 ve Şekil 4.24-4.25’de gösterildi.

Çizelge 4.23. Keçi karaciğer dokusu G6PD enziminin NADP⁺ substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

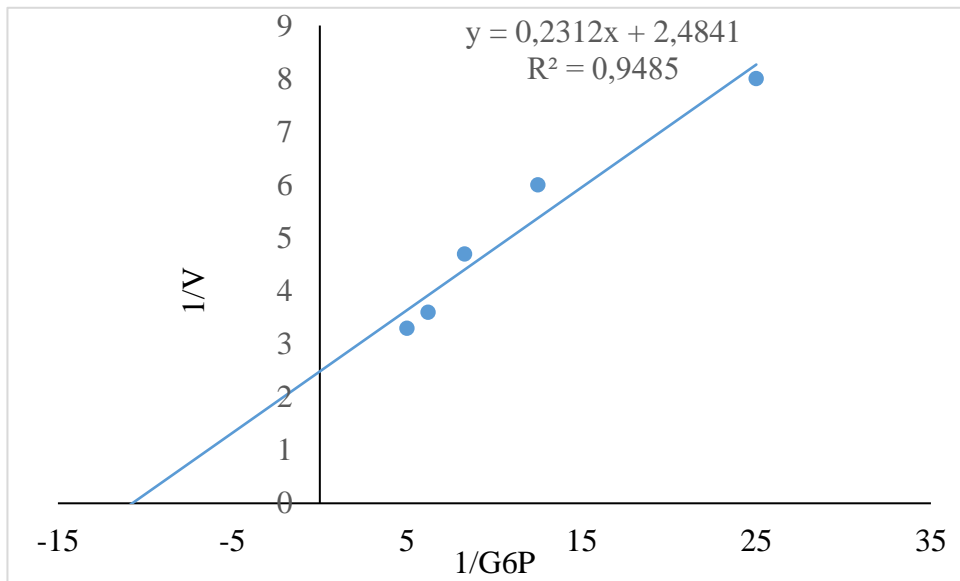
[NADP ⁺] (mM)	25,0	12,5	8,3	6,2	5,0
Aktivite (EÜ/mL)	9,0	6,0	5,4	4,5	3,8



Şekil 4.27. G6P için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

Çizelge 4.24. Keçi karaciğer dokusu G6PD enziminin G6P substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

[G6P] (mM)	25,0	1,25	0,83	0,62	0,50
Aktivite (EÜ/mL)	4,80	3,64	2,64	2,23	2,03



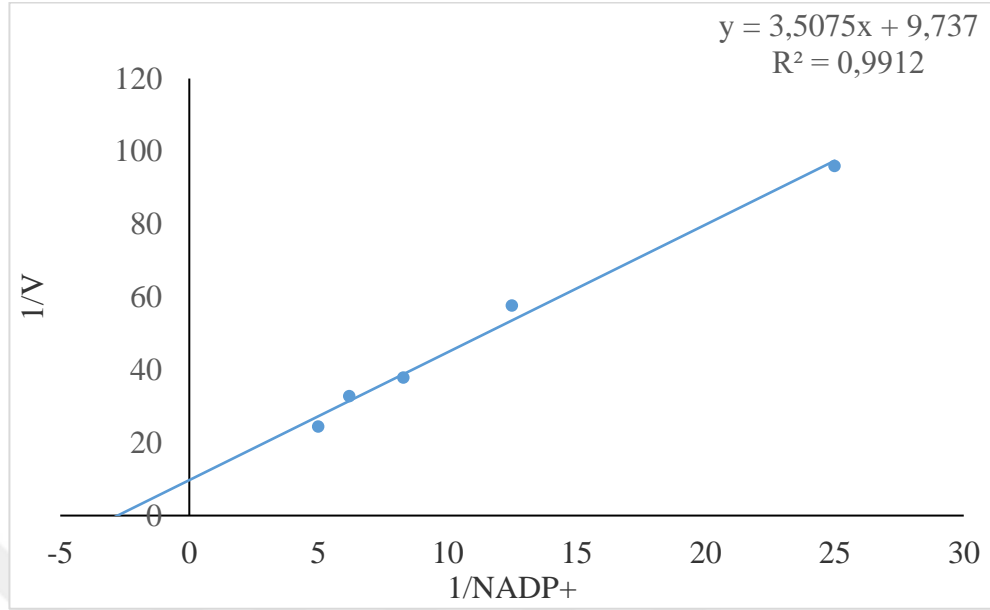
Şekil 4.28. G6P için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik.

4.7.5.b. NADP⁺ ve 6PGA substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer 6PGD enziminin NADP⁺ ve 6PGA substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.2.3.e’de anlatıldığı gibi sabit 6PGA konsantrasyonunda NADP⁺ nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle 1/[NADP⁺]-1/V Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADP⁺ için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADP⁺ nin sabit konsantrasyonunda 6PGA’nın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak 1/[6PGA]-1/V Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve 6PGA için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADP⁺ için K_M değeri 0,36 mM ve V_{max} değeri 0,102 EÜ/ml olarak; 6PGA için ise, K_M değeri 0,37 mM ve V_{max} değeri 0,11 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25-4.26 ve Şekil 4.26-4.27’de gösterildi.

Çizelge 4.25. Keçi karaciğer dokusu 6PGD enziminin NADP⁺ substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

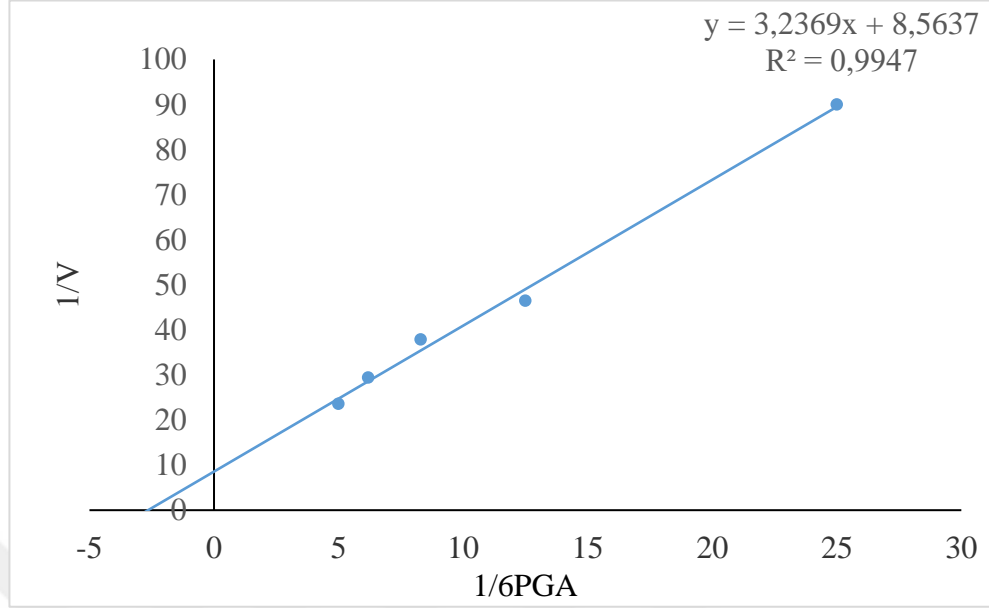
[NADP ⁺] (mM)	25,0	12,5	8,3	6,2	5,0
Aktivite (EÜ/mL)	96,0	57,6	37,9	32,7	24,4



Şekil 4.29. 6PGD için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

Çizelge 4.26. Keçi karaciğer dokusu 6PGD enziminin 6PGA substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

[6PGA] (mM)	25,0	12,5	8,3	6,2	5,0
Aktivite (EÜ/mL)	90,0	46,4	37,9	29,3	23,6



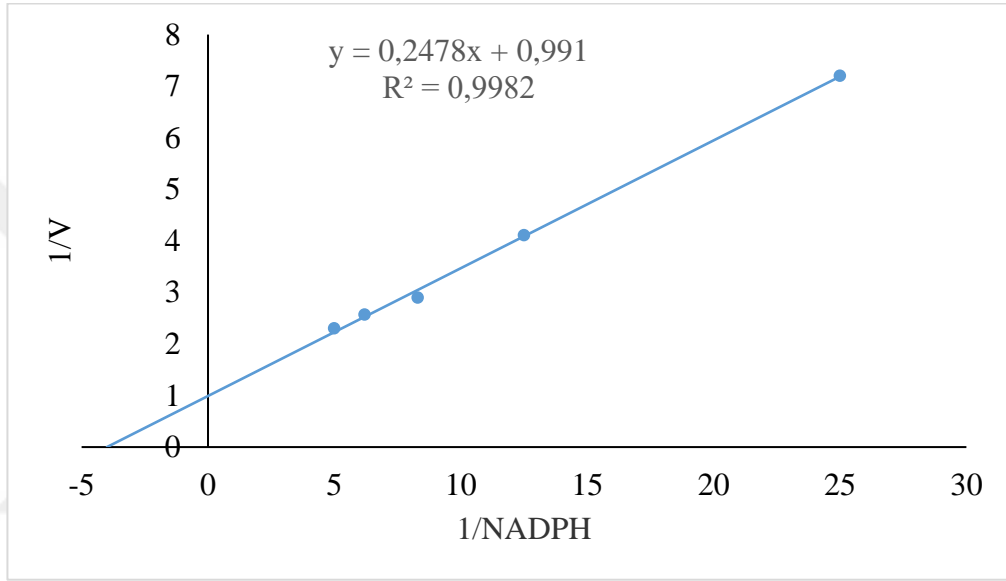
Şekil 4.30. 6PGA için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

4.7.5.c. NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Keçi karaciğer GR enziminin NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.2.3.e’de anlatıldığı gibi sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/[NADPH]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH in sabit konsantrasyonunda GSSG’nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/[GSSG]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADPH için K_M değeri 0,25 mM ve V_{max} değeri 1,009 EÜ/ml olarak; GSSG için ise, K_M değeri 0,92 mM ve V_{max} değeri 0,67 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27-4.28 ve Şekil 4.28-4.29’da gösterildi.

Çizelge 4.27. Keçi karaciğer dokusu GR enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

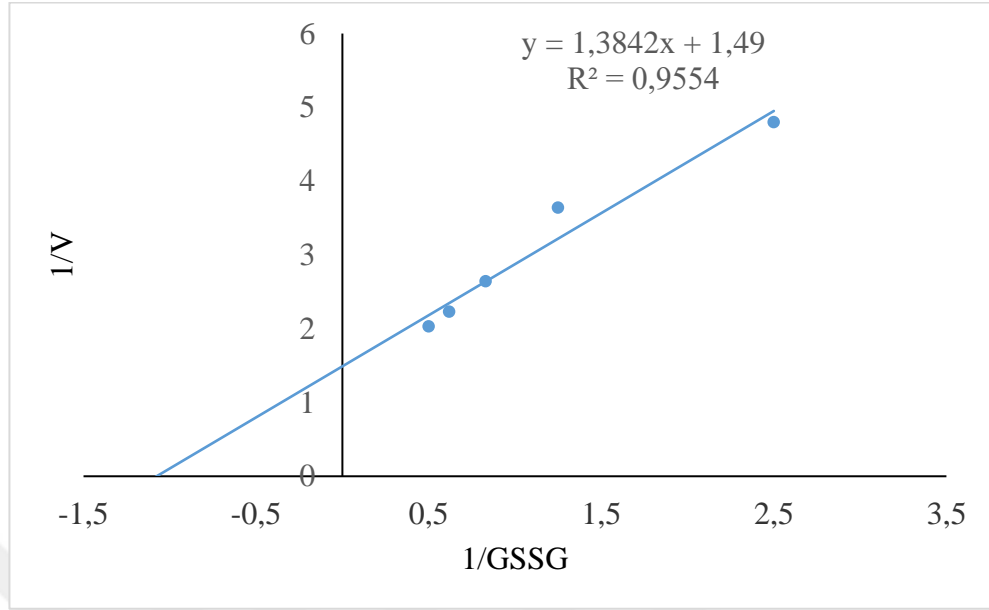
[NADPH] (mM)	25,0	12,5	8,3	6,2	5,0
Aktivite (EÜ/mL)	7,2	4,1	2,9	2,5	2,3



Şekil 4.31. GR için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

Çizelge 4.28. Keçi karaciğer dokusu GR enziminin GSSG substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

[GSSG] (mM)	2,5	1,25	0,83	0,62	0,5
Aktivite (EÜ/mL)	4,8	3,6	2,6	2,2	2,0



Şekil 4.32. GR için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

Çizelge 4.29. Keçi karaciğer G6PD enzimi için karakterizasyon sonuçları

Çalışma tipi	Sonuç
Optimum pH	8,0 (Tris/HCl)
Optimum iyonik şiddet	25 mM (Tris/HCl)
Optimum sıcaklık	55°C
Stabil pH	6,0 (KH ₂ PO ₄)
G6P için K_M	0,09 mM
G6P için V_{max}	0,4 EÜ/mL
NADP ⁺ için K_M	0,08 mM
NADP ⁺ için V_{max}	1,02 EÜ/mL

Çizelge 4.30. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için karakterizasyon sonuçları

Çalışma tipi	Sonuç
Optimum pH	8,0 (Tris/HCl)
Optimum iyonik şiddet	200 mM (Tris/HCl)
Optimum sıcaklık	50°C
Stabil pH	7,5 (Tris/HCl)
6PGA için K_M	0,37 mM
6PGA için V_{max}	0,11 EÜ/mL
NADP ⁺ için K_M	0,36 mM
NADP ⁺ için V_{max}	0,102 EÜ/mL

Çizelge 4.31. Keçi karaciğer GR enzimi için karakterizasyon sonuçları

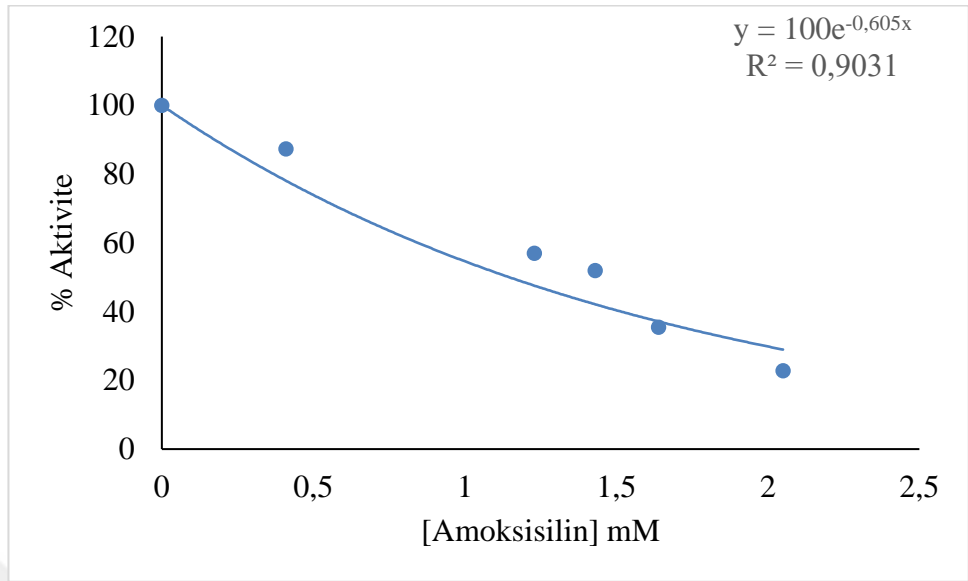
Çalışma tipi	Sonuç
Optimum pH	8,0 (Tris/HCl)
Optimum iyonik şiddet	50 mM (Tris/HCl)
Optimum sıcaklık	50°C
Stabil pH	7,5 (Tris/HCl)
GSSG için K_M	0,92 mM
GSSG için V_{max}	0,67 EÜ/mL
NADPH için K_M	0,25 mM
NADPH için V_{max}	1,009 EÜ/mL

4.8. Keçi Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR Enzimleri Üzerine Bazı İlaç Etken Maddelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Kinetik Çalışmaların Sonuçları

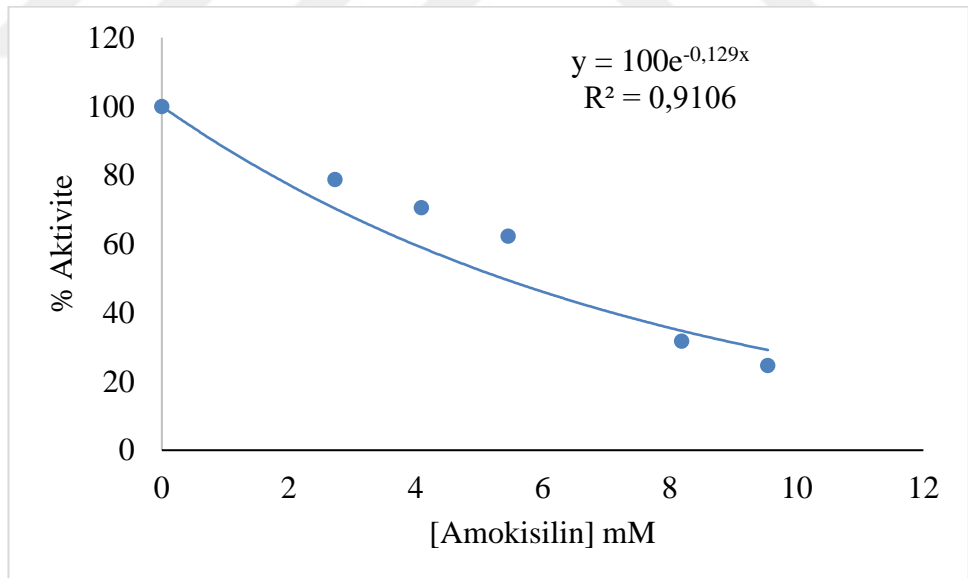
4.8.1. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR Enzimleri Üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaç etken maddeleri için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

İlaçların hazırlandığı stok çözeltileri kullanılarak; keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimleri için Amoksisilin, Ampisilin, Neomisin, oksitetrasiklin, penisilin G, sülfadimidin ve tilozin ilaç etken maddelerinin enzimlerin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerine bakıldı. İlaçların inhibisyon etkisi gösterip göstermediği, inhibisyon etkisi gösterenlerin IC_{50} değeri, inhibisyon etkisi güçlü olanlar içinde K_i sabitleri belirlendi. Bu çalışmalara ait grafikler ilerleyen sayfalarda verilmiştir. Çalışmalarla ilgili toplu sonuçlar çizelgeler halinde verilmiştir.

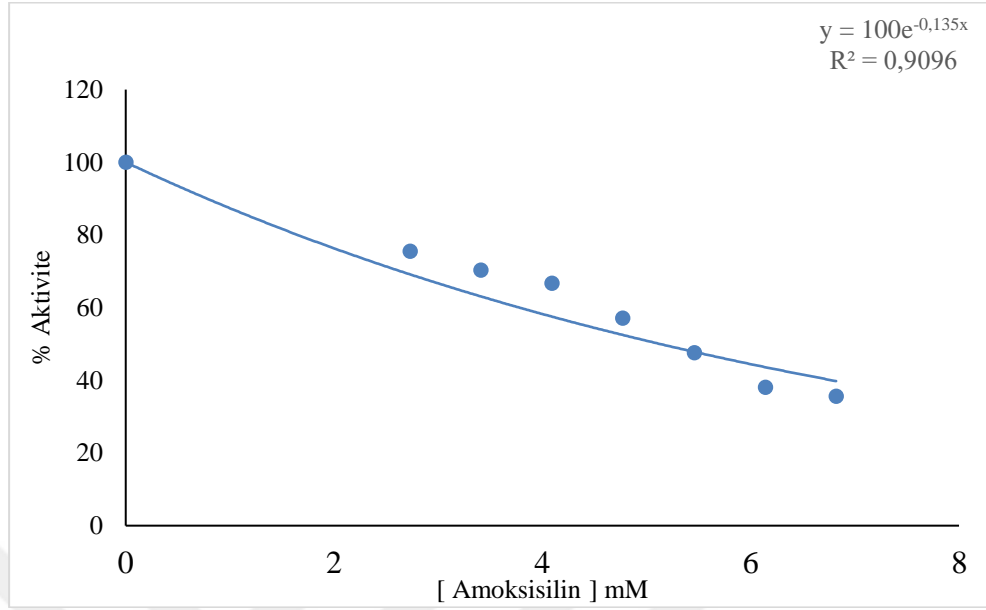
Çalışılan ilaç etken maddeleri arasında keçi karaciğer G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösterenler için bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteleri ölçüldü. %Aktivite-[I] değerleri gösteren grafikleri çizildi ve bu grafiklerden IC_{50} değerleri hesaplandı.



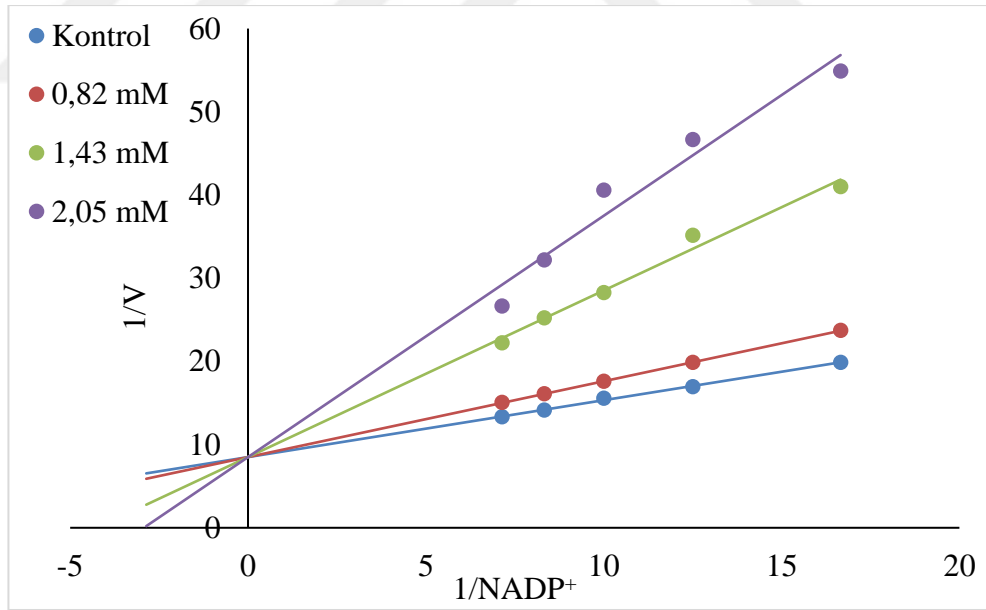
Şekil 4.33. Keçi karaciğerinden G6PDenzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



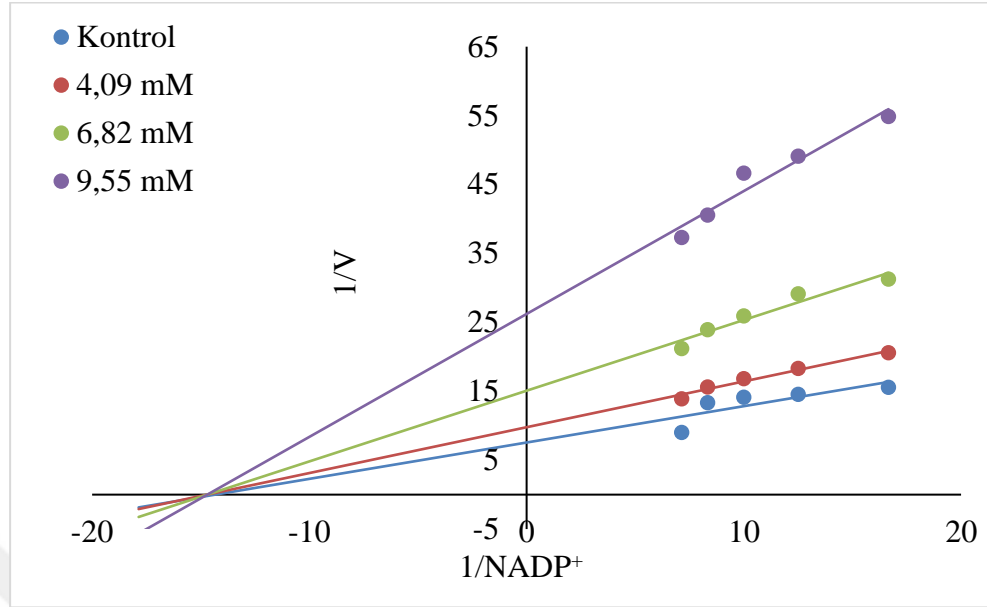
Şekil 4.34. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



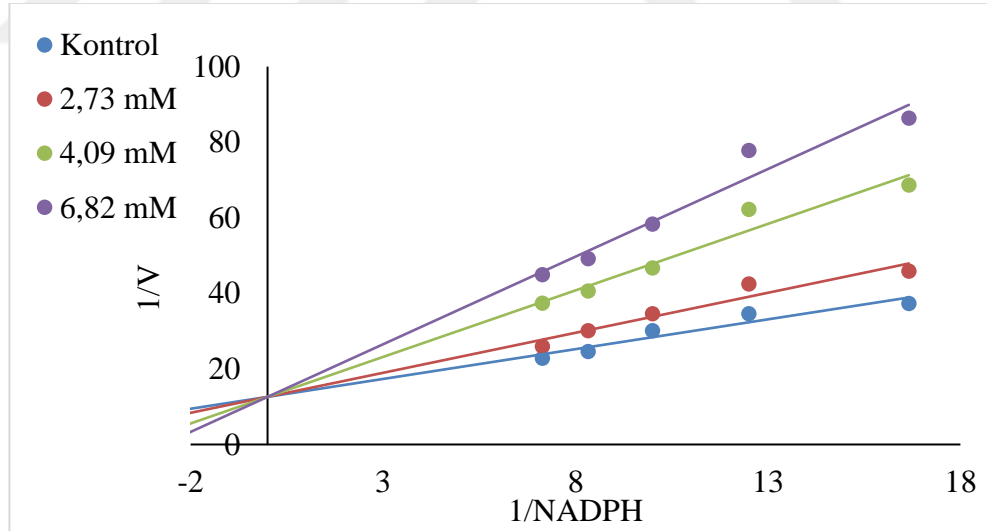
Şekil 4.35. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Amoksisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



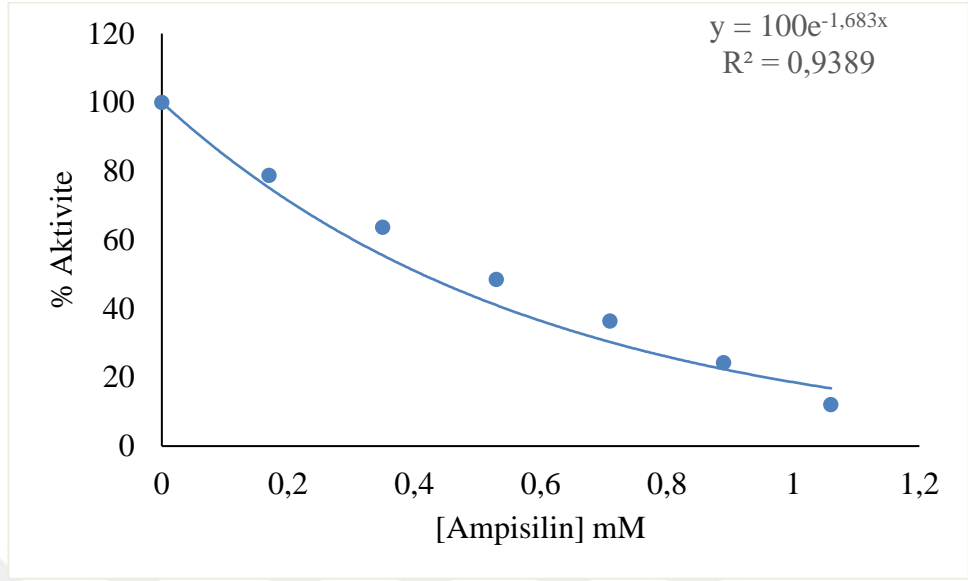
Şekil 4.36. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



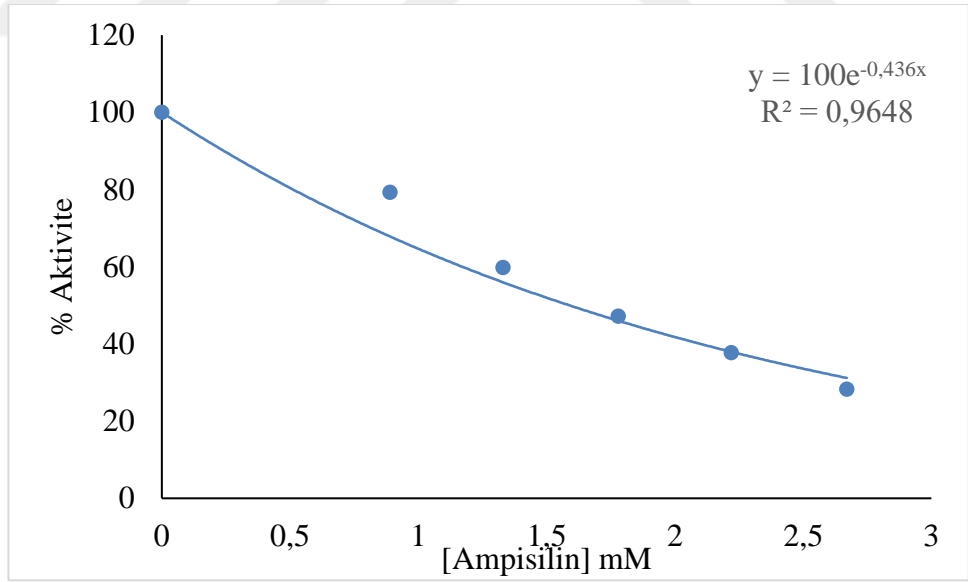
Şekil 4.37. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



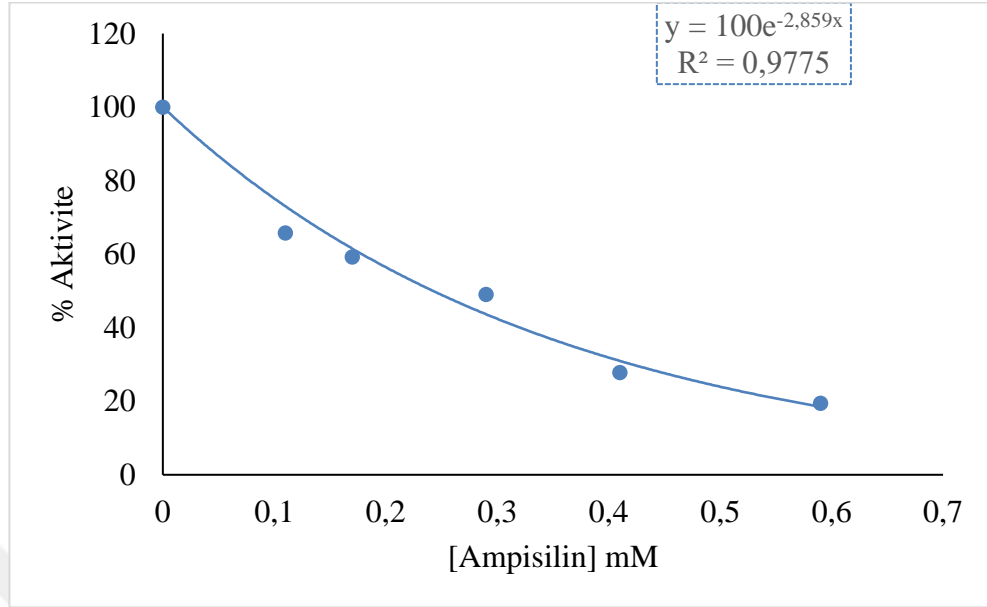
Şekil 4.38. Amoksisilin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



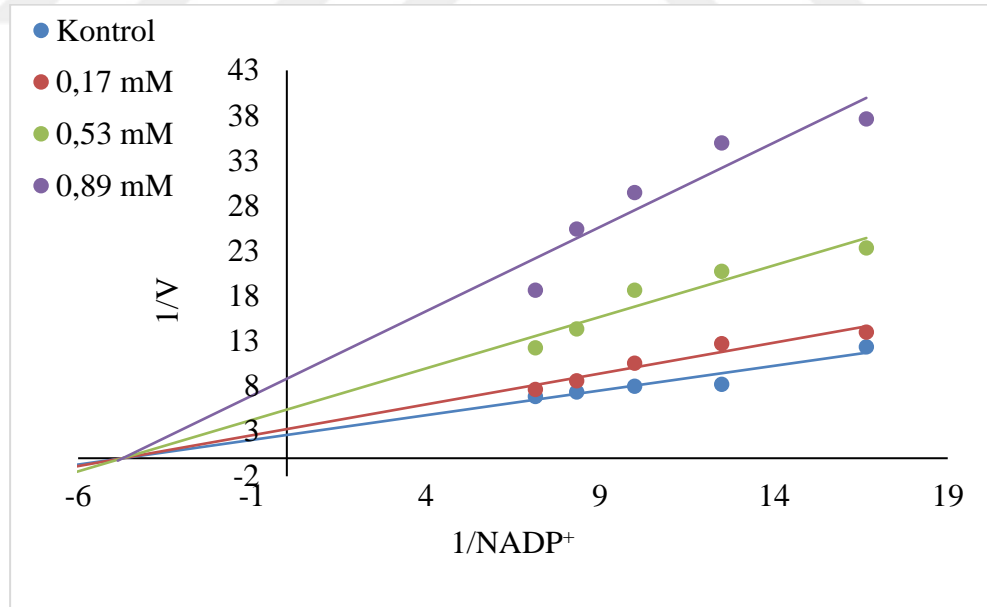
Şekil 4.39. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



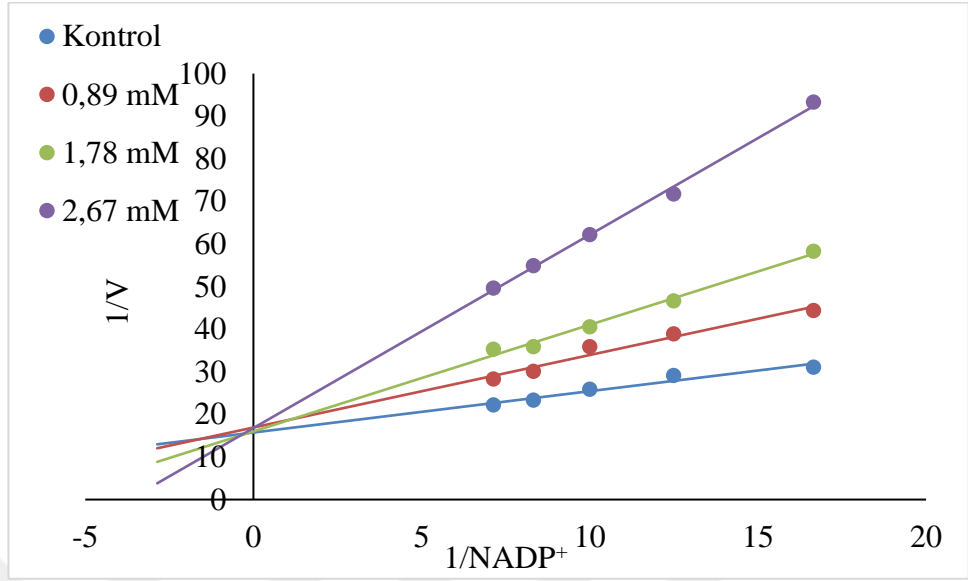
Şekil 4.40. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



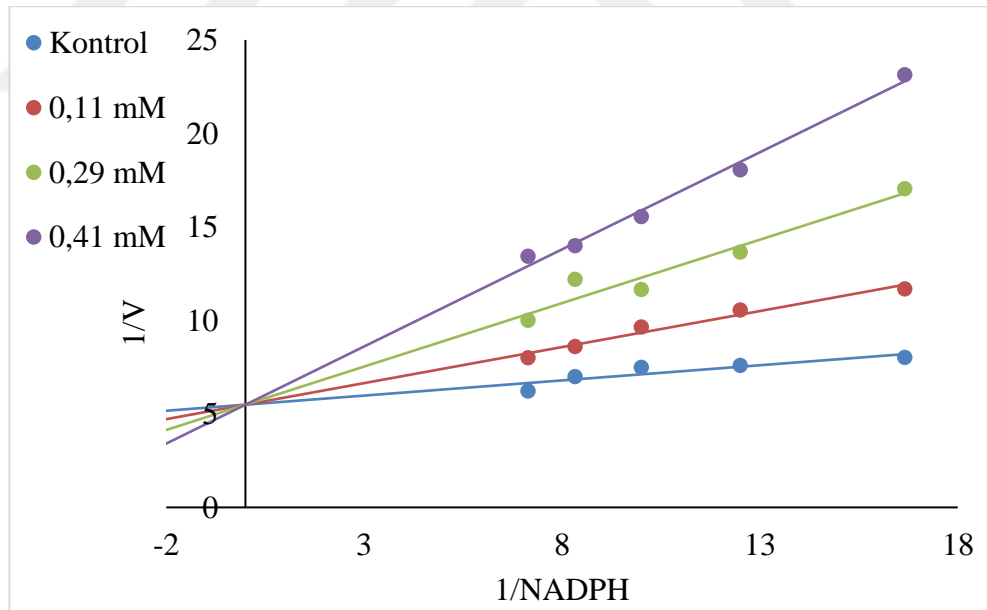
Şekil 4.41. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Ampisilin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



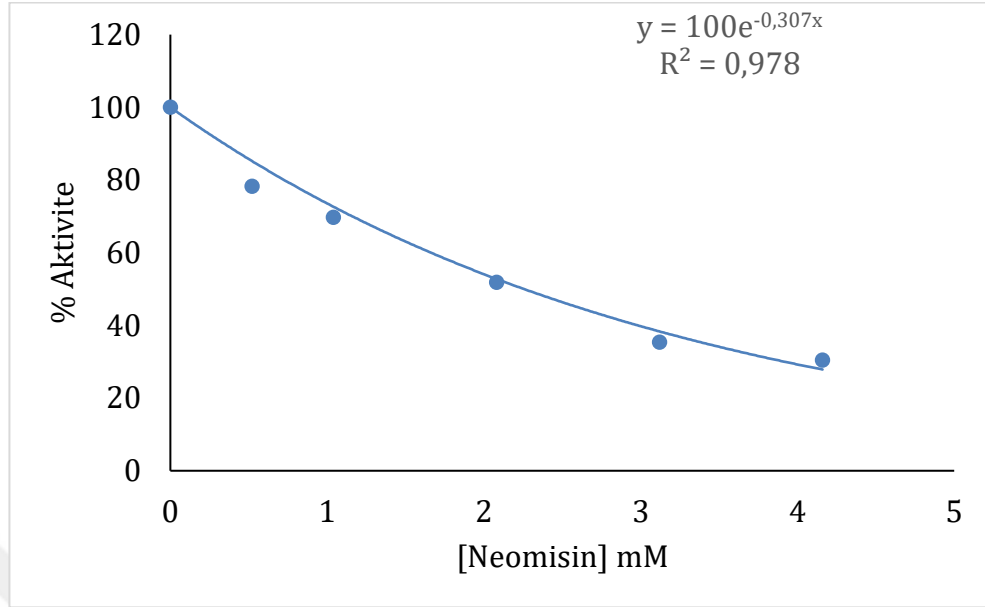
Şekil 4.42. Ampisilin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



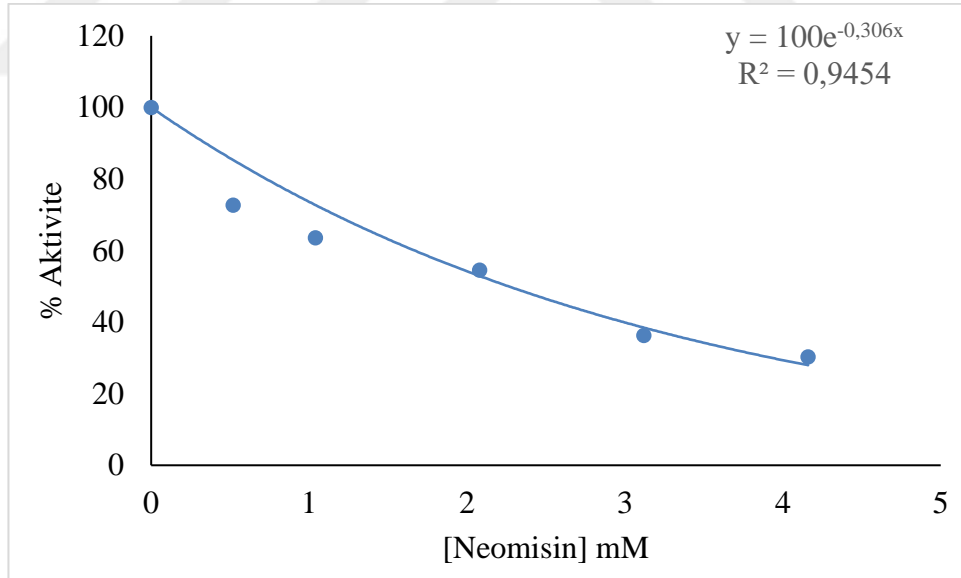
Şekil 4.43. Ampisilin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



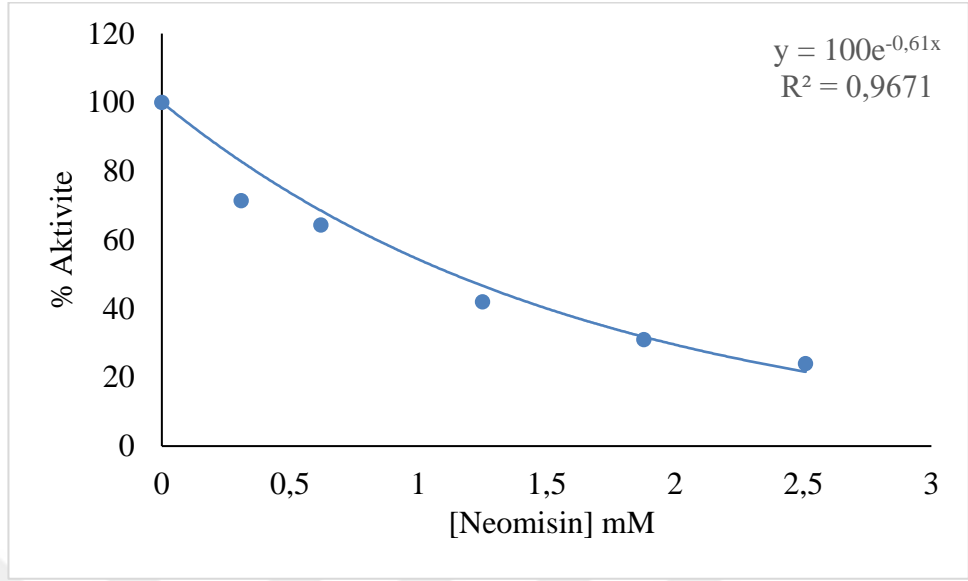
Şekil 4.44. Ampisilin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



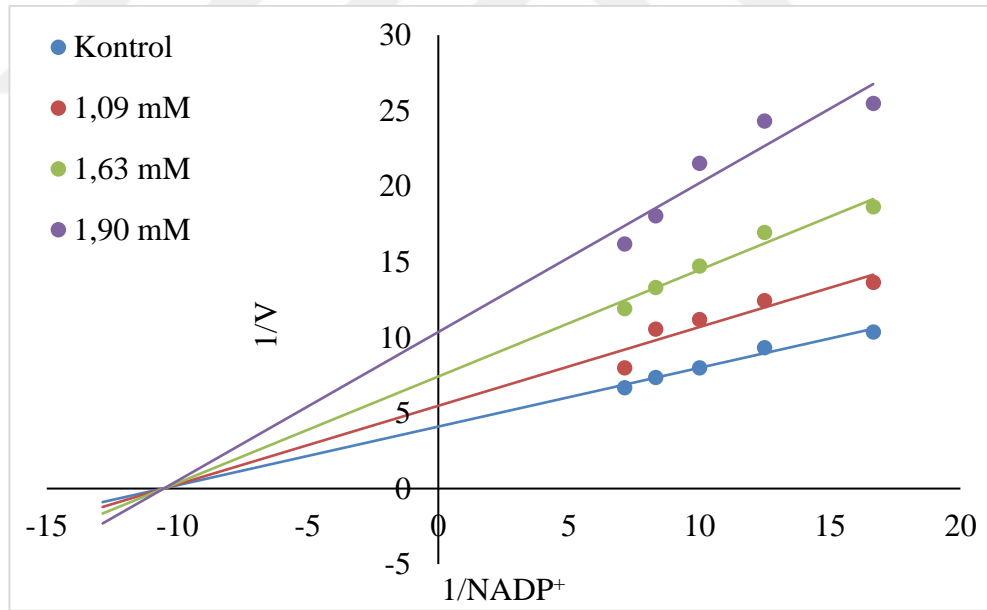
Şekil 4.45. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



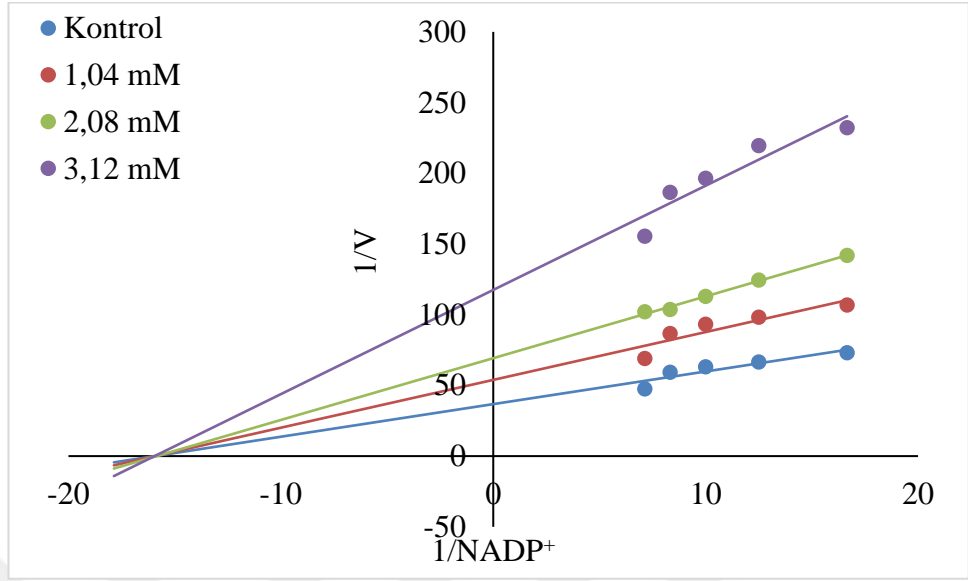
Şekil 4.46. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



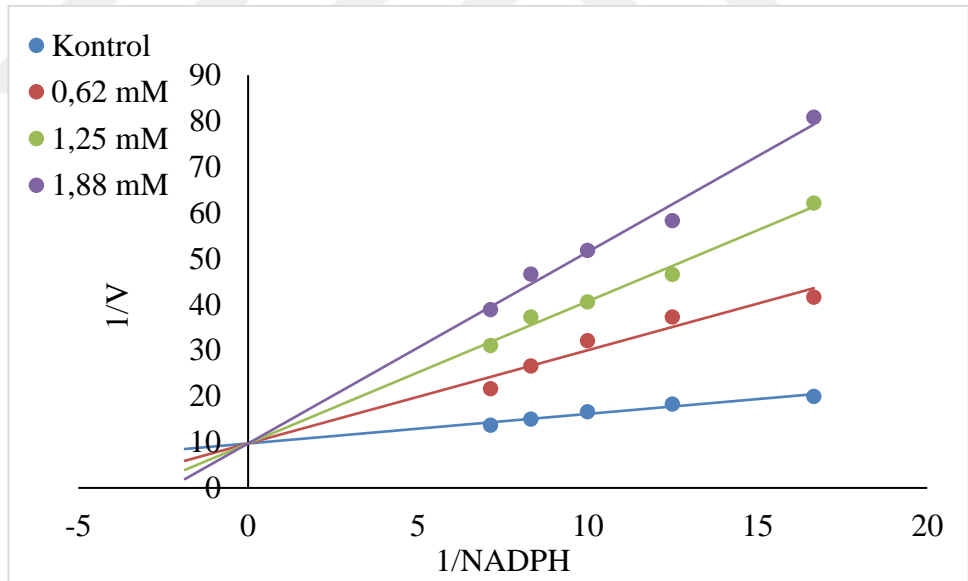
Şekil 4.47. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Neomisin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



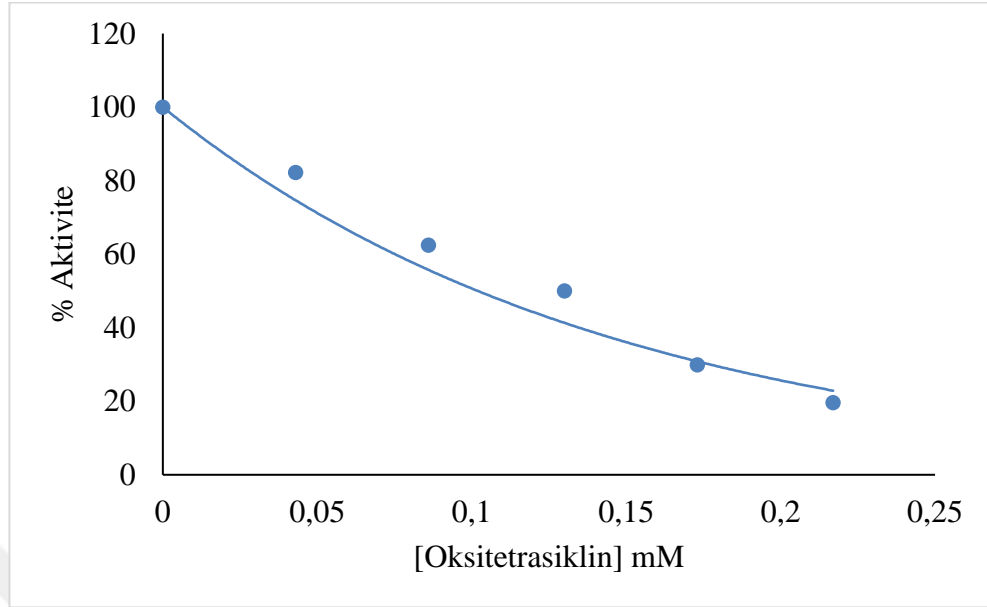
Şekil 4.48. Neomisin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



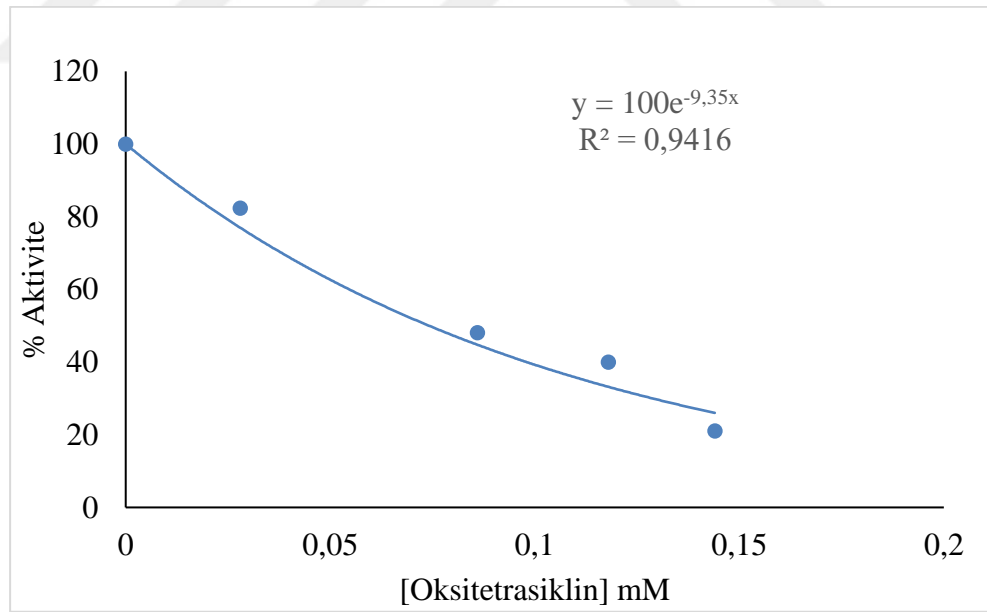
Şekil 4.49. Neomisin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



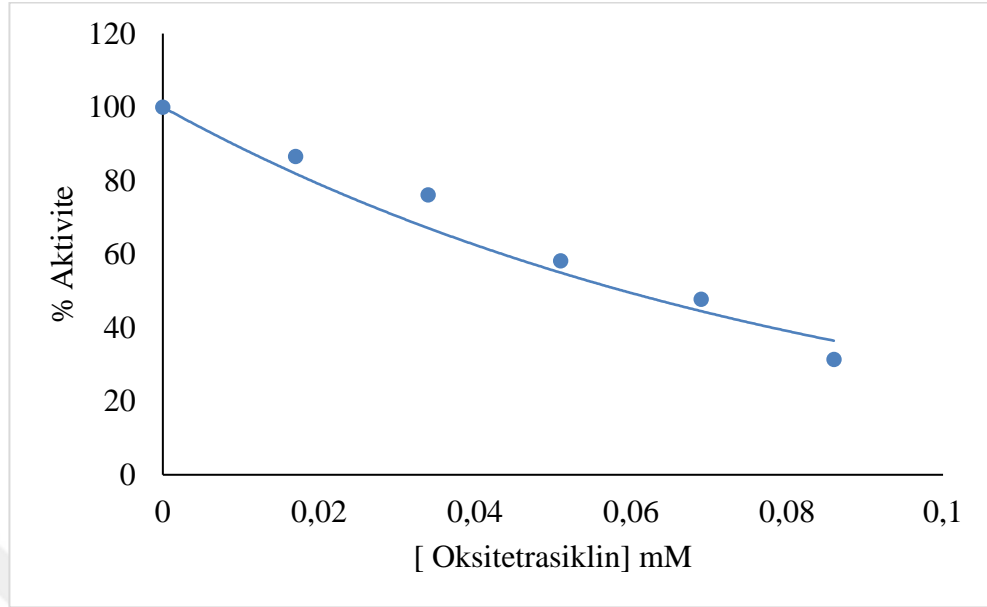
Şekil 4.50. Neomisin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



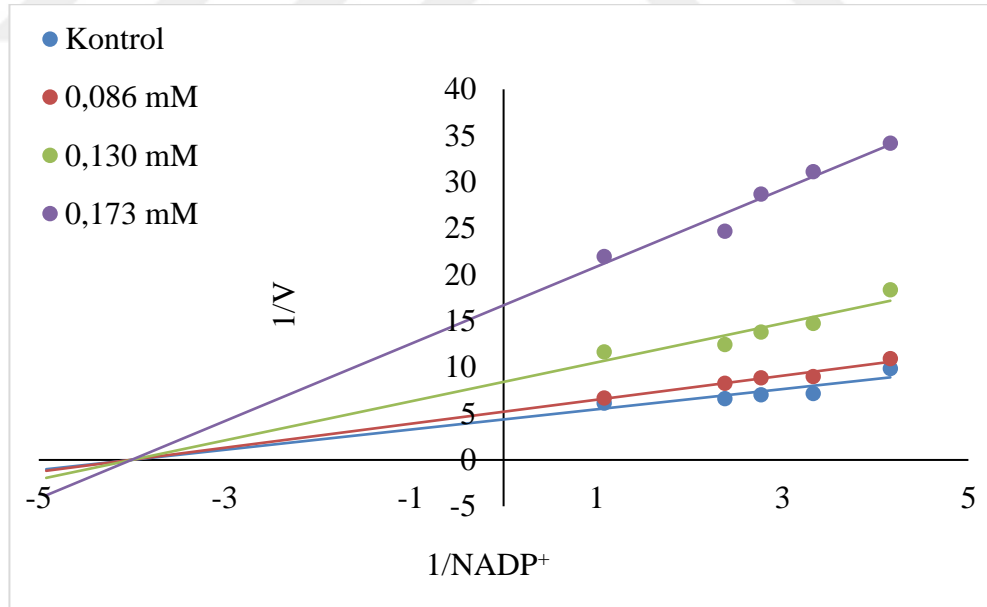
Şekil 4.51. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



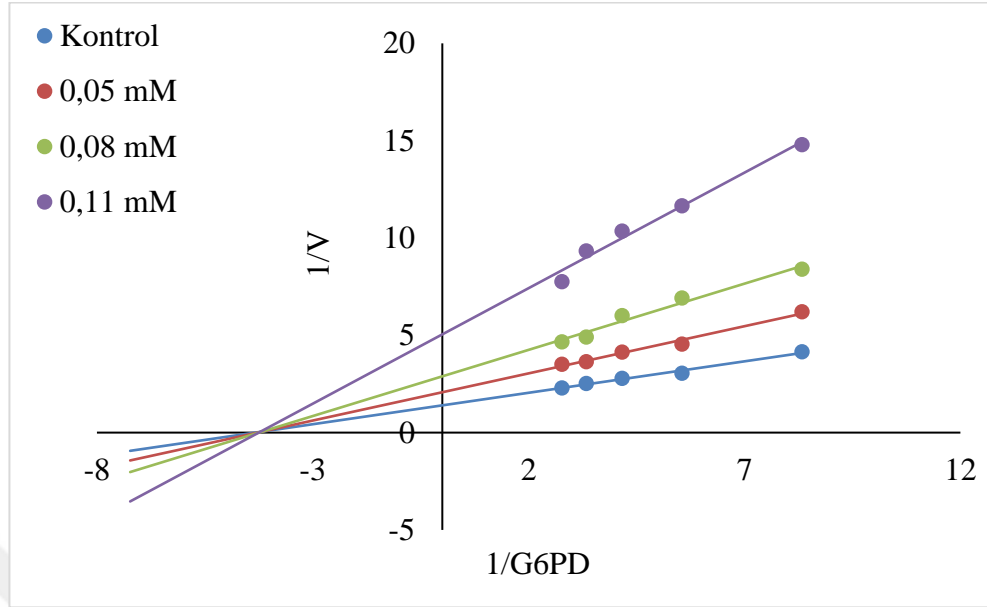
Şekil 4.52. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



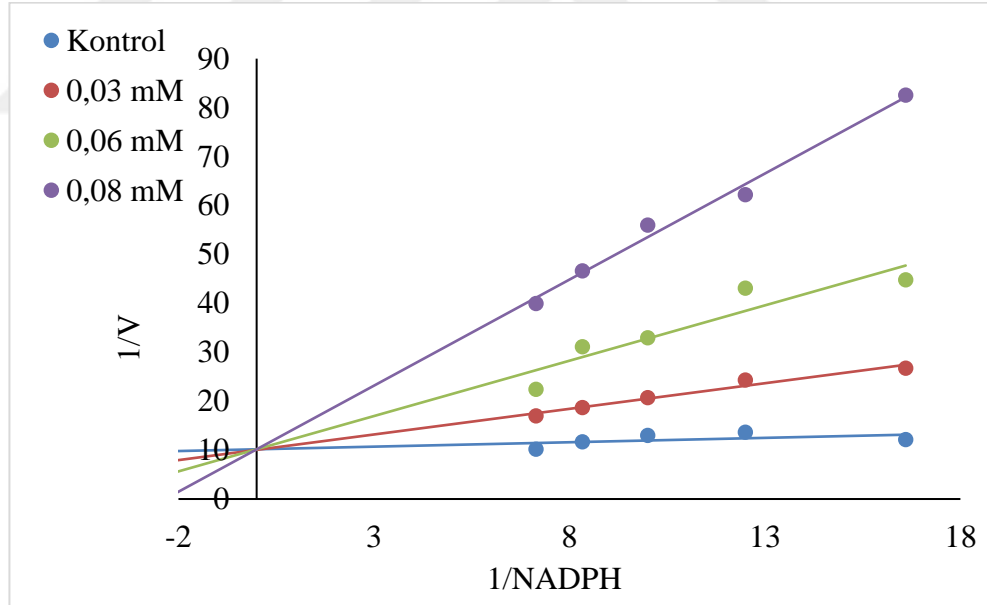
Şekil 4.53. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Oksitetrasiklin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



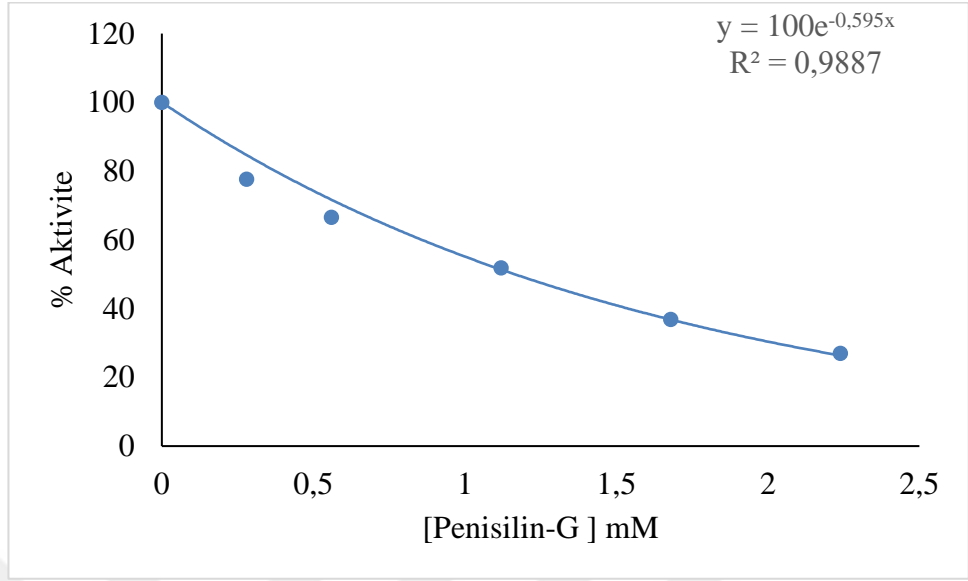
Şekil 4.54. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



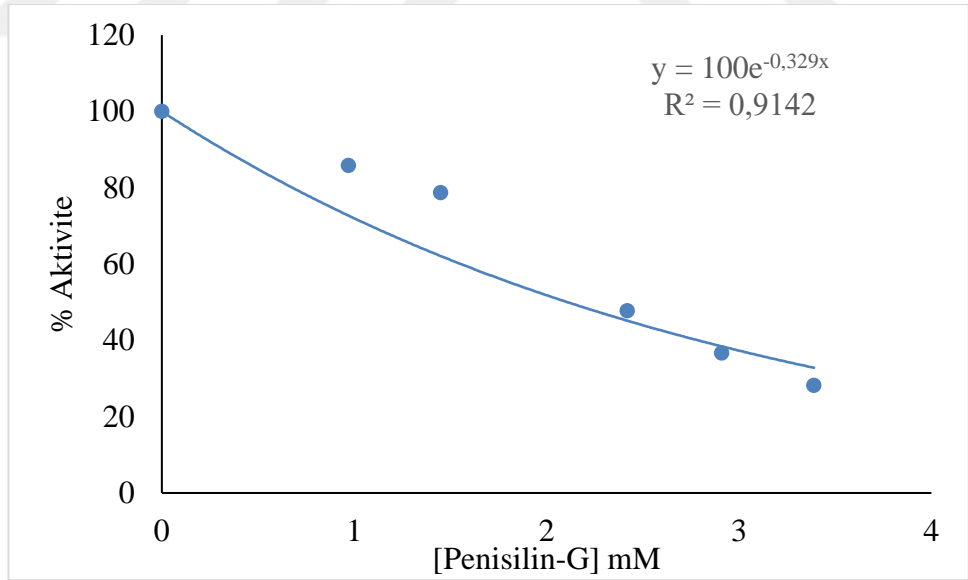
Şekil 4.55. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



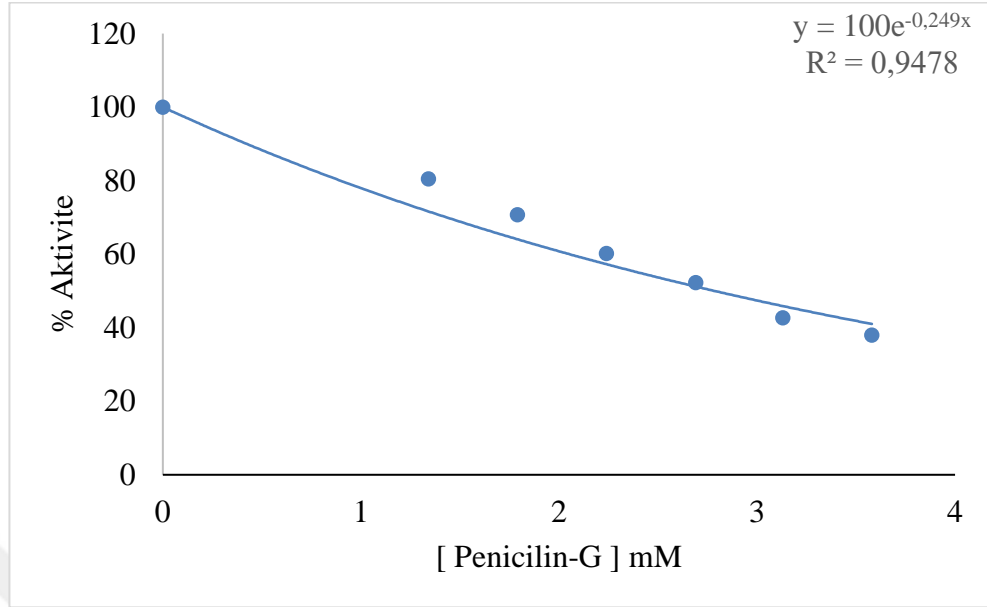
Şekil 4.56. Oksitetrasiklin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



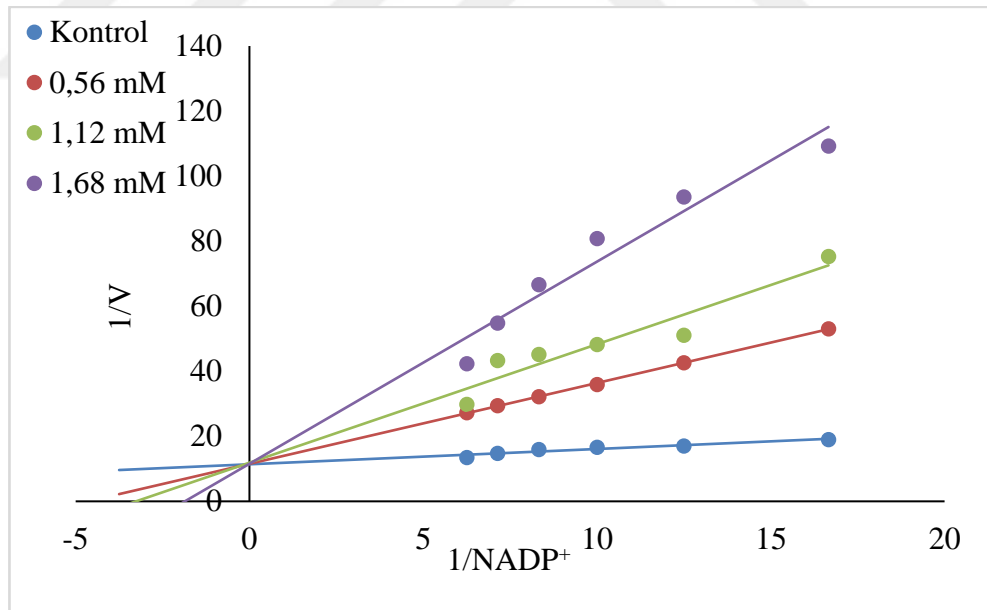
Şekil 4.57. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



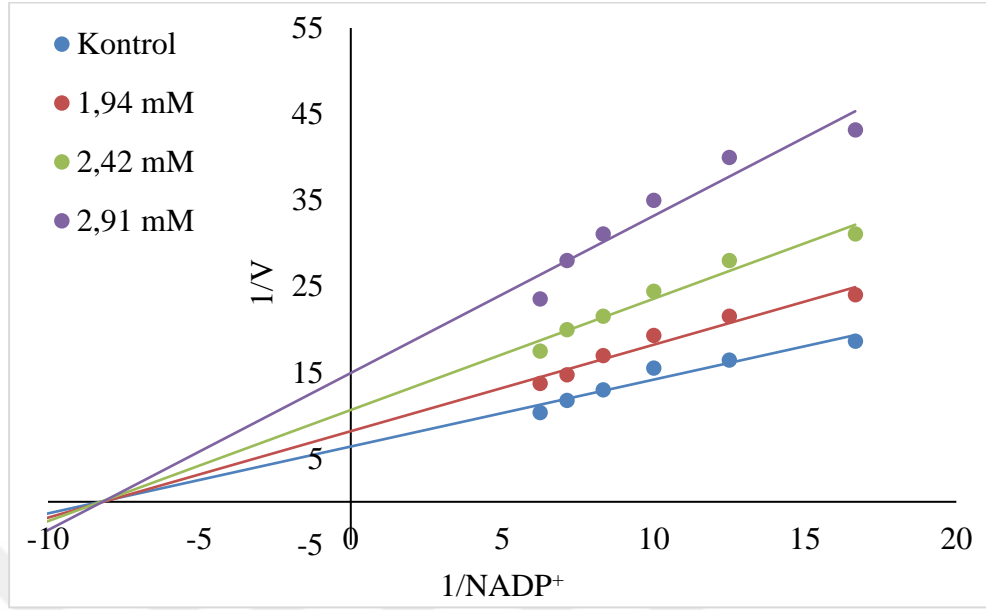
Şekil 4.58. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



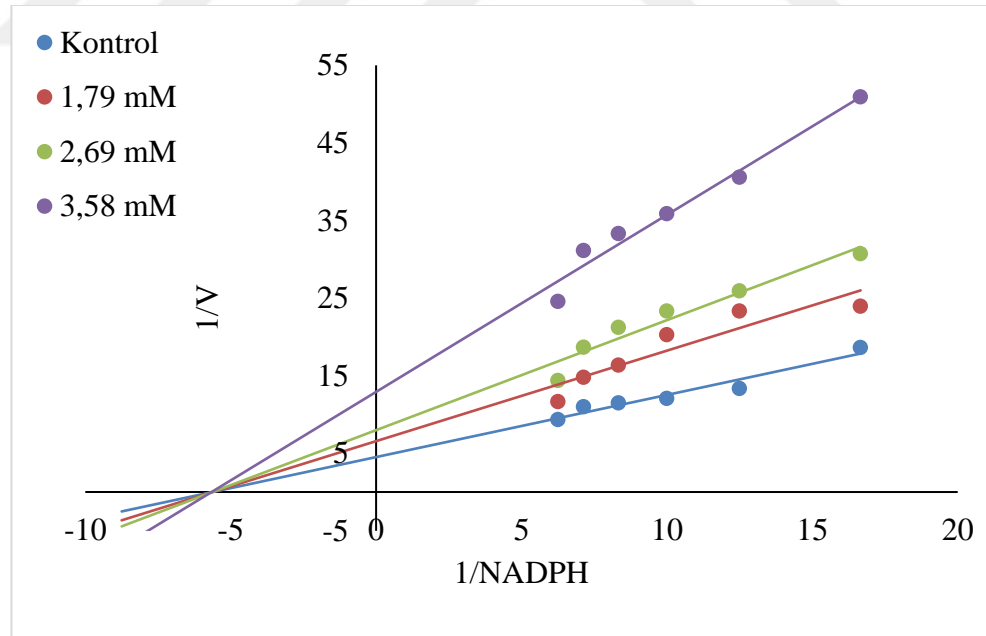
Şekil 4.59. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Penisilin-G ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



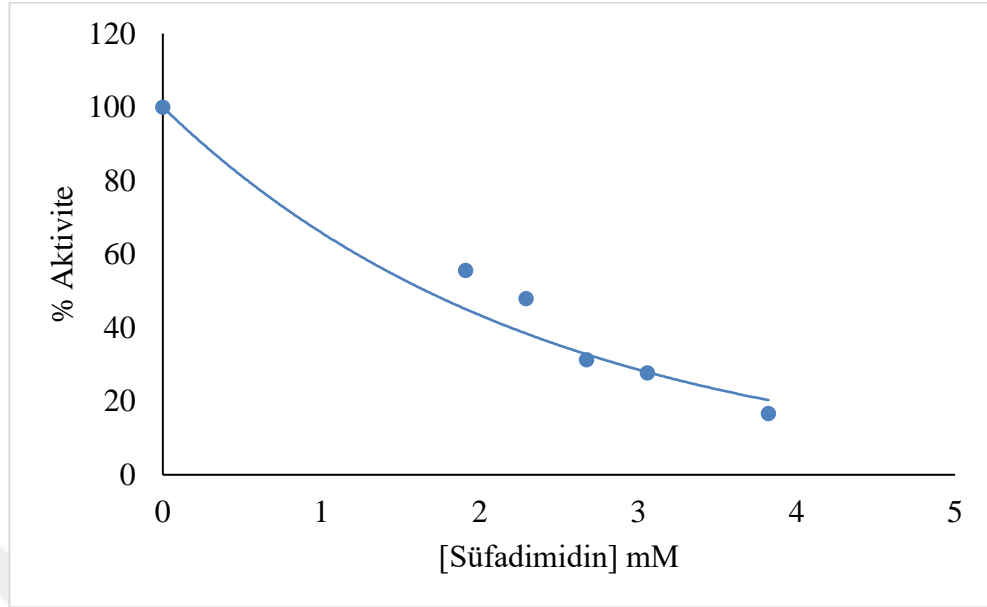
Şekil 4.60. Penisilin-G ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



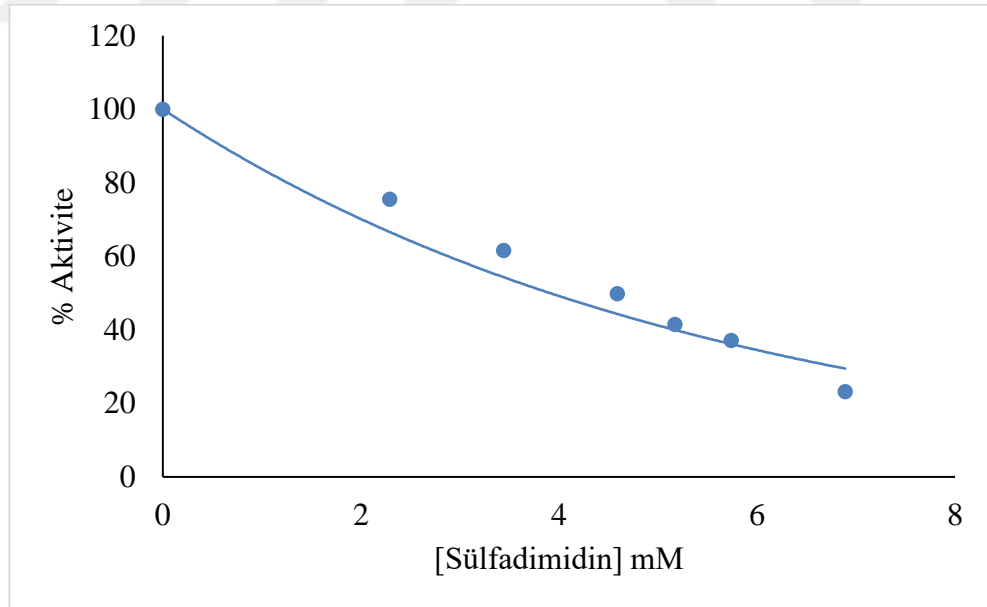
Şekil 4.61. Penicilin-G ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



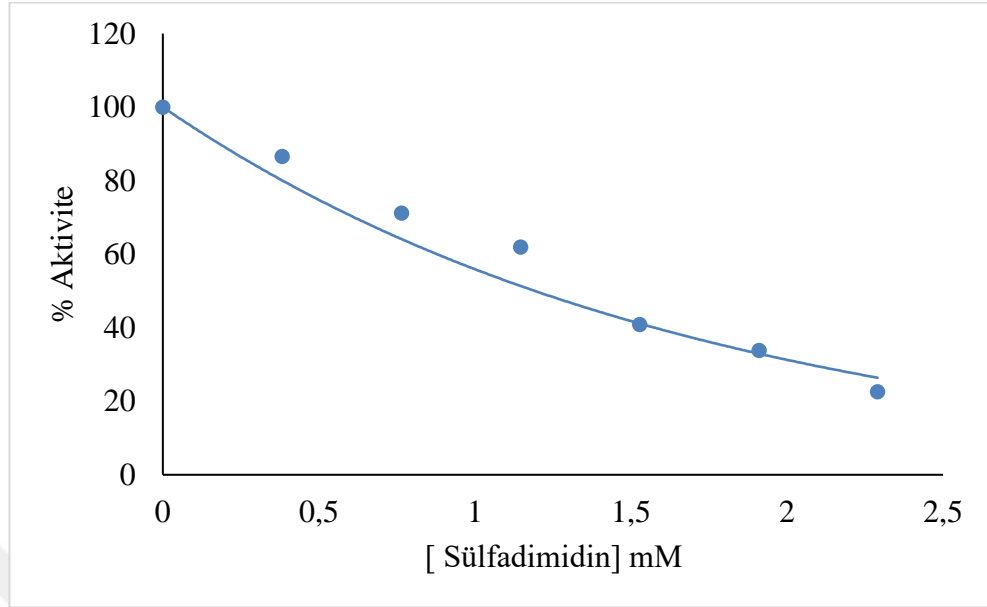
Şekil 4.62. Penicilin-G ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



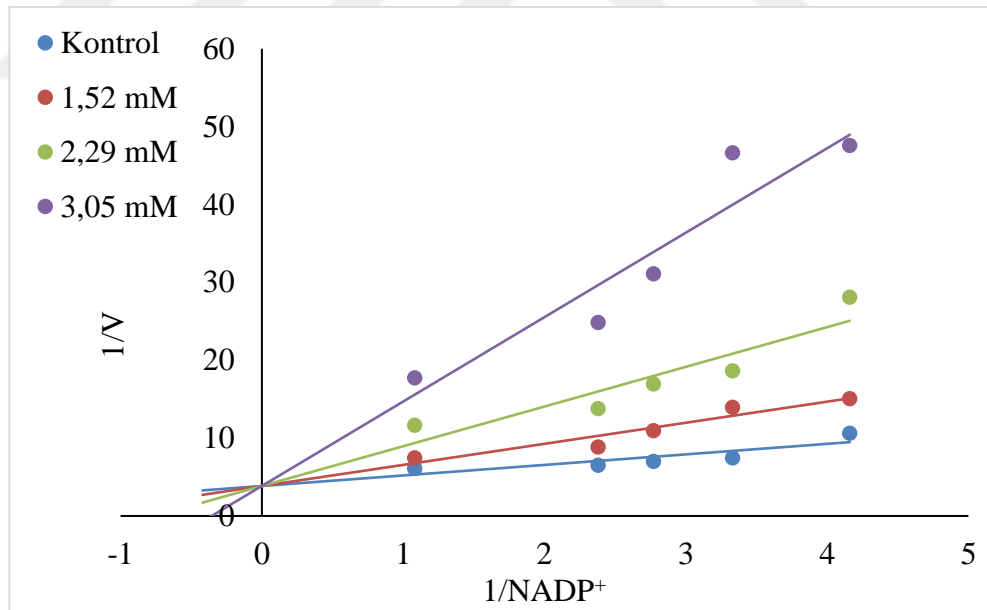
Şekil 4.63. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



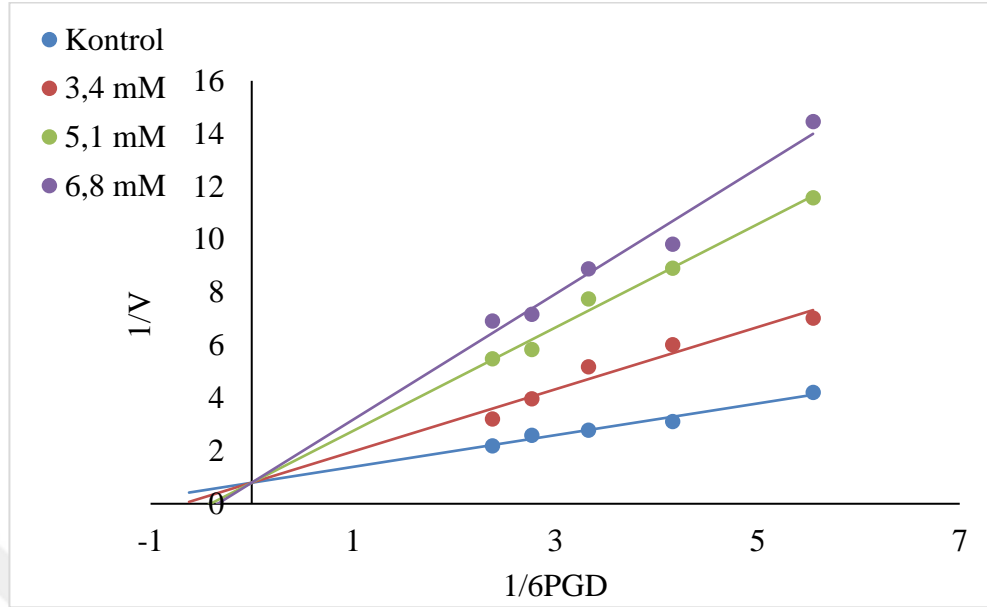
Şekil 4.64. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



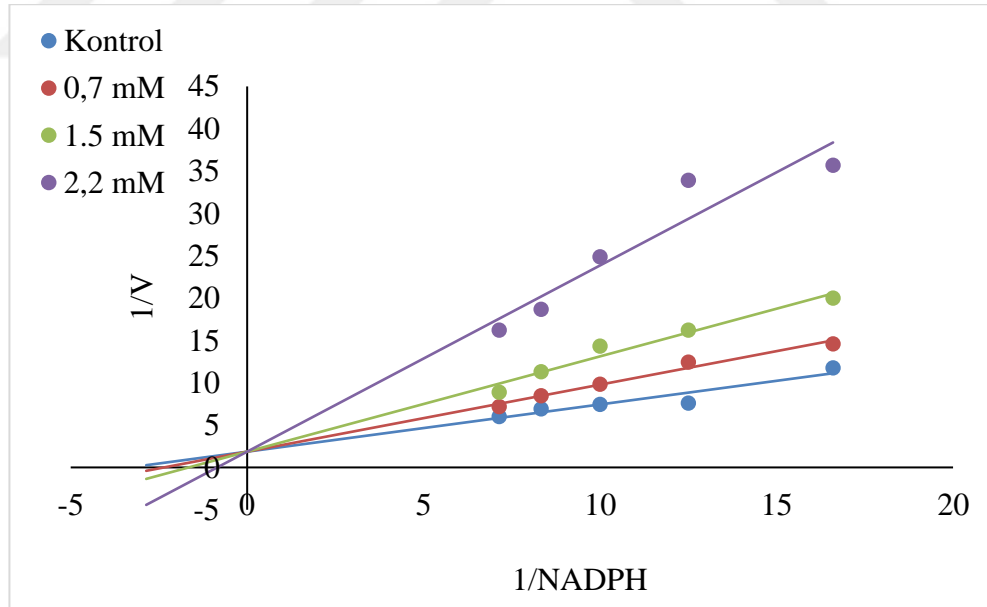
Şekil 4.65. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Sülfadimidin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



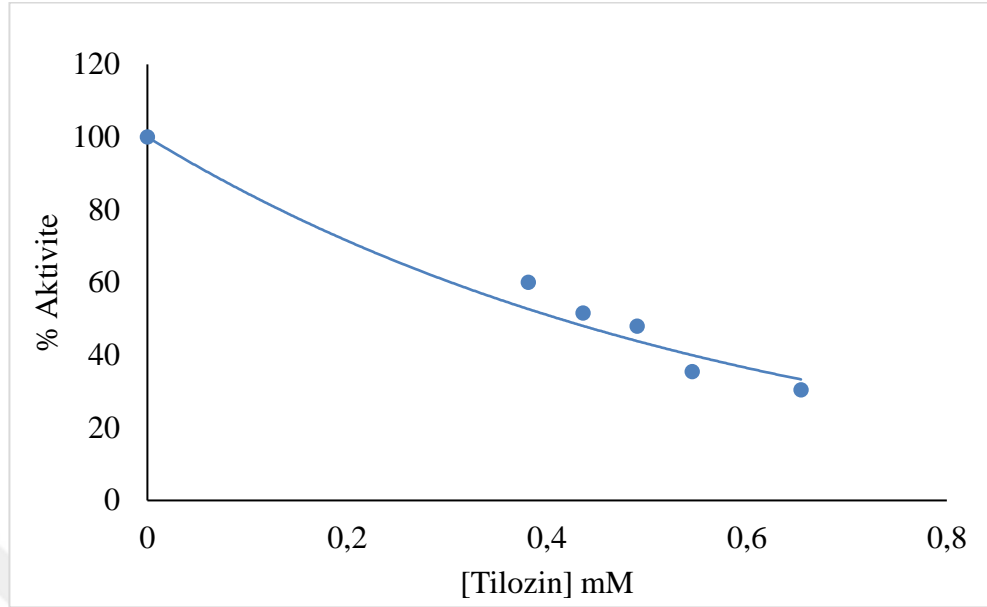
Şekil 4.66. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



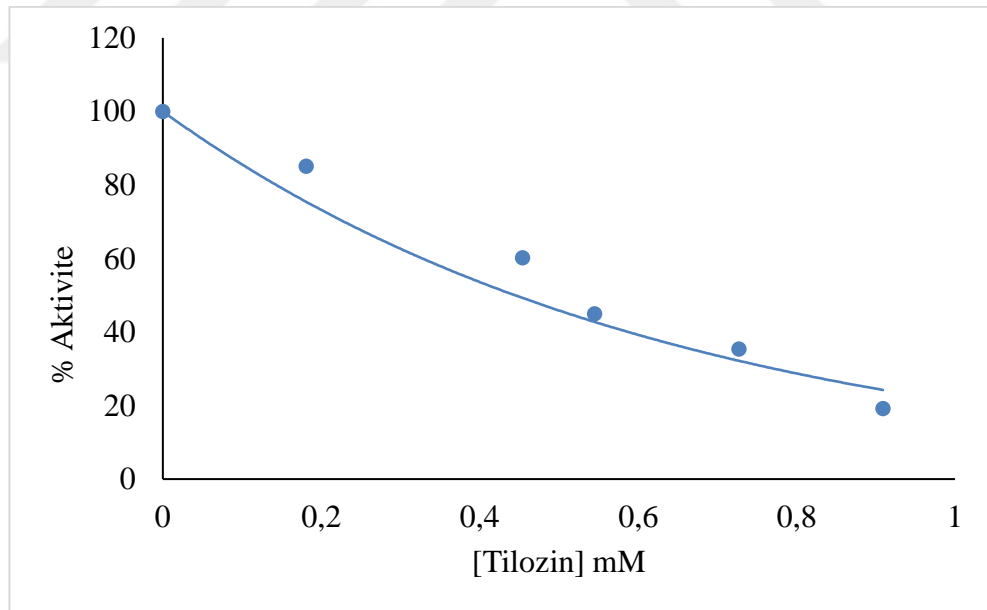
Şekil 4.67. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



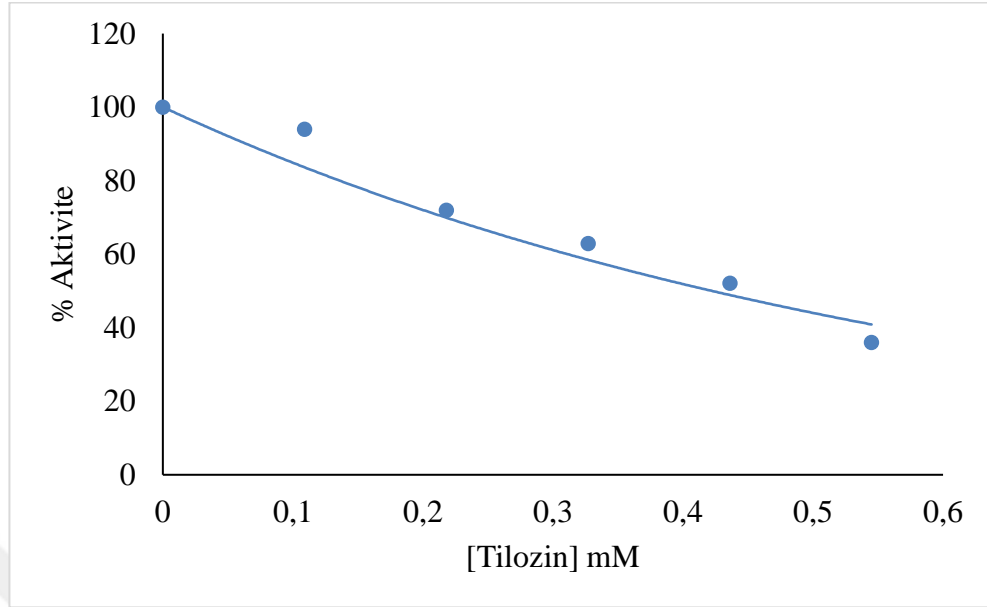
Şekil 4.68. Sülfadimidin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi



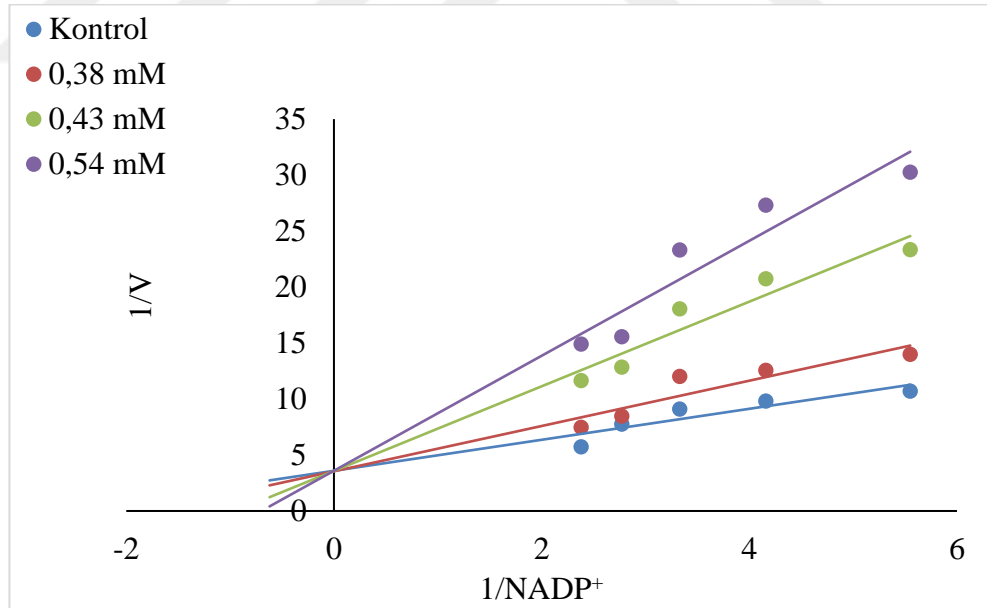
Şekil 4.69. Keçi karaciğerinden G6PD enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



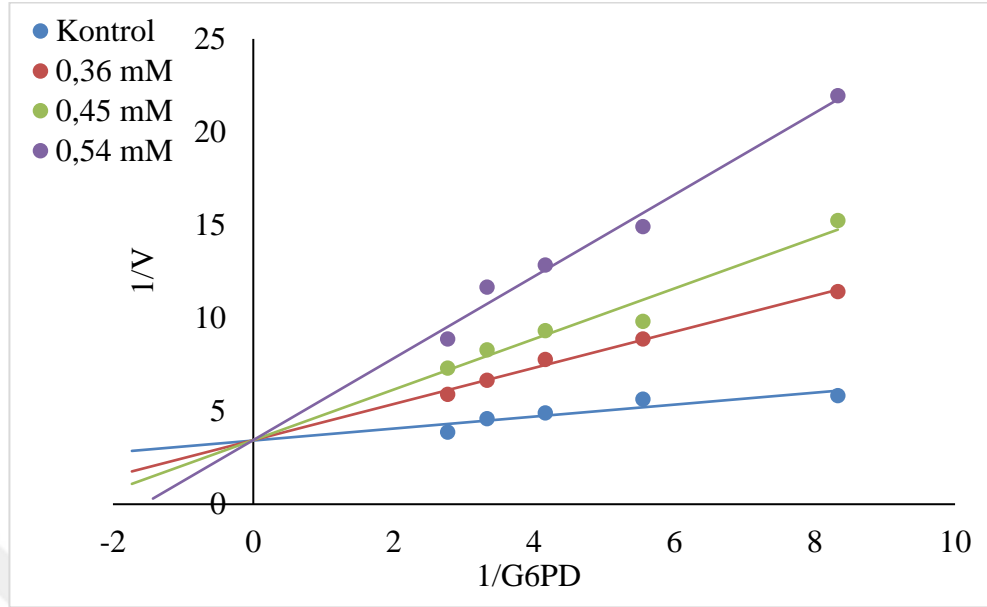
Şekil 4.70. Keçi karaciğerinden 6PGD enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



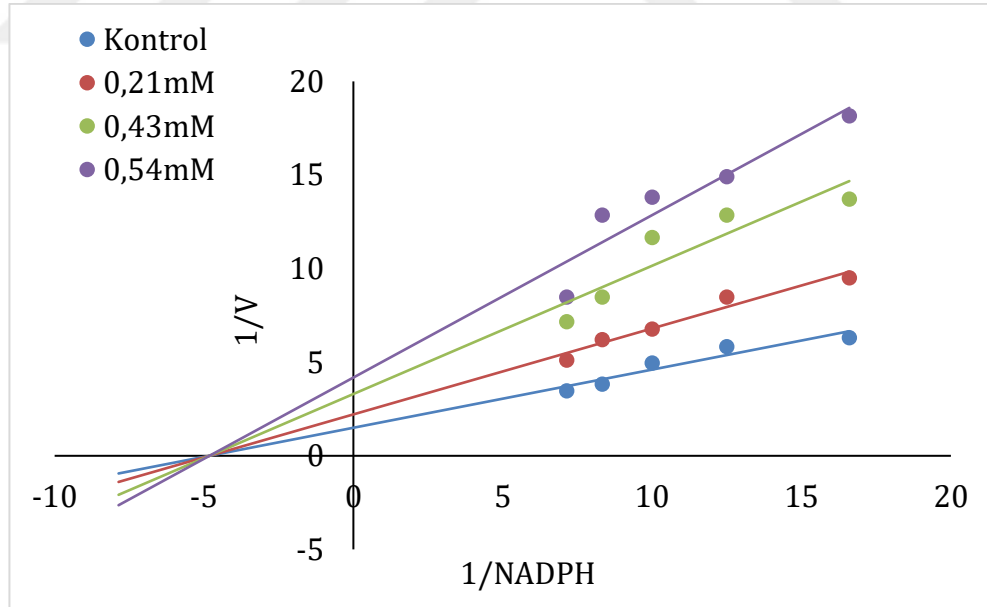
Şekil 4.71. Keçi karaciğerinden GR enzimi üzerine Tilozin ilacının inhibisyon etkisini gösteren grafik



Şekil 4.72. Tilozin ilacının keçi karaciğer G6PD aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.73. Tilozin ilacının keçi karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.74. Tilozin ilacının keçi karaciğer GR aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.32. Keçi karaciğer G6PD enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC₅₀ ve Ki değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaç	IC ₅₀	Ki	Ki Ortalama	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	1,145 (mM)	0,82 (mM)	0,89±0,30	Yarışmalı
		1,43 (mM)		
		2,05 (mM)		
Ampisilin	0,411 (mM)	0,17(mM)	0,51 ± 0,13	Yarışmasız
		0,53 (mM)		
		0,89 (mM)		
Neomisin	2,257 (mM)	1,09 (mM)	2,56±0,53	Yarışmasız
		1,63 (mM)		
		1,90 (mM)		
Oksitetrasiklin	0,101 (mM)	0,08 (mM)	4,33 ± 0,85	Yarışmasız
		0,13 (mM)		
		0,17 (mM)		
Penisilin-G	1,160 (nM)	0,56 (mM)	0,147±0,02	Yarışmalı
		1,12 (mM)		
		1,68 (mM)		
Sülfadimidin	1,661 (mM)	1,52 (mM)	3,22±0,23	Yarışmalı
		2,29 (mM)		
		3,05 (mM)		
Tilozin	0,412 (mM)	0,38 (mM)	0,49±0,06	Yarışmalı
		0,43 (mM)		
		0,54 (mM)		

Çizelge 4.33. Keçi karaciğer 6PGD enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC₅₀ ve Ki değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaç	IC ₅₀	Ki	Ki Ortalama	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	5,372 (mM)	2,73 (mM)	15,24 ± 2,97	Yarışmasız
		4,09 (mM)		
		9,55 (mM)		
Ampisilin	1,287 (mM)	0,89 (mM)	1,59 ± 0,22	Yarışmalı
		1,78 (mM)		
		2,67 (mM)		
Neomisin	2,257 (mM)	1,04 (mM)	2,56±0,50	Yarışmasız
		2,08 (mM)		
		3,12 (mM)		
Oksitetrasiklin	0,074 (mM)	0,05 (mM)	0,08 ± 0,03	Yarışmasız
		0,08 (mM)		
		0,11 (mM)		
Penisilin-G	2,106 (nM)	1,94 (mM)	6,76 ± 2,13	Yarışmasız
		2,42 (mM)		
		2,91 (mM)		
Sülfadimidin	3,915 (mM)	3,44 (mM)	7,92±1,30	Yarışmalı
		5,17 (mM)		
		6,89 (mM)		
Tilozin	0,444 (mM)	0,36 (mM)	0,48±0,10	Yarışmalı
		0,45 (mM)		
		0,54 (mM)		

Çizelge 4.34. Keçi karaciğer GR enzimi için inhibisyon etkisi gösteren ilaçlara ait IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaç	IC ₅₀	K _i	K _i Ortalama	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	5,13 (mM)	2,73 (mM)	5,12 ± 1,83	Yarışmalı
		4,09 (mM)		
		6,82 (mM)		
Ampisilin	0,24 (mM)	0,11 (mM)	0,32±0,15	Yarışmalı
		0,29 (mM)		
		0,41 (mM)		
Neomisin	1,07 (mM)	0,62 (mM)	1,28±0,32	Yarışmasız
		1,25 (mM)		
		1,88 (mM)		
Oksitetrasiklin	0,059 (mM)	0,03(mM)	0,75 ± 0,06	Yarışmalı
		0,06 (mM)		
		0,08 (mM)		
Penisilin-G	2,78 (mM)	1,79 (mM)	3,42 ± 0,49	Yarışmasız
		2,69 (mM)		
		3,58 (mM)		
Sülfadimidin	1,192 (mM)	0,765 (mM)	2,83±0,80	Yarışmalı
		1,528 (mM)		
		2,290 (mM)		
Tilozin	0,422 (mM)	0,21 (mM)	0,36±0,06	Yarışmasız
		0,43 (mM)		
		0,54 (mM)		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

G6PD enzimi nükleik asit sentezi, beş karbonlu şeker, çeşitli biyosentez ve detoksifikasyon tepkimeleri için gerekli NADPH'ı sağlayan pentoz fosfat yolunun ilk ve kilit enzimidir. G6PD eksikliği halinde birçok klinik tablo oluşmaktadır. Bu enzim eksikliğinden dolayı bugün dünyada 400 milyon civarında insan olumsuz yönde etkilenmektedir (Segel 1968; Stryer 1985; Telefoncu 1986; Lehninger 2005; Keha ve Küfrevolu 2012).

G6PD aktivitesinin azalması, hücrenin NADPH oluşturma yeteneğini bozar. NADPH ise redükte glutasyon havuzunun sürdürülmesi için mutlaka gereklidir. Bunun sonucunda, hücre içinde oluşan serbest radikallerin ve peroksitlerin hücresel detoksifikasyonlarında azalma olur. Glutasyon, hemoglobin dahil, proteinlerin sülfhidril gruplarının redükte durumda kalmalarının da sağlar. Bu sülfhidril gruplarının oksidasyonları sonucunda denatüre proteinler oluşur. Bu denatüre proteinler çözünmez kütleler (bunlara Heinz cisimcikleri de denir) oluşturarak eritrositlerin membranlarına tutunurlar. Membran proteinlerinin daha ileri oksidasyonu ile eritrositler rijit ve deforme edilemez (şekillerini değiştirmez) hale gelirler. Böylece eritrositler dolaşımında, karaciğer ve dalak makrofajları tarafından uzaklaştırılırlar. G6PD eksikliği, olan şahıslarda eritrositler diğer hücrelere göre daha çok etkilenir, çünkü burada NADPH üreten tek yol pentoz fosfat yoludur. Diğer dokular, glutasyonu indirgenmiş halde tutabilmek için alternatif NADPH üretim kaynaklarına (NADP⁺ bağımlı malat dehidrogenaz gibi) sahiptir. Eritrosit nükleus ve ribozomu bulunmadığında enzimi tekrar elde edemez. Bu nedenle, eritrositler düşük stabiliteli enzim varyantlarına karşı özellikle savunmasızdırlar (Lippincott and Lippincott 2007).

G6PD mutasyonlarından birine sahip kişilerin birçoğu klinik bulgular göstermez. Ancak G6PD eksikliği olan bazı hastalar oksidan ilaçlarla tedavi edildiklerinde veya ağır bir enfeksiyona yakalandıklarında hemolitik anemi görülebilir (Lippincott and Lippincott 2007).

G6PD eksikliğinin bazı formları, örneğin Akdeniz varyantı, Akdeniz bölgesinin bir besin maddesi olan baklanın hemolitik etkilerine çok duyarlıdır. Favizm olarak adlandırılan bakla yenmesi sonucu görölen hemolitik etki G6PD eksikliği olan kişilerin tümünde görölmez fakat favizmi olan hastaların tümünde G6PD eksikliği vardır. Enfeksiyon G6PD eksikliğinde hemolizin açığa çıkmasına neden olan en önemli faktördür. Enfeksiyona karşı meydana gelen inflamatuvar cevap makrofajlarda serbest radikallerin oluşumuyla sonuçlanır ve bunlar eritrositlerin içine difüze olarak oksidatif harabiyete neden olurlar. G6PD eksikliği ile doğan bebeklerde doğumdan bir ila dört gün sonra yeni doğan sarılığı görülebilir (Lippincott and Lippincott 2007).

Sıklıkla kullanılan ve G6PD eksikliği olan hastalarda hemolitik anemiye sebep olan ilaçlar vardır: antibiyotikler (örneğin, sulfametaksozol ve kloramfenikol), antimalaryal ilaçlar (örneğin, primakain) ve antipiretikler (örneğin, asetanilid) (Lippincott and Lippincott 2007).

G6PD geninin klonlanması ve komplementer DNA sekansının belirlenmesi G6PD eksikliğine neden olan mutasyonlarının tanımlanması sağlamıştır. Bu gene ait 300'den fazla mutasyon veya mutasyon kombinasyonları bulunmuştur. Bu da bugüne kadar tanımlanan çok çeşitli biokimyasal varyantları açıklar. Bu DNA değişikliklerinin çoğu 'misense' ve nokta mutasyonlarıdır. Hem G6PD A⁻ hem de G6PD Akdeniz, mutant enzimleri temsil ederler. Bunların her ikisinde de normal varyantlarından bir amino asit farklıdır. Büyük delesyonlar veya gen yapısını kaydıran mutasyonlara rastlanmamıştır. Böyle mutasyonlarda G6PD aktivitesi hiç bulunmayacağı için, ölümcül olacağı ileri sürölmektedir (Lippincott and Lippincott 2007).

Canlı organizmalarda direkt veya indirekt antioksidan etki gösteren birçok enzimler bulunmaktadır. 6PGD bu enzimlerden biridir. (Reiter *et al.* 1997; Jakobasch *et al.* 1996). Bu enzim, eritrositlerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Dallocchio *et al.* 1985). Enzim eksikliğinde glutatyon eksikliği meydana gelir. Dolayısıyla hücrede oluşan peroksitlerin ve Fe⁺³ 'ün indirgenmemesinden dolayı, oluşan radikaller hücre zarındaki yağlara zarar verip hücrenin parçalanmasına neden olabilir (Soysal ve Bakan 1984).

Glutatyon redüktaz, hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı koruyan hücre içi antioksidan sistemin kilit enzimlerinden biridir. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler (Torinibo 1996).

Enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünü olan indirgenmiş glutatyon, Glutatyon peroksidaz katalizliğinde hidrojen peroksidin suya dönüşümünü sağlayarak hidrojen peroksidi etkisiz hale getirir. Bu reaksiyon sonucu oluşan okside glutatyon tekrar redükte glutatyona dönüşmelidir ki vazifesini devam ettirebilsin. Bu dönüşüm ise GR enzimi katalizliğinde gerçekleşir. Bu nedenle GR enzimi hücre içinde GSH/GSSG oranının korunmasında son derece önemli bir göreve sahiptir.

Glutatyon, yapısında bulunan –SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutatyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutatyonun görevlerini serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi, çeşitli proteinlerin tiyol gruplarının korunması, ksenobiyotiklerin ve bazı ilaçların zehirsizleştirilmesi şeklinde sıralayabiliriz. Glutatyon redüktaz klinik kimyada karaciğer ve kanser hastalıklarının belirlenmesinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde ve bazı genetik eksikliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Beutler 1984).

Sonuç olarak G6PD, 6PGD ve GR enzimleri canlı metabolizmanın önemli enzimlerindedir. Metabolizma için gerekli indirgeyici molekül olan NADPH ve birçok biyomolekülün yapıtaşı olan riboz-5-fosfat, G6PD ve 6-PGD enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşur. Glutatyon redüktaz (GR), okside glutatyonu (GSSG) indirgeyerek glutatyona (GSH) dönüştüren antioksidan bir enzimdir.

Sözü edilen enzimlerin üçü de 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla birçok dokudan saflaştırılmıştır. Erat tarafından 2004 yılında yaptığı bir çalışmada insan eritrositlerinden G6PD ve GR enzimlerini aynı kolondan ayrı ayrı saflaştırmayı başarmıştır.

Bu çalışma kapsamında keçi karaciğer dokularından G6PD, 6PGD ve GR enzimleri 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu kullanılarak aynı homojenattan sırayla saflaştırıldı. Saflaştırma basamakları; homojenat hazırlama ve afinite kromatografisi olmak üzere iki basamaktan ibarettir. Saflaştırma işlemleri homojenat hazırlama dahil yaklaşık olarak 5 saat sürmekte ve sonuçta üç enzim kolondan elüe edilebilmektedir. Elüsyon işlemi G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin elüsyon çözeltileri sırayla kolondan geçirilerek yapılmıştır. Bir önceki enzim tamamem kolondan alındıktan sonra diğerinin elüsyonuna geçilmiştir. Elüsyon işlemi her bir enzim için 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Bu saflaştırma yönteminin avantajları enzimlerin denatüre olma oranının az olması, saflaştırma süresinin kısalığı, daha az kimyasal kullanılması, çok hızlı ve yüksek verimle saflaştırma yapılmasıdır. Sözü edilen enzimlerin saflık derecesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve jel filtrasyon kromatografisi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez sonucunda G6PD, 6PGD ve GR için tek bantlar elde edilmiştir.

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

Keçi karaciğer dokularından sırayla G6PD, 6PGD ve GR enzimleri saflaştırıldıktan sonra, karakterizasyon işlemleri ile kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

G6PD enzimi; keçi karaciğerden %18,3 verimle 3997,65 kat, saflaştırma yapılmıştır. Spesifik aktivitesi 7,196 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır. G6PD enzimi için, bölüm 3.2.1.c 'de anlatıldığı gibi enzimin saflık derecesi belirlenmiş ve alt birim molekül kütlelerini belirleyen SDS-PAGE jel elektroforezi yapılmıştır. Elüsyonla alınan G6PD enzimi numunelerinin SDS-PAGE' de tek bantları elde edilmiştir. Jelden elde edilen fotoğraf yardımıyla enzimin Log M_A-R_f grafiği çizilerek, standartlarla çizilen grafiğe göre molekül kütleleri hesaplanmıştır. Bulunan değer kullanılarak standartlarla çizilen grafikten elde edilen enzimlerin alt birim molekül kütleleri belirlenmiştir. Buna göre karaciğer G6PD enziminin molekül kütlesi 63,1 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon

sonrası karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin K_{av} değeri ve doğal halinin molekül kütlesi 0,35 ve 63,09 kDa olup monomer yapıda olduğu belirlenmiştir. Buffalo eritrositinde alt birim molekül kütlesi 64 kDa (Çiftci *et al.* 2003) ve alabalık eritrositinde alt birim molekül kütlesi 66 kDa (Çiftci *et al.* 2004), olarak belirtilmiştir. Enzimlerinin doğal hallerinin molekül kütleleri, buffalo ve alabalık eritrositleri G6PD ile benzerdir.

G6PD enziminin optimum pH'sı keçi karaciğer dokusunda 8,0 (Tris-HCl) olarak bulunmuştur. Belirlenen değerler literatürde belirlenen aralıkta olup, koyun karaciğeri için bulunan değerle benzerlik göstermektedir (Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Uluşu 2005).

Optimum iyonik şiddet için keçi karaciğer dokusunda Tris-HCl için 25 mM, olarak belirlenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara benzememektedir (Tekman *et al.* 2008).

G6PD enzimi sıcaklıkla enzim aktivitesinin oda şartlarında ki aktivitesinin yaklaşık 2 katına kadar çıktığı gözlemlenmiştir ve 55°C de optimumdur 70°C üzerinde enzimin hemen denatüre olduğu tespit edilmiştir. Keçi karaciğer dokusu için bulunan değer literatürde bulunan değerlerden farklılık göstermektedir (Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003; Tandoğan and Uluşu 2005).

Keçi karaciğer dokusundan G6PD enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH fosfat tamponunda 6,0 olarak belirlenmiştir. Literatür ile benzerlik göstermemektedir, (Yılmaz *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2003; Çiftci *et al.* 2004).

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda G6P ve NADP⁺ substratları için hesaplanan K_M sabitleri sırasıyla 0,09 ve 0,08 mM; V_{max} değerleri ise 0,4 ve 1,02 EÜ/mL olarak bulunmuştur. K_M sabitlerinde görüldüğü gibi saflaştırılan G6PD enziminin NADP⁺'ya olan ilgisi G6P'ye göre daha yüksektir. Çünkü K_M sabiti daha düşüktür. Bu durum literatürle uygunluk göstermektedir (Yılmaz *et al.* 2002; Beydemir *et al.* 2003; Türkoğlu *et al.* 2003; Çiftci 2004 *et al.*).

6PGD enzimi; keçi karaciğerden %13,68 verimle 7428,57 kat saflaştırıldı. Spesifik aktivitesi 20,8 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzim aynı afinite kolonu kullanılarak %78 verimle sıçan ve insan eritrositlerinden saflaştırıldığı belirtilmektedir (Beydemir *et al.* 2004; Adem 2006).

2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonla alınan 6PGD enzim numunelerinin, SDS-PAGE'de tek bantları elde edilmiştir. Jelden elde edilen fotoğraf yardımıyla enzimin Log M_A -Rf grafiği çizilerek, standartlarla çizilen grafiğe göre molekül kütleleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler kullanılarak standartlarla çizilen grafikten elde edilen enzimlerin alt birim molekül kütleleri belirlenmiştir. Buna göre karaciğer 6PGD enziminin molekül kütlesi 51,4 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon sonrası karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enziminin K_{av} değeri ve doğal halinin molekül kütlesi 0,25 ve 100,02 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyon sonuçları beraber değerlendirildiğinde enzimin her iki dokuda da homodimer yapıda olduğu anlaşılmaktadır. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enziminin molekül kütlesi ve yapısı için bulunan değerler, literatürde diğer dokulardan saflaştırılan 6PGD enzimi sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Procsal and Holten 1972; Betts and Mayer 1975; Ceyhan *et al.* 2005).

6PGD enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri keçi karaciğer dokusunda 8,0 (Tris-HCl) olarak belirlenmiştir. 6PGD enzimi için belirlediğimiz değer literatürde yapılan diğer çalışmalarda belirlenen değerlerle değerle aynıdır (Corpas *et al.* 1995).

Optimum iyonik şiddet keçi karaciğer dokusunda Tris-HCl için 200 mM olarak belirlenmiştir. Bu veriler enzimin yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivitesinin fazla olduğunu göstermektedir.

6PGD enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri keçi karaciğer dokusunda 50°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklıkla enzim aktivitesinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Enzimin 60°C üzerinde denatüre olduğu da tespit edilmiştir. Enzimin keçi karaciğer dokusundan belirlenen optimum sıcaklık değeri literatürde daha önce çalışılan ince

bağırsak dokusunda bulunan değerlerle aynıdır (Beydemir *et al.* 2004; Ceyhan *et al.* 2005).

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH Tris-HCl tamponunda 7,5 olarak belirlenmiştir. Literatürle benzerlik göstermemektedir (Erat 2005).

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan 6PGD enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda 6PGD ve NADP⁺ substratları için hesaplanan K_M sabitleri sırasıyla 0,37 ve 0,036 mM; V_{max} değerleri aynı sıra ile 0,110 ve 0,102 EÜ/mL olarak tespit edilmiştir. K_M sabitlerinde görüldüğü gibi her iki dokudan da saflaştırılan 6PGD enzimlerin NADP⁺’ya olan ilgisi 6PGA’ya göre daha fazladır. Çünkü K_M değeri daha küçüktür. Bu durum literatürle benzerlik göstermektedir (Corpas *et al.* 1995; Ceyhan *et al.* 2005).

GR enzimi keçi karaciğer dokusundan %91,28 verimle yaklaşık 2192,14 kat, saflaştırılmıştır. Spesifik aktivitesi 61,38 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan enzim yüksek verimle elde edilmiştir. Enzim daha önce aynı afinite kolonuyla %50’nin altında bir verimle saflaştırılmışken bu çalışmada verim %90’nın üzerine çıkmıştır (Erat 2004; Tekman *et al.* 2008). Verimin yüksek olmasının nedeni enzimlerin stabil pH’larında çalışılmış olması, saflaştırma işleminin kısa sürede yapılması ve saflaştırmanın tek basamakta yapılmış olmasıdır.

Afinite sonrası elde edilen GR enzim numuneleri ile yapılan SDS-PAGE’de tek bantlar elde edilmiştir. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi jelden elde edilen fotoğraf yardımıyla enzimin Log M_A-Rf grafiği çizilerek, standartlarla çizilen grafiğe göre molekül kütleleri hesaplanmıştır. Molekül kütlesi 61,3 kDa olarak hesaplanmıştır. Jel filtrasyon sonrası, karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için K_{av} değeri ve doğal hallinin molekül kütlesi 0,2 ve 125,89 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyon sonuçlarına göre enzimin doğal yapısı homodimer olduğu görülmektedir. Enzimlerin molekül kütleleri ve yapıları literatürle benzerlik göstermektedir (Carlberg and Mannever 1975; Acan and Tezcan 1989; Erat 2002).

GR enziminin optimum pH'sı keçi karaciğer dokusunda 8,0 (Tris-HCl tamponunda) olarak belirlenmiştir. Bulunan değerler literatürle benzerlik göstermektedir (Scott *et al.* 1963; Ulusu *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008).

GR enziminin optimum aktivite gösterdiği optimum tuz konsantrasyonu çalışmamızda Tris-HCl tamponunda 50 mM olarak belirlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu için çizilen şekil incelendiğinde aktivite ölçümlerinde tuz konsantrasyonunun GR enzimi için çok önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında stabil pH Tris/HCl tamponunda 7,5 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bulunan bu değer sığır eritrositi GR için bulunan değere yakındır (Tekman *et al.* 2008).

Optimum sıcaklık değerleri saflaştırılan GR enzimi için 50°C'dir. Literatürde GR enziminin ısıya dayanıklı bir enzim olduğu belirtilmiştir (Lopez and Lee 1979).

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda GSSG ve NADPH substratları için hesaplanan K_M değerleri sırasıyla 0,92 ve 0,25 mM; V_{max} değerleri aynı sırayla 0,67 ve 1,009 EÜ/mL olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, substratlar için hesaplanan K_M sabitlerinden görüldüğü gibi, GR enziminin NADPH'a olan ilgisi GSSG'a olandan daha fazladır. Çünkü K_M değerleri daha düşüktür. Bu durum ve bulunan değerlerin bazıları literatürle uygunluk göstermektedir (Ulus *et al.* 2005; Tekman *et al.* 2008).

İlaçların söz konusu enzim aktivitelerini inhibe ettiği birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmayla rapor edilmiştir (Çiftci *et al.* 2000; Akyüz 2004; Erat ve Çiftci 2003; Şentürk 2006). Bu çalışmamızda keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine, küçükbaş hayvanlarda kullanılan ve tedavi sürecinde ilgili dokuyu hedef alan ilaçlarla çalışılmıştır.

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

Yaptığımız çalışmalarımızda, keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD, GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkisi incelendi. Bu amaçla amoksisilin, ampisilin, neomisin, oksitetrasiklin, penisilin G, sülfadimidin ve tilozin çalışıldı.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda amoksisilinin keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. IC_{50} değerleri sırayla 1,145, 5,372 ve 5,130 mM olarak; K_i sabitleri aynı sırayla $0,89 \pm 0,30$, $15,24 \pm 2,97$ ve $5,12 \pm 1,83$ mM olarak hesaplanmıştır. Amoksisilin G6PD ve GR enzimlerinde yarışmalı 6PGD enzimin de yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda Van Gölü balığı karaciğer G6PD ve insan eritrosit 6PGD enzimleri üzerinde amoksisilin *in vitro* etkileri incelenmiş ve bu enzimleri inhibe ettiği, insan eritrosit GR enzimini de aktive ettiği belirlenmiştir (Çiftci et al. 2006; Adem and Çiftci 2007; Şentürk et al. 2008). Amoksisilinin insan eritrosit 6PGD ve tavuk karaciğer dokusu GR enzimleri üzerinde yarışmasız, koyun karaciğer GR enzimi üzerinde ise yarışmalı inhibisyon etkisi rapor edilmiştir (Akyüz 2004; Demir 2006; Erat ve Çiftci 2003).

Ampisilinin keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. IC_{50} değerleri sırayla 0,411, 1,287 ve 0,240 mM olarak, K_i sabitleri de aynı sırayla $0,89 \pm 0,30$, $15,24 \pm 2,97$ ve $0,32 \pm 0,15$ mM olarak hesaplanmıştır. Ampisilin, 6PGD ve GR enzimlerinde yarışmalı, G6PD enzimi için ise yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Ampisilin insan eritrosit G6PD ve enzimlerinin inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ampisilin insan eritrosit GR enziminin inhibisyonu gözlemlenmemiştir. Bulunan değerler literatürle 6PGD ve GR enzimleri için benzerlik

göstermektedir. GR enzimi için ise çalışmamızda literatürden farklı olarak inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir. (Çiftci 1998 Çiftci *et al.* 2002 Erat 2002 Akyüz *et al.* 2004).

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan biri de Neomisindir. IC₅₀ değerleri sırayla 1,90, 1,93 ve 0,68mM olarak; K_i sabitleri aynı sırayla 2,03±1,18, 1,79±0,91 ve 0,91±0,42 mM olarak hesaplanmıştır. Seftazidim enzimleri yarışmasız olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Seftazidimin, insan eritrosit 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği literatürde rapor edilmiştir (Akyüz 2004; Şentürk 2006).

Oksitetrasiklin keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini yarışmasız olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Bulunan IC₅₀ değerleri sırayla 8,15, 9,24 ve 1,56 mM olarak, K_i değerleri aynı sırayla 7,21±3,63, 15,64±7,48 ve 1,57±0,31 mM olarak hesaplanmıştır. Sefuroksimin insan eritrosit G6PD enzimini in vivo ve in vitro, 6PGD ve GR enzimlerini in vitro olarak inhibe ettiği literatürde rapor edilmiştir (Çiftci *et al.* 2000; Adem 2006; Şentürk 2006).

Penisilin G keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini yarışmasız olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Bulunan IC₅₀ değerleri sırayla 1,16, 2,10 nM 2,78 mM olarak, K_i değerleri aynı sırayla 0,147±0,02, 6,76 ± 2,13 ve 3,42 ± 0,49 mM olarak hesaplanmıştır. Penisilin G insan eritrosit G6PD , 6PGD ve GR enzimlerini inhibe ettiği literatürde rapor edilmiştir (Akyüz *et al.* 2004; Şentürk 2006)

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan biri de Sülfadimidindir. IC₅₀ değerleri sırayla 1,66, 3,91 ve 1,19 mM olarak; K_i sabitleri aynı sırayla 3,22±0,23, 7,92±1,30 ve 2,83±0,80 mM olarak hesaplanmıştır. Sülfadimidin enzimleri yarışmalı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan biri de Tilozindir . IC₅₀ değerleri sırayla 0,42, 0,44

ve 0,41 mM olarak; K_i sabitleri aynı sırayla $0,49 \pm 0,06$, $0,48 \pm 0,10$ ve $0,36 \pm 0,06$ mM olarak hesaplanmıştır. Tilozin G6PD ve 6PGD enzimlerini yarışmalı GR enzimini ise yarışmasız olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Kılınç 2011 yılında yaptığı bir çalışmada tilozinin hCAI enzimi için esteraz aktivitesinde artış görürken hCAII enzimi için esteraz aktivitesinde azalış görmüştür. Bu iki enzim için hidrataz aktivitesinde ise inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak çalışma kapsamında metabolizma için oldukça önemli üç enzim olarak bilinen G6PD, 6PGD ve GR keçi karaciğer dokusundan saflaştırılıp karakterize edildi. Çalışmamızda enzimlerin optimum pH, optimum iyonik şiddet, konsantrasyonu, stabil pH ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık gibi kinetik özellikleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. G6PD, 6PGD ve GR enzimleri için karakterizasyon toplu sonuçları

Çalışma tipi	G6PD Enzim İçin Sonuçlar	6PGA Enzimi İçin Sonuçlar	GR Enzimi için Sonuçlar
Optimum pH	8,0 (Tris/HCl)	8,0 (Tris/HCl)	8,0 (Tris/HCl)
Optimum iyonik şiddet	25 mM (Tris/HCl)	200 mM (Tris/HCl)	50 mM (Tris/HCl)
Optimum sıcaklık	55°C	50°C	50°C
Stabil pH	6,0 (KH ₂ PO ₄)	7,5 (Tris/HCl)	7,5 (Tris/HCl)
G6P için K_M	0,09 mM	-	-
G6P için V_{max}	0,4 EÜ/mL	-	-
6PGA için K_M	-	0,37 mM	
6PGA için V_{max}	-	0,11 EÜ/mL	
NADP ⁺ için K_M	0,08 mM	0,36 mM	-
NADP ⁺ için V_{max}	1,02 EÜ/mL	0,102 EÜ/mL	-
GSSG için K_M	-	-	0,92 mM
GSSG için V_{max}	-	-	0,67 EÜ/mL
NADPH için K_M	-	-	0,25 mM
NADPH için V_{max}	-	-	1,009 EÜ/mL

Aynı zamanda enzim-substrat arasındaki ilginin bir göstergesi olan K_M sabitleri ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğikleriyle belirlenmiştir. Enzimlerin katelizediği reaksiyonların ürünlerinin enzim aktivitesi üzerinde etkisi incelenerek, ürünlerin inhibisyon türü ve K_i sabitleri Lineweaver-Burk grafiğiklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. (Çizelge 3.32; Çizelge 3.33; Çizelge 3.34)

Her üç enzim de 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisi kullanılarak, aynı anda sırayla saflaştırılmıştır. Bazı ilaçların saflaştırılan enzimler üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Seçilen ilaçlar dokuda oluşan rahatsızlıkların tedavisi için kullanılan ilaçlar olmasına dikkat edilmiştir. Keçi karaciğer dokusu G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitesi üzerine de amoksisilin, ampisilin, neomisin, oksitetrasiklin, penisilin G, sülfadimidin ve tilozinin etkileri araştırılmıştır. Keçi karaciğer dokusu G6PD, 6PGD, GR enzimlerini *in vitro* olarak inhibe eden amoksisilin, ampisilin, neomisin, oksitetrasiklin, penisilin G, sülfadimidin ve tilozin için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. (Çizelge 3.32; Çizelge 3.33; Çizelge 3.34)

KAYNAKLAR

- 1946 Nobel prize for Chemistry laureates at <http://nobelprize.org> Accessed 4 April 2007
- Acan, N.L. and Tezcan, E.F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Letter*, 250, 1, 72-74.
- Açan, L., 1990. Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Adem, S., İnsan eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimini saflaştırılması, Bazı ilaç ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, (Y.Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (2006).
- Adem, Ş., 2011. Sıçan kalp ve akciğer dokularından glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz enzimlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu, kotinin ve bazı ilaçların enzimlerin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adem, Ş., Çiftci, M., 2016. Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, and Glutathione Reductase from Rat Heart and Inhibition Effects of Furosemide, Digoxin, and Dopamine on the Enzymes Activities, *Journal of Biochem Molecular Toxicology*, 30 : 295-301
- Agrios, G.N., 1997. *Plant Pathology*. Academic Pres, London. 212-213
- Akerlund, B., Tynell E., Bratt G., Bielenstein M., Lidman C., 1997. N-Acetylcysteine Treatment and The Risk Of Toxic Reactions To Trimethoprim-Sulphamethoxazole In Primary Pneumocystis Carinii Prophylaxis In HIV-Infected Patients. *J. Infect*, 35:143-147.
- Aksoy K., Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı, Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1997.
- Akyuz, M., Erat, M., Ciftci, M., Gumustekin, K., Bakan, N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19:361-5.
- Ann-Sofie, J., 2002. Exploring the functional plasticity of human glutathione transferases. PhD thesis. Acta Universitatus Upsaliensis. Uppsala. 1-56.
- Anonymous, 2018. www.drugbank.ca/drugs
- Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., Adams, M. J., 2000. Human glucose-6- phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP+ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8, 293-303.
- Avdan. *Enzymol.*, John Wiley and Sons inc., New York. 59, 103-167.
- Bansal, A.K., Bansal, M., Soni, G., Bhatnagar, D., 2005. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver, *Chemico-Biological Interactions*, 156 (2005) 101-111.
- Barengi L, Ceriotti F, Ripamonti M, Luzzano M, Banini P. Erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase measured by a differential pH technique. *Clin Chem*. 1987; 33(4): 579-82.
- Barrett, M. P. 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today*.13(1):11-6.
- Bayoumi, R. A., Bashir, A. H., Abdulhadi, H., 1986. Resistance to falciparum malaria among adults in central Sudan. *Am J Trop Med Hyg*. 35(1):45-55.

- Becker K., Savvides S.N., Kese M., Schirmer R.H. and Karplus P.A., 1998. Enzyme inactivation via sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nat. Struct. Biol.* 5, 267-271.
- Beitner R., Nordenberg J., Inhibition of 6-PGD by Glucose 1,6-bisphosphate, *Biochim Biophys Acta*, 583, 266-69, (1979).
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., 2006. *Biochemistry* New York, ABD: W. H. Freeman. (6. bs., 564-574).
- Bergamini, C. M., Signorini, M., Hanau, S., Rippa, M., De Laureto, P. P., Cremonini, M.A., 1995. Inactivation and cleavage of liver 6-P-gluconate dehydrogenase during irradiation in the presence of vanadate. *Arch Biochem Biophys*, 321(1), 1-5.
- Betts, SA., Mayer, RJ., 1975. Purification and Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Rabbit Mammary Gland. *Biochem. J.* 151, 263-270
- Beutler, E., 1984. Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*. 3rd ed. Grune and Starton, Inc. Orlando, FL 32887, London.
- Beydemir, Ş., Ciftci, M., Yılmaz, H., Küfrevioğlu Ö.İ., 2004. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase: Purification, Characterization and Kinetic Properties from Rat Erythrocytes. *Turk J Vet Anim Sci* 28, 707-714
- Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Çiftci, M., Bakan, E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003. Purification of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Goose Erythrocytes and Kinetic Properties. *Turk J Vet Anim Sci* 27-1179-1185
- Bianchi, D., Bertrand, O., (2001), Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum*. Purification and properties of 6-PGD, *Enzyme Microb Technol* 28, 754-759.
- Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., Sarma V.R., 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution". *Nature* 22, (206), 757-761
- Boggaram, V., Brobjer K.L. and Mannervik B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brodelius, P., Larsson P.O. and Mosbach K., 1974. The synthesis of three AMP analogues: N6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N6-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate and N6-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *J. Biochem.*, 47, 81-89.
- Budak H., Gonul N., Ceylan H., Kocpinar E. F., 2014a. Impact of long term Fe³⁺-toxicity on expression of glutathione system in rat liver. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37, 365-370.
- Budak, H., Kocpinar, E.F., Gonul, N., Ceylan, H., Erol, H.S., Erdogan, O., 2014b. Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 166 (2014) 44-50.

- Bülbül, M., Erat, M., 2008. Investigation of the effects of some sulfonamide derivatives on the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, June; 23(3): 418–423
- Cabezas, H., Raposo, R. R., Meléndez-Hevia, E., 1999. Activity and metabolic roles of the pentose phosphate pathway cycle in several rat tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 201, 57-63.
- Cacciapuoti, A.F., and Lessie, T.G., 1977, Characterization of the fatty acid-sensitive glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas Cepacia*, *Journal of Bacteriology*, s, 555-563.
- Camardella, L., Carusco, C., Rutigliano, B., Romano, M., Di Prisco, F., 1988. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Identification of a reactive lysyl residue labelled with pyridoxal 5'-phosphate. *European Journal of Biochemistry*, 171, 485-489
- Cankaya, M., Hernandez A.M., Ciftci M., Beydemir S., Ozdemir H., Budak H., Gulcin I., Comakli V., Emircupani T., Ekinci D., Kuzu M., Jiang Q., Eichele G., Kufrevioglu O.I., 2007. An analysis of expression patterns of genes encoding proteins with catalytic activities. *BMC Genomics*, 8 (232), 1-15.
- Cappellini M.D., Tavazzi D., Martiner Di Monstemuros F., Sampietro M., Gaviraghi A., Carandini D., Fiorelli G., 1993, Alternative Splicing of Human G6PD Messenger RNA in K562 Cells but not in cultured erythroblast, *Eur. J. Clin. Invest*, 23, 188-191.
- Caprari, P., Caforio, M. P., Ciancuilli, P., Maffi, D., Pasquino, M. T., Tarzia A, Amadori S., 2001. 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family,. *Ann Hematol.*, 80, 41-44.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Press, Orlando, FL.
- Ceyhan, D., Danisan, A., Ogus, H., Ozer, N., 2005. Purification and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *The Protein Journal*, Vol. 24, No. 5
- Champe, P. C., Harvey R. A., Lipincott. Tercüme: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E 1997. *Biyokimya, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri*, 117.
- Chaudhari M., Jayaraj R., Santhosh S.R. and Lakshmana Rao P.V., 2009. Oxidative Damage and Gene Expression Profile of Antioxidant Enzymes After T-2 Toxin Exposure in Mice. *J Biochem Molecular Toxicology*, Volume 23, Number 3, 212-221.
- Ciftci, M., Beydemir, Ş., Yilmaz, H., Bakan, E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *Pol J Pharmacol*. 54: 275-280.
- Ciftci, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, MN., Pençe, S., Küfrevioğlu Ö.İ., 2001. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo. *Clinical Biochemistry* 34,297–302
- Comaklı, V., Akkemik, E., Çiftci, M., Küfrevioğlu, O. İ., 2015. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and investigation of the effects of some metal ions on enzyme activity, *Toxicology and Industrial Health*, 31(5) 403–411
- Comar, J.F., Sa'-Nakanishi A.B., Oliveira A.,L., Wendt M.M.N., Amado C.A.B., Iwamoto E.L.I., Peralta R.M., Bracht A., 2013. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 58, 144–153.
- Corpas F.J., Garca-Salguero L., Barroso J.B., Aranda F., Lupitez J.A.,1995. Kinetic Properties of Hexose-monophosphate dehydrogenases II, Isolation and Partial Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from Rat Liver and Kidney Cortex, *Moll Cell Biochem.*, 144 (2), 97-104,
- Corrons, V., Colomer, D., Pujades, A., Rovira, A., Aymerich, M., Merino, A., 1996. Congenital 6- phosphogluconate dehydrogenase deficiency Associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. *American J of Hemato*, 53, 221-227.
- Cottreau D., Boivin P., Kahn A., Milani A., Marie J., 1975. Human granulocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification by elective elution with NADP immunological and kinetic properties, *Biochimie (Biochimie)* 57 (3), 325-35.,
- Cristina, D., M., Cristina, T., and Jose L., 1990, Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography*, 498, 159-168.
- Çiftci M., Erat, M., 2003. *In Vitro* Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase from Sheep Liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, December Vol. 18 (6), pp. 545–550
- Çiftci M., Küfrevioğlu Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ. 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacol. Res.*41,109-113.
- Çiftci, M., 1998. Bazı İlaçların İnsan Eritrositlerinde Bulunan Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.*
- Çiftci, M., Çiltaş, A., Erdoğan O., 2004. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Vet. Med. Czech*, 49,(9): 327-333
- Çiftci, M., Türkoğlu, V., Aldemir, S., 2002. Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver. *Vet. Med. Czech*, 47, (10–11): 283-288
- Danner, J., Lenhoff H.M. and Heagy W., 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH. *Analytical Biochemistry*, 82, 586-590.
- David S. Shreve and H. Richard Levy, 1977, On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 1369-1375.
- Del Mar M., Puerta M., Perlierra AG., 1986. Purification and properties of the enzyme 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *dicentrarchus labrax* 1.liver. *Comp Biochem Physiol.*;83 B (1): 215-220.
- Deneke S.M., Fanburg B.L., 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, 257:163–173.
- Deutsch, J., 1983, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, 199-196

- Dikmen, N., Yuregir, T.G., 1989, Kordon kanından izole edilen galaktoz 6-fosfat kullanımını ile ilginç iki glukoz 6-fosfat dehidogenaz varyantı, Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 14, 212-219.
- Dalocchio F., Matteuzzi M., Bellini T., Half-site reactivity in 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, *Biochem J.*, 227, 305-10, (1985).
- Dohnalek, J. C., Barrett, M. A., Adams, M. J., 1998. A 2.8 Å Resolution structure of 6-pgd from protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol*, 282(3), 667-681.
- Douglas, K.T., 1987. Mechanism of glutathione-dependent enzymes., Meister, A., (ed).
- Dyson J.E., D'Orazio R., 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver, *Biochem Biophys Res Com*, 43(1), 183-88, (1971).
- Erat, M. and Çiftçi M., 2003. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase from sheep liver. *Journal of Enzyme and Medicinal Chemistry*, 18, 545-550.
- Erat, M., 2004. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2,5 -ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. *Protein Expr Purif*;34:257–260.
- Erat, M., 2005. Purification of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Chicken Liver and Investigation of Some Kinetic Properties *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Volume 35, Issue 1 , pages 53 – 69
- Erat, M., Çiftçi M., Gumustekin K., Gul M., 2007. Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 554, 92–97.
- Erdoğan, O., Çiftçi, M., Çiltaş, A., Hisar, O., 2004. Inhibition Effects of Some Antibiotics on the Activity of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Erythrocytes. *Turk J Vet Anim Sci* 28, 675-681
- Fairbanks V.F., 1967, Copper sulfat-induced hemolytic anemia *Arch. Intern. Med.*, 120, 428.
- Fickenscher, K. and Scheibe, R., 1986. Purification and properties of the cytoplasmic glucose 6-phosphate dehydrogenase from pea leaves, *Biophysics*, 247, 393-402.
- George, D.L. and Franke U. 1976. *Cytogenet. Cell Genet.* 17, 282-286.
- Gossling, P. G., Ross, J. O., 1979. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase from hazel cotyledons. *Phytochemistry*, 18, 1441-1445
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.* 1225.
- Gulcin İ., Beydemir S., The Effects of melatonin on 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study, *Turk J Med Sci* 34, 295-99, (2004).
- Gül M., Kutay F.Z., Temocin S. and Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol.*, 38, 625-634.
- Gürdöl, F., ve Ademoğlu, E., 2010. *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.*
- Hanau S., Rippa M., Dalocchio F., 1992, NADPH activates a decarboxylation reaction catalysed by lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochim Biophys Acta*, 1122, 273-7.
- Hanau, S., Dalocchio, F., Rippa, M., 1992. NADPH activates a decarboxylation reaction catalysed by lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.*:1122; 273-277

- Hansen, J. M., Go Y. M., Jones D. P., 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46: 215-234.
- Harvey, R.A., Champe P.C., and Ferrier D.R., 2007. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri. Bursa.*
- Hey, Y., Dean, P.D., 1983. Tandem dye-ligand chromatography and biospecific elution applied to the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochem J.* Feb 1, 209(2), 363-71
- Hitchler, M. J., Domann F. E., 2007. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.*, 43: 1023–1036.
- Hochster, R.M., Kates, M., Quastel, J.H.: *Metabolic Inhibitors*. Academic Press, New York, 1972; 71-89
- Hutchison, J. S., Winberry, L., Nakayama, R., Holten, D., 1984. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes. *Biochim et Biophysic Acta* 781:30-38.
- Ibraheem, O., Adewale, I. O., Afolayan, A., 2005. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (5), 584-590.
- Iribarne, F., Paulino, M., and Tapia, O., 2000. Hybrid-transfer transition structure as a possible unifying redox step for describing the branched mechanism of glutathione reductase. *Molecular-electronic antecedents. Theoretical Chemistry Accounts*, 103, 451-462.
- Iskusnykh, I.Y., Popova, T.N., Agarkov, A.A., Pinheiro de Carvalho, M.Â. A., Rjevskiy, S.G., 2013. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats, *Journal of Toxicology*, Volume 2013, 1-9.
- Iyer, R.B., Wang, J., Bachas, L.G., 2002. Cloning, expression, and characterization of the *gsdA* gene encoding thermophilic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles*, 6 (4), 283-9.
- Jakobasch G., Rapoport S.M., Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies, *Mol Asp Med*, 17, 143-70, (1996).
- Jana, K., Samanta P.K., and De D.K., 2010. Nicotine Diminishes Testicular Gametogenesis, Steroidogenesis, and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression in Adult Albino Rats: Possible Influence on Pituitary Gonadotropins and Alteration of Testicular Antioxidant Status. *Toxicological Sciences*, 116(2), 647–659.
- Jeffery, J., Persson, B., Wood, I., Bergman, T., Jeffery, R., Jornvall, H., 1993. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Structure-function relationships and the *Pichia jadinii* enzyme structure. *European Journal of Biochemistry*, 212, 41-49.
- Jenner, P., Olanow C.W., 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 44:72–84.
- Jiang, F., Hellmans U., Stroga E., Bergman B. and Mannervik B., 1995. Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *The Journal of Biological chemistry*, 270(39), 22882-22889.

- Johansson, G., Joelsson, J., 1987. Affinity partitioning of enzymes using dextran-bound procion yellow HE-3G. Influence of dye-ligand density. *J Chromatogr.* 393 (2), 195-208.
- Jones, D.P., 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.*, 348: 93–112.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidativestress. *Antioxid. RedoxSignaling*, 8, 1865-1879
- Kanji, MI., Toews, ML., Carper, WR., 1976. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Purification and partial characterization *JBC*, 251 (8), 2255-2257.
- Karaman, M., Akkemik, E., Budak, H., and Ciftci, M., 2012. In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(1): 18–23.
- Kato N., Sham H., Wagner F., Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from a methanolutilizing yeast, *Candida boidinii*, *Biochim Biophys Acta*, 566, 1-11, (1979).
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Tas Yayıncılık. Ankara.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya, Aktif yayınları*, Erzurum.
- Kelner J. M. and Montoya M. A. 2000. Structural Organization of the Human Glutathione Reductase Gene: Determination of Correct cDNA Sequence and Identification of a Mitochondrial Leader Sequence *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 366–368.
- Kim, S.J., Jung H.J., Hyun D.H., Park E.H., Kim Y.M., Lim C.J., 2010. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie*, 92, 927-932.
- Kola, I., Hertzog P.J., 1997. Animal models in the study of biological functions of genes on chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down's syndrome, *Hum.Mol.Genet.*, 6, 1713-1727.
- Kondo, T., Dale G.L., Beutler E., 1980. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:6359–6362.
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. *Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper, Nobel Tıp Kitapevleri*, Ankara
- Krebs, H.A., and Eggleston, L. V., 1978. The regulation of pentose phosphate cycle in rat liver, Weber G., *Advances in enzyme regulation*, Pergamon Pres Ltd, Oxford, Cilt.12. 421-433
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680.
- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M. P. and Kobrehel, K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4978-4983.
- Le Trang, N., Bhargava, K. K. and Cerami, A., 1983. Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analytical Biochemistry*. 133, 94-99.
- Lee, W. T., Levy, H. R., 1992. Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in sub
- Lehninger, A.L., 2005. *Principles of biochemistry*. Worth Publishers Inc, Newyork.
- Lehninger, A.L., Nelson D.,L, Cox M.M., 2007. *Principles of Biochemistry 3th ed* Worth Publishers Inc; 558-560, New York.

- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. Principles of biochemistry, 5. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Levy, H.R., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Adv. Enzymol), 48, 97-192.
- Liang, Q.N., Sheng Y., Jiang P., Ji L.L., Xia Y.Y., Min Y., Wang Z.T., 2011. The difference of glutathione antioxidant system in newly weaned and young mice liver and its involvement in isoleucine-induced hepatotoxicity. Arch Toxicol., 85:1267–1279.
- Liang, Q.N., Sheng Y., Jiang P., Ji L.L., Xia Y.Y., Min Y., Wang Z.T., 2011. The difference of glutathione antioxidant system in newly weaned and young mice liver and its involvement in isoleucine-induced hepatotoxicity. Arch Toxicol., 85:1267–1279.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 57, 685
- Lippincott W. and Lippincott W., 2007. Pentoz fosfat yolu ve NADPH. Lippincott' s Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, Ed: Champe P.C. Harvey R.A Ferrier D.R. NOBEL TIP KİTAPEVLERİ, Bursa, 143-151.
- López-Barea, J., Lee C., 1979. Mouse-Liver Glutathione Reductase Purification, Kinetics, and Regulation. Eur. J. Biochem., 98, 487-499.
- Luzzatto L., Battistuzzi G., 1985, Glukose 6-phosphate dehydrogenase Adv. Hun. Genet, 14, 217-329.
- Mannervik, B., Jacobsson K. and Boggaram V., 1976. Purification of glutathione reductase from erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'- ADP-Sepharose 4-B. FEBS Letters, 66, 221-224.
- Mason, P. J., Bautista, J. M., Gilsanz, F., 2007. G6PD deficiency: The genotype-phenotype association. Blood Reviews, 21, 267-283.
- May, C, Ng., Hitoshi, S., 1997. Purification and properties of glutathione reductases from bovine ciliary body. Elsevier.
- McCallum, M. J. and Barrett, J., 1995. Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 27, 393-401.
- Mieyal, J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D., 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. Antioxid. Redox Signaling, 10: 1941–1988.
- Mikami, D., Kurihara, H., Ono, M., Kim, S. M., Takahashi, K., 2015. Inhibition of algal bromophenols and their related phenols against glucose 6-phosphate dehydrogenase, 108 : 20–25
- Misra, I. and Griffith, O.W., 1998. Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. Prot. Expr. Purific. 13, 268-276.
- Moritz B., Striegel K., De Graaf A.A., Sahm H. Kinetic properties of glucose 6- phosphate dehydrogenase and 6-PGDH from corynebacterium glutamicum and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo., Eur J Biochem, 267, 3442-52, (2000).
- Mullineaux, P., Creissen G.P., 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry. ABD: McGraw-Hill Companies., 16. bs., s.163 -172

- Müller, F., 1992. Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes; Williams C.H., Ed.; CRC Pres. 121-211. Boca Raton, Florida.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, New York, ABD W. H. Freeman & Co. 4. bs., 558–561.
- Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani, and Rapa. S., 1990, Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes, Preparative Biochemistry, 20, 297-309.
- Noltmann, E. A., Gubler, C. J., Kuby, S. A., 1961. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwischenferment) I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. The Journal of Biological Chemistry, 236 (5), 1125-1230. nonallosteric feed back inhibition by glutathione. J. Biol. Chem. 250, 1422-1426.
- Oeser, A., Tolbert, N.E., Schnarrenberger, C., 1973. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves, Arch. Biochem. Biophys. 154, 438±448.
- Ohara, H., Russell, R., Uchida, K., and Kondo H., 2004. Purification and characterization of nad-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Leuconostoc lactis* sho-54. Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 98, No. 2, 126–128.
- Ozols J., 1993. Isolation and complete amino acid sequence of lumenal endoplasmic reticulum glucose-6-phosphate dehydrogenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 5302±5306.
- Özabacıgil, F., 2005. İnsan eritrosit 6-fosfogluconat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Özer, N., Bilgi, C., Ögüs, H., 2002. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase purification and kinetic properties. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34, 253–262
- Patel, M. P., Marcinkeviciene, J. and Blanchard, J. S., 1998. Enterococcus faecalis glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. FEMS Microbiology Letters, 166, 155- 163.
- Pearse, B.M., Rosemeyer, M.A., 1975. 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, Methods Enzymol, 41, 220-226.
- Proscal, D., Holten, D., 1972. Purification and properties of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Activity at normal in vivo concentration of coenzyme, Biochem, 11(7), 1310-1314.
- Ray, A., Chatterjee, S., Mukherjee, S., Bhattacharya, S., 2014. Arsenic trioxide induced indirect and direct inhibition of glutathione reductase leads to apoptosis in rat hepatocytes, Biometals, 1-13.
- Reddon J.R., Giblin M.C., Audit I.M., Rosa J., Rosa R., 1988, The enzymes of the Glycolytic pathway in erythrocytes with Plasmodium Falciparum Malaria Parasites, Blood, 72, 6.
- Reiter R., Tang L., Garcia J.J., Munoz-Hoyos A., Life Sci. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical, Pathophysiology, 60: 2255-71, (1997).
- Rendon, J. L., Calcagno, M., Mendoza-Hernandez, G. and Ondarza, R. N., 1986. Purification, properties and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 248(1), 215-223.

- Reuter, R., Naumann, M., Metz, P., Kopperschlager, G., 1990, Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6, *Biomed. Biochim. Acta*, 7, 539-546.
- Richman, P.G., and Meister, A., 1975. Regulation of γ - glutamylcysteine synthetase by Rowland, P., Basak, A. K., Gover, S., Levy, H. R., Adams, M. J., 1994. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2Å resolution. *Structure*, 2 (11), 1073-1087.
- Sawa Y, Suzuki K, Ochiai H. Purification and Characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *phormidium* sp. *Agric Biol Chem*. 1985; 49 (9): 2543-2549.
- Schafer, F.Q., Buettner G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med* 30:1191–1212.
- Schnarrenberger C, Flechner A, Martin W., 1995. Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol* 108: 609–614
- Scott, WA., Tatum EL., 1971. Purification and partial characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 246 (20), 6347-6352.
- Segel I.H., 1968. *Biochemical calculations*. Inc., New York, 403.
- Seo. J.S., Lee K.W., Rhee J.S., Hwang D.S., Lee Y.M., Park H. G., Ahn I.Y., Lee J.S., 2006. Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 80, 281–289.
- Sertié, A.L., Quimby M., Moreira E. S., Murray J., Zatz M., Antonarakis S.E. and Passos-Bueno M.R., 1996. A gene which causes severe ocular alterations and occipital encephalocele (Knobloch syndrome) is mapped to 21q22.3, *Hum.Mol.Genet.* 5, 843-847.
- Siegel, R.L.K., Arscoff, L.D., Janas, A.S., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., 1998. Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*. 37, 13968-13977.
- Silverberg, M., Dalziel, K., 1973. Crystalline 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. *Eur J Biochem.*, 38(2), 229-38.
- Smith, J., Ladi E., Mayer-Proschel M., Noble M., 2000. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiations in a dividing glial precursor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:10032–10037.
- Sosa-Saavedra, F., Leon-Barrios, M., Perez-Galdona, R., 2001. Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in *Bradyrhizobium* sp lacking Entner-Doudoroff pathway A role for NAD(+)-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating). *Soil Biol Biochem*, 33(3), 339-343
- Soysal T., Bakan E., Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi, kinetik parametreleri ve klinik onemi. *Doğa Bilim Dergisi* 8 (1), 150-3, (1984).
- Stryer, L., 1985, *Biochemie*, Vieweg, Braunschweig, Pp: 93.
- Şahin, A., Şentürk, M., Salmas R. E., Durgai, S., Ayan, A., Karagölge, A., Mestanoğlu., 2016. Investigation of inhibition of human glucose 6-phosphate dehydrogenase by some ^{99m}Tc chelators by in silico and in vitro methods, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(SI): 141–147

- Şentürk, M., 2006. Glutasyon redüktaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tamura T., McMicken H.W. Smith C.V. and Hansen T.N. 1997. Gene structure for mouse glutathione reductase, including a functional,
- Tandogan, B., Uluşu, N. N., 2005. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase purified from lamb kidney cortex. Turkish Journal of Biochemistry, 30 (2), 178-182.
- Tekman, B., Özdemir H., Şentürk M., Çiftçi M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 148, 117-121.
- Telefoncu A., ve Telefoncu F., 1989, Glucose 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine Primaquine'in etkisi. Tr.J.of Medical Sciences, 14, 57-63.
- Text of Eduard Buchner's 1907 Nobel lecture at <http://nobelprize.org> Accessed 2007
- Thomas, J.H., and Gilham, B., 1983. Wills' Biochemical Basis of Medicine Wright, London. 297-302.
- Topham CM., Dalziel K., 1986. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Biochem J. 234: 671-677.
- Toribio, F., Martinet-Lara E., Pascual P. and Lopez-Barea J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, Journal of Chromatography B. 684, 77-97.
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, Journal of Chromatography B. 684, 77-97.
- Townsend, D.M., Kenneth D., Tew K.D., Tapiero H., 2003. The importance of glutathione in human disease, Biomedicine & Pharmacotherapy 57, 145-155.
- Tsai CS, Chen Q. Purification and kinetic characterization of 6- phosphogluconate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem Cell Biol. 1998;76(4):637-44.
- Tutic M., Lu X. A., Schimer R. H. and Werner D. 1990. Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA. 188, 523-528.
- Türkoğlu, V., Aldemir, S., Ciftçi, M., 2003. Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Sheep Liver. Turk J Chem 27, 395-402
- Ullah, S., Hasan, Z., Dhama, K., 2015. Toxic Effects of Endosulfan on Behaviour, Protein Contents and Antioxidant Enzyme System in Gills, Brain, Liver and Muscle Tissues of Rohu, *Labeo rohita*. International Journal of Pharmacology, 12(1), 1-10.
- Uluşu N.N., Kus M.S., Acan L., Tezcan E.F., 1999. A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31, 787-796.
- Uluşu, N. N., Tandogan, B., 2006. Purification and kinetics of sheep kidney cortex glucose-6-phosphate dehydrogenase. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 143, 249-255.
- Uluşu, N.N., Tandoğan B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovin liver. Mol Cell Biochem, 303, 45-51.

- Veronese, M.F., Boccu, E., Fontana, A., (1974), Isolation and some properties of 6- PGD from *Bacillus stearothermophilus*, *Biochim Biophys Acta*, 334, 31-44.
- Vijayalingam, S., Parthiban A., Shanmugasundaram K.R., Mohan V., 1996. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.*,13: 715–719.
- Walter, G., Niehaus, and T. Conn Mallett., 1994. Purification and characterization of glukose 6-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus Neoformans*, *Biophysics*, 313, 304-309.
- Weisz, K. S., Schofield, P. J., Edwards, M. R., 1985. Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification and kinetic properties. *J of Neurochem.* 44 (2): 510-517.
- Williams W.J., Beutler E., Ersleu A.J. and Lichtman M.A., 1986, *Hematology*, New York, McGraw-Hill Book Company, 567
- Williamson JH, Krochko D, Geer BW. 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*. I. Purification and properties of the A isozyme. *Biochem Genet.* 1980;18(1-2):87-101.
- Wrigley, N. G., Heather, J. V., Bonsignore, A., De Flora, A., 1972. Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. *Journal of Molecular Biology*, 68 (3), 483-499.
- Wu, H., Zhang R., Liu J., Guo Y., Ma E., 2011. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defence system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, 83, 599–604.
- Yılmaz, H., Ciftci, M., Beydemir, Ş., Bakan, E., 2002. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from chicken erythrocytes investigation of some kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32: 3, 287-301
- Yoshida Y., Nakano Y., Yamashita Y., ICoga T., 1997, The and gene encoding a novel 6-PGDH and its adjacent region of *actinobacillus acclinomycelemcomitans* chrosomal DNA, *Biochem Biophys Res Commun.* 230, 220-5,
- Yoshida, A., 1966. Glucose–6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes. I.
- Yousef, M.I. and Hussien H.M., 2015. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor- α , interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: Protective effect of ginseng. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 17–25.
- Yusuf, T., Koçyiğit, U. M., 2017. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity, *Journal of Biochem Molecular Toxicology*, 31(9), e 21927
- Zubay, G., 1988. *Biochemistry*, Second Edition, Macmillan Publishing Company.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2014 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2014 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda doktora eğitimine başladı.

