

**SIĞIR BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ
VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU
VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Namık KILINÇ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2015

Her Hakkı Saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SİĞİR BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL
DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Namık KILINÇ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Sıgır Böbreğinden Aldoz Redüktaz ve Sorbitol Dehidrogenaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Namık KILINÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 02/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza

Üye : Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 12.02.2015 tarih ve 06/228 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEĞLU
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

SIĞIR BÖBREĞİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Namık KILINÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Hiperglisemi durumunda aktifleşen ve diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynayan polioller yolu enzimlerinden Aldoz redüktaz (AR, Alditol: NADP⁺ 1-oksiredüktaz, E.C. 1.1.1.21) ve Sorbitol dehidrogenaz (SDH, L-İditol: NAD⁺ oksiredüktaz, EC 1.1.1.14) sığır böbreğinden saflaştırılarak karakterize edildi ve bazı antibiyotiklerin enzimlerin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. AR enziminin saflaştırılması homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisini içeren 5 basamakta gerçekleştirilmiştir. SDH enzimini saflaştırma işlemi ise homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirildi. 2,53 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan AR enzimi %1,94 verimle, yaklaşık 31 kat saflaştırıldı. 2,50 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan SDH enzimi %2,34 verimle, yaklaşık 17 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Her iki enzim için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH'lar belirlendi. Enzimlerin alt birimlerinin mol kütleleri ise SDS-PAGE ile sırasıyla 37,50 kDa ve 37,56 kDa olarak bulundu. Ayrıca iki enziminde substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Daha sonra sığır böbrek AR enzimi ve SDH enzimi aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri incelendi. İnhibisyon gösteren ilaçlar için Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi.

2015, 155 sayfa

Anahtar Kelimeler: Enzim saflaştırma, Aldoz redüktaz, sorbitol dehidrogenaz, sığır böbreği, antibiyotik, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALDOSE REDUCTASE AND SORBITOL DEHYDROGENASE ENZYMES FROM BOVINE KIDNEY AND INVESTIGATION OF SOME ANTIBIOTICS EFFECTS ON THE ENZYMES ACTIVITY

Namık KILINÇ

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied sciences

Department of Chemistry

Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Aldose reductase (AR, Alditol: NADP⁺ 1- oxidoreductase, E.C. 1.1.1.21) and Sorbitol dehydrogenase (SDH, L- iditol: NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.14) are enzymes of the polyol pathway which is activated in the event of hyperglycemia that plays an important role in the development of diabetic complications, purified from bovine kidney. These enzymes were characterized and effects of some antibiotics on the enzymes activities were investigated. The purification of AR enzyme, including preparation of homogenate, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration chromatography and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography was purified in five steps. The purification steps of SDH enzyme are preparation of homogenate, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel filtration chromatography. AR enzyme was obtained having a specific activity of 2,53 EU/mg proteins, with a yield 1.94% and approximately 31 fold. SDH enzyme was obtained having a specific activity of 2,50 EU/mg proteins, with a yield 2,34% and approximately 17 fold. SDS-PAGE was done to control the purity of enzymes and to determine molecular weight of subunits as 37.5 kDa and 37.56 kDa, respectively. Optimal pH, optimal ionic intensity, optimal temperature, stable pH were determined for both enzymes. Besides, K_M and V_{max} values for substrates of two enzymes were calculated. Then effects of some antibiotics on bovine kidney AR and SDH activities were examined. For drugs that exhibit inhibitory effect, K_i constants were calculated and inhibition types were determined by the help Lineweaver-Burk curves.

2015, 155 pages

Keywords: Enzyme purification, Aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, bovine kidney, antibiotic, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca yardım ve destekleri için Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVIÖĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis şAKİROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasındaki yardımları için değerli arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Zuhal ALIM'a, Sayın Dr. Bülent şENGÜL'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru AKKEMİK'e, Sayın Sevtap PİRÇEK'e, Sayın Muammer KILINÇ'a, Sayın Çetin BAYRAK'a, Sayın Miraç YILMAZ'a, Sayın Mahinur KIRICI'ya, Sayın Mesut IşIK'a, Sayın Musa AKKUş'a, Sayın Yeliz DEMİR'e, Sayın Hatice Esra ASLAN'a, Sayın Emrah DİKİCİ'ye, Sayın Ramazan KALIN'a, Sayın Ahmet TAşER'e, Sayın Adem AKDAĞ'a ve biyokimya araştırma labratuarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme, dualarıyla desteklerini sürekli yanımda hissettiğim annem Sayın Zeynep KILINÇ'a ve babam Sayın Ahmet KILINÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez, 16.10.2013 günü lenfomadan kaybettiğimiz rehberim, bugüne gelmemin en büyük müsebbibi ve bu yoldaki en büyük destekçim olan abim Sayın Nevzat KILINÇ'ın unutulmaz anısına adanmıştır.

Namık KILINÇ

şubat, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus.....	1
1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu.....	9
1.3. Aldoz Redüktaz Enzimi.....	15
1.4. Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) Enzimi.....	21
1.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar.....	25
1.5.1. Sefuroksim.....	25
1.5.2. Sefazolin.....	25
1.5.3. Gentamisin.....	26
1.5.4. Amikasin.....	27
1.5.5. Seftriakson.....	28
1.5.6. Seftezidim.....	28
1.5.7. Ampisilin.....	29
1.5.8. Linkomisin.....	30
1.5.9. Tylosin.....	31
1.5.10. Vankomisin.....	31
1.5.11. Metronidazol.....	32
1.5.12. Siprofloksasin.....	33
1.5.13. Kloramfenikol.....	34
1.5.14. Sefotaksim.....	34
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	45
3.1. Materyal.....	45

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	45
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	47
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	47
3.2. Yöntem	53
3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü	53
3.2.2. Protein tayini	54
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini	54
3.2.2.b. Kantitatif protein tayini	54
3.2.3. Sığır böbrek AR enziminin saflaştırılması	55
3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması	55
3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	56
3.2.3.c. Diyaliz	57
3.2.3.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	57
3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi.....	57
3.2.3.f. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve sığır böbrek AR enziminin saflaştırılması	58
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile AR enzim saflığının kontrolü	59
3.2.5. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları.....	60
3.2.5.a. AR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	60
3.2.5.b. AR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	60
3.2.5.c. AR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	61
3.2.5.d. AR enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	61
3.2.5.e. DL-Gliseraldehit substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	61
3.2.6. Sığır böbrek AR enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi	61
3.2.6.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	62
3.2.7. Sığır böbrek SDH enziminin aktivitesinin ölçümü	62
3.2.8. Protein tayini	63

3.2.8.a. Kalitatif protein tayini	63
3.2.8.b. Kantitatif protein tayini	63
3.2.9. Sığır böbrek SDH enziminin saflaştırılması.....	64
3.2.9.a. Homojenat hazırlanması	64
3.2.9.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	65
3.2.9.c. Diyaliz	66
3.2.9.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	66
3.2.9.e. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi.....	67
3.2.9.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi	68
3.2.10. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile SDH enzim saflığının kontrolü.....	68
3.2.11. SDH enzimi için karakterizasyon çalışmaları	69
3.2.11.a. SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar	69
3.2.11.b. SDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	70
3.2.11.c. SDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar ...	70
3.2.11.d. SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	70
3.2.11.e. Sorbitol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	71
3.2.12. Sığır böbrek SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi	71
3.2.12.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	71
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	73
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	73
4.2. Sığır Böbreğinden Aldoz Redüktaz Enziminin saflaştırılması.....	73
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	73
4.2.2. Diyaliz	74
4.2.3. DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	74
4.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları	75
4.2.5. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları.....	75

4.2.6. Sığır böbreğinden aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	76
4.2.7. Sığır böbrek aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	77
4.3. Sığır Böbreğinden SDH Enziminin Saflaştırılması	78
4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	78
4.3.2. Diyaliz	79
4.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçları	79
4.3.4. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	79
4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları	80
4.3.6. Sığır böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	81
4.3.7. Sığır böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	82
4.4. Sığır Böbreği Aldo Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	83
4.4.1. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	83
4.4.2. Sığır böbrek aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	84
4.4.3. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	86
4.4.4. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	87
4.4.5. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	87
4.5. Sığır Böbrek SDH Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar ..	88
4.5.1. Sığır böbrek SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	88
4.5.2. Sığır böbrek SDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	90
4.5.3. Sığır böbreği SDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	91

4.5.4. Sığır böbreği SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	92
4.5.5. Sığır böbrek SDH enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	93
4.6. Sığır Böbrek Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	94
4.7. Sığır Böbrek SDH Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	115
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	128
KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ	156

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

3DG	3-deoksiglukoz
ADA	American Diabetes Association
AGE	İleri Glikasyon Ürünleri
AKR1B10	Aldehit redüktaz
ALR1	Aldehit redüktaz
AR	Aldoz redüktaz
ATP	Adenozin trifosfat
DAG	Diaçilgliserol
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim komisyon numarası
ECM	Ekstrasellüler matriks
EÜ	Enzim ünitesi
F3P	Fruktoz-3-fosfat
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
HNE	Hekzanitroetan
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
IUB	Uluslararası biyokimya birliği
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamidadenindinükleotit (indirgenmiş form)
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (indirgenmiş form)

NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nox	NADH-oksidaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
PKC	Protein kinaz C
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
SDH	Sorbitol dehidrogenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Diyabet türlerine göre insülin davranışının şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2. Hiperglisemi sonucu aktifleşen metabolik yollar	7
Şekil 1.3. Polioliol (sorbitol) yolu.....	9
Şekil 1.4. Polioliol yolu ve ROS ilişkisi	10
Şekil 1.5. Hiperglisemi ile aktifleşen polioliol yolunun sebep olduğu diyabetik komplikasyonlar	11
Şekil 1.6. Hiperglisemi ile artan DAG üretiminin metabolik yollarla etkileşimi ve oluşturduğu stres basamakları	13
Şekil 1.7. Aldoiz redüktaz enziminin yapısı	16
Şekil 1.8. Aldo-keto redüktaz süper ailesinin 3 boyutlu yapıları.....	18
Şekil 1.9. AR enzimi tarafından indirgenen lipit aldehit çeşitleri.....	19
Şekil 1.10. (A) İnsan SDH enziminin quarterner yapısı ve (B) enzimin bir alt biriminin yapısı	22
Şekil 1.11. Sefuroksim Sodyum'un molekül yapısı	25
Şekil 1.12. Sefazolin Sodyum'un molekül yapısı.....	26
Şekil 1.13. Gentamisin'in molekül yapısı.....	27
Şekil 1.14. Amikasin Sülfat'ın molekül yapısı	27
Şekil 1.15. Seftriakson'un molekül yapısı	28
Şekil 1.16. Sodyum Seftazidim Pentahidrat'ın molekül yapısı	29
Şekil 1.17. Ampisilin'in molekül yapısı	30
Şekil 1.18. Linkomisin'in molekül yapısı.....	30
Şekil 1.19. Tylosin'in molekül yapısı	31
Şekil 1.20. Vankomisin'in molekül yapısı.....	32
Şekil 1.21. Metronidazol'un molekül yapısı.....	33
Şekil 1.22. Siprofloksasin'in molekül yapısı	33
Şekil 1.23. Kloramfenikol'un molekül yapısı.....	34
Şekil 1.24. Sefotaksim'in molekül yapısı	35
Şekil 2.1. Bilinen en iyi aldoiz redüktaz inhibitörlerinden bazıları	43

Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	73
Şekil 4.2. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	74
Şekil 4.3. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	74
Şekil 4.4. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	75
Şekil 4.5. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren grafik.....	75
Şekil 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	77
Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA-R _f grafiği	78
Şekil 4.8. Sığır böbrek SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	78
Şekil 4.9. DEAE- sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	79
Şekil 4.10. CM-selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	80
Şekil 4.11. Sığır böbreği Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	80
Şekil 4.12. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	82
Şekil 4.13. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA-R _f grafiği	83
Şekil 4.14. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği.....	84
Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=6,0) tampon çözeltileri kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	85
Şekil 4.16. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	86
Şekil 4.17. Değişik pH'lardaki NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek AR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	87
Şekil 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	88

Şekil 4.19. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği	89
Şekil 4.20. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	90
Şekil 4.21. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	91
Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	92
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	92
Şekil 4.24. Değişik pH'lardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	93
Şekil 4.25. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin için 5 farklı Sorbitol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	94
Şekil 4.26. Sefuroksim Sodyum'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	95
Şekil 4.27. Seftriakson'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	96
Şekil 4.28. Amikasin Sülfat'ın sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	97
Şekil 4.29. Sefazolin Sodyum'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	98
Şekil 4.30. Gentamisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.31. Linkomisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	100
Şekil 4.32. Tylosin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	101
Şekil 4.33. Sefotaksim'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	102
Şekil 4.34. Vankomisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	103

Şekil 4.35. Ampisilin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	104
Şekil 4.36. Metronidazol'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	105
Şekil 4.37. Siprofloksasin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.38. Sodyum Seftazidim Pentahidrat'ın sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	107
Şekil 4.39. Kloramfenikol'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	108
Şekil 4.40. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefuroksim'in Lineweaver-Burk grafiği	109
Şekil 4.41. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği	109
Şekil 4.42. Sığır böbrek AR enzimi üzerine gentamisin'in Lineweaver-Burk grafiği	110
Şekil 4.43. Sığır böbrek AR enzimi üzerine amikasin sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği	110
Şekil 4.44. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefotaksim'in Lineweaver-Burk grafiği	111
Şekil 4.45. Sığır böbrek AR enzimi üzerine seftriakson'un Lineweaver-Burk grafiği	111
Şekil 4.46. Sığır böbrek AR enzimi üzerine kloramfenikol'un Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 4.47. Sığır böbrek AR enzimi üzerine seftazidim pentahidrat'ın Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 4.48. Sığır böbrek AR enzimi üzerine ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği	113
Şekil 4.49. Sığır böbrek AR enzimi üzerine vankomisin'in Lineweaver-Burk grafiği	113
Şekil 4.50. Sefuroksim Sodyum'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	115

Şekil 4.51. Amikasin Sülfat'ın sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	116
Şekil 4.52. Sefazolin Sodyum'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.53. Gentamisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.54. Linkomisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	118
Şekil 4.55. Vankomisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	119
Şekil 4.56. Metronidazol'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	120
Şekil 4.57. Sefotaksim'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	120
Şekil 4.58. Ampisilin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	121
Şekil 4.59. Tylosin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	121
Şekil 4.60. Seftriakson'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	122
Şekil 4.61. Siprofloksasin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	123
Şekil 4.62. Kloramfenikol'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	123
Şekil 4.63. Seftazidim pentahidrat'ın sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	124
Şekil 4.64. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine gentamisin'in Lineweaver-Burk grafiği	124
Şekil 4.65. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine linkomisin'in Lineweaver-Burk grafiği	125
Şekil 4.66. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği	125
Şekil 4.67. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine amikasin sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği	126
Şekil 5.1. En önemli aldoz redüktaz inhibitörlerinden bazıları	132

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsan dokusunda aldoz redüktaz miktarları	20
Çizelge 1.2. Sıçan dokularındaki SDH miktarları	23
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği yerler	45
Çizelge 4.1. Sığır böbreği aldoz redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları.....	76
Çizelge 4.2. Sığır böbreği SDH enziminin saflaştırma sonuçları	81
Çizelge 4.3. 800 mM Na-fosfat tamponu kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	84
Çizelge 4.4. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=6,0) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	85
Çizelge 4.5. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları.....	86
Çizelge 4.6. 40 mM Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	89
Çizelge 4.7. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum iyonik şiddeti için Glisin/NaOH (pH=9,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	90
Çizelge 4.8. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları	91
Çizelge 4.9. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi.....	95
Çizelge 4.10. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Seftriakson'un etkisi	96
Çizelge 4.11. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi	97
Çizelge 4.12. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin Sodyum'un etkisi.....	98

Çizelge 4.13. Sığır Böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Gentamisin'in etkisi	99
Çizelge 4.14. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Linkomisin'in etkisi	100
Çizelge 4.15. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Tylosin'in etkisi	101
Çizelge 4.16. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sefotaksim'in etkisi	102
Çizelge 4.17. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Vankomisin'in etkisi	103
Çizelge 4.18. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ampisilin'in etkisi	104
Çizelge 4.19. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Metronidazol'un etkisi	105
Çizelge 4.20. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi.....	106
Çizelge 4.21. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Sodyum Seftazidim Pentahidrat'ın etkisi	107
Çizelge 4.22. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine Kloramfenikol'un etkisi	108
Çizelge 4.23. Sığır böbrek AR enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri, K _i sabitleri ve inhibisyon türleri	114
Çizelge 4.24. Sığır böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine Sefuroksim Sodyum'un etkisi	115
Çizelge 4.25. Sığır böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat'ın etkisi	116
Çizelge 4.26. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Sefazolin Sodyum'un etkisi	116
Çizelge 4.27. Sığır Böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Gentamisin'in etkisi.....	117
Çizelge 4.28. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Linkomisin'in etkisi.....	118
Çizelge 4.29. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Vankomisin'in etkisi.....	118
Çizelge 4.30. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Metronidazol'un etkisi.....	119

Çizelge 4.31. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Sefotaksim'in etkisi	120
Çizelge 4.32. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Ampisilin'in etkisi	120
Çizelge 4.33. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Tylosin'in etkisi	121
Çizelge 4.34. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Sefriakson'un etkisi	122
Çizelge 4.35. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Siprofloksasin'in etkisi	122
Çizelge 4.36. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Kloramfenikol'un etkisi.....	123
Çizelge 4.37. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine Seftazidim'in etkisi.....	124
Çizelge 4.38. Sığır böbrek SDH enzimi için bulunan IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri	126
Çizelge 5.1. Sığır böbreğinden AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	140
Çizelge 5.2. Sığır böbreğinden SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	140
Çizelge 5.3. Sığır böbrek AR enzimi için bulunan IC_{50} değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	141
Çizelge 5.4. Sığır böbrek SDH enzimi için bulunan IC_{50} değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	142

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Ana özellikleriyle Diyabet, antik çağlardan beri bilinen bir hastalık olarak göze çarpmaktadır. George Ebers tarafından çözülen, milattan önce 1550 yılına ait bir antik mısır papirüsünde, diyabete özgü olan yüksek miktarda idrar durumu tespit edilmiş ve tip 1 diyabet olarak tanımladığımız durumu ilk kez, milattan önce 2. yüzyılda yaşayan, Kapadokyalı Aretaeus kullanmıştır. Yunancada “sifon” anlamına gelen “Diabetes” terimini ilk kez Aretaeus kullanmıştır (Anonymous 2010a).

Diyabet hastalarının idrarındaki şeker teşhisi ilk olarak milattan önce 400-500 yılları arasında yaşamış, hindu hekimler Charak ve Sushrut tarafından yapılmıştır. Charak ve Sushrut, idrarın tadılması ya da karıncaların diyabetik hasta idrarı etrafında toplanmasıyla idrardaki şekeri teşhis etmişlerdir. Charak ve Sushrut, bu hastalığın tembel, obur, boğazına düşkün ve şekerli ve yağlı yiyeceklerle beslenenler arasında çok yaygın bir şekilde görüldüğünü fark ettiler. İbn-i Sina tarafından yazılan medikal ansiklopedide, milattan sonra 9-11. yüzyıllarda, Arap tıp kaynaklarında da, diyabetik idrarın tadılması yönteminin uygulandığı belirtilmektedir (Anonymous 2010a).

“Hiperglisemi” tanımı ilk kez Matthew Dobson (1735–1784) tarafından, 1776 yılında yayınlanan bir makalede kullanılmıştır (Dobson 1776). Dobson, günde yaklaşık 14 litre idrar üreten hastası Peter Dickonson’ın idrarının tatlı olduğunu keşfetmiştir. Dobson, idrarı buharlaştırmış ve böbreklerin şekeri dışarı attığını ancak bunun boşaltım organlarında oluşamayacağından kan serumundan kaynaklanabileceği sonucuna varmıştır (Anonymous 2010a).

Latince “bal” anlamına gelen “mellitus” kavramını ise ilk kez John Rollo adlı bir cerrah, 1797 yılında yayınladığı *An Account of Two Cases of the Diabetes Mellitus* adlı kitabında kullanmıştır (Rollo 1797).

Diyabet, vücudun yeteri miktarda insülin üretememesi ya da insülini etkili şekilde kullanamaması sonucu oluşan, kronik bir hastalıktır (Anonymous 1997). İnsülin, kas ve doku hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamak için besin maddelerinden üretilen glukozun hücre içine alınmasından sorumlu, pankreasta üretilen bir hormondur. Diyabetik insan hücresi glukozu doğru şekilde absorblayamadığı için hiperglisemi durumu ortaya çıkarak doku hasarına sebep olmaktadır. Bu hasar yaşam kalitesini etkileyen sağlık sorunlarına sebep olabilmektedir (Anonymous 2013)

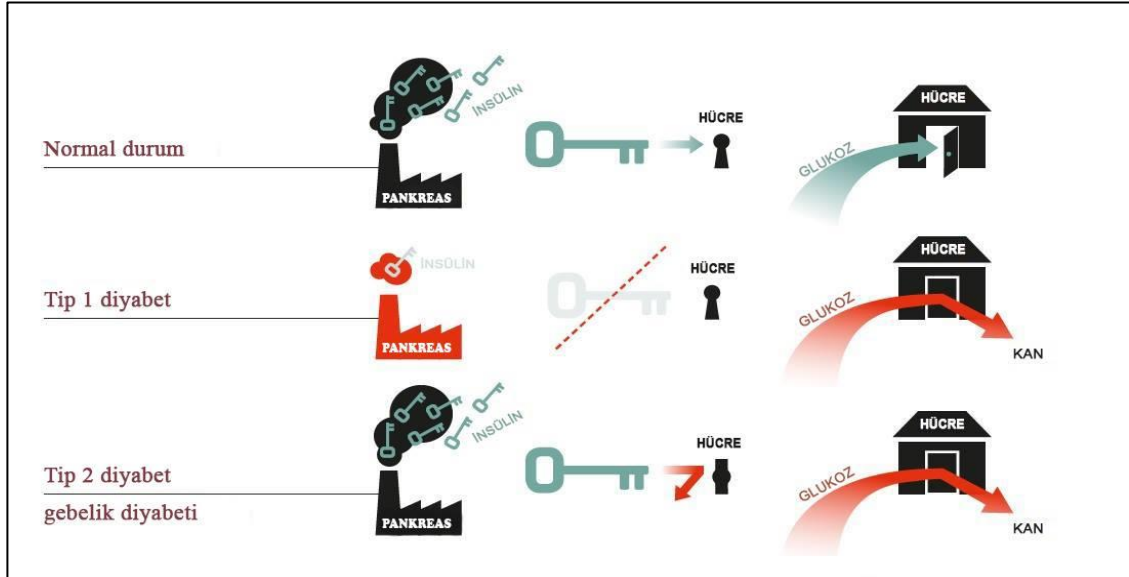
Diyabet, insülin salgısı veya aktivitesinin yokluğu ya da her ikisinin azlığı durumunda meydana gelen, yüksek glukoz düzeyi (hiperglisemi) ile karakterize olan metabolik bir sendromdur (Anonymous 2004a). Diyabetin temel nedeni, dolaşımdaki insülinin eksikliği veya periferel dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasıdır (insülin direnci).

Açlık kan glukoz düzeyi 100-125 mg/dL arasında olan bireyler için “Bozulmuş Açlık Glukozu” (Impaired Fasting Glucose, IFG) tanımı yapılmış ve bu bireylere oral glukoz tolerans testinin uygulanması öngörülmüştür. Oral glukoz tolerans testinde, 2. saat sonunda plazma glukoz düzeyinin 140-199 mg/dL aralığında çıkması, “Bozulmuş Glukoz Tolerans” (Impaired Glucose Tolerans, IGT) olarak tanımlanmaktadır. Bu testin sonucu 200 mg/dL ve üzerinde olması durumunda ise doğrudan diyabet tanısı konmaktadır (Anonymous 2003).

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın β -hücrelerindeki insülin salgılanmasında ve/veya insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıkan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan, kronik hiperglisemi ile karakterize olan bir metabolik hastalıktır. Diyabet esnasında meydana gelen kronik hipergliseminin göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarlarının dâhil olduğu pek çok organda hasar oluşturduğu bilinmektedir (Anonymous 2005; Fain 2009; Anonymous 2010b).

İnsülin hormonunun üretilmemesi ya da efektif olarak kullanılamaması durumunda ortaya çıkan diyabet, tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve gestasyonel (gebe) diyabeti olmak

üzere üç ana gruba ayrılır. İnsülin anahtar gibi davranarak glukozun hücre içine alınmasından sorumludur. İnsülin vasıtasıyla hücre içine alınan glukoz hücre tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır. Ani bir otoimmün proses sonucu oluşan tip 1 diyabette hastalar yaşamlarını sürdürebilmek için insülin terapisine ihtiyaç duyarlar. Tip 2 diyabette ise teşhisin konulması bazen yıllar alabilir. Bu durum vücutta bir çok sağlık riskinin oluşmasına sebep olur. Gestasyonel diyabet ise gebelik sırasında oluşan, anne ile bebeği için ciddi sağlık sorunlarına sebep olan diyabet türüdür. Gestasyonel diyabet, bebeğin sonraki zamanlarda Tip 2 diyabet hastalığı riskini arttıran bir sağlık sorunudur (Anonymous 2013).



Şekil 1.1. Diyabet türlerine göre insülin davranışının şematik gösterimi (Anonymous 2013).

Tip 1 diyabette, genetik faktörler, insan lökosit antijeni ve çevresel nedenlerle, T-lenfosit ve makrofajların otoimmün saldırısı sonucu insülin salgılanmasından sorumlu pankreasın beta hücrelerinin harabiyeti meydana gelmektedir (Anonymous 1997). Pankreastaki bu harabiyet sonucu, Tip 1 diyabetli bireylerde insülin sekresyonu yetersiz ya da tamamen yoktur. Buna bağlı olarak serum glukoz düzeyleri normalden yüksektir.

Tip 1 diyabetin görülme sıklığı, çocuklar ve genç erişkinlerde daha fazla olduğu için ‘Gençlik Diyabeti’ (Juvenil Onset Diabetes Mellitus) olarak da adlandırılır. Tip 1 diyabet, her yaş grubunda görülmekle beraber en sık 7-15 yaşları arasında görülür (Anonymous 2013). Tip 1 diyabet, %75 oranında 30 yaş öncesinde başlamasına karşın yaş faktörü sınıflandırmada kriter değildir.

Ani gelişen Tip 1 diyabetin en önemli belirtileri;

- Sık sık susama ve anormal ağız kuruluğu
- Sık sık idrara çıkma
- Halsizlik ve sürekli yorgunluk
- Sürekli acıkma hissi
- Ani kilo kaybı
- Yavaş iyileşen yaralar
- Nükseden enfeksiyonlar
- Bulanık görme

olarak sıralanabilir (Anonymous 2013).

İnsülin yetersizliği, insülin gereksinimi olan kas ve adipoz doku gibi periferik dokularda, insüline yanıt verme yeteneğinin azalması Tip 2 diyabetin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Patricia *et al.* 2003). Tip 2 diyabet ile gelişen komplikasyonların en birincil nedeni; insülin direncidir (Gilligan and Spector 1984). İnsülin hormonu, plazmadaki glukozun, okside şekilde enerji üretiminde kullanılmasını veya glikojen şeklinde depolanmak üzere kas ve adipoz doku gibi periferik dokulara taşınmasından sorumludur. İnsülin hormonu, ayrıca karaciğerdeki glikojenoliz ve glukoneogenezi baskılayarak hepatik glukoz üretimini de engellemektedir (Donkin *et al.* 1997).

İnsülin direncinin gelişmesi sonucu, periferik dokularda direnç meydana gelmeye başlamaktadır. Buna bağlı olarak adipoz ve kas dokularındaki insüline bağımlı glukoz kullanımını miktarı azalarak karaciğerdeki glukoz baskılaması bozulur. İnsülin direncinin gelişmesine paralel olarak, plazma glukoz düzeyinin yükselmemesi için pankreas beta hücreleri, normalden daha fazla miktarda insülin üretmek durumunda kalır. Normal glukoz düzeyine ulaşılması için, daha fazla çalışmak zorunda kalan pankreasın beta hücrelerinde, zamanla fonksiyon kaybı meydana gelmekte ve bununla birlikte insülin sentezinin azalması sonucu Tip 2 diyabet ortaya çıkmaktadır (Ferrannini *et al.* 1987; Hollenbeck and Reaven 1987).

Tip 2 diyabetin ortaya çıkmasındaki bir diğer risk faktörü de obezitedir. Beden kitle endeksi (BKE) arttıkça diyabet gelişim riskinin arttığı belirlenmiştir. BKE'den başka vücuttaki yağ oranının diyabet gelişiminde etkili olduğu, düzenli egzersiz yapmanın diyabetin ortaya çıkışını önemli oranlarda azalttığı ortaya konulmuştur (Zimmet *et al.* 1990; Anonymous 1999).

Pankreasta amiloid plakların meydana gelmesi ile β hücrelerinin sayısının azalması, insülin salınımında yetersizliğe sebep olur (Rhodes 2005). Tip 2 diyabete, erişkin başlangıçlı diyabet de denilmektedir. Tip 2 diyabet gelişiminin nedenleri tam olarak bilinmemekle beraber, ortaya çıkması için birçok risk faktörü bulunduğu ortaya konmuştur. Bunlar:

- Obezite
- Kötü beslenme
- Fiziksel inaktivite
- Yaşın ilerlemesi
- Ailenin diyabet geçmişi
- Etnisite
- Doğmamış çocuğun gebelik sırasında yüksek kan şekeri durumuna maruz kalması

olarak sıralanabilir (Anonymous 2013).

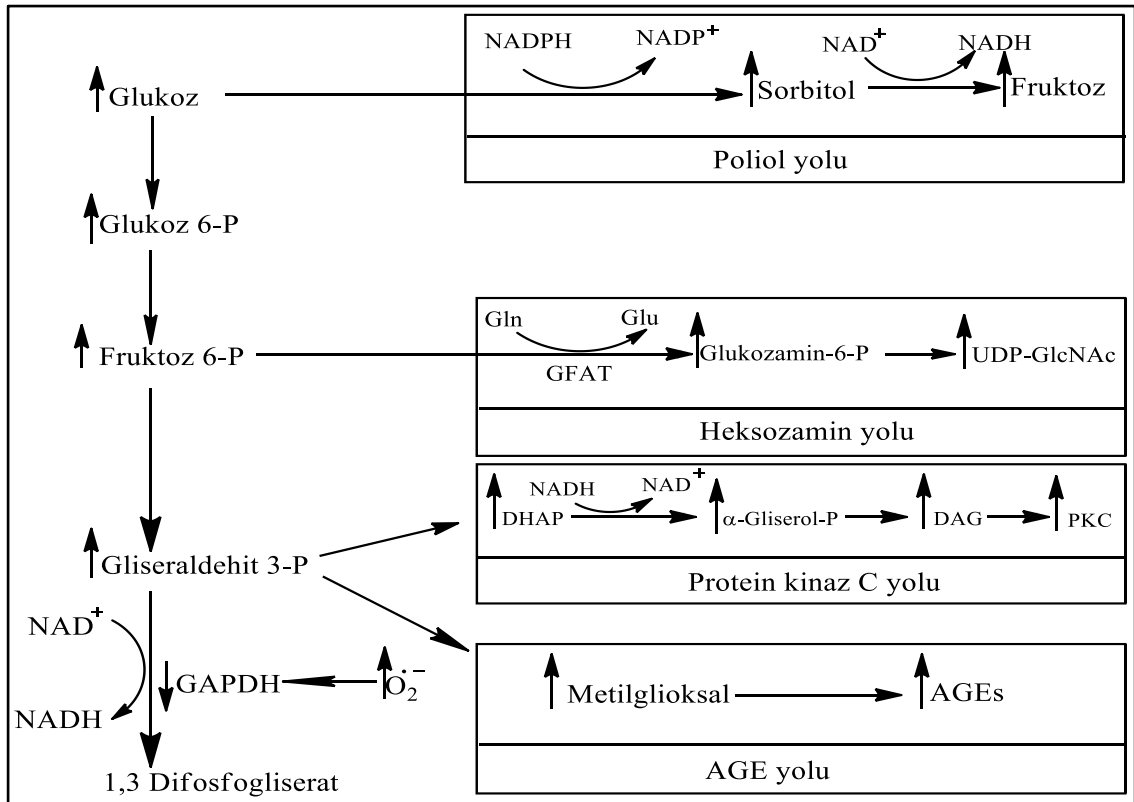
Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), gebelik sırasında meydana gelen glukoz intoleransı derecesine göre belirlenen bir diyabet türüdür. Kullanılan tanı testlerinin özelliğine ve incelenen nüfusa yapısına bağlı olarak gebeliklerin yaklaşık %1-%14'ü yani yılda 200.000 bin gebe bu hastalığa maruz kalmaktadır. Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association -ADA) tarafından açlık plazma glukoz seviyesinin 126 mg/dL (7.0 mmol/l) den fazla ya da tokluk plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dL (11.1 mmol/l) den fazla olduğu durum, yüksek gestasyonel diabetes mellitus (GDM) riski olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, 25 yaşından küçük, gebelik öncesinde normal kiloda bulunan, yüksek olmayan GDM yoğunluğu olan etnik bir grubun üyesi olan, daha önce diyabet tanısı konmayan ve glukoz toleransı geçmişi bulunmayan gebeler, düşük GDM riski taşıyan bireyler olarak tanımlanmıştır (Anonymous 2004b).

Kan şekeri düzeyinin yüksek olması durumunda, bazı metabolik yolların aktivitesinin artmasıyla ve bu metabolik yolların birbiriyle olan etkileşimleri sonucunda diyabetik komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (Anonymous 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000). Bahsedilen bu metabolik yollar; polioliol yolu (Zimmet and Alberti 2001; Oates 2008), glukoz oksidasyonu (Lipinski 2001; Ostenson 2001; Jakus and Rietbrock 2004), protein kinaz C (PKC) aktivasyonu (Brownlee 2001), enzimatik olmayan glikasyon ve ileri glikasyon ürünleri (AGE) oluşumudur (Chappey *et al.* 1997; Yamagishi and Takeuchi 2004).

Hiperglisemi sonucunda mitokondriyal süperoksitin aşırı miktarda üretimi gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimi aktivitesini yaklaşık olarak %66 oranında azalmasını indükler (Du *et al.* 2000). Hiperglisemi sonucu aktifleşen polioliol yolu, glukozun da dâhil olduğu, birçok glikolitik metabolitin birikimine neden olarak GAPDH miktarının azalmasını sağlar. GAPDH'ın reaktif oksijen türleriyle geri dönüşümlü inhibisyonunun iyi bilinmesine rağmen, GAPDH'ın hiperglisemiden kaynaklanan reaktif oksijen türleri ile inhibisyonu, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)'ın aktive olmasına ve NAD⁺ miktarının azalmasına neden olabilir (Garcia Soriano *et al.* 2001). Trioz fosfatların parçalanmasının sonucunda meydana gelen hücre içi metilglioksal türevi Advanced Glycation End-products-İleri Glikasyon Ürünleri

(AGEs)'nin oluşumu hiperglisemi tarafından indüklenir (Shinohara *et al.* 1998). Dolayısıyla, hiperglisemi ile hücre içinde oluşan ileri glikasyon ürünlerinin artışı, mitokondriyal reaktif oksijen türleri aşırı üretiminin bir sonucu olarak inhibe olan GAPDH enzimi yokluğundan kaynaklı trioz fosfat miktarında artışa yol açabilir (Brownlee 2001).

Hiperglisemi diaçil gliserol (DAG)'un de novo sentezi miktarını arttırarak Protein Kinaz C (PKC) yolunu aktive eder (Koya and King 1998). Bu yüzden, PKC yolunun hiperglisemi ile aktivasyonu, reaktif oksijen türleriyle inhibe olan GAPDH eksikliğinden kaynaklı dihidroksiaseton fosfat (DHAP) miktarında artışa neden olabilir (Brownlee 2001). Hiperglisemi kaynaklı, heksozamin yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan, glutamin-fruktoz 6-fosfat aminotransferaz (GFAT) enzimi için gereken fruktoz 6-fosfat miktarında artış meydana gelerek heksozamin yolunun aktivasyonuna sebep olur (Du *et al.* 2000).



Şekil 1.2. Hiperglisemi sonucu aktifleşen metabolik yollar (Brownlee 2001)

Diyabetik komplikasyonlar, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olmak üzere temel iki kısma ayrılmaktadır. Mikrovasküler komplikasyonlar; retinopati, nefropati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalıkları ve serebrovasküler hastalık türleridir (Kurt *et al.* 2004).

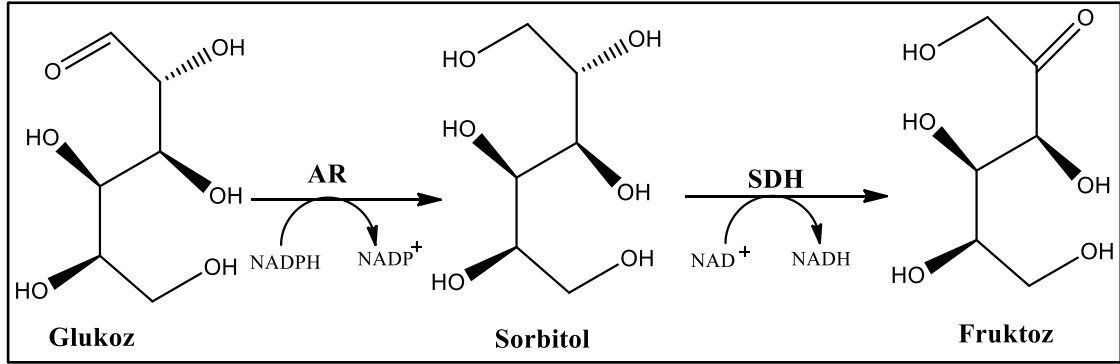
Makrovasküler komplikasyonlar, hiperglisemi sonucu vasküler fonksiyon kaybı meydana gelmesine bağlı olarak gelişen damar hastalıklarıdır. Diyabetik komplikasyonların en önde geleni kardiyovasküler hastalıklardır (Anonymous 1997). Kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabetli bireylerin %70'inin ölüm sebebidir (Laasko 1999). Glisemik kontrolün diyabet kaynaklı kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu görülmüştür (Carrozza *et al.* 1993).

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları, kontrolsüz hipergliseminin ortaya çıkmasından yaklaşık 15-20 yıl sonra ortaya çıkar. Uzun vadede kontrolsüz hiperglisemiye bağlı olarak; bazal membran kalınlaşması, kanın akışının ve viskozitesinin artışı, kapiller permeabilite ve trombosit fonksiyonlarındaki bozuluktan kaynaklı mikroalbuminüri, mikrotrombus (küçük damarların çeperlerine fibrinin çökmesi) ve iskemik hasar meydana gelmektedir. Sonuç olarak; diyabete bağlı periferik nöropati (Oates 2002), retinopati (Reddy *et al.* 2008), katarakt oluşumu (Lee *et al.* 1995) ve nefropati (Sato 1992) gelişmektedir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin 2013 verilerine göre dünyadaki diyabetli hasta sayısının 382 milyon olduğu ve bu sayının 2035 yılında 592 milyon olacağı tahmin edilmektedir. IDF'ye göre 2013 yılında, 6 saniyede bir, toplam 5,1 milyon insan diyabet kaynaklı hastalıklardan yaşamını yitirmiştir. Diyabet kaynaklı hastalıklar için 2013 yılında toplam 548 milyar dolar harcandı ve 2035 yılında bu rakamın yıllık 627 milyar dolar olacağı tahmin edilmektedir (Anonymous 2013).

1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu

İki enzimli poliöl yolunun, kofaktör olarak NADPH kullanan ve glukozu sorbitole indirgeyen, ilk enzimi aldöz redüktaz (AR) enzimidir. İkinci enzim ise kofaktör NAD^+ yardımıyla sorbitolun fruktoza dönüşümünden sorumlu sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimidir (Chung *et al.* 2003). Poliöl (sorbitol) yolu, hız-sınırlayıcı bir enzim olan aldöz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimlerinden oluşmaktadır (Gleissner *et al.* 2007).

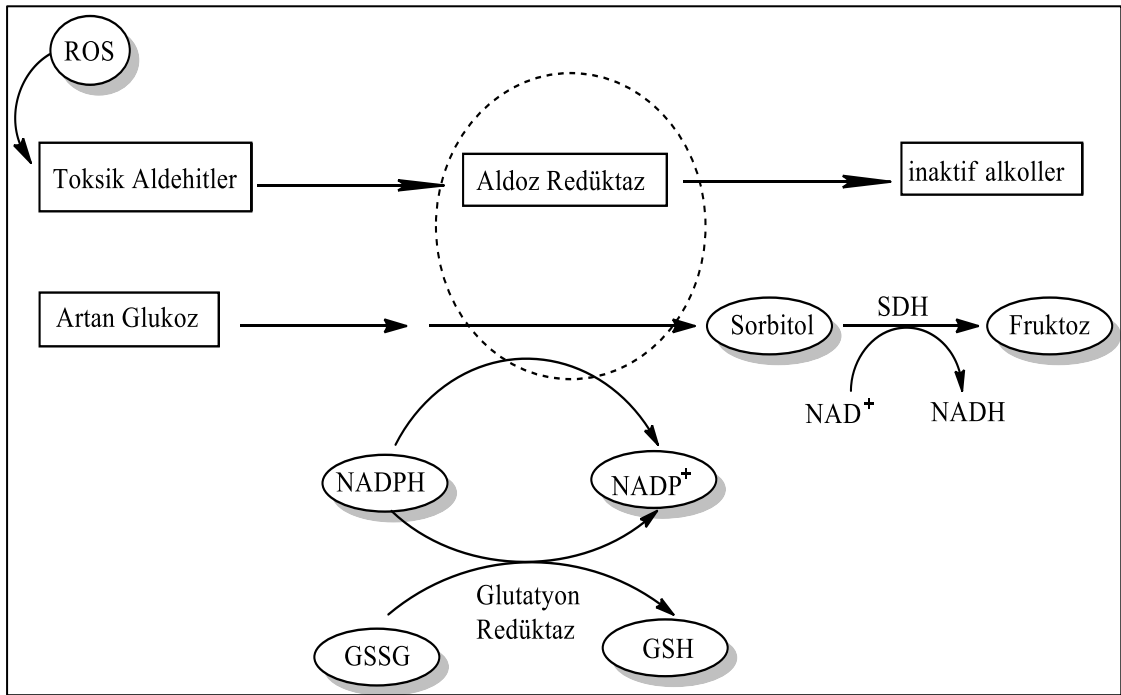


Şekil 1.3. Poliöl (sorbitol) yolu (Alım and Beydemir 2012)

Poliöl yolunun ilk enzimi olan aldöz redüktaz (alditol: NAD(P)^+ 1-oksideredüktaz, EC 1.1.1.21), glukoz dâhil, birçok karbonil bileşiğinin redüksiyonundan sorumlu, NADPH bağımlı sitozolik, monomerik bir oksideredüktazdır. AR enziminin kristal yapısı, α/β kıvrımlarıyla oluşmuş fiçî şeklindedir ve substrat bağlanma bölgesi β kıvrımlarının sonunda yerleşmiş karboksi terminal ucunda yer almaktadır (Wilson *et al.* 1992). Diyabetik olmayan normal glukoz şartlarında AR enziminin glukozu karşı düşük bir afinitesi (yüksek K_M) bulunmaktadır. Normal şartlar altında total glukoz kullanımının oldukça az bir miktarı poliöl yolu vasıtasıyla metabolize edilmektedir. Ama hiperglisemik şartlarda artan hücre içi glukoz konsantrasyonunun bir sonucu olarak polialkollerin sorbitole enzimatik olarak dönüşümü artar ve bununla birlikte NADPH miktarının azalmasına yol açar. Sorbitol yolunda sorbitolun fruktoza indirgenmesi, NAD^+ kofaktörü varlığında, sorbitol dehidrogenaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Hiperglisemik şartlar altında glukozun bu yol ile kullanılması %33-%11 arasında

değişmektedir. Bu sebeple, bu yolun diyabetik komplikasyonların oluşumuna verdiği katkı oldukça yüksektir (Brownlee 2001).

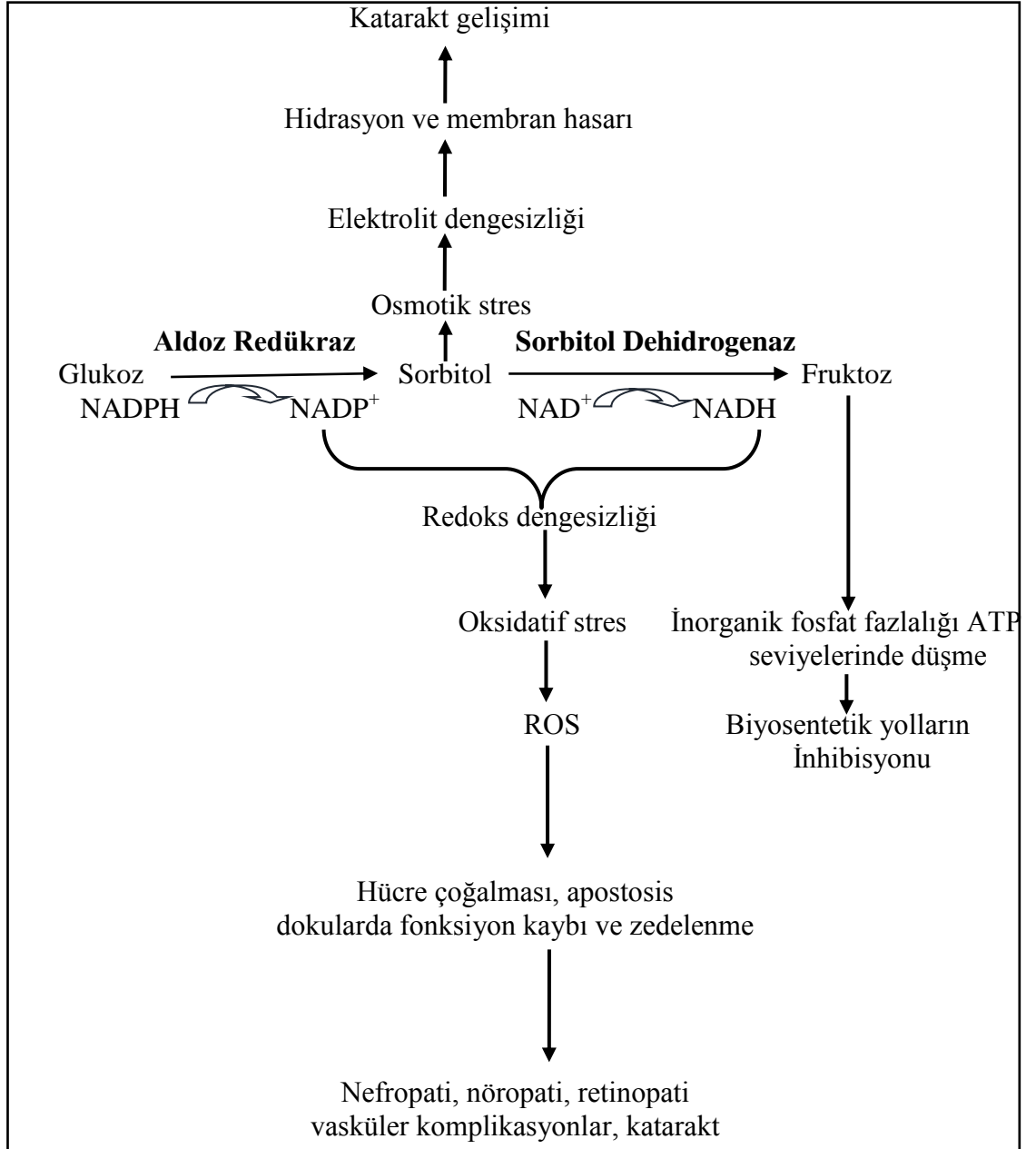
Aldoz redüktaz, NADPH kofaktörünün de varlığında, reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı aldehitleri inaktif alkollere dönüştürmesinin yanısıra, glukozu da sorbitole dönüştüren bir enzimdir. Aldoz redüktaz aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerde NADPH'ın tükenmesi GSH seviyesinde artışa sebep olarak oksidatif stresin de artışına neden olur (Brownlee 2001) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Polioli yolu ve ROS ilişkisi (Brownlee 2001)

Normal şartlarda, dokularda hücre içine alınan glukoz, heksokinaz enzimi vasıtasıyla fosforillenecek, glukoz-6-fosfat oluşturulmak suretiyle glikoliz yoluna girer. Glikoliz sonucu oluşan ürünler, aerobik koşullarda, elektron transport zinciri (ETS) vasıtası ile enerji üretmek üzere krebs çemberine dahil olurken, anaerobik koşullardaysa laktat oluşturulmasına dahil olurlar. Kan glukoz konsantrasyonunun normal olduğu süre boyunca polioli yolu aktif hale gelmez. Glukoz girişi bakımından bener özellikler gösteren lens, retina, böbrek, karaciğer, sinirler, beyin, eritrosit, pankreas adacıkları, aort ve kapiller

damarlar gibi dokulara glukoz, hücreye insülden bağımsız bir şekilde girebilmekte ve hücre içi glukoz konsantrasyonu, kandaki glukoz konsantrasyonuna bağımlı olarak değişiklik arz etmektedir (Cameron and Cotter 1996).



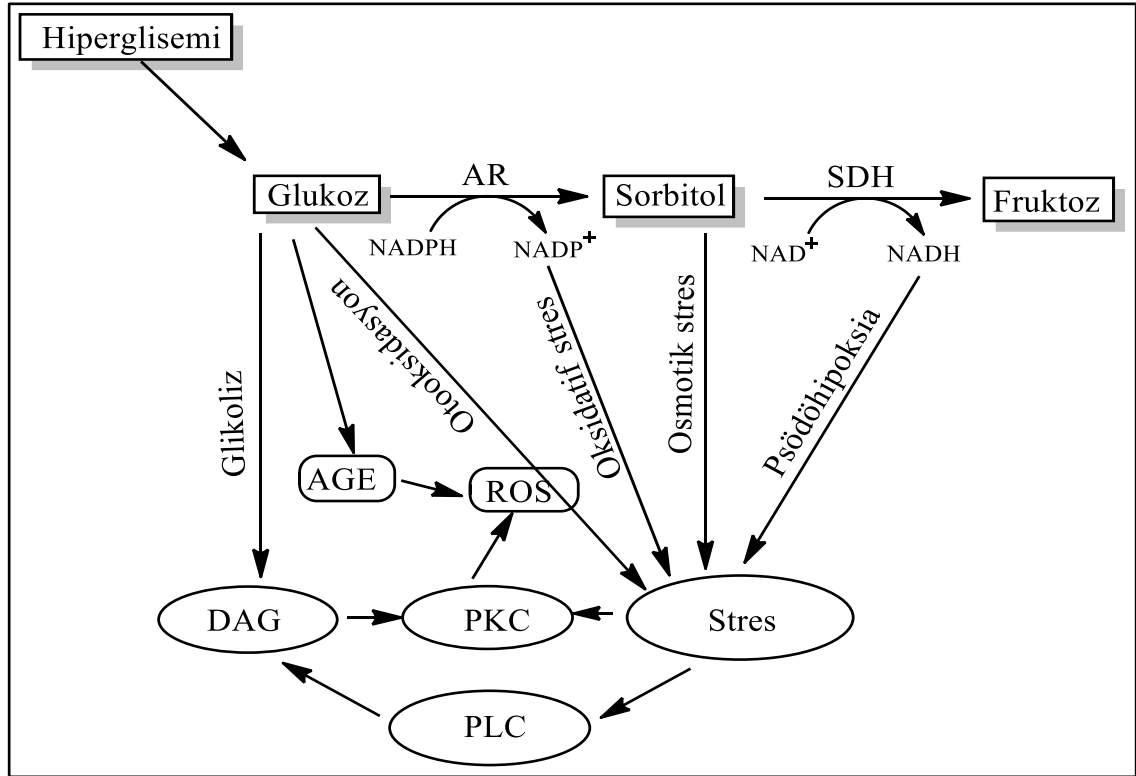
Şekil 1.5. Hiperglisemi ile aktifleşen polioll yolunun sebep olduğu diyabetik komplikasyonlar (Srivastava 2005)

Hiperglisemik şartlar altında glukoz sorbitole, polioliol yolağının ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan, aldoz redüktaz tarafından indirgenerek metabolize edilir. Sorbitolun fruktoza dönüşümü ise sorbitol dehidrogenaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu yolda NADPH AR enziminin, NAD^+ ise SDH enziminin kofaktörleri olarak kullanılır. Sorbitol birikmesi sonucu osmotik stresin artması ve $NADPH/NADP^+$ oranının değişmesi de oksidatif strese sebep olur. $NADH/NAD^+$ oranındaki azalma sekonder diyabetik komplikasyonların gelişiminin en önemli sebeplerinden biri olduğu gösterilmiştir (Srivastava 2005).

AR vasıtası ile indirgenen glukoz, bazı dokularda daha fazla sorbitol birikmesine yol açar. Glukozun fruktoza indirgenmesi (polioliol-sorbitol yolu) sadece NADPH'ın kullanımını değil aynı zamanda NAD^+ 'ın da kullanımını artırır. Hiperglisemi sonucunda artan sorbitol yolu aktivitesi NADPH miktarının azalmasının yanısıra indirgenmiş olan NAD^+ birikimine de neden olabilir. Piridin nükleotidlerinde polioliol yolundan kaynaklanan değişiklikler, nitrik oksit (NO) sentezi ve protein kinazların aktivasyonu gibi çeşitli metabolik değişikliklerle de ilintilidir (Nishikawa *et al.* 2000). Polioliol yolunun aktivitesinin artmasıyla artan NADH üretiminin Dihidroksiaseton fosfat (DAP)'tan üretilen diaçilgliserol (DAG) sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Ortamda DAG seviyesi artışı fosfolipaz C'yi aktive edebilir. Diaçilgliserol, protein kinaz C ailesinin en temel aktivatörüdür ve DAG tarafından aktive edilen bu kinazlar, yüksek glukoz düzeyi ile uyarılan düz kasların kasılmasında da anahtar rol üstlendikleri düşünülmektedir (Derubertis and Craven 1994; Graier *et al.* 1995; Koya and King 1998). Bunun sonucu olarak, protein kinaz C (PKC)'lerin inhibisyonunda kullanılan spesifik inhibitörler diyabetik komplikasyonların giderilmesi için klinik olarak da kullanılabilir (Srivastava 2005).

NADPH kullanan bir diğer enzim de nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir. Hiperglisemik durumda polioliol yolunun aktifleşmesinden dolayı hücre içi NADPH tüketimi artışı, GSH üretimi azalmasının da yanında, NO sentezini de etkilemektedir. AR enzimi aktivitesinin artışı ile azalan NADPH düzeyi, NADPH kullanarak argininden NO oluşumunu katalizleyen NOS'un aktivitesinin azalmasına neden olarak, endotelial NO

sentezini azaltmaktadır (Tescham 1994). Oksidatif stresin artışına bağımlı olarak, NO sentezinin azalması da ateroskleroza neden olmaktadır (Kurowska 2002).



Şekil 1.6. Hiperglisemi ile artan DAG üretiminin metabolik yollarla etkileşimi ve oluşturduğu stres basamakları (Srivastava 2005)

Sorbitolun fruktoza dönüşüm reaksiyonu esnasında meydana gelen NADH, diyabetik dokularda yanıtıcı hipoksi ortaya çıkmasını sağlar (Dunlop 2000). Bunun yanı sıra artan NADH miktarı, intraselüler oksidan çeşitlerinin artmasının sebebi olan NADH oksidaz enziminin substratı olarak kullanılmaktadır (Lorenzi 2007). Bununla birlikte, hücre içerisindeki $NADH/NAD^+$ oranının artması, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enziminin de aktivitesinde inhibisyona sebep olarak gliseraldehit-3-P konsantrasyonunu arttırdığı gibi $NADP^+$ miktarının artışı ise pentoz fosfat yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır ve bunun sonucu olarak da hücre içerisindeki trioz fosfatların seviyesinde artış meydana gelmektedir (Dunlop 2000; Setter *et al.* 2003). Hücre içerisinde miktarı artan trioz fosfatlar, AGE'lerin bir öncülü olan metilgliksal ve

PKC aktivatörü olan DAG oluşumunda artışa sebep olmaktadır (Dunlop 2000; Setter *et al.* 2003).

Kalp, kan damarları, iskelet kası veya beyin dokularında aldoz redüktazın aşırı ekspresyonu, glukoz metabolizması ve osmotik regülasyonun yanısıra, aşırı demir artışı (Barisani *et al.* 2000), kalp yetmezliği (Yang *et al.* 2000), miyokardial iskemi (Shinmura *et al.* 2000), vasküler inflamasyon (Rittner *et al.* 1999), restenoz (damar genişlemesi) (Ruef *et al.* 2000) gibi proseslerle de ilişkisinin olabileceği düşünülmektedir (Ramana *et al.* 2002).

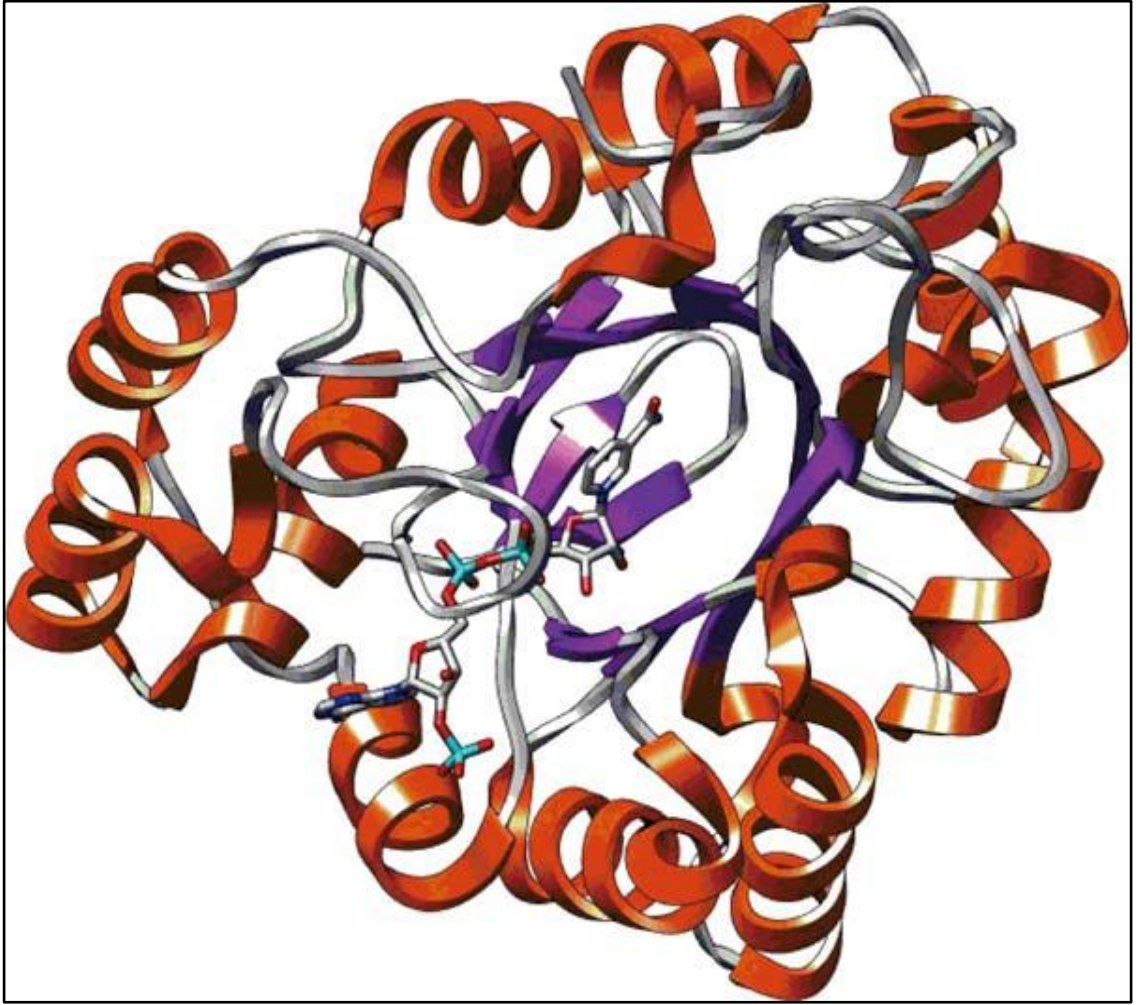
Sorbitol dehidrogenaz'ın kataliz reaksiyonu sonucu oluşturulan fruktozun, *in vitro* ortamda enzimatik reaksiyonlar ile 3-fosfofruktoza dönüştürülmesinden sonra, bu molekül hidroliz edilerek 3-deoksiglukozona (3-DG) çevirilmektedir. Bu sonuçla, 3-deoksiglukozonun poliyol yolu vasıtasıyla oluşabildiği gösterilmiştir (Tsukushi *et al.* 1999). Glukozun, sorbitole dönüşümü esnasında proton verici olarak görev yapan NADPH kofaktörünün kullanılıyor olması, NADPH/NADP⁺ oranının azalmasına yol açmaktadır (Morrisey *et al.* 1999).

Poliol yolağı aktivitesinin artmasının sonucu olarak protein kinaz C'nin aktive olması, kan damarlarının düz kas hücrelerinde aşınmaya ve aterosklerozun oluşumu sonuçlarına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda ise, yetişkin diyabet hastalarının %75-80'inin ateroskleroz komplikasyonları sebebiyle hayatını kaybetme nedenini açıklamış olmaktadır (Nakamura *et al.* 2001; Suzuki *et al.* 2001). Bunun yanısıra, polioliol yolağının artan aktivitesi, yükselmiş olan oksidatif stresin de varlığında endotel hücrelerinin hasar görmesine neden olarak aterosklerotik komplikasyonların gelişmesinde de aracı rol oynamaktadır (Oyama *et al.* 2006). Diğer taraftan polioliol yolağı sonucu fruktoz ürünleri miktarının artmasıyla da, ileri glikasyon ürünlerinin (AGEs) oluşumuna da yol açmaktadır. AGE ürünlerinin oluşumu ise kovalent modifikasyonlar meydana getirerek protein fonksiyonlarında patolojik değişikliklere neden olmaktadır (Jerums *et al.* 2003; Dan *et al.* 2004).

1.3. Aldoz Redüktaz Enzimi

Aldoz redüktaz (alditol: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.21, ALR2), aldo-keto aldoz süper ailesinin bir üyesi olup, poliol yolağının ilk enzimidir. Domuz ve insan aldoz redüktazları ile yapılmış olan X-ray kristallografisi çalışmaları, enzimin α/β kıvrımlarından oluşmuş bir varil şeklinde olduğu ve koenzimi olan NADPH'nin β kıvrımlarının C-terminal ucuna bağlandığını ortaya koymuştur (Wilson *et al.* 1992; Harrison *et al.* 1994). (Şekil 1.7) Aldoz redüktaz enzimi D-glukozu D-sorbitole indirgerken, NADPH'ı koenzim olarak kullanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda meydana gelen D-sorbitol D-fruktoza sorbitol dehidrogenaz (L-iditol: NAD⁺, 5-oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14)'ın kataliziyle dönüşmektedir (Kador 1988; Tomlinson *et al.* 1994).

Hiperglisemi durumunda, 2-4 kat artan glukoz metabolizmasının etkisiyle, AR enzimi aktivitesinde ciddi bir artış meydana gelir. Bunun sonucunda sorbitol dehidrogenaz enzimine bağımlı sorbitol, hücre membranından geçemeyerek hücrede birikime sebep olur. Dokularda sorbitol birikmesi sonucu nöropati, nefropati, retinopati, katarakt ve kardiyovasküler hastalıklar gibi uzun vadeli diyabetik komplikasyonların meydana gelmesi için oluşacak olaylar dizisini başlatır (Yabe-Nishimura 1998; Brownlee 2001; Petrova *et al.* 2005).



Şekil 1.7. Aldoz redüktaz enziminin yapısı (Wang *et al.* 2009)

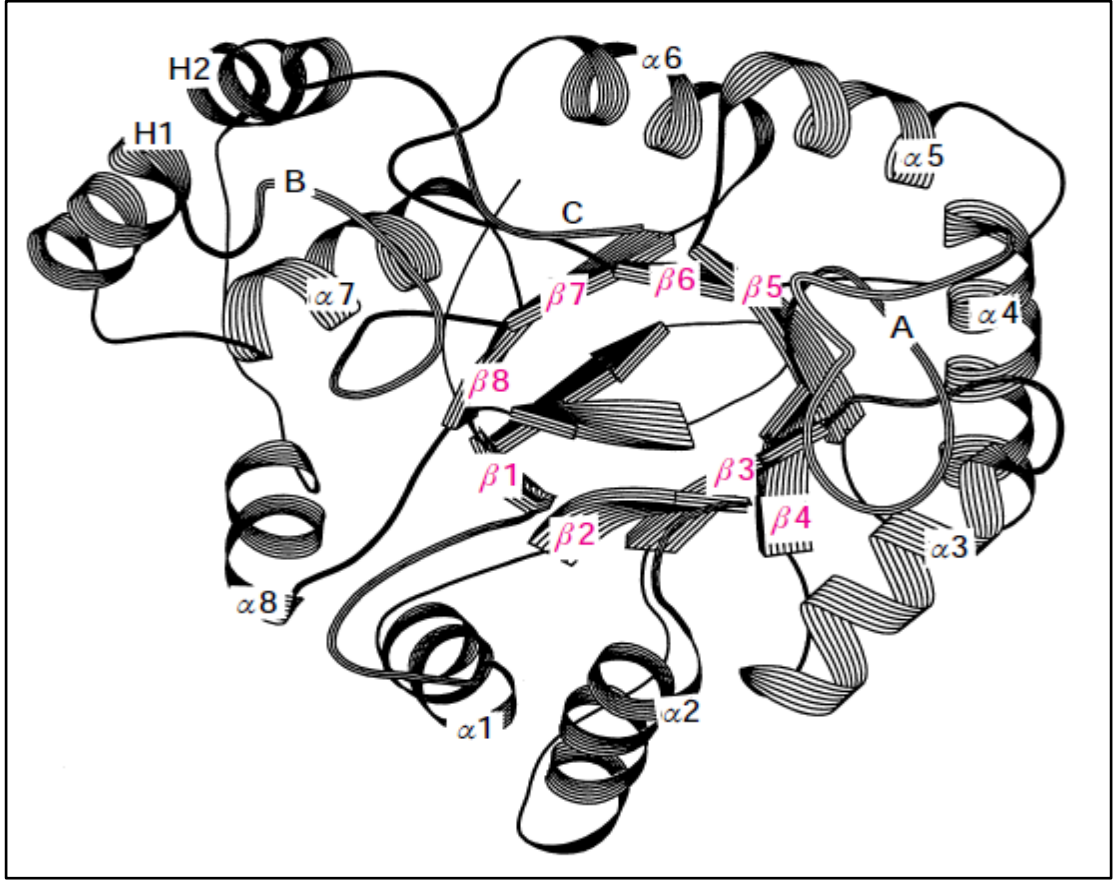
Aldoz redüktaz aldo-keto süperailisi (AKR) üyesidir ve aldo-keto süperailisi protein üyelerinin çoğu alifatik ve aromatik aldehytler, monosakkaritler, steroidler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve izoflavanoidler gibi substratların indirgenmesinden sorumlu, ayrıca detoksifikasyon basamaklarında da yer alan bir enzim ailesidir. İnsan aldoz redüktaz enzimi 316 amino asitten oluşur ve molekül kütlesi de 36 kDa olan bir proteindir (Kumar and Reddy 2007).

Aldoz redüktaz enzimi, indirgenmiş NADPH kofaktörünü de kullanarak, substrat molekülünde bulunan aldehyt grubunun redüksiyonundan sorumlu, poliöl yolağının ilk ve hız kısıtlayıcı enzimi olup (Hers, 1956) substrat molekülündeki karbonil grupların redüksiyonunu kataliz etmektedir (Kador *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1993; Del Corso

et al. 2000). AR enzimi, diyabetik komplikasyonların patogeneğinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Yabe-Nishimura 1998).

Aldoz redüktaz enziminin, substrat olarak serbest aldehitlerden çok, doymamış aldehitlerin glutatyon konjugatlarında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalarla, redükte glutatyonun N-terminal ucundaki glutamatın ve C-terminal ucundaki glisin, AR'ın aktif bölgesi ile stabilize olduğu ortaya konulmuştur (Dixit *et al.* 2000). Lipid türevi aldehitler içinde en çok bulunan ve toksik özelliği olan hekzanitroetan (HNE) ve bunun redükte glutatyon (GSH) ile olan bileşimi, AR enzimi için mükemmel substratlardır (Srivastava *et al.* 1998).

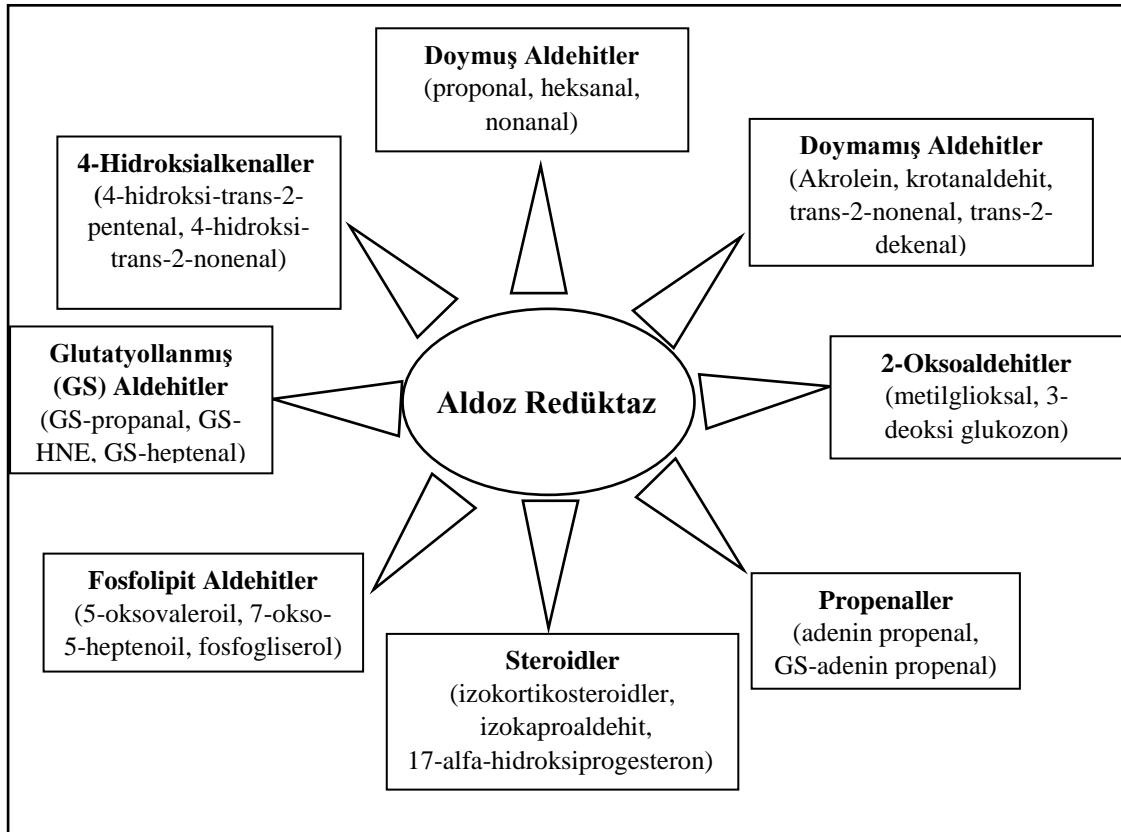
Aldo-keto redüktaz süper ailesinin diğer bütün üyelerinde olduğu gibi aldoz redüktaz enziminin yapısı da α/β fiçli modelindedir. α/β fiçli modelinin merkezinde birbirine eklenmiş olan sekiz beta zincirinin etrafını, sekiz alfa heliksin sarmasıyla $(\alpha/\beta)_8$ fiçli yapısı meydana gelmektedir. Ayrıca, H1- α -helix, H2- α -helix, sarmal A, B (esnek) ve C yapıları da modele eşlik etmektedir (Jez *et al.* 1997; Bohren *et al.* 2005). AR enziminin fonksiyonunda, H2- α -heliks, sarmal B ve C yapıları oldukça önemli rol oynamaktadırlar. H2- α -heliks, C₃₀₃₋₃₀₅ sarmalını stabil hale getirirken, C sarmalı substrat molekülünün aktif bölgeye uygun bir şekilde lokalizasyonunu ve enzimin optimum aktiviteyi göstermesini sağlamaktadır. Yapıdaki B sarmalı ise, yaklaşık olarak 17 Å kadar hareket ederek nükleotidin üzerine kapanır ve kofaktörün enzim içindeki kararlılığını artırır (Bohren *et al.* 2005) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Aldo-keto redüktaz süper ailesinin 3 boyutlu yapıları (Jez *et al.* 1997)

AR, aldehit ve ketonların ve bunların bağlantılı olan alkollerinin indirgenmesinden sorumlu, NADPH'a bağımlı olan sitozolik bir enzimdir. AR lens, böbrek, retina, böbreküstü bezi ve üreme gibi organlarda eksprese olan bir enzimdir. NADPH kofaktörü varlığında, glukozu sorbitole indirgeyen ve poliöl yolağının hız sınırlayıcı enzimidir. Normal glisemik şartlar altında fosforillenmemiş olan glukozun poliöl yolağına girişi minimum düzeydedir çünkü glukoz aldoz redüktaz enzimi için ideal bir substrat değildir ($K_M=100$ mM, $K_{cat}/K_M=2,8 \times 10^2$ M⁻¹ min⁻¹). Bundan dolayı, normal glisemik şartlarda seminal vaziküllerde fruktozu bir enerji kaynağı olarak kullanan sperm hücrelerinde ve sorbitol üretmek osmotik düzenlenmeye katkı yapan böbrek medullasında poliöl yolağının önemini büyük oranda sınırlandırmaktadır. Fakat yapılan son çalışmalar göstermiştir ki reaktif aldehitlerin ve glutatyon konjugatlarının giderilmesinde AR enzimi detoksifikasyonda görevli sistemin oldukça önemli bir parçasıdır (Kumar and Reddy 2007).

Yapılmış olan *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki AR'ın doymuş ve doymamış aldehytleri glukozdan yaklaşık olarak 10^3 - 10^4 kat daha iyi katalizlemektedir (Srivastava *et al.* 1999). AR enzimi, lipit peroksidasyonu ile oluşan orta ve uzun zincirli aldehytlerin (6-18 C'lu) indirgenmesinde daha etkilidir (Srivastava *et al.* 2001; Srivastava *et al.* 2002). Bu enzimin doymamış aldehytlerin glutasyon konjugatlarının indirgenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Ramana *et al.* 2001; Ramana *et al.* 2000). Glutasyon konjugatlarının AR enzimi vasıtasıyla indirgenmesi aldehytlerin reaktifliğini minimum düzeye düşürerek sistemi zararlı etkilere karşı korur. Bunun yanı sıra, okside fosfolipidlerden meydana gelen aldehytlerin katalizlenmesinde de AR oldukça önemli bir enzimdir (Nakano and Petrash 1996).



Şekil 1.9. AR enzimi tarafından indirgenen lipit aldehyt çeşitleri (Srivastava *et al.* 2005)

Schwann hücrelerinde eksprese olan AR enziminin, farklı doku çeşitlerinde ve türlerde kinetik ve yapısal özellikler bakımından aynı olduğu ortaya konmuştur (Nishimura *et al.* 1990). AR, insan plasenta, kas ve lens dokularından izole edilmiştir (Bohren *et al.*

1989). Hemen hemen her dokuda bulunan AR enzimi, lens, beyin, karaciğer ve iskelet kasında diğer dokulara göre yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (Flynn *et al.* 1975; Wermuth *et al.* 1977).

Çizelge 1.1. İnsanda farklı dokularda aldoz redüktaz miktarları (Tanimoto *et al.* 1998)

Doku	AR miktarı (µg/mg protein)
Böbrek (medulla)	29.3
Siyatik sinirler	5.1
Lens	2.8
Testis	1.9
Kalp	1.7
Kornea	1.4
Karaciğer	0.8
Böbrek (korteks)	0.7
Mide	0.7
Dalak	0.7
Akciğer	0.5
İnce bağırsak	0.4
Kolon	0.4

Sıçan lensi AR enziminin substratı olan DL-gliseraldehit'in K_M değeri 0,08 mM iken, sıçan lensi ALR1'in DL-gliseraldehit için K_M değeri 6,2 mM'dir (Sato and Kador 1989).

Aldoz redüktaz enziminin fazla miktarda ifade olunması, birçok kanser hücresinde görülmektedir (Kang *et al.* 2005). iCOX-2 enziminin aşırı ifadesi kolon kanserinin en belirgin özelliklerindedir. iCOX-2 enzimi, araşidonik asitten kolon epitel hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını sağlayan prostaglandinlerin sentezinde rol almaktadır. Bu hücrelerde, COX-2 enziminin transkripsiyonel düzenlenmesi bazı büyüme faktörleri (TGF, IGF, VEGF, FGF) ve sitokinler (TNF- α) aracılığıyla

sağlanmaktadır. Bununla birlikte, büyüme faktörleri ve sitokinler AR enziminin transkripsiyonunun da aktivasyonunu sağlamaktadır (Tammali *et al.* 2006). TNF- α gibi sitokinler kolon kanserine yakalanma riskini arttırmaktadırlar. AR enziminin inhibisyonu, TNF- α uyarımlı PKC ve NF-kappaB'nin aktivasyonunu engelleyerek COX-2 enziminin ekspresyonuna engel olmaktadır. Bu durum AR'ın, NF-kappaB'nin aktive olması için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Tammali *et al.* 2006; Tammali *et al.* 2007).

1.4. Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) Enzimi

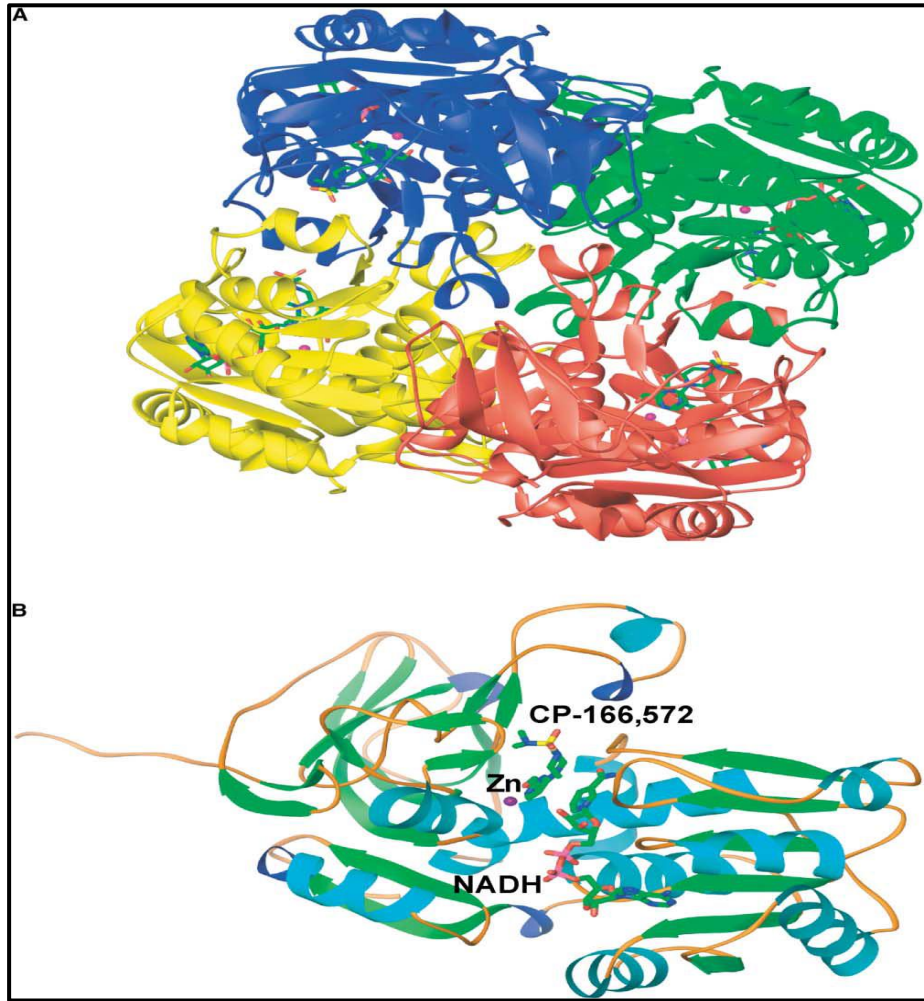
Sorbitol Dehidrogenaz (L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) poliol (sorbitol) yolağının ikinci ve son enzimidir ve koenzim NAD⁺ varlığında sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalizlemektedir (Lindstad *et al.* 1994).

Sorbitol dehidrogenaz (SDH) uzak akraba olduğu alkol dehidrogenazlarla olan aminoasit sekans benzerliği yaklaşık %20'dir. Tetramerik bir yapıya sahip SDH enziminin, her alt biriminde bir çinko iyonu bulunduran bir metaloenzimdir (Johansson *et al.* 2001).

İnsan SDH enzimi homotetramer olup her alt birimi de katalitik olarak aktiftir. Katalitik bölgede His69, Cys44, Glu70 ve bir su molekülü ile koordine olmuş olan bir çinko atomu bulunmaktadır (Pauly *et al.* 2003). Aktif bölge içerisindeki bu çinko atomunun fonksiyonu, sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunun katalizi süresince sorbitol hidroksilinin veya fruktoz karbonilinin oksijenini bağlamaktır (Jeffery *et al.* 1984; Eklund *et al.* 1985; Karlsson *et al.* 1989, 1995). SDH enziminin izoenzimlerinin varlığı bu güne kadar kanıtlanabilmiş değildir. Enzimin kristalografik araştırmaları sürmektedir. Çinko atomu koordinasyonun geometrisi, substrat bağlanması için iki serbest koordinasyon ile birlikte ligantlar arasında 90°/180°'lik açının olduğu oktahedral bir yapıdır (Johansson *et al.* 2001).

Enzimin dört alt biriminden herbiri 355 rezidüden meydana gelir (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989).

Aşırı glukoz metabolizmasının poliol yolu vasıtasıyla gerçekleşmesinin biyokimyasal sonucu, glikoliz ve pentoz fosfat yollarını bypass ederek, bazı dokularda sorbitolun birikmesine sebep olduğundan beri diyabetik komplikasyonlar ile bağlantılı olarak fazlaca ilgi çekmeye başlamıştır (Gabbay 1973). Sorbitol dehidrogenaz (SDH) aldoz redüktaz enzimiyle beraber poliol metabolik yolunun bir enzimidir. Çinko bağımlı SDH enzimi NAD^+ koenzimi varlığında sorbitolun fruktoza oksidasyonundan sorumludur (Johansson *et al.* 2001).



Şekil 1.10. (A) İnsan SDH enziminin quarterner yapısı ve (B) enzimin bir alt biriminin yapısı (Pauly *et al.* 2003)

Dokuların birçoğunda bulunan SDH ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır (Brakley 1951). En yüksek miktarda bulunduğu doku karaciğer olduğundan enzimolojik çalışmalar için bu doku kaynak niteliği taşımaktadır (Hoshi *et al.* 1996) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Sıçan dokularındaki SDH miktarları (Hoshi *et al.* 1996)

Doku	SDH miktarı (ünite/mg protein)
Karaciğer	13.9±3,9
Böbrek	12.1±1.4
Testis	3.1±0.6
İskelet kası	0.6±0.3
Mide	4.8±1.5
Akciğer	5.0±4.2
Beyin	3.5±1.5
Dalak	0.7±0.2

Karaciğer, anatomik ve fonksiyonel bakımdan gastrointestinal kanal ve dolaşım sistemi arasında yer alan, sindirim sisteminin oldukça farklı fonksiyonlarına sahip kompleks bir organdır. Bundan dolayı organizmaya etki eden faktörlerden karaciğerin etkilenmesi muhtemel bir durumdur. Sorbitol dehidrogenaz enzimi hepatosit sitoplazmasında bulunmakla birlikte karaciğer için kısmi spesifik bir enzimdir. Karaciğer hastalıklarında aminotransferaz düzeyleriyle paralel bir seyir ortaya koymaktadır ve serumda stabil değildir (Turgut 1997). Normal durumda serumda bulunmayan SDH karaciğer harabiyeti halinde seruma geçerek yüksek aktivite göstermektedir. Bundan dolayı serum SDH enzim aktivitesinde ortaya çıkan değişiklikler, karaciğer rahatsızlıklarının klinik teşhisinde faydalı olabilmektedir (Dixon *et al.* 1987).

Hiperglisemi sonucu sorbitol birikiminin ortaya çıkması hücreden hücreye farklılıklar göstermektedir. En büyük etki sinir vazo nervorumlarında ve böbrek bazal membranlarında görülür (Yeniğün ve Altuntaş 2001).

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

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

On yıldan fazla bir süredir gelecek vadede AR inhibitörlerinin birçoğu *in vitro* ve hayvan modellerinde etkili sonuçlar vermiş olmasına karşın sadece biri (Epalrestat) marketlerde yerini almıştır. Ayrıca son yıllarda SDH inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, SDH'nin inhibisyonunun poliol metabolizması ile ilgili redoks bozukluklarını düzelterek

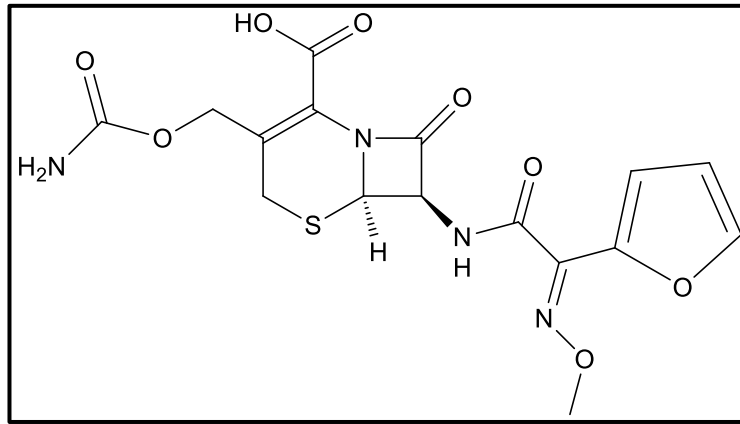
diabetik komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirmede faydalı olabileceğini ileri sürmektedir (Kador *et al.* 1998).

1.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan İlaçlar

Sığır böbrek aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerine etkileri incelenen ilaçlarının özellikleri şöyledir:

1.5.1. Sefuroksim

İkinci kuşak sefalosporin olan sefuroksim, *H.influenzae*'ye karşı (ampisilin'e rezistan olanlar dahil) ve *Neisseria*'lara karşı (beta-laktamaz salgılayanlar dahil) güçlü etkilidir. Antistafilokokal etkinliği sefalotininkinden zayıftır. Fakat antipnömonokokal etkinliği sefalotininkinden daha fazladır. Plazma proteinlere az bağlanır (%33) (Kayaalp 2002).

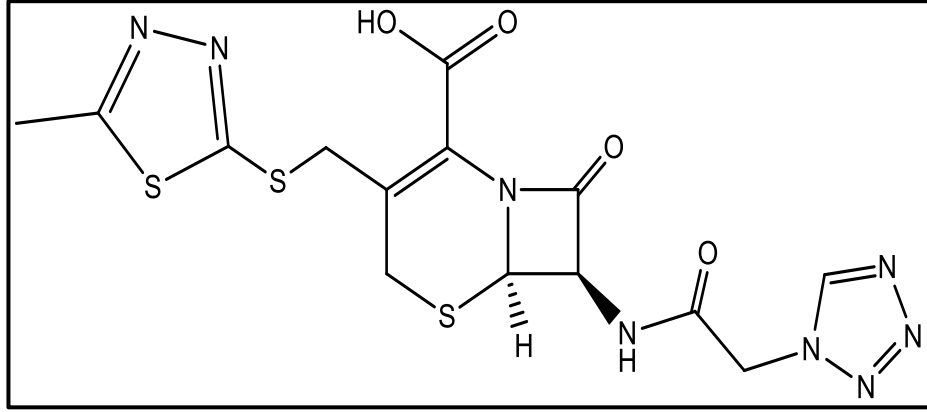


Şekil 1.11. Sefuroksim sodyum'un molekül yapısı

1.5.2. Sefazolin

Birinci kuşak sefalosporin olan sefazolin, plazma proteinlerine en fazla bağlanan sefalosporin olması ve böbreklerden esas itibariyle glomerüler filtrasyonla atılması nedeniyle parenteral kullanılan birinci kuşak ilaçlar arasında eliminasyon yarılanma

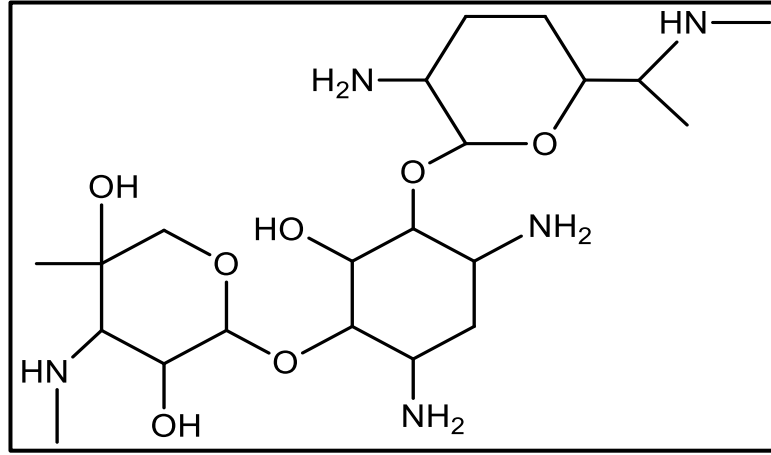
ömrü en uzun olanıdır (yaklaşık 1,5 saat). Bu nedenle cerrahideki profilaktik uygulamalarda diğer sefalosporinlere, tercih edilir. Sefazolin, sefalotine kıyasla stafilokokal beta-laktamaza daha duyarlıdır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.12. Sefazolin sodyum'un molekül yapısı

1.5.3. Gentamisin

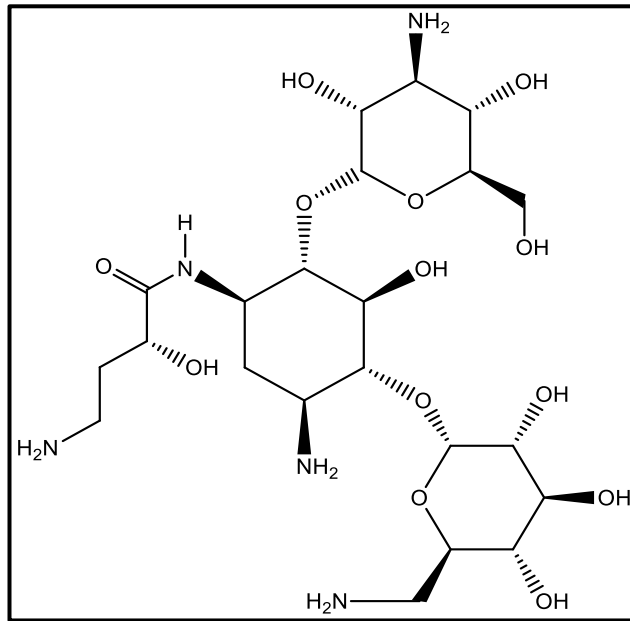
Micromonospora purpurea'dan elde edilen aminoglozid türevi bir antibiyotiktir. Streptomisin, kanamisin ve amikasin'den daha güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içerisinde, amikasin'den sonra, spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olan antibiyotiktir. Bakterisid etki yapar. Özellikle Enterobacteriaceae grubu bakteriler ile *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif basiller, penisilin ve metisiline dayanıklı *Staphylococcus aureus* suşları üzerinde etkilidir (Kayaalp 2002).



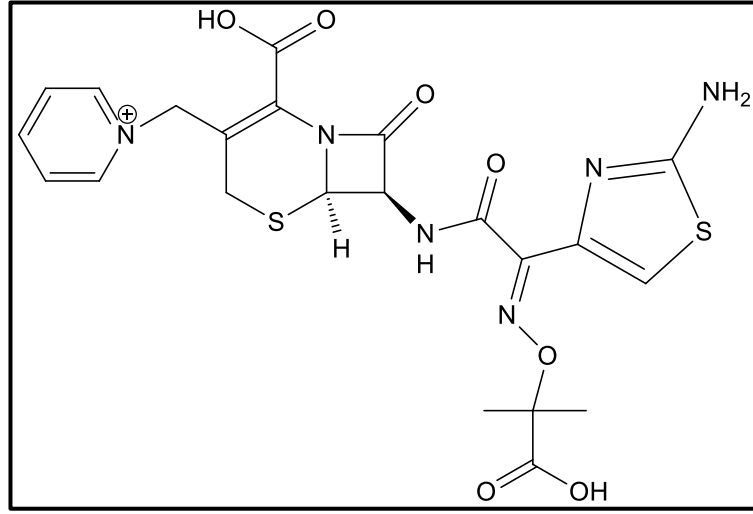
Şekil 1.13. Gentamisin'in molekül yapısı

1.5.4. Amikasin

Aminoglikozidler arasında yarı sentetik olarak yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan asilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili bu özelliği nedeniyle; gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere karşı dayanıklı olduğundan en geniş spektrumlu aminoglikoziddir (Kayaalp 2002).



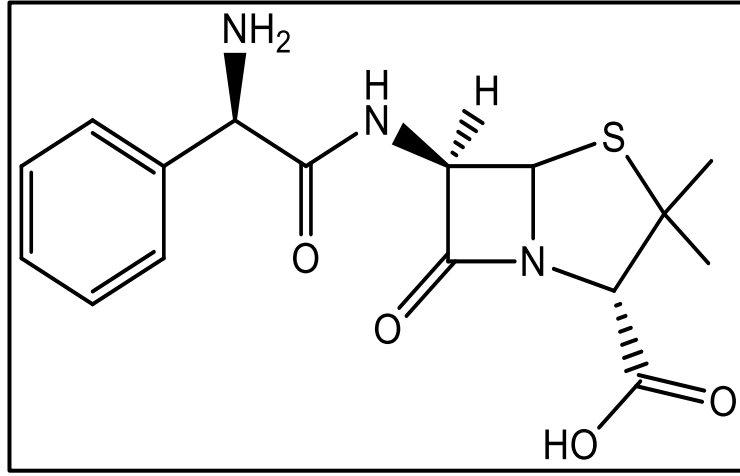
Şekil 1.14. Amikasin sülfat'ın molekül yapısı



Şekil 1.16. Sodyum seftazidim pentahidrat'ın molekül yapısı

1.5.7. Ampisilin

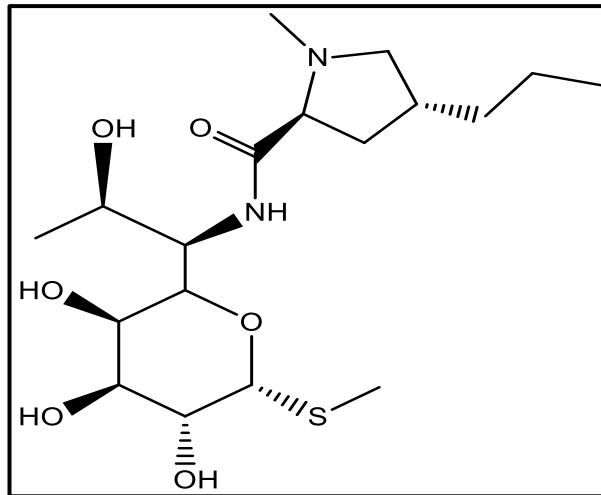
Geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, hem ağızdan hem de parenteral uygulanabilir. Grup A streptokoklara, pnömokoklara, Neisseria'lara ve Clostridium'lara karşı *in vitro* etki gücü penisilin G'ye göre biraz daha düşüktür. Fakat enterokoklara, viridans grubu streptokoklara ve *Listeria monocytogenes*'e karşı ondan biraz daha etkilidir. *Haemophilus influenzae*, *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus mirabilis* gibi gram-negatif basillerin suşlarından beta laktamaz sentezlemeyenlere karşı bakterisid etkinlik gösterir. Ülkemizde izole edilen *E.coli* suşlarının yaklaşık %60-80'nin ampisilin'e dirençli olduğu bulunmuştur. Klebsiella ve Enterobacter suşlarının çoğu, *Proteus mirabilis* dışındaki *Proteus* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* türleri ve beta-laktamaz salgılayan *S. Aureus* suşları ampisilin'e rezistandırlar (Kayaalp 2002).



Şekil 1.17. Ampisilin'in molekül yapısı

1.5.8. Linkomisin

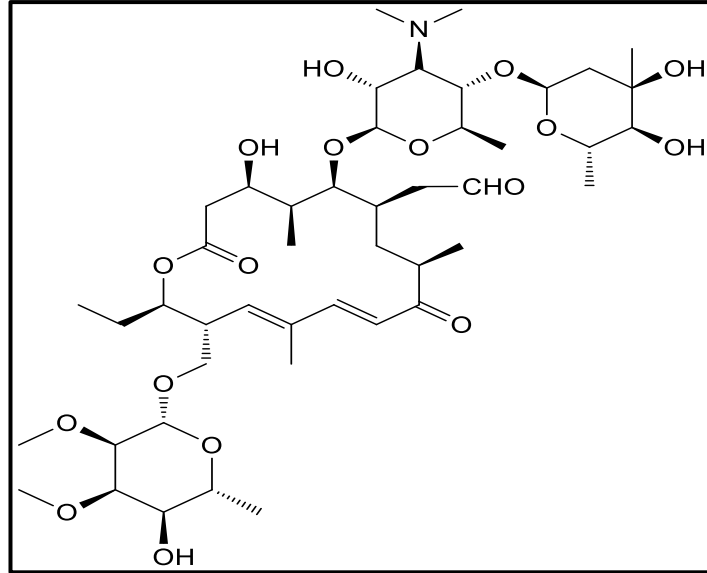
Dar spektrumlu bir antibiyotik olan linkomisin; sübstitüe edilmiş prolin amino asidi ile kükürtlü amino-oktoz (8 karbonlu amino şeker) molekülünün oluşturduğu, tıbbi kullanıma ilk giren, linkozamiddir. Linkomisin BOS'a yetersiz derecede girebilir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.18. Linkomisin'in molekül yapısı

1.5.9. Tylosin

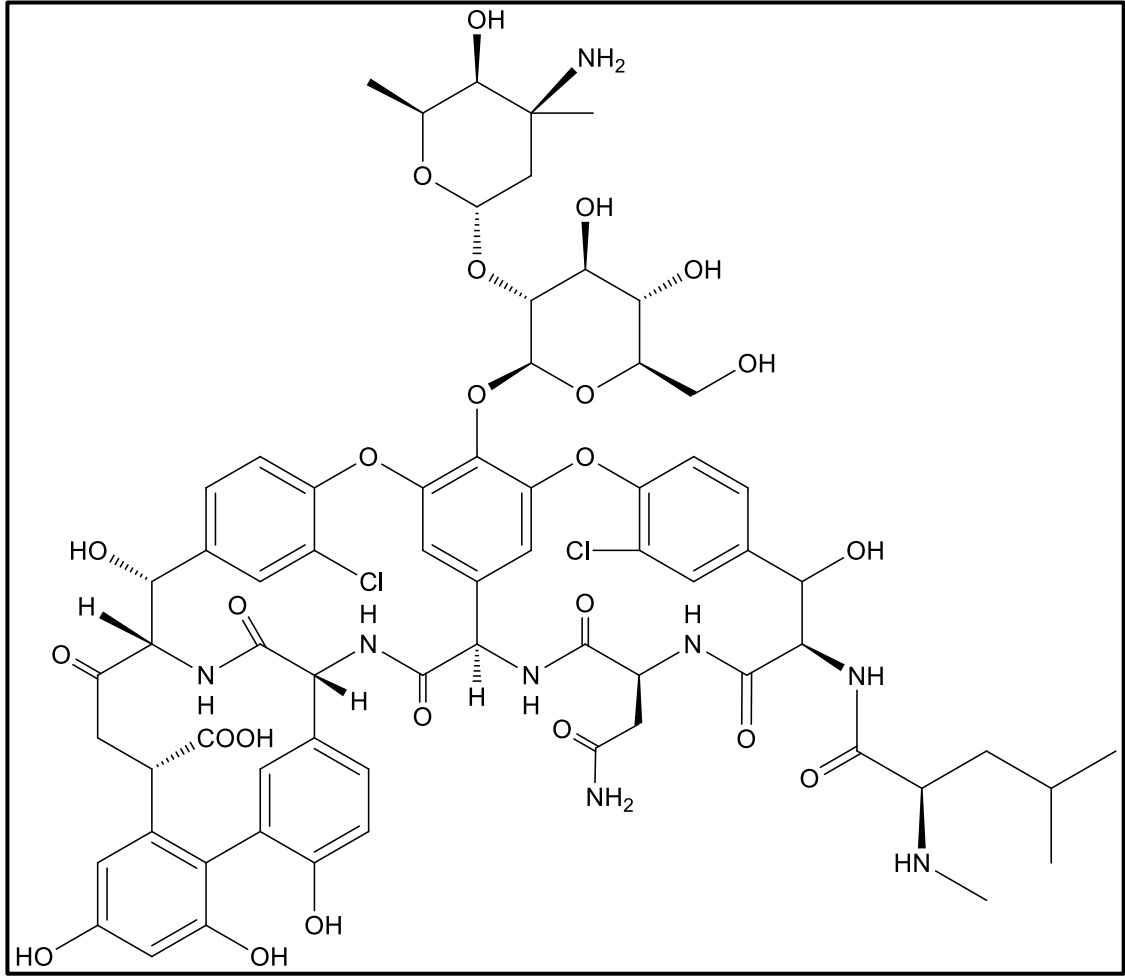
Tylosin, *Streptomyces fradiae* kültürlerinden elde edilen bakteriyostatik etkili bir antibakteriyeldir. Tylosin kas içi uygulama sonrası hızla emilir. Uygulama yerinden emilen tilozin tüm vücuda dağılır, süte önemli miktarlarda geçer. Tilozin hücre içindeki 50S ribozomal alt birimlere bağlanıp, peptitlerin translokasyonunu ve protein sentezini engelleyerek duyarlı mikroorganizmalara karşı bakterisidal ve mikoplazmisidal etki gösterir (Anonymous 2013).



Şekil 1.19. Tylosin'in molekül yapısı

1.5.10. Vankomisin

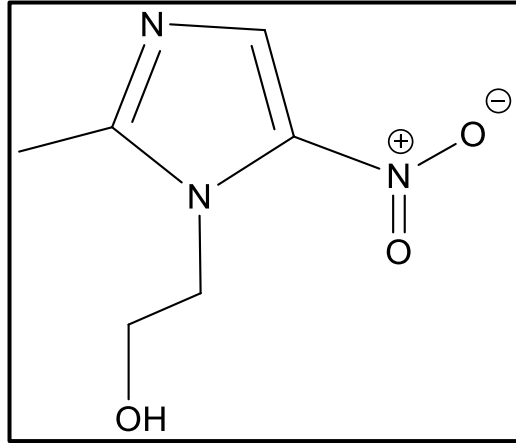
Streptomyces orientalis'ten elde edilen, yaklaşık 3300 dalton molekül kütleli kompleks bir glikopeptiddir. Yapıca diğer antibiyotiklerin hiç birisine benzemez. Suda fazlaca çözünebilen stabil bir bileşiktir. Penisilinler gibi, bakteri hücre duvarının sentezini bozar. Ancak etki mekanizması penisinlerden farklıdır. Antibakteriyel spektrumu dar bir antibiyotiktir. Gram-pozitif kokusları ve clostridium'ları etkiler. Penisilinler gibi, bölünmekte olan duyarlı bakteriler üzerinde bakterisit etki yapar (Kayaalp 2002).



Şekil 1.20. Vankomisin'in molekül yapısı

1.5.11. Metronidazol

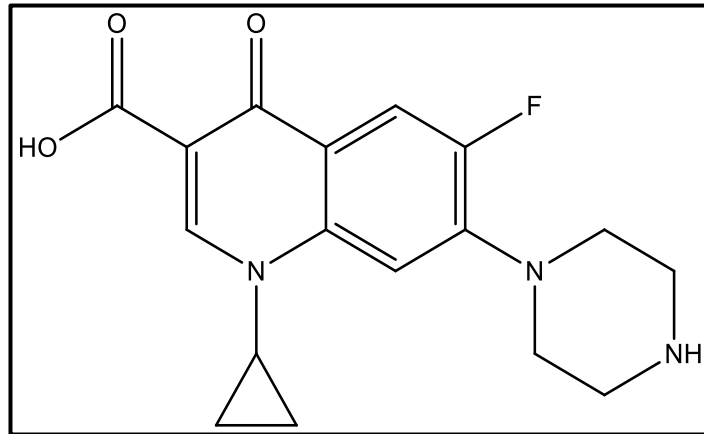
1959 yılında *Trichomonas* vajinitinin tedavisi için çıkarılmış olan belirli protozoonlar üzerinde güçlü öldürücü etkinliği olan 5-nitroimidazol türevi bir antibiyotiktir. Metronidazol'un anaerobik bakteri infeksiyonlarında etkili olduğu, antiprotozoal ilaç olarak çıkışından iki yıl sonra tesadüfen farkedilmiştir. Bütün bakteri ve diğer mikroorganizma hücrelerine pasif difüzyonla kolayca girebilirler. Çabuk başlayan, güçlü bir bakterisid etki yaparlar. Metronidazol'un anaerob bakteriler üzerindeki bakterisid etkisinin, klindamisin'in ve Penisilin G'ninkinden daha çabuk olduğu saptanmıştır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.21. Metronidazol'un molekül yapısı

1.5.12. Siprofloksasin

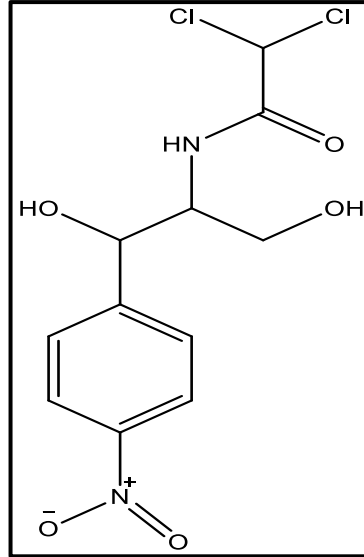
İlk kuşak florokinolon sınıfından olan siprofloksasin, birçok sayıda patojen mikroorganizma üzerinde etkili olan ve sistemik enfeksiyonlara karşı en sık kullanılan antibiyotik türlerinden biridir. 6 numaralı karbonunda bulunan flor gram-pozitif bakterilere karşı, 8 numaralı karbondaki bulunan piperazin halkası ise gram-negatif bakterilere karşı olan etkinliğini artırır. *E-coli*, *salmonella*, *shigella*, *klebsiella* gibi bakteri türlerine karşı oldukça etkindir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.22. Siprofloksasin'in molekül yapısı

1.5.13. Kloramfenikol

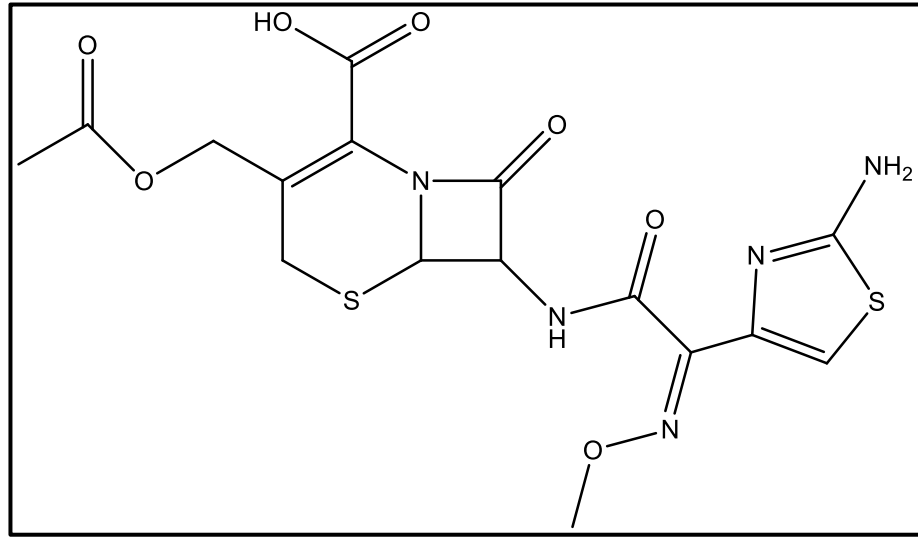
Kloramfenikol, 1947'de *streptomyces venezuelae* kültürlerinden elde edilmiş ve 1949'da piyasaya sürülmüştür. Kimyasal yapısı diğer antibiyotiklerin çoğuna göre basittir. Dikloroasetikasit grubu içeren bir nitrobenzen türevidir. Kloramfenikol, dört önemli özelliği nedeniyle diğer antibiyotiklerin çoğuna göre üstünlüğü olan bir ilaçtır. Bu özellikler geniş spektrumlu oluşu, yan etki insidansının düşük oluşu, vücutta dağılımının iyi olması ve fiyatının düşük olmasıdır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.23. Kloramfenikol'un molekül yapısı

1.5.14. Sefotaksim

Sefotaksim, tıpta ilk kullanılan üçüncü kuşak sefalosporin türevi antibiyotiktir. Aerobik gram-negatif basillerin çoğuna etkilidir. BOS sıvısı içine yeterli derecede geçtiği için menenjitte karşı etkilidir. Karaciğerde %30-50'ye varan oranda desasetil sefotaksime metabolize olur. Bu metabolitin antibakteriyel etkisi sefotaksime oranla daha düşük olmakla birlikte, herikisi de sinerjistik etki göstererek birbirlerinin etkilerini potansiyalize ederler. Yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.24. Sefotaksim'in molekül yapısı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Diabetes Mellitus (DM), pankreas β -hücrelerindeki insülin sekresyonunda ve/veya insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıkan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan, kronik hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalıktır. Diyabetteki kronik hiperglisemi göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları dahil olmak üzere pekçok organda hasar oluşturmaktadır (Anonymous 2005; Fain 2009; Anonymous 2010).

Diyabet, insülin salgısı veya aktivitesinin yokluğu ya da her ikisinin azlığı durumunda meydana gelen, yüksek glukoz düzeyi (hiperglisemi) ile karakterize olan metabolik bir sendromdur (Anonymous 2004a). Diyabetin temel nedeni, dolaşımdaki insülinin eksikliği veya periferik dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasıdır (insülin direnci).

Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda oluşan insülin direnci, kan glukoz düzeyini arttırmakta ve pankreasın beta hücrelerinin daha fazla insülin hormonu sentezlemesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak, bir süre sonra beta hücrelerinin fonksiyon kaybına uğraması sonucu, insülin salgı miktarı ve insülin konsantrasyonu giderek azalmaktadır. Normal koşullarda karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi baskılayan insülin hormonunun karaciğer üzerindeki etkisinin azalması, kan glukoz seviyesinin daha da yükselmesi sonucu Tip 2 diyabetin gelişimini başlatmaktadır (Kahn 2001; Jain and Saraf 2008).

Hipergliseminin belirtileri arasında; aşırı susama (polidipsi), sık sık idrara çıkma (poliüri), aşırı yeme (polifaji), bulanık görüş, ketonüri, glukozüri ve kilo kaybı sayılabilir. Amerikan Diyabet Birliği (ADA), bu belirtilere ek olarak, günün herhangi bir saatinde açlık veya tokluk durumuna bakılmaksızın, ölçülen plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dL'ye eşit veya üzerinde olması, minimum 8 saatlik tam açlık sonrası, açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dL'nin üzerinde olması ve 75 g'lık oral

glukoz tolerans testinde (OGTT) 2. saat sonunda plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dL'nin üzerinde olması durumunu diyabet olarak tanımlamaktadır (Anonymous 1997). Hastaların büyük kısmında, kan glukoz seviyesinin diyabet tanısının konulması için yeterince yüksek olmasa da, açlık kan glukoz seviyesinin 100-125 mg/dL arasında ve 2. saat plazma glukoz düzeyinin 140-199 mg/dL arasında tespit edilmesi, ADA tarafından sırasıyla Bozulmuş Açlık Glukozu (IFG) ve Bozulmuş Glukoz Toleransı (IGT) olarak tanımlanmaktadır (Anonymous 1997; Anonymous 2004).

Hiperglisemi ile mitokondriyal süperoksitin aşırı üretimi, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enziminin aktivitesinde düşüşe sebep olur (Du *et al.* 2000). Hiperglisemi ile aktifleşen polioll yolu, glukoz dâhil, birçok glikolitik metabolitin birikmesine sebep olarak GAPDH miktarının azalmasına sebep olur. GAPDH'nin hiperglisemi kaynaklı reaktif oksijen türleriyle inhibisyonu, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)'in aktivasyonuna ve NAD⁺ miktarında azalmaya neden olabilir (Garcia Soriano *et al.* 2001). Trioz fosfatların parçalanması sonucu oluşan hücre içi metilglioksal türevleri glikasyon ürünleri (AGE)'nin oluşumu hiperglisemi tarafından indüklenir (Shinohara *et al.* 1998). Hiperglisemi ile hücre içinde oluşan ileri glikasyon ürünlerinin artışı, mitokondriyal ROS'nin aşırı üretimi sonucu inhibe olan GAPDH enzimi yokluğundan kaynaklanan trioz fosfat miktarında artışa sebep olabilir (Brownlee 2001).

Diyabetik hastaların yaklaşık %5-10'unu kapsayan tip 1 diyabette, pankreas beta hücrelerinin otoimmün saldırı sonucu harabiyeti ile ortaya çıkan insülin yetmezliği söz konusudur. Tip 1 diyabette hastaların yaşamlarını sürdürebilmek için insülin enjeksiyonuna ihtiyaç duydukları, ayrıca küçük yaş bireylerinde ve gençlerde daha sık ortaya çıkmasından dolayı insüline bağımlı diyabet (IDDM) veya gençlik diyabet (Juvenile Onset Diabetes) olarak da isimlendirilmiştir (Atkinson and Maclaren 1994).

Diyabetik hastaların %90-95'ini kapsayan Tip 2 diyabet; insülinin periferik hücreler üzerindeki etki bozukluğu (insülin direnci) ve insülin salgılanması bozukluğu (insülin yetmezliği) ile karakterize olan bir hastalıktır. Tip 2 diyabet (T2DM), insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) ve yetişkin başlangıçlı diyabet (adult onset diabetes) olarak

da isimlendirilmektedir (Reaven *et al.* 1976; DeFronzo *et al.* 1979; Turner *et al.* 1979; Olefsky *et al.* 1982).

Sitozolik bir protein olan AR enzimi, biyosentez, detoksifikasyon ve metabolizma gibi çeşitli hücre proseslerinde oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen çeşitli enzimleri içeren aldo-keto ailesine üyedir. 315 a.a.lik monomerik bir protein olan insan AR enzimi 7q35 kromozom bölgesinde eşleştirilen AKR1B1 geni tarafından kodlanır (Barski *et al.* 2008).

AR enzimi; sperm kesesinde kan glukozunu fruktoza çevirerek sperm hücrelerine enerji kaynağı sağlayan ilk enzim olarak belirlendi (Hers 1956). AR'ın belirlenmesinden 4 yıl sonra, Heyningen (1959), şeker indüklenmiş kataraktogeneze sırasında fare lensinde yüksek konsantrasyonda galaktikol ve sorbitol birikimini ortaya koydu.

AR, bazı fizyolojik ve ksenobiyotik aldehyitlerin NADPH bağımlı redüksiyonunu katalizler. İzokortizol ve izokortikosteron gibi izokortikosteroidler bu enzim için en iyi substratlardır ($K_M < 1 \mu M$). Daha sonra bunları biyojenik aldehyitleride içeren aromatik ve arilalkilaldehyitler takip etmektedir ($K_M = 3-15 \mu M$). Aldozlara karşı aktivite gliseradehit ($K_M = 25 \mu M$) ile en yüksektir ve şekerdeki karbon sayısının artmasıyla aktivite azalır. Quercetin ve rutin gibi flavonoidler aldoz redüktazı inhibe ederler. Bir başka deyişle sülfat iyonları enzim aktivitesini stimüle eder. 4-Hidroksicivabenoat ve iyodoasetat gibi modifiye edilmiş tiyol reaktifleri zamana bağımlı inaktivasyona sebep olur. Aldoz redüktaz 38.000 molekül kütesine ve 5,9 izoelektrik noktaya sahip tek bir polipeptit zincirden oluşmuştur. Tiyol reaktifleri varlığında izoelektrik nokta 5,1'e değişmektedir (Wermuth *et al.* 1982).

Poliol yolunun hız kısıtlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz (AKR1B1), bilinen en iyi NADPH bağımlı aldo-keto redüktazdır. Poliol yolu vasıtasıyla hızlandırılmış glukoz metabolizması diyabetik katarakt ve retinopatiye neden olmaktadır. Güncel çalışmaların şimdiki hedefi, diyabetik komplikasyonlara sebep olan ve AKR1B1 ile yakın ilişkisi

bulunan, aldo-keto redüktaz gen familyasının bir üyesi olan AKR1B10'un ekspresyon profilinin karakterize edilmesidir (Huang *et al.* 2010).

AR enziminin aktivitesinin aşırı artışı, hücre içinde belirli koenzimlerin (NADPH ve NADH) miktarını değiştirerek antioksidan savunma sistemine ait enzimlerin gen ekspresyon durumlarını engellemektedir. Bu durum hücrede oksidatif strese sebep olur (Larkins and Dunlop 1992; Hodgkinson *et al.* 2003). Bununla paralel olarak, hücrede biriken sorbitol osmotik strese neden olarak doku hasarına yol açar ve miyoinositol miktarını da azaltarak fosfoinozidit sinyallerinin oluşumunu azaltmaktadır. Böylece sinir hücrelerinde iletim hızı yavaşlamakta ve diyabetik nöropati gibi diğer mikrovasküler komplikasyonlara da yol açabilmektedir (Larkins and Dunlop 1992; Podwall and Gooch 2004).

NADPH kofaktörü enzimin aktif bölgesine, nikotinamid halkasındaki amid grubu Gln184, Asn163 ve Ser162 kalıntıları ile hidrojen bağı yaparak bağlanır. Ayrıca, kofaktör yapısındaki adenosin halkasının 2'-fosfatı ile enzimin aktif bölgesinde bulunan Lys263 ve Arg269 rezidüleri arasında kurulan tuz köprüleri, kofaktörün enzim üzerindeki kararlılığını arttırmaktadır. Fosfat gurubunun kurmuş olduğu bu tuz köprüleri, enzimin NADH yerine NADPH'ı tercih etme sebebini de açıklamaktadır (El-kabbani *et al.* 1998).

Kalp, kan damarları, iskelet kası ya da beyin gibi dokularda aldoz redüktazın aktivitesinin aşırı artışı, glukoz metabolizması ve osmotik regülasyondan başka; aşırı demir yükselmesi (Barisani *et al.* 2000), kalp yetmezliği (Yang *et al.* 2000), miyokardial iskemi (Shinmura *et al.* 2000), vasküler inflamasyon (Rittner *et al.* 1999), restenoz (damar genişlemesi) (Ruef *et al.* 2000) gibi proseslerle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ramana *et al.* 2002).

Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) (L-iditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) polioll yolunun ikinci enzimidir ve nikotinamid adenin dinükleotid NAD⁺'i koenzim olarak kullanarak halkalı yapıda olmayan poliollerin oksidasyonunu katalizler (Rehg and

Torack 1977). D-Sorbitolu daha sonra fosforilat şeker fruktoz 1- fosfata metabolize olacak okside bir ürün olan fruktoza çevirir (Jeffery and Jörnvall 1988).

SDH enzimi, birçok alkol dehidrogenazı da içeren protein süper ailesine bağlıdır ve birçok memeli dokusunda bulunur. Fonksiyonel memeli SDH'ı 38 kDa alt birimine sahip homotetramerik enzimdir. Sıçan, koyun ve insan SDH'ının kristal yapıları karakterize edilmiştir. Enzimin her alt birimi bir aktif bölge içerir ve her alt birimin katalitik çinko atomu Cys43, His68, Glu69 ve su ile koordine edilir (koyun enzimi) (Estonius *et al.* 1993; Iwata *et al.* 1995; Johansson *et al.* 2001; Pauly *et al.* 2003; Jörnvall *et al.* 2010; Yennawar *et al.* 2011).

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

SDH enzimi, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi pek çok canlıda bulunur (Jeffery and Jörnvall 1988). Enzim bağırsak bölgesi hariç bütün memeli dokularında ekspresyon gösterir (Estonius *et al.* 1993). Sorbitolün metabolik kullanımında önemli bir enzim olan SDH, meyvenin gelişimi boyunca karbon sağlamada da önemli rol oynar (Oura *et al.* 2000).

SDH enzimi, ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmış, sorbitol ve galaktitol'u içeren çeşitli asiklik poliollerin oksidasyonunu katalizlediği gösterilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim sıçan karaciğeri (Brakley 1951), koyun karaciğeri (Smith 1962), sıçan beyni (Rehg and Torack 1977), at karaciğeri (Bailey *et al.* 1981), insan beyni (O'Brien

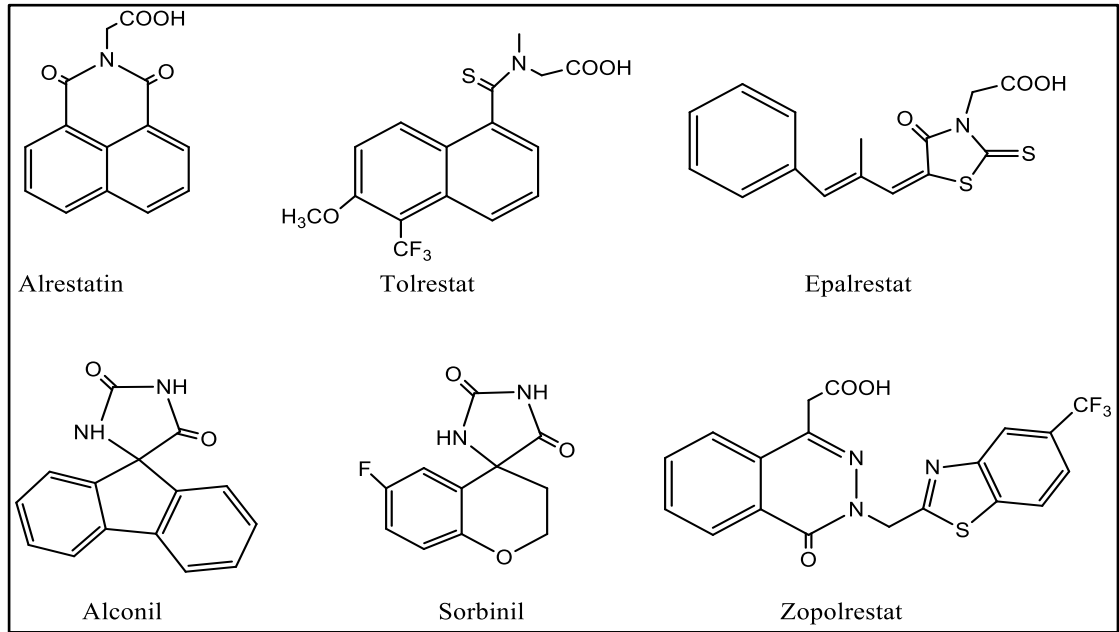
et al. 1983), sığır beyni (Wiesinger and Hamprecht 1987), insan karaciğeri (Maret and Auld 1988), sığır lensi (Marini *et al.* 1997) gibi çeşitli memeli dokularından ve bazı bitki kaynaklarından (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000) saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Normal ve diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmanın sonucunda SDH'nin özellikle karaciğer, böbrek ve testis dokularında çok yüksek seviyede eksprese olduğu, mide, beyin, akciğer ve dalak dokularında düşük seviyede, iskelet kasında ise çok düşük seviyede eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Normal sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında hem SDH ekspresyonunun hem de SDH enzim aktivitesinin yüksek olduğu ancak testis dokusunda SDH ekspresyonunun yüksek olmasına rağmen SDH enzim aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda ise SDH enzim aktivitesinin düştüğü ancak SDH ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda diyabetik karaciğer ve testis dokularındaki mRNA seviyeleri ve enzim aktivitesinde gözlenen bu farklılıkların diyabetik şartlar altında aktivasyonu artan poliollu yolu ile açıklanabileceği belirtilmiştir (Hoshi *et al.* 1996).

SDH enziminin aktifleşmesi sonucu oluşan NADH, NADH-oksidadaz (Nox) enziminin etkisi ile ROS oluşumuna sebep olur (Tefamariam 1994; Morre *et al.* 2000). ROS, GAPDH inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliollu yolağına yönelmesine ve AR'nin aktivasyonuna neden olmaktadır (Stevens *et al.* 2000). AR enzim aktivitesi için NADPH kullandığından hücre içi NADPH tüketimi artar. GR enzimi, NADPH bağımlı olarak, GSSG'nin GSH'a redüksiyonunu sağlayan enzimdir. AR'nin NADPH için K_M değeri, GR enziminin NADPH için K_M değerinden 10 kat daha düşüktür. Poliollu yolağında artan AR aktivitesiyle NADPH'nin fazlaca tüketilmesi, GSH'nun üretiminin azalmasına neden olur (Yeh and Ashton 1990). Hücre içi ana antioksidan olan GSH'nun azalması hücrenin antioksidan kapasitesini düşürerek hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü zayıflatır ve bu durum oksidatif strese neden olur (Lee and Chung 1999; Maritim *et al.* 2003). Poliollu yolağının antioksidan savunma sistemine zararlı etkileri bu mekanizma ile açıklanmaktadır (Giugliano *et al.* 1996; Nishimura 1998; Nishikawa *et al.* 2000).

Hiperglisemi sonucu AR enzimi aktivitesi artmaktadır. Aktivitesi artan AR, osmotik dengenin, elektrolit taşınmasının ve redoks dengesinin değişmesine neden olarak, diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve katarakt gibi diyabetik komplikasyonların oluşumuna sebep olmaktadır (Rakowitz *et al.* 2006; Brownlee *et al.* 2006; Djoubissie *et al.* 2006). Dolayısıyla, AR inhibitörleri (ARI), diyabetik komplikasyonların ilerlemesinin geciktirilmesi veya başlamasının engellenmesi için tedavi edici ajan olarak oldukça geniş bir yelpazede araştırılmaktadır (El-Kabbani *et al.* 2004; Sun *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009).

Ancak, son yirmi yılı aşkın sürede, AR inhibitörlerine ait bazı klinik denemeler ve araştırmalar ya tasarımdaki yetersizlikten, ya da sentezlenen inhibitörün poliyol yolağına yetersiz şekilde etki etmesi nedeniyle tatmin edici sonuçlar oluşturmamıştır (Obrosova *et al.* 2002). Bununla beraber, insan klinik deneme safhasına ulaşan sorbinil ve ponalrestat gibi diğer tüm ARI leri, hem etkilerinin yetersiz olması hem de yan etkilerinden dolayı piyasadan geri çekilmişlerdir. Görülen yan etkilerin oluşmasına, AR enzimi ile aynı süperaileden olan ve yapısal olarak birbirlerine çok benzeyen aldehit redüktazların da inhibe edilmesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, sadece aldoz redüktaz enzimine bağlanabilen inhibitörler tasarlanmaya çalışılmaktadır (El-Kabbani *et al.* 2004). Buna karşın, 1989 yılında piyasaya sürülen tolrestat, 1996 yılında düşük etkinliği ve karaciğer toksisitesi nedeniyle geri çekilmiştir. Aynı şekilde zopolrestat, ranirestat ve zenarestat bileşiklerinin de klinik denemeleri iptal edilmiştir. Şu anda Japonya'da, Ono tarafından 1992 yılında geliştirilen epalrestat kullanılmaktadır (Asano *et al.* 2002; Miyamoto 2002; Sturm *et al.* 2006).



Şekil 2.1. Bilinen en iyi aldöz redüktaz inhibitörlerinden bazıları (Donkor *et al.* 1999)

Diyabetik Nefropati olarak adlandırılan diyabetik böbrek hasarı, ölüm oranını ve şiddetini arttıran diyabetik komplikasyonlardan biridir. Non-enzimatik glikasyon sonucu oluşan Maillard Reaksiyon Ürünleri ya da diğer adıyla İleri Glikasyon Ürünleri (Glikozillenmiş hemoglobin, Karboksimetilis, Pentosidin ve Glikozillenmiş albumin)'nin oluşumu diyabetik nefropatinin patogenezini ve diğer diyabetik komplikasyonların meydana gelişini hızlandırmaktadır. Dolayısıyla anti-glicative ve/veya antienflamatuar ajanlarla diyabetik nefropatinin etkileri potansiyel olarak önlenebilir ya da geciktirilebilir (Ziyadeh *et al.* 1997; Gugliucci and Bendayan 1997; Dunlop 2000).

Glukozu sorbitole indirgeyen AR, poliol yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. SDH ise sorbitolu fruktoza dönüştüren, poliol yolunun ikinci enzimidir. SDH enziminin aktivitesinin artmasıyla fruktoz üretimindeki artış ileri glikasyon ürünlerinin oluşumuna sebep olarak diyabetik kaynaklı microvascular anomalilerin ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı rapor edilmektedir (Mizisin *et al.* 1996; Maekawa *et al.* 2001; Cheung *et al.* 2005).

Ayrıca fenolik bir bileşik olan kafeik asitin anti diyabetik etkilerinin olduğu belirlenmiş ve glisemik kontrol için kullanılabileceği de gözlemlenmiştir (Jung *et al.* 2006).

Ayrıca, ellagik asitin bir AR inhibitörü olduğu ve diyabetik ratların eritrosit, lens ve siyatik sinirlerinde sorbitol birikimini önlediği rapor edilmiştir (Ueda *et al.* 2004).

Yapılan bu çalışmalar ışığında kafeik asit ve ellagik asitin kan glukoz seviyesini düşürerek poliols yolunun çalışmasını düzenlediği ve diyabetik anomalilerin geciktirilmesi ya da azaltılmasını sağladığı söylenebilir. Ancak, bu bileşiklerin diyabet kaynaklı böbrek hasarını önleyip önlemediği konusu halen bilinmemektedir (Chao *et al.* 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği yerler

2', 5' ADP-sepharose 4B	Pharmacia
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Amonyum Sülfat	E.Merc AG
Asetik Asit	E.Merc AG
Brom timol mavisi	Sigma
CM-Sephadex	E.Merc AG
Coomessie Brillant Blue G-250	Sigma
Coomessie Brillant Blue R-250	Sigma
DEAE Sephadex	E.Merc AG
Diyaliz Torbaları	Sigma
DL-Gliseraldehit	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Fluka
Gliserin	E.Merc AG
Gliserol	Sigma Chemical Comp.
Metanol	E.Merc AG
Glisin	E.Merc AG
Glutaraldehit	Sigma
Hidroklorik Asit	E.Merc AG
İzopropanol	E.Merc AG

Çizelge 3.1 (devam)

Jel filtrasyon kromatografisi için molekül kütlesi standartları	Sigma
N,,N'- metilen bisakrilamid	Sigma
N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum fosfat	Riedel de Haen
Potasyum Fosfat	E.Merc AG
Protein Marker	BioRad 0375
Protein Marker V	peqGOLD/peqlab
Sephadex G-100	Sigma
Sephadex G-100	E.Merc AG
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	E.Merc AG
Sodyum Fosfat	E.Merc AG
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum Klorür	E.Merc AG
Sorbitol	E.Merc AG
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Sigma
Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
β -merkpto etanol	Fluka
β -merkpto etanol	E.Merc AG
β -NAD ⁺	E.Merc AG
β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH)	Sigma
β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP ⁺)	Sigma

Çalışmamızda kullanılan diğer kimyasallar Sigma Chemical Comp.'den ya da E.Merc AG'den, temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	: Beckman coulter
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), Sigma
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midii Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Siemens Derindondurucu
(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Madical Freezer
(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

AR enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

- 1 M Na-fosfat tamponu (pH=5,5): 6 g NaH₂PO₄ tartılarak 40 mL saf suda çözüldü, pH=5,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- 0,11 mM NADPH çözeltisi: 0,0045 g NADPH tartılarak 5 mL saf suda çözüldü.

3. 4,7 mM DL-gliseraldehit çözeltisi: 0,021 g DL-gliseraldehit tartılarak 10 mL saf suda çözüldü.

SDH enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 100 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,5): 0,75 g Glisin 90 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=9,5'a getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 mL ye tamamlandı.
2. 4,7 mM β -NAD⁺ çözeltisi: 0,0155 g β -NAD⁺ alındı 5 mL 100 mM pH=9,5 olan Glisin/NaOH tampon çözeltisi içinde çözüldü.
3. 100 mM sorbitol çözeltisi: 0,182 g sorbitol alındı 10 mL 100 mM pH=9,5 olan Glisin/NaOH tampon çözeltisi içinde çözüldü.

AR enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4): 1,2 g NaH₂PO₄ tartılarak yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. pH= 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

SDH enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

5 mM KH₂PO₄, pH=7,0: 0,068 gr KH₂PO₄ alındı. 90 mL saf suda çözüldü. pH=7,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

AR enziminin diyalizinde kullanılan çözelti

5 mM β -merkaptöetanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4): 1,2 g NaH₂PO₄ tartılarak yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. İçerisine 72 μ L β -merkaptöetanol eklendi. pH=7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

SDH enziminin diyalizinde kullanılan çözeltiler

1. 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=7,9), (Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası yapılan diyalizde kullanılan tampon): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra içerisine 72 μL β -merkaptotanol eklenerek son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

2. 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=6,2), (DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonrası yapılan diyalizde kullanılan tampon): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=6,2'ye getirildikten sonra içerisine 72 μL β -merkaptotanol eklenerek son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4), (DEAE-Sephadex iyon değişim kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tampon): 1,2 g NaH_2PO_4 tartılarak yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. pH= 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4), (Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonunda kullanılan tampon): 1,2 g NaH_2PO_4 tartılarak yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. pH= 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

AR için hazırlanan afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4), (2'5' ADP-Sepharose afinite kolonunun dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tampon): 1,2 g NaH_2PO_4 tartılarak yaklaşık

900 mL saf suda çözüldü. pH= 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

SDH için hazırlanan DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=7,9): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH=7,9'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

SDH için hazırlanan CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

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

SDH için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

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

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:

1. 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL; protein tayini için kullanılan çözelti): 1 mg standart serum albuminin 1 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, 1M HCl ile pH=8,8'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8):12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, 1M HCl ile pH=6,8'e getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 mL saf suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 mL ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8,0)'den 0,5 mL, %10'luk SDS'den 1 mL, %100'lük gliserinden 1 mL ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su karıştırılarak elde edildi.
11. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü.Bu

çözeltiyeye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi.Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 mL 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler:

1. Tespit çözeltisi: (60 mL saf su, 30 mL %96'lik etanol, 10 mL asetik asit)
2. Redüksiyon çözeltisi: (4,8 g Sodyum asetat, 45 mL Etanol ve 80 mL saf su karıştırıldı, pH=6'ya asetik asit ile ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutaraldehit eklenerek toplam hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı).
3. Boyama çözeltisi: (150 mg gümüş nitrat, 150 mL saf su, 30 µl formaldehit)
4. Yıkama çözeltisi 1: (3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su ve 120 µl formaldehit)
5. Yıkama çözeltisi 2: (1 mL gliserin ve %5'i asetik asit olan 250 mL saf su)

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin hazırlanması

1. 0,548 M Sefotaksim çözeltisi: 500 mg sefotaksim tartılıp, hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı.
2. 0,314 M Gentamisin sülfat çözeltisi: 150 mg gentamisin sülfat tartılıp, hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.
3. 0,109 mM Tylosin çözeltisi: 50 mg Tylosin tartılıp, hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
4. 0,18 M Seftriakson Disodyum 3,5 H₂O: 1 g Seftriakson Disodyum 3,5 H₂O tartılıp, hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
5. 0,0345 M Vankomisin HCl: 1 g Vankomisin HCl tartılıp, hacim saf su ile 20 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 20 kat seyreltildi.
6. 0,294 M Sefuroksim Sodyum: 250 mg Sefuroksim Sodyum tartılıp, hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
7. 0,55 M Sefozolin Sodyum: 1 g Sefozolin Sodyum tartılıp, hacim saf su ile 4 mL'ye tamamlandı.

8. 0,737 M Linkomisin HCl: 600 mg Linkomisin HCl tartılıp, hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı.
9. 0,073 M Amikasin Sülfat: 100 mg Amikasin Sülfat tartılıp, hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı.
10. 6 mM Siprofloksasin: 400 mg Siprofloksasin tartılıp, hacim saf ile 10 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
11. 0,183 M Seftazidim pentahidrat : 1 gr Seftazidim Pentahidrat tartılıp, hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
12. 0,715 M Ampisilin: 1 gr ampisilin tartılıp, hacim saf su ile 4 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 5 kat seyreltildi.
13. 0,029 M Metronidazol: 500 mg Metronidazol tartılıp, hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
14. 0,515 M Kloramfenikol: 1 gr kloramfenikol tartılıp, hacim saf su ile 6 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 kat seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü

Kullanılan çözeltiler:

1. 0,8 M Na-fosfat tamponu, pH=5,5
2. 0,11 mM NADPH çözeltisi
3. 4,7 mM DL-gliseraldehit çözeltisi

AR enziminin aktivite ölçümü Cerelli ve arkadaşlarının (1986) kullandığı prosedür modifiye edilerek yapıldı. Reaksiyon ortamı, 0,25 mL Na-fosfat tamponu, 0,1 mL NADPH ve 0,45 mL saf su üzerine 0,1 mL izole edilen enzim eklenerek hacim 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Reaksiyon, yukarıda hazırlanan küvete 0,1 mL DL-gliseraldehit ilavesi ile başlatıldı. Spektrofotometre kullanılarak 340 nm'de ve oda sıcaklığında NADPH konsantrasyonundaki azalma 3 dakika süresince takip edildi. Daha

sonra absorbans değerleri lineer olan aralıklar tespit edilip, eğim hesaplamaları yapıldı. Eğim değerleri, aşağıdaki formüle uygulanarak enzimin aktivitesi U/L cinsinden hesaplandı.

$$U/L = \Delta A \times V(L) \times 1000 \text{ (}\mu\text{mol/dk}^{-1}/\text{L}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta t = v(L) \varepsilon \times d$$

$$\Delta A = \text{Test t} \ddot{u}\text{p} \ddot{u}\text{ndeki absorbans farkı}$$

$$\Delta t = \text{Zaman (dakika)}$$

$$\Delta A / \Delta t = \text{Eğim}$$

$$\varepsilon = \text{Ekstinsiyon Katsayısı (3.4} \times 10^2 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}\text{)}$$

$$d = \text{Işık Yolu (10 mm)}$$

$$V(L) = \text{Total hacim}$$

$$v(L) = \text{Enzim hacmi}$$

3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbans gstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan b}t}n fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz k}vetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede k}re karşı okundu.

3.2.2.b. Kantitatif protein tayini

Hazırlanan homojenat, amonyum s}lfat }okt}rmesi ile elde edilen enzim }ozeltisi ve saflaştırılan enzim i}in kantitatif protein miktarı Bradford metoduna g}re belirlendi. Bu y}ntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir y}ke sahiptir ve protein }zerindeki pozitif y}ke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\text{max}}=465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{\text{max}}=595 \text{ nm}$) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi

forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 µg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konularak. saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 5 mL Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik cam küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ile 5 mL Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 20 kat veya daha çok seyreltme yapıldı. Elde edilen seyreltilmiş çözeltilerden 3 ayrı tüpe sırasıyla 50, 100 ve 200 µl alınarak üzerlerine 5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.3. Sığır böbrek AR enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması

İzolasyon işlemi için, -80°C'de saklanmış dokular, ağırlıklarının (gr) 3 katı 5 mM β-merkaptoetanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile sıvı azot kullanılarak dondurma-çözme esasına göre homojenize edildi. Daha sonra elde edilen homojenat, +4°C'de 13.500g'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Amonyum sülfat çöktürmesi proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Sığır böbreğinden elde edilen homojenat sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 ve %70-80 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çöktürme işlemlerinden sonra homojenat +4°C, 13.500g'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen pelletler, homojenat tamponu içerisinde çözülerek aktivite ölçümü yapıldı ve çöktürme aralığı belirlendi. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77xVx(S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda AR aktivitesinin tamamının %0-70 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında %0-70 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Elde edilen numune 13500g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (10 mM NaH₂PO₄, pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.3.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (5 mM β -merkaptolanol içeren, 10 mM Na-fosfat pH=7,4) karşı 2 defa diyaliz edildi. Diyaliz işlemi +4°C’de gerçekleştirildi.

3.2.3.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

Çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılacak DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 100-120 mL yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 mL saf suya konularak 80-90°C’de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 mL soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 mL 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm 2x30 cm boyutundaki kolona doldurulduktan sonra 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 mL/saat’e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek santrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. AR enzimi kolona tutunmayıp yıkamada aynen alındı. Alınan enzim numuneleri birleştirilerek jel filtrasyon kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirildi.

3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olarak kullanılan Sephadex G-100 den 5 g alınıp 200 mL su da oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH=7,0 olan 200 mM Na- fosfat tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve pakatlendi. Kolonu dengelemek için 10 mM pH=7,4 olan Na-fosfat tamponu kullanıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 mL/saat’e ayarlandı. Dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçirilerek ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun 280 nm’de absorbansı ile pH değerinin aynı olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı. Dengelenmiş kolona numunelerin tatbiki için kolonun üzerindeki kapalı sistem açıldı ve

jelin üzerinde birikmiş tamponun emilmesi beklendi. Tampon oranı jel seviyesine indiğinde iyon değişim kolonundan elüe edilip 0,25 mL gliserol ile karıştırılan enzim numunesi jelin üzerine tatbik edildi. Numune tatbik edildikten sonra numunenin jel seviyesine inmesi beklendi ve daha sonra tampon ilave edildi. Stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı. Daha sonra elüatlar alınmaya başlandı ve alınan elüatlarda 280 nm de absorbans değerlerine bakılıp elüat ve kör olarak kullanılan elüsyon tamponunun absorbans farkı sıfır olana kadar elüatlar alındı ve kaydedildi.

3.2.3.f. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve sığır böbrek AR enziminin saflaştırılması

10 mL'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 mL saf su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındı ve daha sonra dengeleme tamponu (5 mM β -merkaptotanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4)) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla Na-fosfat tamponu ile yıkanarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tampon çözeltide 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Elde edilen çözelti tampon ile dengelenmiş olan kolana uygulandı. Daha sonra kolon 5 mM β -merkaptotanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm'deki absorbans değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Daha sonra 0,2-2,5 mM NaCl gradientli Na-fosfat tampon çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve AR enzimi elde edildi.

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

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkanarak her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yağma jeli hazırlanarak jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yağma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yağma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakaları birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılarak üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi ve önce 80 voltta 20 dakika yürütülerek ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak boya jelin alt sınırına gelinceye kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel çıkarıldı ve protein bantlarının belirgin hale gelmesi için gümüş boyama metodu uygulandı. Bunun için çıkarılan jel, 60 mL saf su, 30 mL etanol ve 10 mL asetik asit karışımından oluşan tespit çözeltisinde, bir shaker yardımıyla, yarım saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra jel redüksiyon çözeltisi içine alınarak yine yarım saat boyunca karıştırıldı. 15 dk, 5'er dakika arayla 3 defa saf su ile yıkanır. Taze hazırlanmış boyama çözeltisi içine alınan jel, 20 dakika süreyle boyanır. Saf sudan geçirildikten sonra 1.yıkama çözeltisi içine alınır ve protein bantları belirginleşinceye kadar beklenir. Jelin

kararmaması için bu işlem kısa tutulmalıdır. Protein bantlarının iyice belirginleşmesi ve netleşmesi için 2. yıkama çözeltisinde yarım saat bekletilir. Son olarak jelin fotoğrafı çekilir.

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 5 mL 1M Tris-HCl (pH=8,8), 4,4 mL %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10'luk SDS, 0,130 mL %5'lik TEMED, 0,2 mL %10'luk PER ve 3,13 mL saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,410 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,4 mL %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED, 0,05 mL %10'luk PER ve 2,45 mL saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karışıma eklenerek jel hazırlandı.

3.2.5. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.5.a. AR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

AR enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 ve 8,0 olan 0,8 M Na-fosfat, tamponları hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi (Soyut and Beydemir 2008).

3.2.5.b AR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

AR enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH belirlendikten sonra optimum pH'da 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM Na-Fosfat tamponları kullanılarak belirlendi (Soyut and Beydemir 2008).

3.2.5.c. AR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

AR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 60°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı (Demir *et al.* 2009).

3.2.5.d. AR enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 ve 8,0 olan Na-fosfat tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 mL'si 1 mL enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 4 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi (Soyut *et al.* 2008).

3.2.5.e. DL-Gliseraldehit substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

DL-Gliseraldehit substratı için sığır böbrek dokusundan saflaştırılan AR enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.6. Sığır böbrek AR enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi

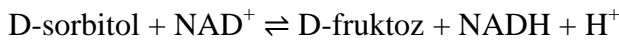
Sığır böbrek AR enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla kuvvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman kuvvete katılan

tampon hacmi azaltılarak ilaç konsantrasyonu artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.6.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla sığır böbreği AR enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max}=V_{I_{max}}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

3.2.7. Sığır böbrek SDH enziminin aktivitesinin ölçümü



Reaksiyonuyla NAD⁺ 'nin indirgenmesi sonucu oluşan absorbans artışı 340 nm'de üç dakika süreyle ölçüldü. Bunun için 1 mL'lik kuvarz küvet içerisinde 50 mM Glisin/NaOH tamponu (pH=10,0), 10 mM sorbitol, 470 µM NAD⁺ ve enzim olacak şekilde hazırlandı (Lindstad *et al.* 1992). 340 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. NADH'in milimolar ekstinksiyon katsayısı aktivitenin hesaplanması için kullanıldı. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺), SDH tarafından sorbitol varlığında indirgenir. NADH'in oluşum oranı SDH aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. SDH aktivitesinin üniteleri dakika başına okside olan

sorbitol'un mikro molünü verir. Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

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

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : β -NADH 'ın 340 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3.2.8. Protein tayini

3.2.8.a. Kalitatif protein tayini

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

3.2.8.b. Kantitatif protein tayini

Sığır böbreği numunesinden hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi, CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya

olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976). Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bu amaçla 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirildi. Tüplere Sığır böbreğinden elde edilen homojenattan ve saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er mL konularak üzerine 5'er mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metotla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve homojenatta protein tayini yapıldı.

3.2.9. Sığır böbrek SDH enziminin saflaştırılması

3.2.9.a. Homojenat hazırlanması

Deneyde kullanılan sığır böbrek dokusu taze olarak temin edildi. Doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 mL/g olacak şekilde 5 mM KH_2PO_4 (pH=7,0) tampon

çözeltisinin içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.9.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır. Sığır böbreğinden elde edilen SDH enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. çöktürme işlemleri sırasında 13000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katıldı ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözülmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda SDH aktivitesinin tamamının %40-70 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında ilk basamak olarak %30-70 amonyum sülfat kesitlemesi uygulandı. Önce %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi

yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı (böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı çökelek çözünbileceği minimum fosfat tamponunda (5 mM KH_2PO_4 , pH=7,9) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.9.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (1mM β -merkaptoetanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH=7,9) karşı 2 defa diyaliz edildi. Diyaliz işlemi sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.9.d. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

Çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılan DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 100-120 mL yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 mL saf suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 mL soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 mL 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm \times 30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,9) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 mL/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek ultrasantrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. SDH enzimi DEAE-Sephadex kolon materyaline tutunmadığından, kolonu dengeleme işleminde kullanılan 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,9) kullanılarak elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 mL/saat'e ayarlanarak yaklaşık 3 mL'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı, aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle 1mM β -merkaptoetanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH=6,2 olan tampona karşı

diyaliz edildi. Böylece birleştirilen elüat çözeltisi CM-sephadex C-50 katyon değişim kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numuneler için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.9.e. CM-Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi

Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Sephadex C-50 iyon değişim reçinesinin öncelikle şişirilmesi gerekir. Bu amaçla 100-120 mL yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 mL saf suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 mL soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 mL 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3cm2x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH=6,2) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 mL/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek DEAE Sephadex iyon değişim kolonundan toplanan ve diyaliz edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Daha sonra 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH=6,2) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponununun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 mL 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH=6,2) ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 mL 1,5 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başladı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 mL/saat'e ayarlanarak yaklaşık 2 mL'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.9.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olarak kullanılan sephadex G-100 den 5 g alınıp 200 mL suda oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH=7,0 olan 200 mM K- fosfat tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlenildi. Kolonu dengelemek için 5 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 mL/saat'e ayarlandı. Dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçirilerek ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun 280 nm'de absorbansı ile pH değerinin aynı olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı. Dengelenmiş kolona numunelerin tatbiki için kolonun üzerindeki kapalı sistem açıldı ve jelin üzerinde birikmiş tamponun emilmesi beklendi. Tampon oranı jel seviyesine indiğinde iyon değişim kolonundan elüe edilip 0,25 mL gliserol ile karıştırılan enzim numunesi jelin üzerine tatbik edildi. Numune tatbik edildikten sonra numunenin jel seviyesine inmesi beklendi ve daha sonra tampon ilave edildi. Stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı. Daha sonra elüatlar alınmaya başlandı ve alınan elüatlarda 280 nm de absorbans değerlerine bakılıp elüat ve kör olarak kullanılan elüsyon tamponunun absorbans farkı sıfır olana kadar elüatlar alındı ve kaydedildi.

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

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli

hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığıma jeli katıldıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi. Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 mL 1M Tris-HCl (pH=8,8), 3,3 mL %30 Akrilamid- %0,8 bisakrilamid, 0,15 mL %10'luk SDS, 0,1 mL %5'lik TEMED, 0,2 mL %1,5'lik PER ve 2,35 mL saf su karıştırıldı. Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,3325 mL %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,025 mL %10'luk SDS, 0,025 mL %5'lik TEMED, 0,05 mL %1,5'lik PER ve 1,84 mL saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen döküldü.

3.2.11. SDH enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.11.a. SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 ve 8,0 olan 0,2 M Na-fosfat, pH'ları 7,5 8,0 8,5 ve 9,0 olan 0,2 M Tris/HCl ve pH'ları 9,0

9,5 10,0 ve 10,5 olan 0,2 M Glisin/NaOH tamponları hazırlandı ve uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı, ayrı enzim aktivitesi belirlendi (Soyut and Beydemir 2008).

3.2.11.b. SDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH belirlendikten sonra optimum pH'da 20, 40, 60, 80, 160, 240, 480, 640, 800 mM Glisin/NaOH tamponları kullanılarak belirlendi.

3.2.11.c. SDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 60°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı (Demir *et al.* 2009).

3.2.11.d. SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 8,0 8,5 9,0 9,5 10,0 ve 10,5 olan Na-fosfat, Glisin/NaOH ve Tris/HCl tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 mL'si 1 mL enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 7 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi (Soyut *et al.* 2008).

3.2.11.e. Sorbitol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Sorbitol substratı için sığır böbrek dokusundan saflaştırılan SDH enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için 5 farklı sorbitol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.12. Sığır böbrek SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi

Sığır böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak ilaç konsantrasyonu arttırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.12.a. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

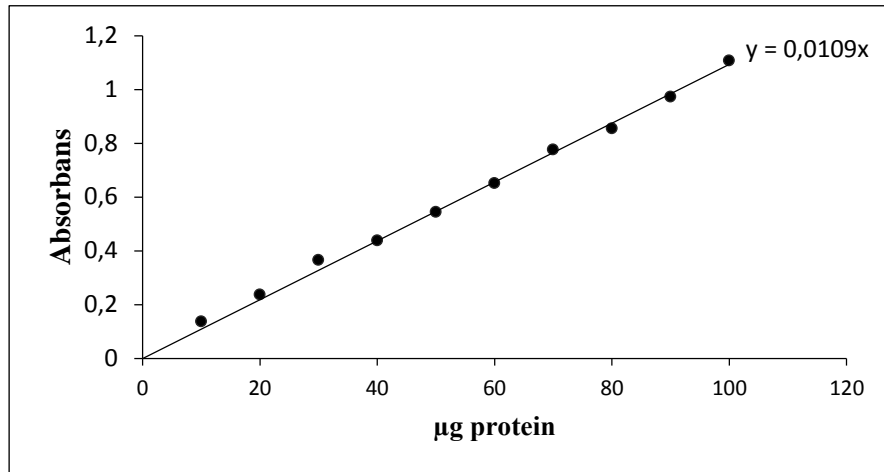
İnhibisyon çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değerleri hesaplanan bazı ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla Sığır böbreği SDH enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı

inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{\max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için $V_{\max}=V_{I_{\max}}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri 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 3.2.2.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 3.1’de gösterildi.

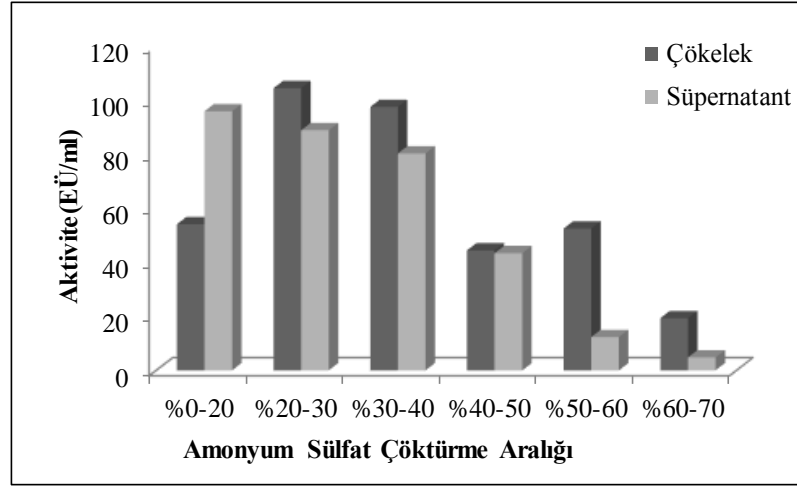


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Sığır Böbreğinden Aldoz Redüktaz Enziminin saflaştırılması

4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılarak çöktürme aralığı %0-%70 olarak belirlendi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı.



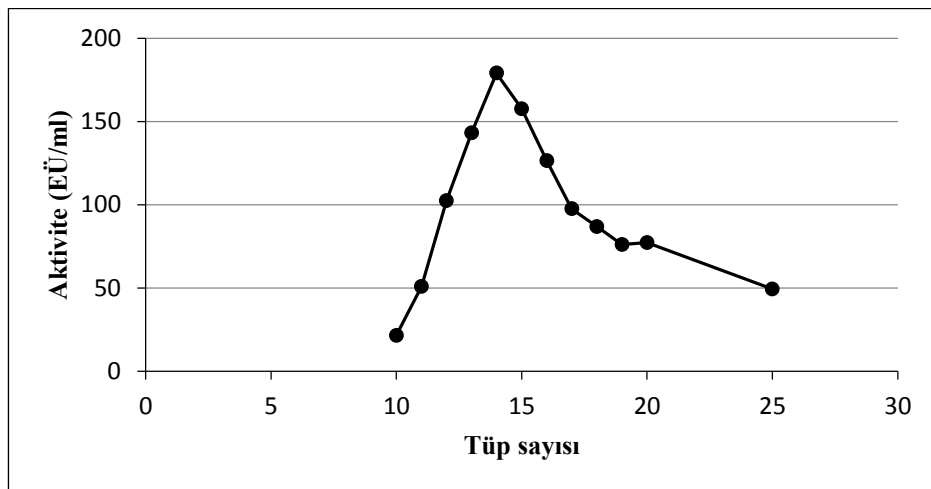
Şekil 4.2. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

4.2.2. Diyaliz

Bölüm 3.2.3.c’de anlatıldığı gibi diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Uygun diyaliz tamponu kullanılan yöntemle göre her defasında değiştirildi.

4.2.3. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

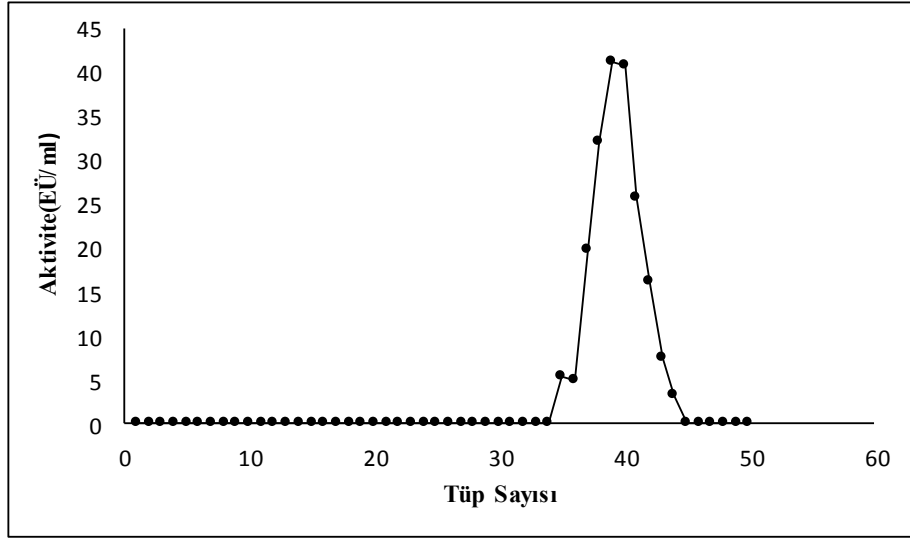
DE-52 selüloz iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.3.d’de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.3. İyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları

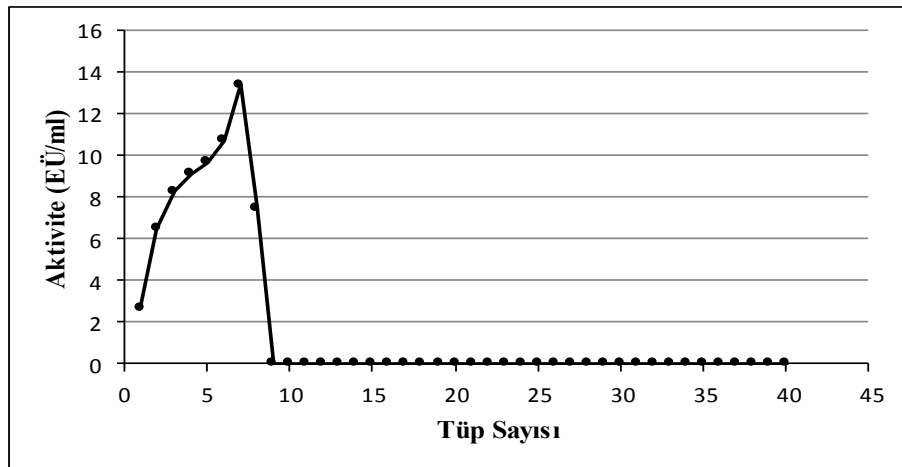
Jel filtrasyon kromatografisi bölüm 3.2.3.c'de anlatıldığı şekilde yapıldı.



Şekil 4.4. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.5. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları

2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi bölüm 3.2.3.f'de anlatıldığı gibi yapıldı.



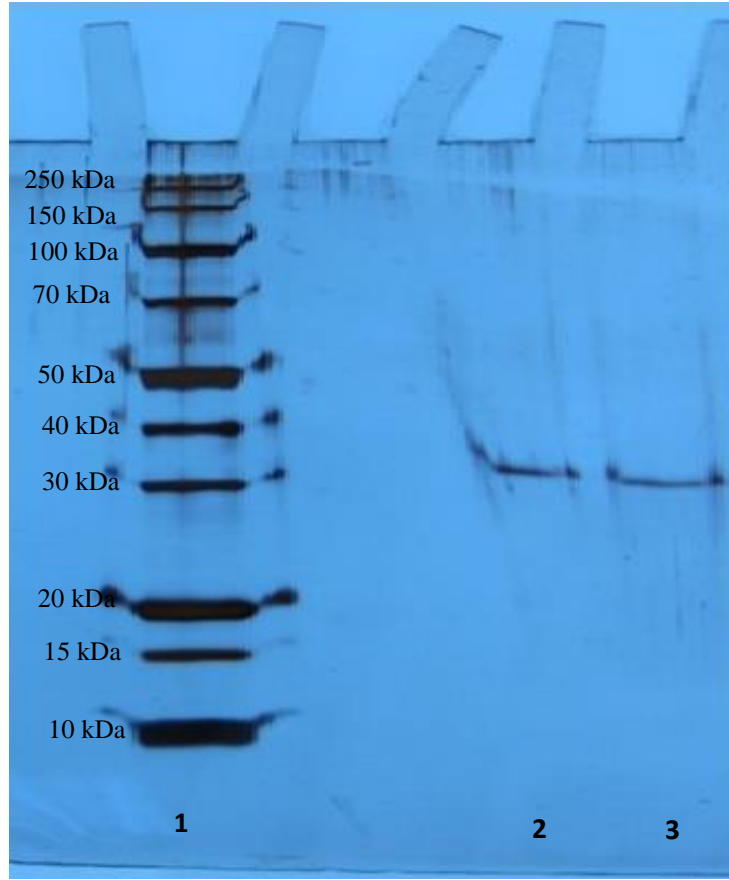
Şekil 4.5. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren grafik

Çizelge 4.1. Sığır böbreği aldoz redüktaz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	0,26	3,10	45	11,7	139,5	0,08	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ve Diyaliz	0,40	3,24	35	14,0	113,4	0,123	1,54	81,3
DEAE İyon Değişim Kromatografisi	0,33	1,44	25	8,20	35,87	0,228	2,85	25,7
Jel filtrasyon kromatografisi	0,30	0,81	22	6,60	17,82	0,370	4,63	12,8
Afinite kromatografisi	0,38	0,15	18	6,84	2,70	2,530	31,6	1,94

4.2.6. Sığır böbreğinden aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Sığır böbreği aldoz redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4.'de izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.6'da gösterildi.

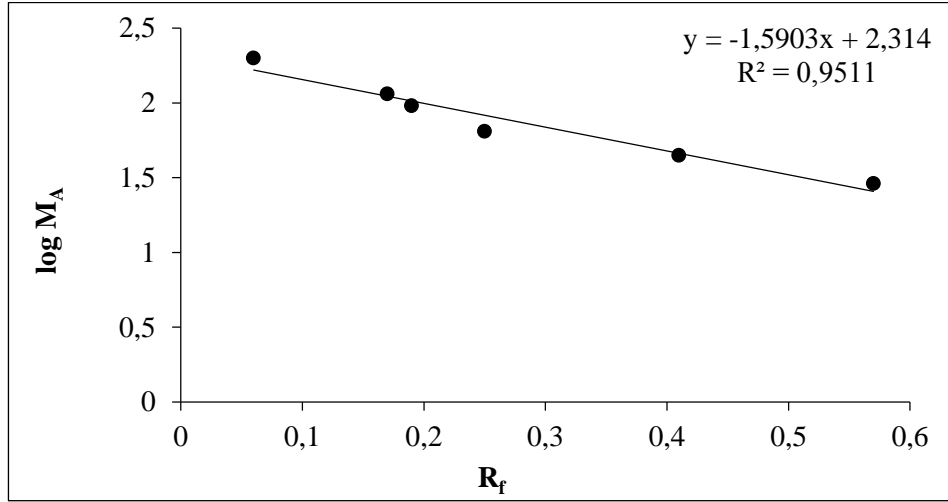


Şekil 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu standart proteinler (*1. kuyu standart proteinler (Thermo scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 2. ve 3. kuyu sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi

4.2.7. Sığır böbrek aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Elde edilen saf enzim SDS-PAGE’te yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.6) Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $\log MK-R_f$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.7). Grafikten faydalanarak Sığır böbreği aldoz redüktaz enziminin mol kütesi ise yaklaşık 37,5 kDa olarak hesaplandı.

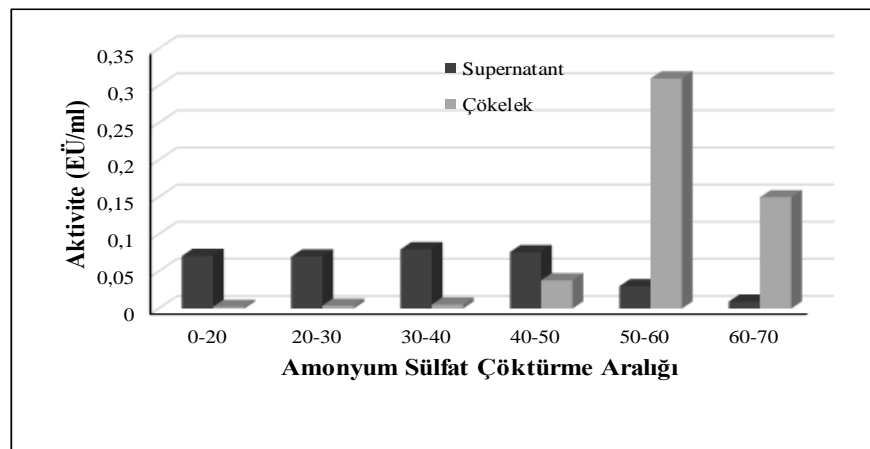


Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen log M_A-R_f grafiği

4.3. Sığır Böbreğinden SDH Enziminin Saflaştırılması

4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Bölüm 3.2.9.b'de anlatıldığı gibi amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılarak çöktürme aralığı %40-%70 olarak belirlendi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı.



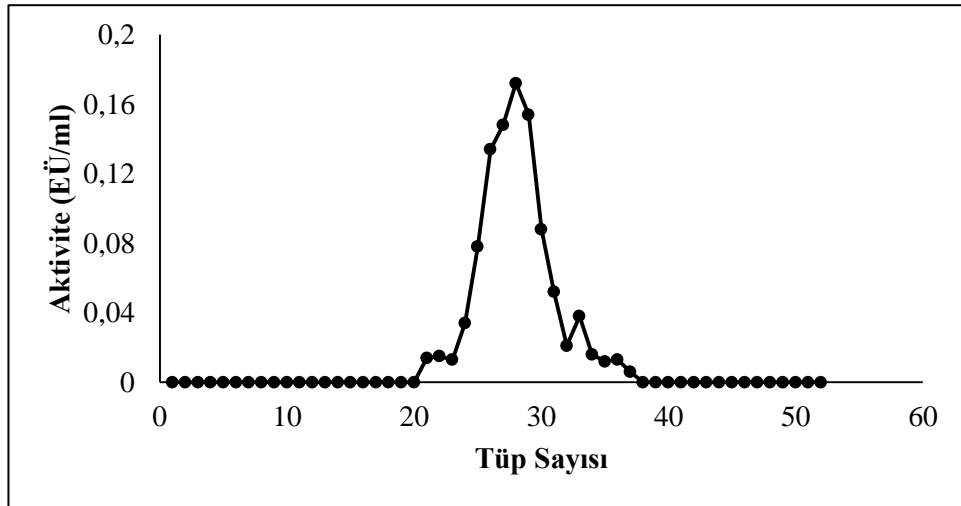
Şekil 4.8. Sığır böbrek SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

4.3.2. Diyaliz

Bölüm 3.2.9.c’de anlatıldığı gibi diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Uygun diyaliz tamponu kullanılan yöntemle göre her defasında değiştirildi.

4.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçları

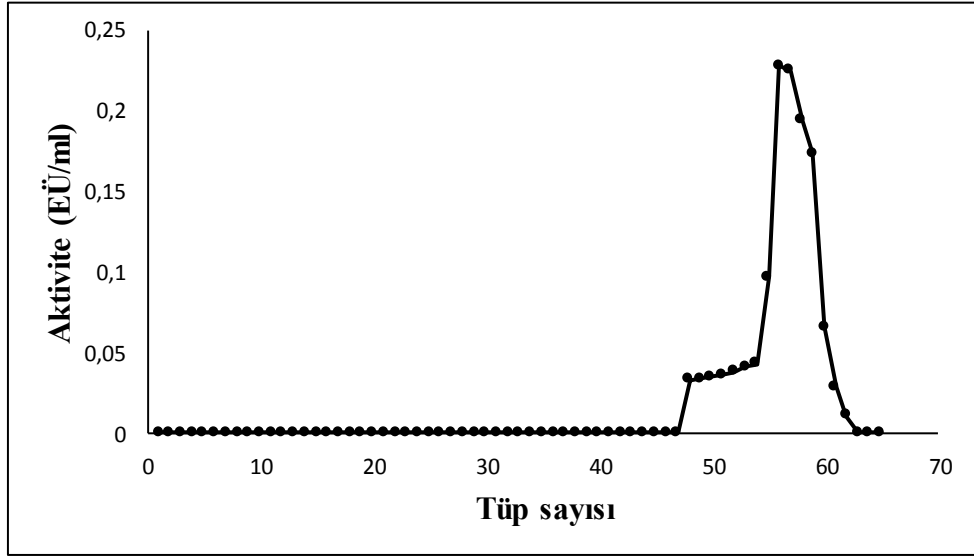
DEAE- sephadex iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.9.d’de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.9. DEAE- sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.4. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

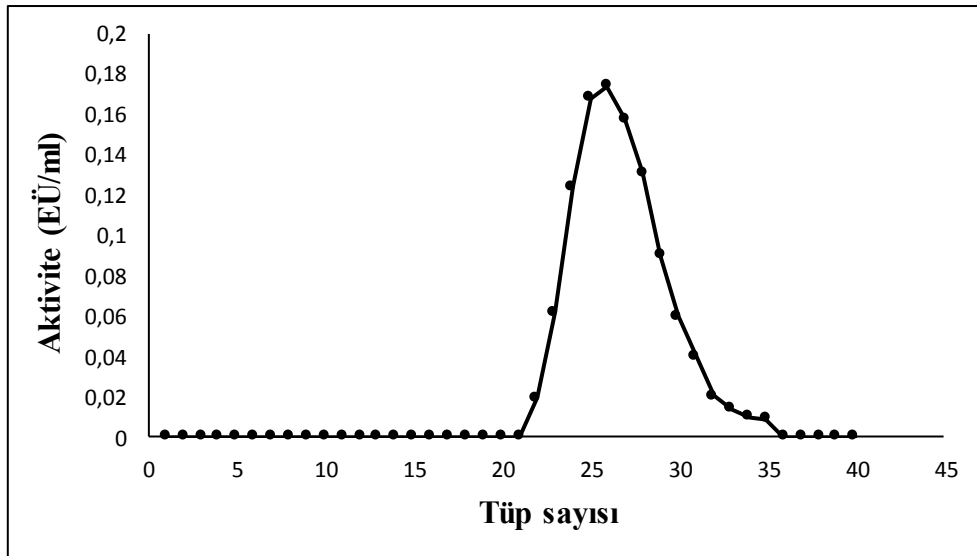
CM-selüloz iyon değişim kromatografisi Bölüm 3.2.9.e’de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.10. CM-selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları

CM-selüloz iyon değişim kromatografisi Bölüm 3.2.9.f'de anlatıldığı gibi yapıldı.



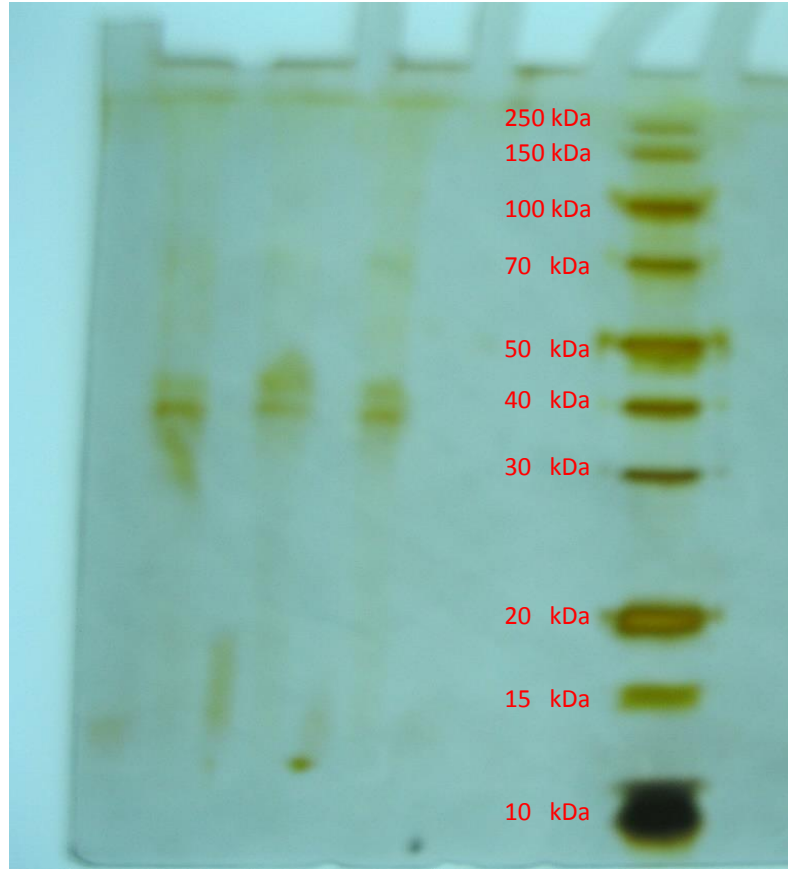
Şekil 4.11. Sığır böbreği Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

Çizelge 4.2. Sığır böbreği SDH enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	0,277	1,992	45	12,46	89,64	0,14	1	100
(NH₄)₂SO₄ Çöktürmesi ve Diyaliz	0,381	1,815	30	11,43	54,45	0,21	1,50	60,74
DEAE İyon Değişim Kromatografisi	0,312	1,25	24	7,49	30,0	0,25	1,78	33,47
CM iyon değişim Kromatografisi	0,286	1,015	20	5,72	20,3	0,28	2,00	22,65
Jel filtrasyon Kromatografisi	0,35	0,14	15	5,25	2,1	2,50	17,9	2,34

4.3.6. Sığır böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Saflaştırma işlemleri sonucu Sığır böbreği SDH enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.10'da izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve elektrik alanda yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.12'de gösterildi.

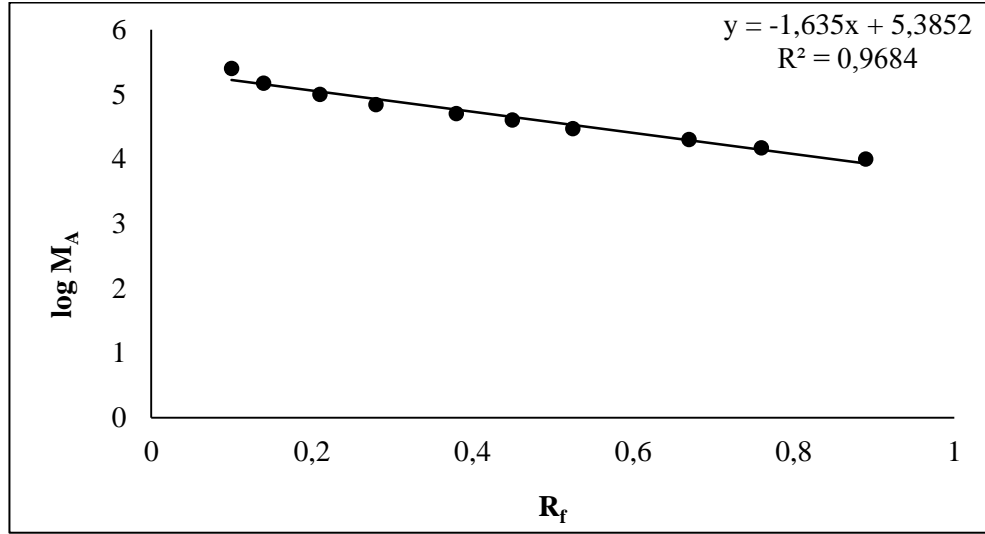


Şekil 4.12. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1. kuyu standart proteinler (Thermo scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 2, 3 ve 4. kuyu Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi

4.3.7. Sığır böbrek SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Elde edilen saf enzim SDS-PAGE’te yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.12) Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $\log M_A-R_f$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.13). Grafikten faydalanarak Sığır böbreği SDH enziminin mol kütesi ise yaklaşık 37,56 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.13. SDS-PAGE sonucu çizilen log M_A-R_f grafiği

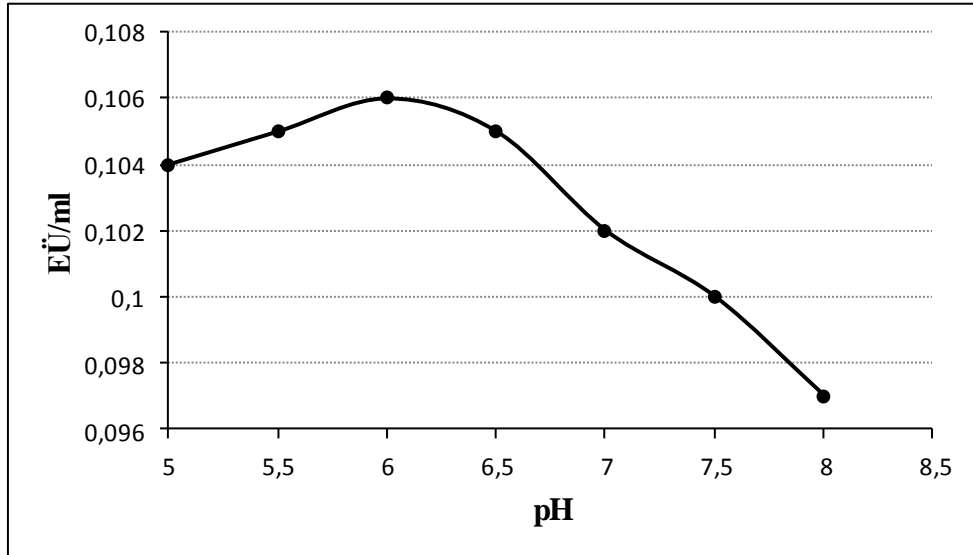
4.4. Sığır Böbreği Aldoz Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.4.1. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için optimum pH Bölüm 3.2.5.a'da anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 ve 8,0 olan 800 mM Na-fosfat tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.3). Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için optimum pH=6,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 800 mM Na-fosfat tamponu kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,104
5,5	0,105
6,0	0,106
6,5	0,105
7,0	0,102
7,5	0,100
8,0	0,097



Şekil 4.14. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği

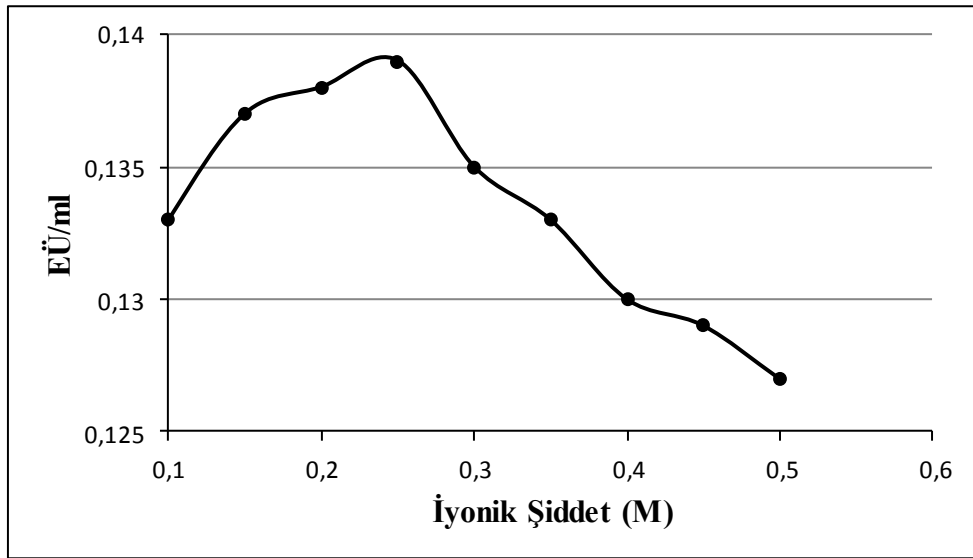
4.4.2. Sığır böbrek aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddet belirlenmesi amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda uygunluğu belirlenen Na-fosfat tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.2.5.b.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Na-fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Na-fosfat konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz

enzim için en uygun iyonik şiddetin 250 mM Na-fosfat (pH=6,0) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=6,0) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Na-fosfat] (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
25	0,111
50	0,128
100	0,133
150	0,137
200	0,138
250	0,139
300	0,135
350	0,133
400	0,130
450	0,129
500	0,127



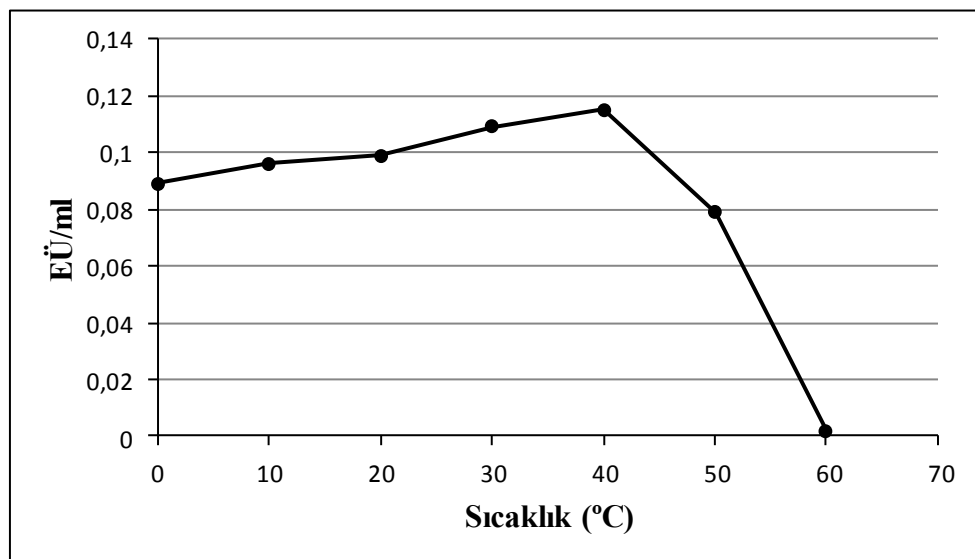
Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=6,0) tampon çözeltileri kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.4.3. Sığır böbrek aldöz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Sığır böbreğinden saflaştırılan aldöz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 200 mM Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 60°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.5.c.'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da ve Çizelge 4.5'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 40°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldöz redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

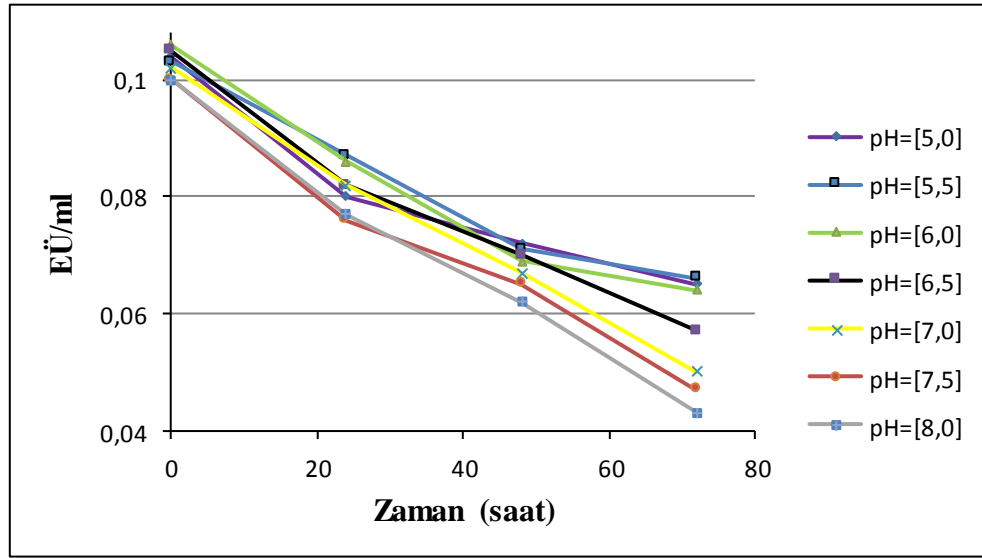
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
5	0,089
10	0,096
20	0,099
30	0,109
40	0,115
50	0,079
60	0,002



Şekil 4.16. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldöz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.4.4. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

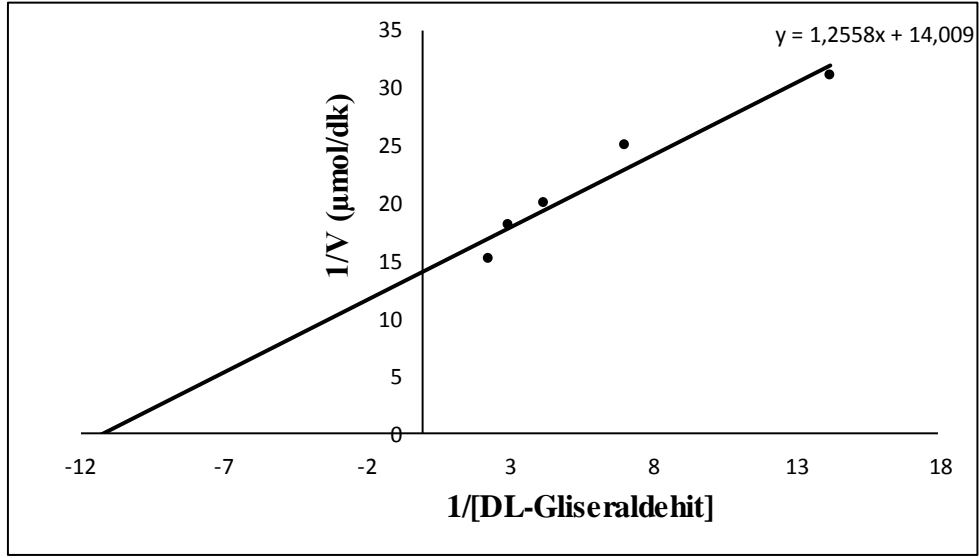
Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin stabil pH'sını belirlemek üzere Bölüm 3.2.5.d'de anlatıldığı gibi stabil pH çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu stabil pH=5,5 olarak tespit edildi.



Şekil 4.17. Değişik pH'lardaki NaH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek AR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.4.5. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere bölüm 3.2.5.e'de anlatıldığı gibi K_M - V_{max} çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu K_M 0,089 mM ve V_{max} 0,07 EU/mL olarak tespit edildi.



Şekil 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan aldöz redüktaz enziminin için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

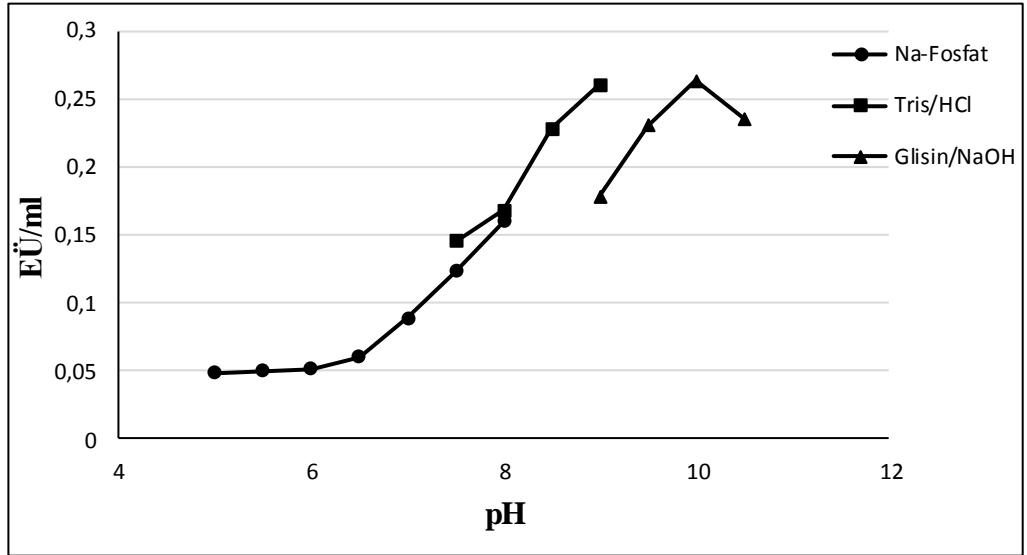
4.5. Sığır Böbrek SDH Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.5.1. Sığır böbrek SDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için optimum pH Bölüm 3.2.11.a'da anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 ve 8,0 olan 200 mM Na-fosfat, pH'ları 7,5 8,0 8,5 ve 9,0 olan 200 mM Tris/HCl, pH'ları 9,0 9,5 10,0 ve 10,5 olan 200 mM Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.19 ve Çizelge 4.6). Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için optimum pH Glisin/NaOH tamponunda 10,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.6. 200 mM Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,048
5,5	0,050
6,0	0,051
6,5	0,060
7,0	0,089
7,5	0,123
7,5	0,145
8,0	0,160
8,0	0,168
8,5	0,228
9,0	0,260
9,0	0,178
9,5	0,230
10,0	0,263
10,5	0,235



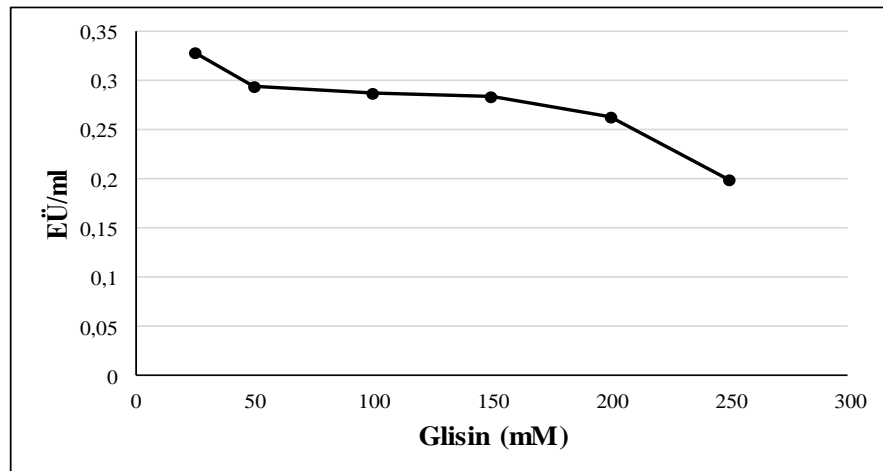
Şekil 4.19. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği

4.5.2. Sığır böbrek SDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Glisin/NaOH tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.2.11.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı glisin konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak glisin konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için en uygun iyonik şiddetin 25 mM glisin/NaOH (pH=10,0) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.20 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum iyonik şiddeti için Glisin/NaOH (pH=10,0) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Glisin/NaOH] (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
25	0,328
50	0,294
100	0,287
150	0,283
200	0,263
250	0,199



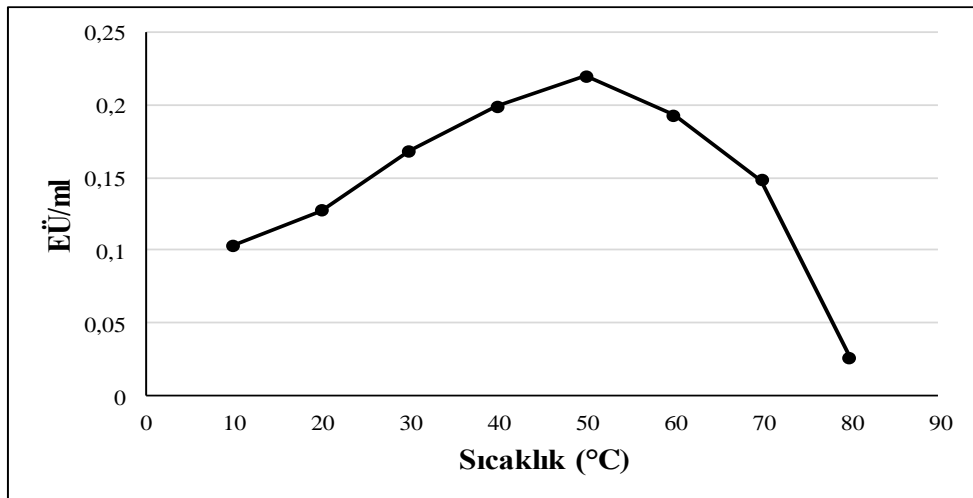
Şekil 4.20. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH (pH=10,0) tampon çözeltisi kullanılarak Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzimi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.5.3. Sığır böbreği SDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 25 mM Glisin/NaOH (pH=10,0) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 80°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere Bölüm 3.2.11.c'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.8. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

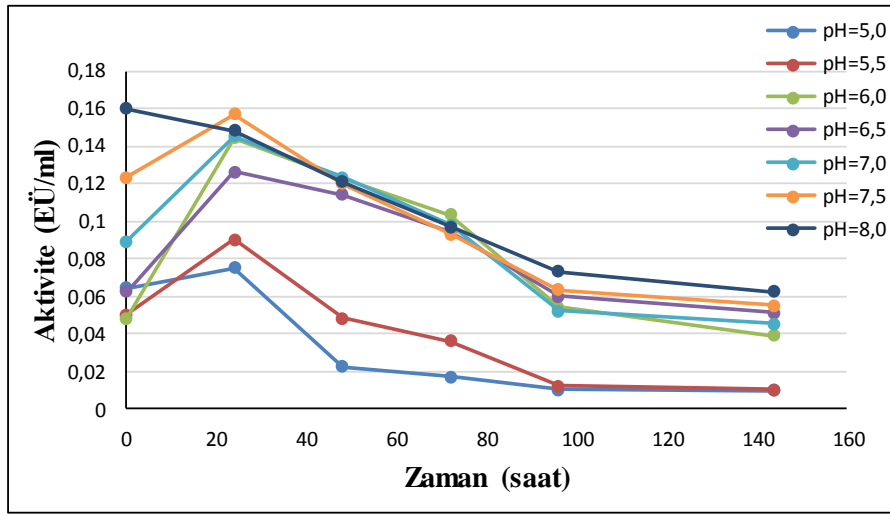
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
10	0,185
20	0,215
30	0,220
40	0,226
50	0,242
60	0,201
70	0,104
80	0,041



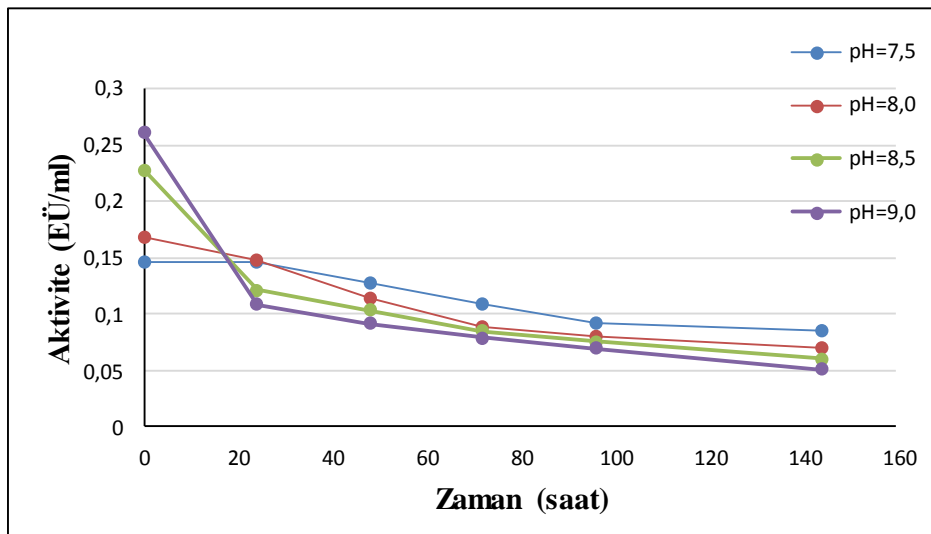
Şekil 4.21. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.5.4. Sığır böbreği SDH enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

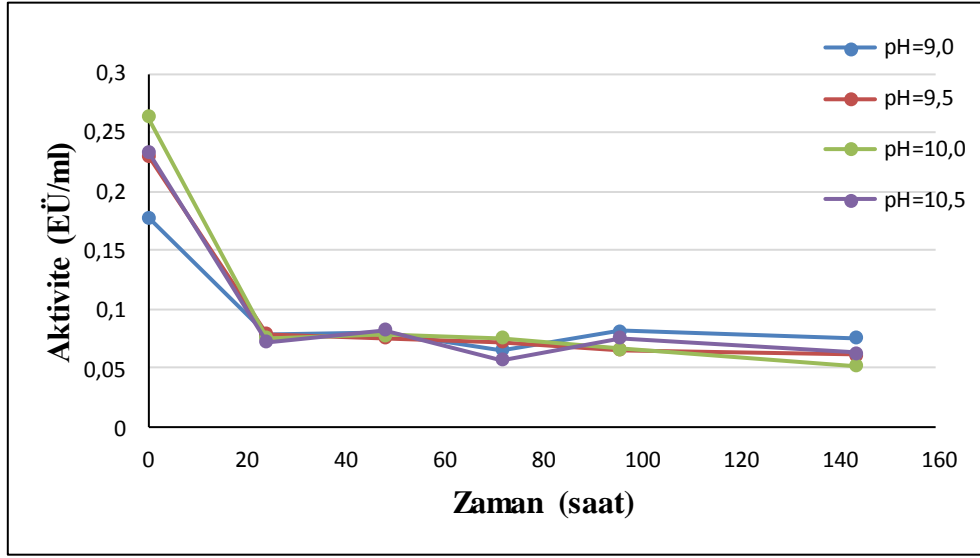
Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin stabil pH'sını belirlemek üzere bölüm 3.2.11.d'de anlatıldığı gibi stabil pH çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te gösterildi. Bu çalışmalar sonucu stabil pH=8,0 olarak tespit edildi.



Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki NaH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



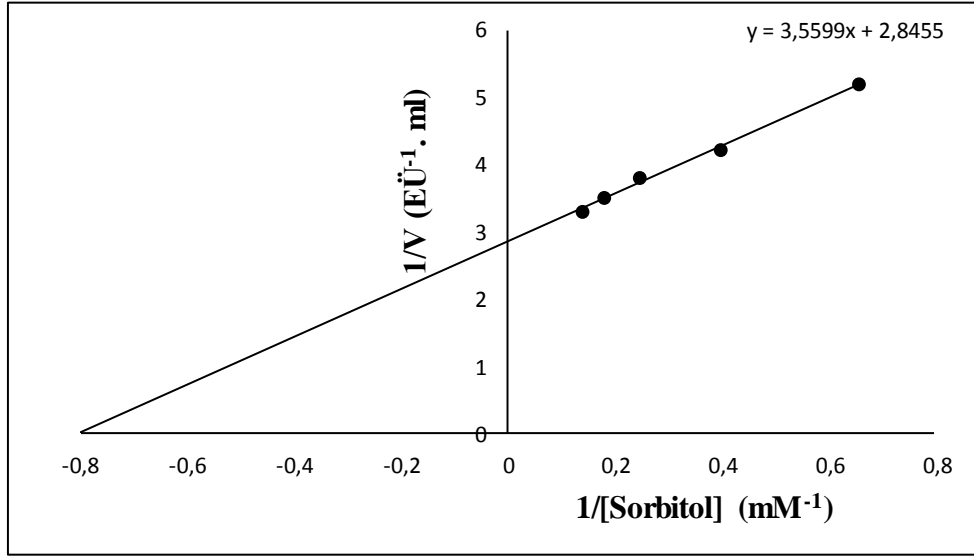
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği



Şekil 4.24. Değişik pH'lardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek SDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.5.5. Sığır böbrek SDH enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere bölüm 3.2.11.e'de anlatıldığı gibi K_M - V_{max} çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.25'te gösterildi. Bu çalışmalar sonucu K_M 1,25 mM ve V_{max} 0,351 EU/mL olarak tespit edildi.



Şekil 4.25. Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enziminin için 5 farklı Sorbitol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

4.6. Sığır Böbrek Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve yok edilmesine inhibisyon denir. Buna neden olan bileşiklere ise inhibitör adı verilir (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

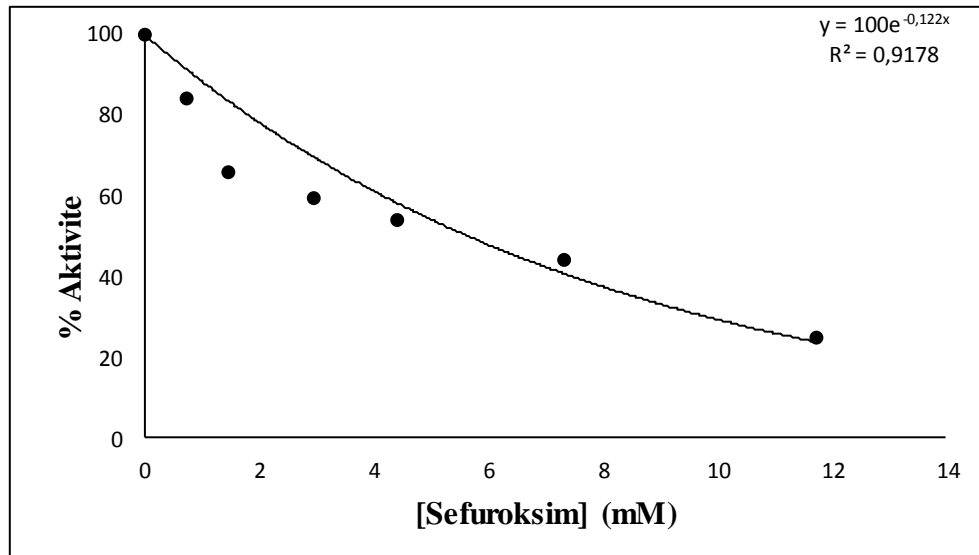
Yarışmalı inhibisyonda yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Fakat enzime dönüşümlü bağlanan inhibitörün substrat konsantrasyonu artırıldığı durumlarda inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Başka bir ifadeyle enzimin V_{max} değeri değişmezken K_M değerinde artış gözlenir (Segel *et al.* 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ile substrat arasında enzimin aktif bölgesine bağlanma hususunda bir yarış söz konusu değildir. Çünkü inhibitör enzimin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Telefoncu 1986;

Keha ve Küfrevioğlu 2009). Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için $K_M I = K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max} I = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Bu çalışma kapsamında sığır böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.9. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi

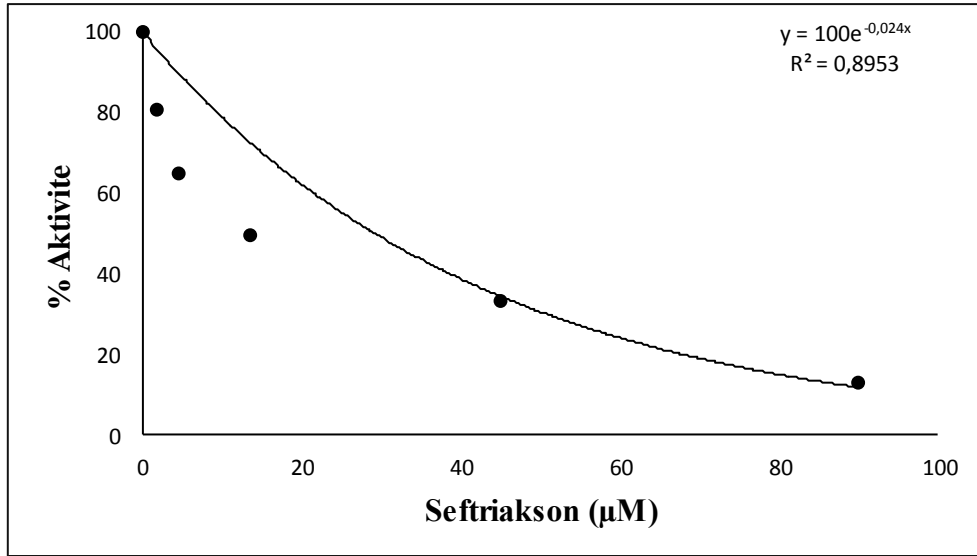
%Aktivite	[Sefuroksim Sodyum] mM
100	0
84,0	0,735
65,0	1,470
59,7	2,910
54,0	4,410
44,0	7,350
25,0	11,76



Şekil 4.26. Sefuroksim Sodyum'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.10. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine seftriakson'un etkisi

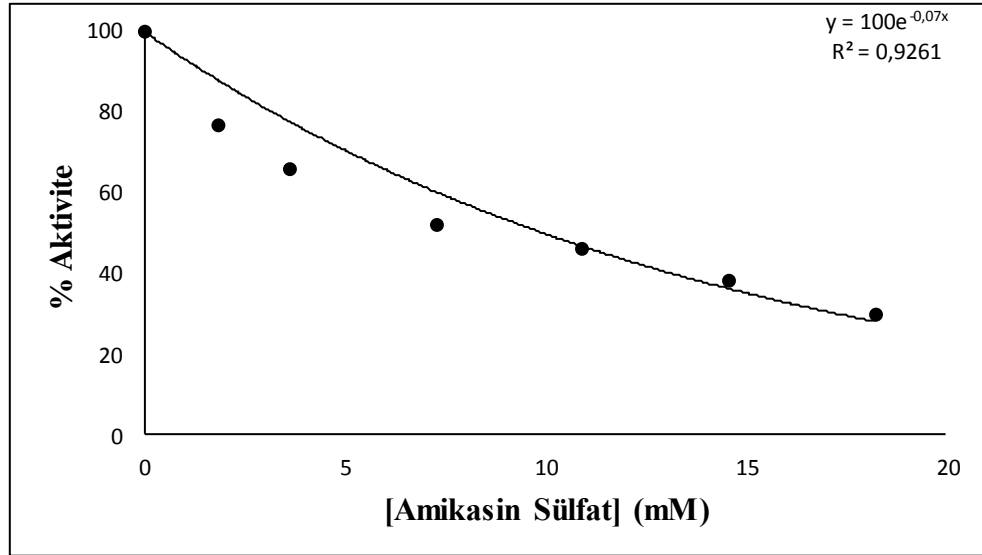
%Aktivite	[Seftriakson] μM
100	0
80,9	1,80
65	4,50
49,7	13,5
33,33	45,0
13	90,0



Şekil 4.27. Seftriakson'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.11. Sığır böbreği aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi

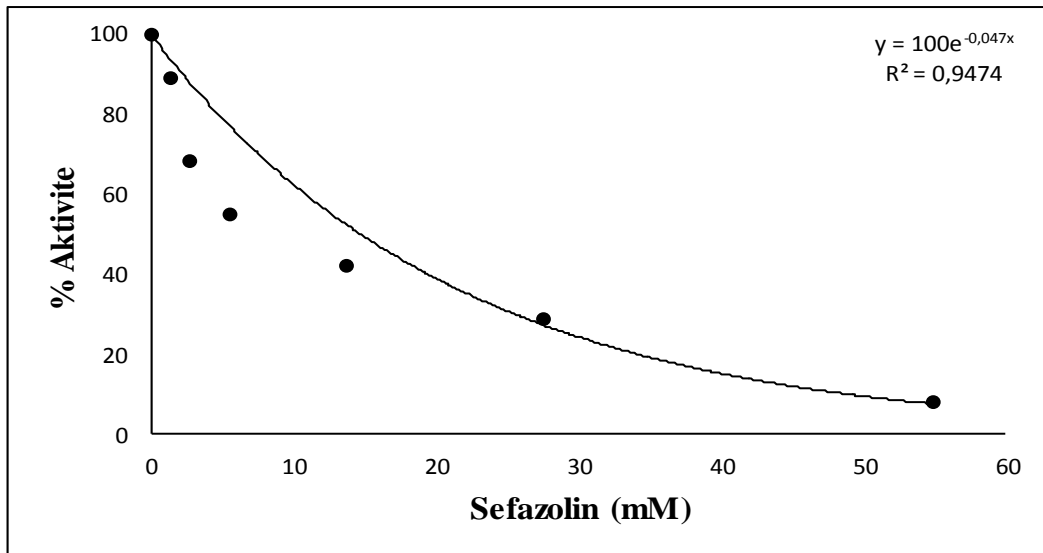
%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
76,57	1,825
65,7	3,65
52	7,3
46,3	10,95
38,3	14,6
30	18,25



Şekil 4.28. Amikasin sülfat'ın sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.12. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi

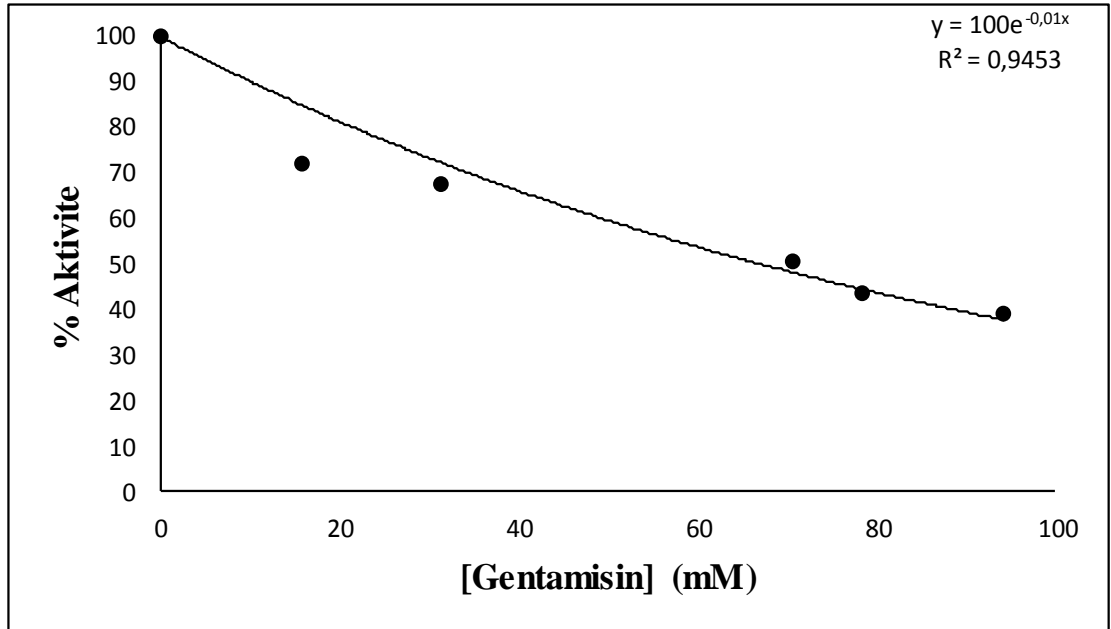
%Aktivite	[Sefazolin Sodyum] mM
100	0
89,1	1,370
68,5	2,750
55	5,500
42,2	13,75
28,9	27,50
8,1	55,00



Şekil 4.29. Sefazolin sodyum'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.13. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine gentamisin'in etkisi

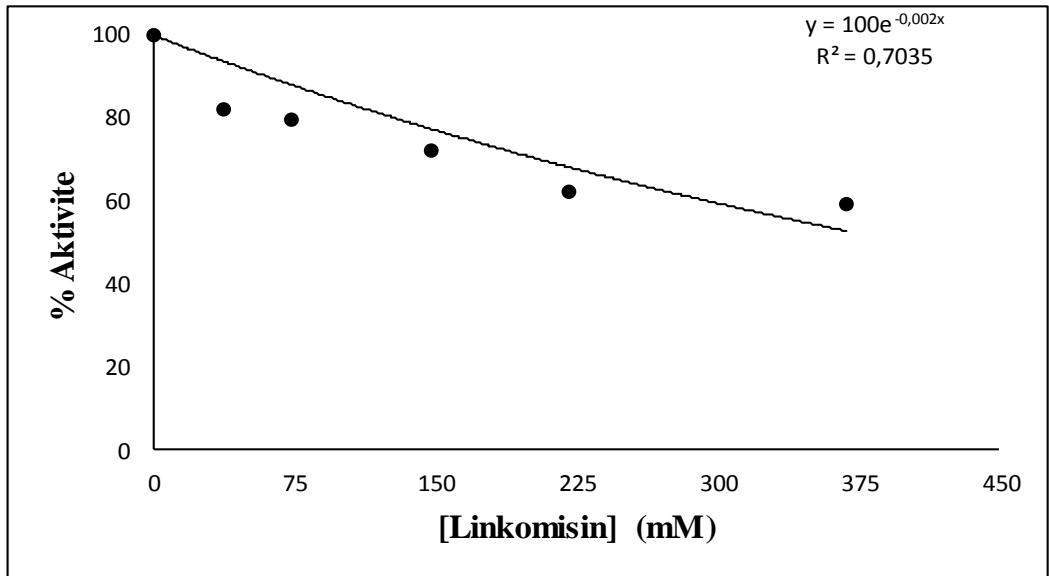
%Aktivite	[Gentamisin] mM
100	0
72,3	15,70
67,4	31,40
50,48	70,65
43,7	78,50
38,8	95,20



Şekil 4.30. Gentamisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

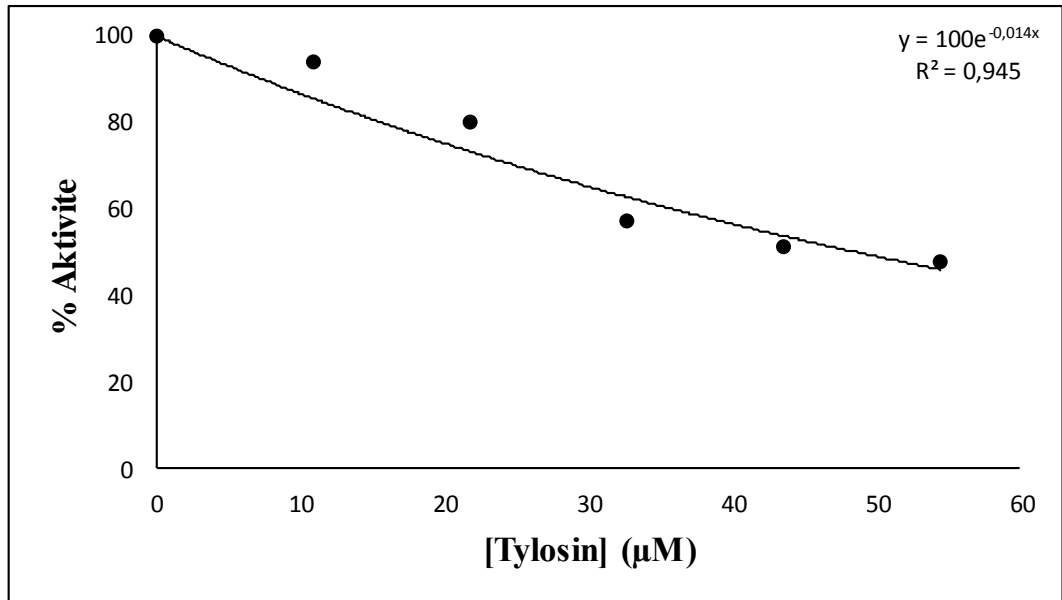
Çizelge 4.14. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine linkomisin'in etkisi

%Aktivite	[Linkomisin] mM
100	0
82,27	36,85
79,74	73,70
72,15	147,4
62,02	221,1
59,5	368,5

**Şekil 4.31.** Linkomisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.15. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine tylosin'in etkisi

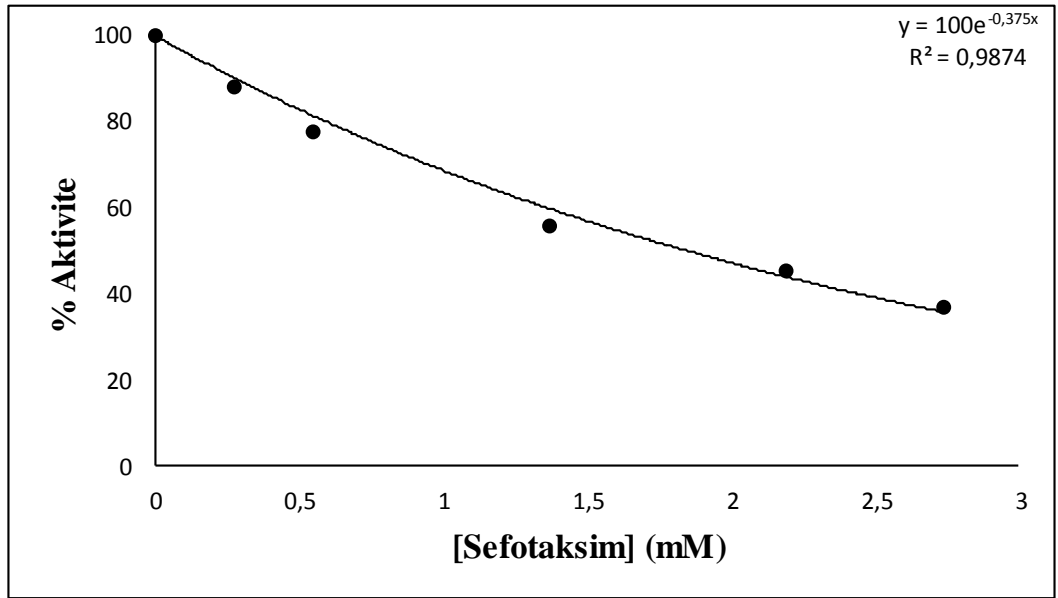
%Aktivite	[Tiylosin] mM
100	0
94,1	10,9
80	21,8
57,35	32,7
51,4	43,6
47,8	54,5



Şekil 4.32. Tylosin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

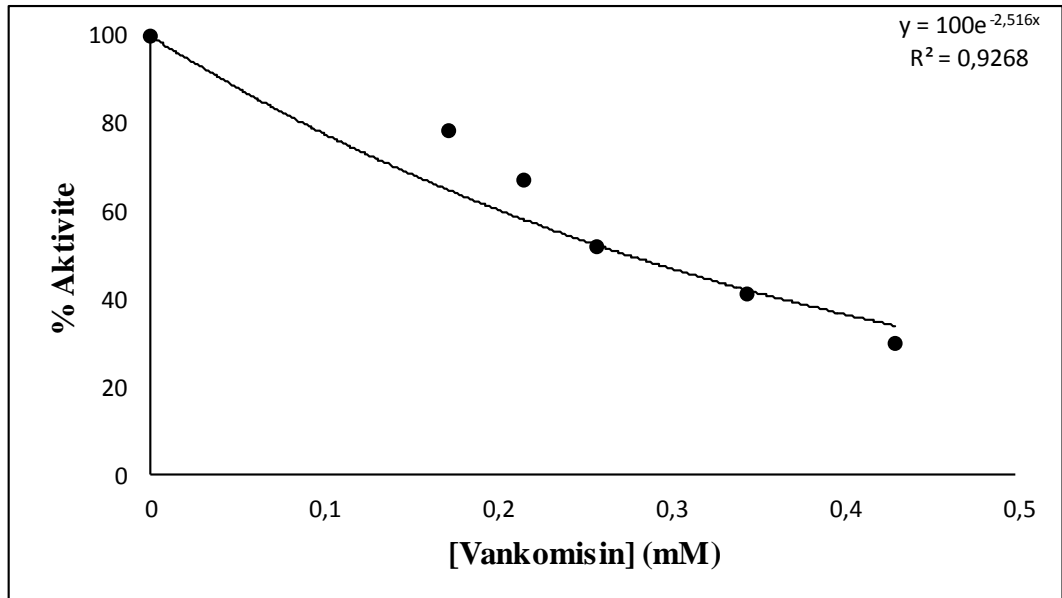
Çizelge 4.16. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine sefotaksim'in etkisi

%Aktivite	[Sefotaksim] mM
100	0
87,97	0,274
77,44	0,548
55,64	1,370
45,11	2,192
36,80	2,740

**Şekil 4.33.** Sefotaksim'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.17. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine vankomisin'in etkisi

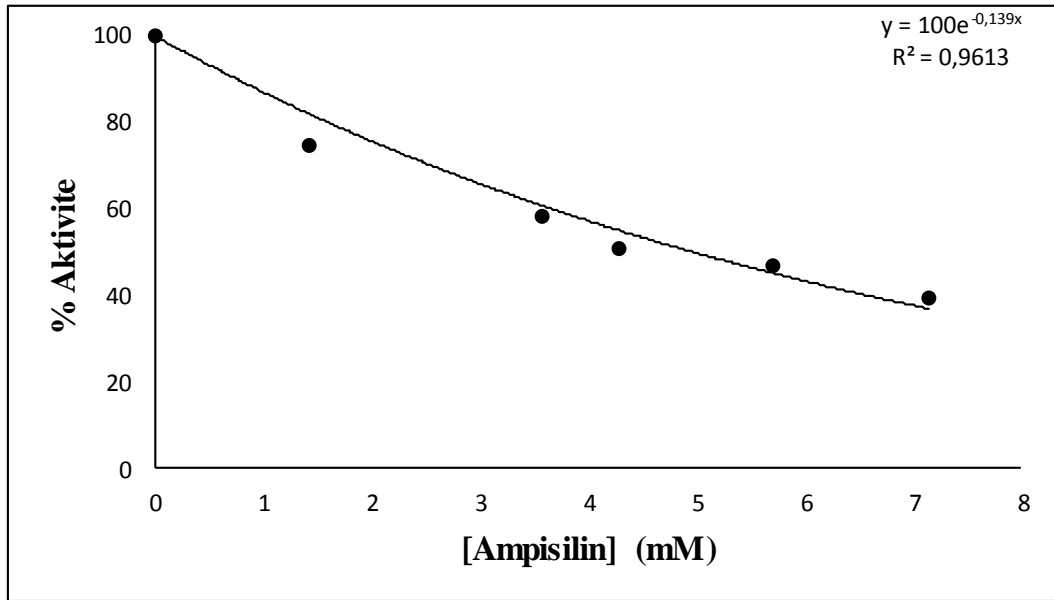
%Aktivite	[Vankomisin] mM
100	0
78,4	0,172
67	0,215
52	0,258
41	0,344
30	0,430



Şekil 4.34. Vankomisin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.18. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine ampisilin'in etkisi

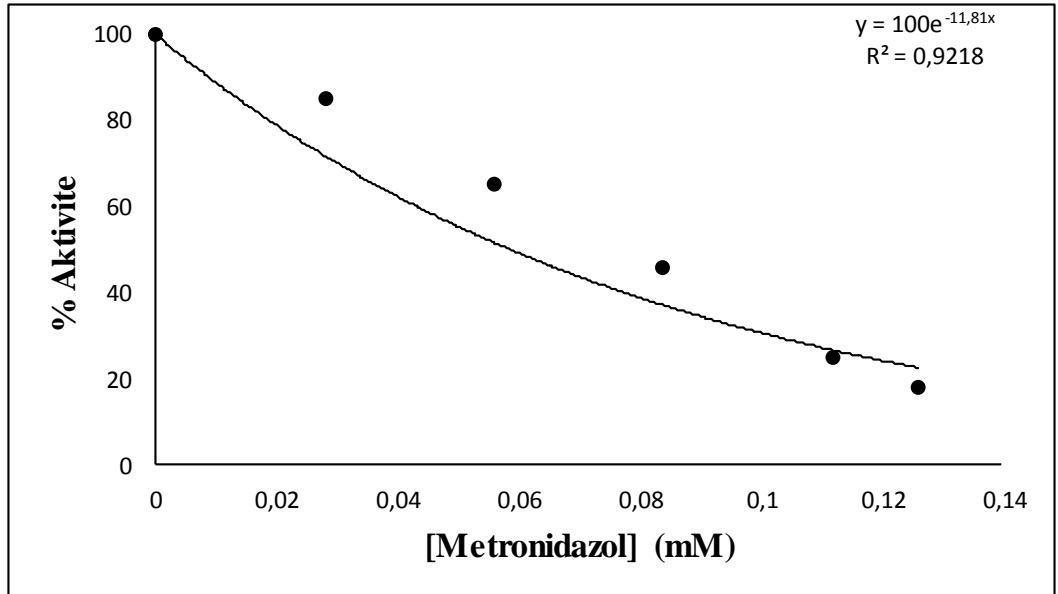
%Aktivite	[Ampisilin] mM
100	0
74,7	0,011
75,42	0,021
65,25	0,042
52,54	0,053
44,06	0,057



Şekil 4.35. Ampisilin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.19. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine metronidazol'un etkisi

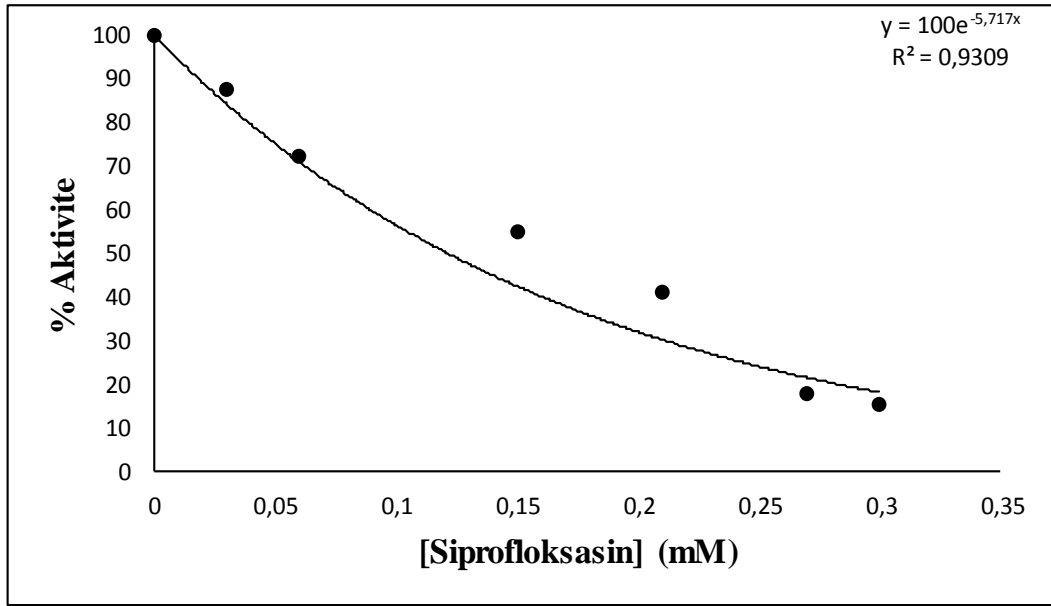
%Aktivite	[Metronidazol] mM
100	0
71,43	0,146
60,32	0,219
52,21	0,292
34,31	0,329
32,68	0,365



Şekil 4.36. Metronidazol'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.20. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi

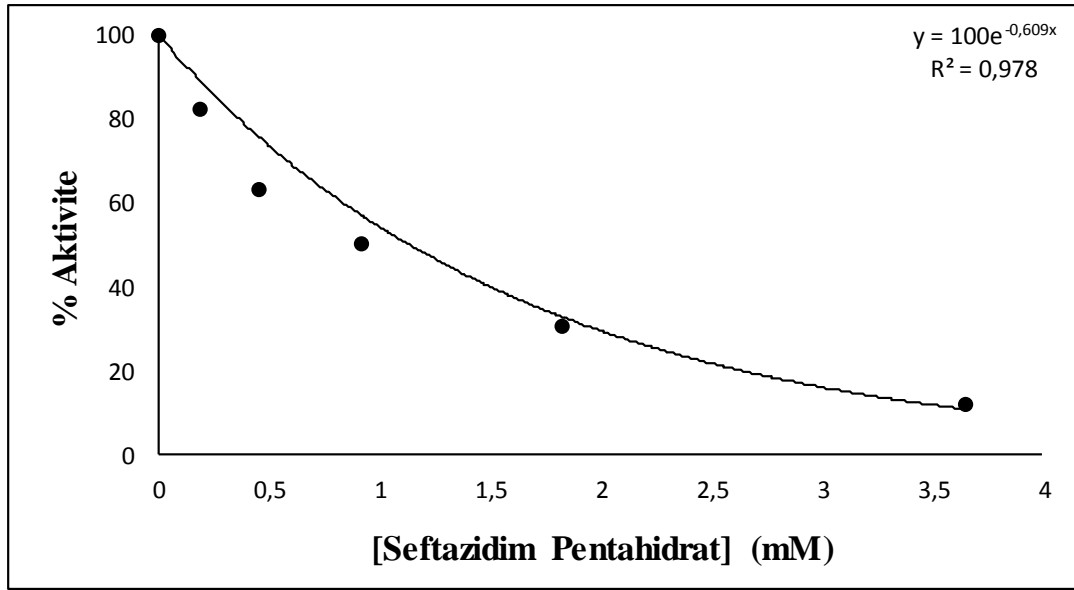
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
87,70	0,03
72,20	0,06
55,00	0,15
41,17	0,21
17,64	0,27
14,97	0,30



Şekil 4.37. Siprofloksasin'in sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.21. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine sodyum seftazidim pentahidrat'ın etkisi

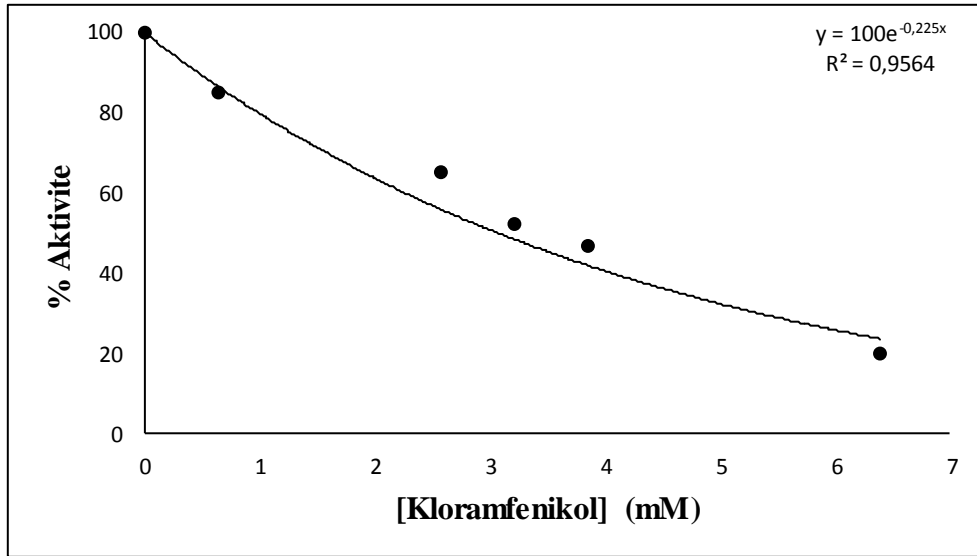
%Aktivite	[Seftazidim Pentahidrat] mM
100	0
71,95	23,55
64,63	31,44
56,16	39,25
46,34	47,18
40,24	54,95
30,32	62,86



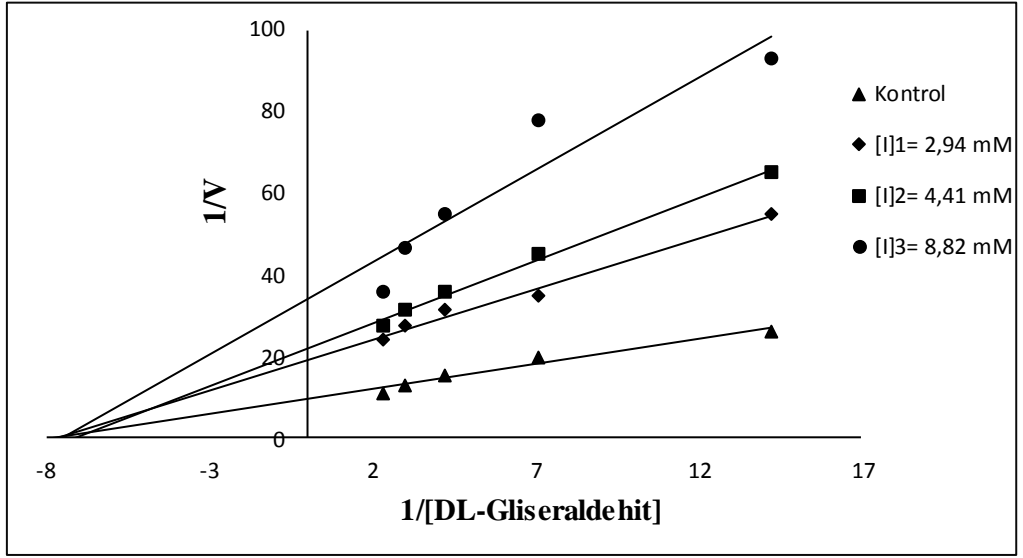
Şekil 4.38. Sodyum seftazidim pentahidrat'ın sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.22. Sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine kloramfenikol'un etkisi

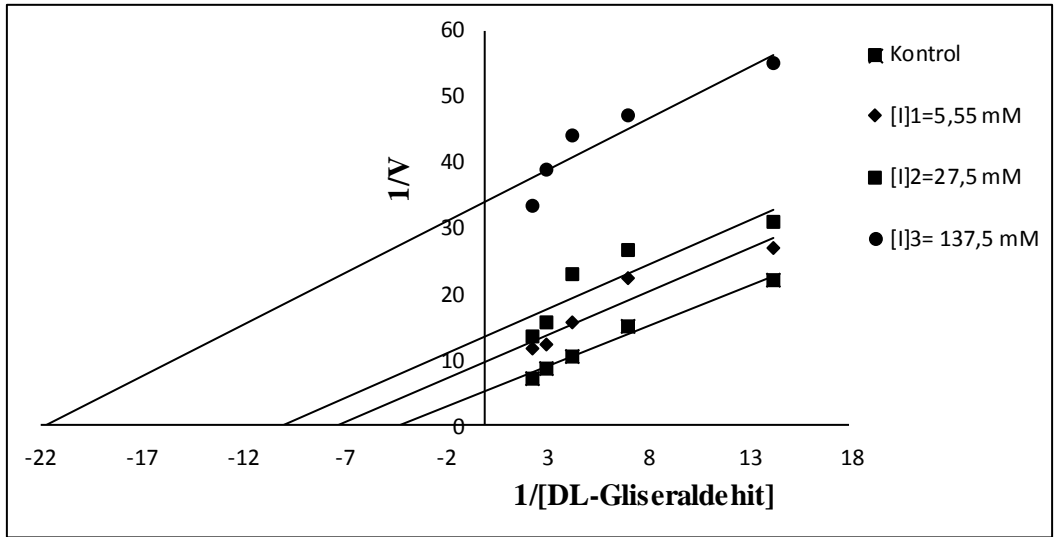
%Aktivite	[Kloramfenikol] mM
100	0
85,00	0,640
65,48	2,575
52,20	3,210
46,90	3,860
20,00	6,400



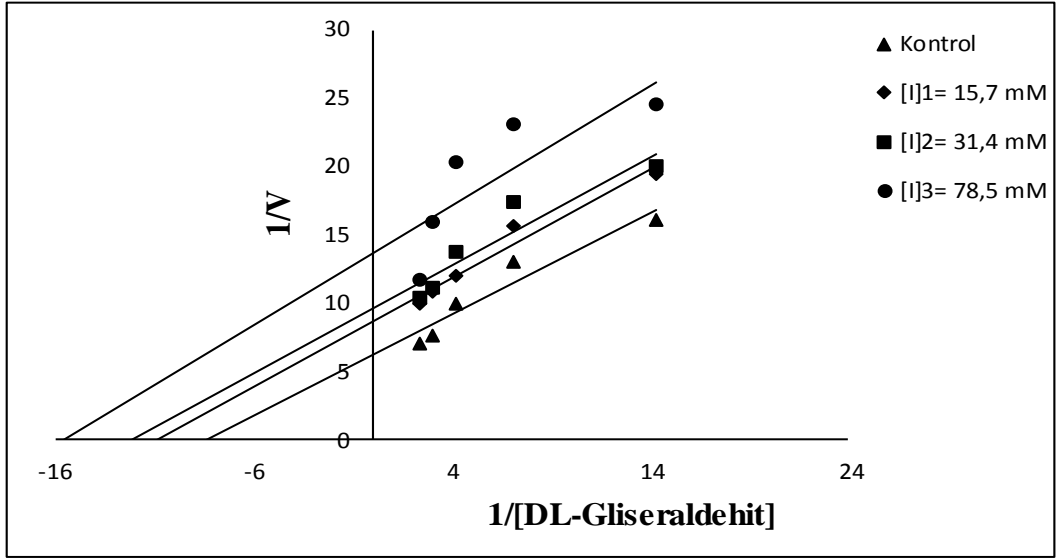
Şekil 4.39. Kloramfenikol'un sığır böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



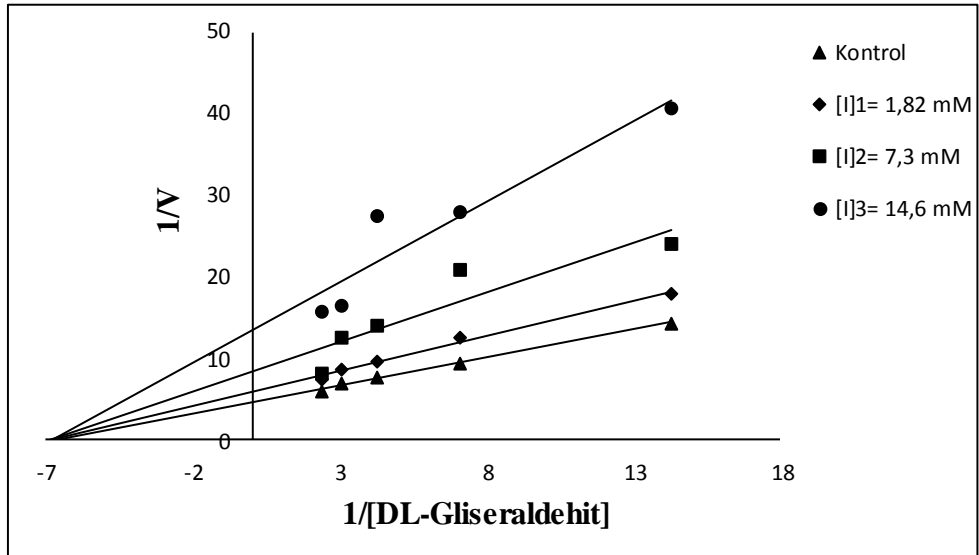
Şekil 4.40. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefuroksim'in Lineweaver-Burk grafiği



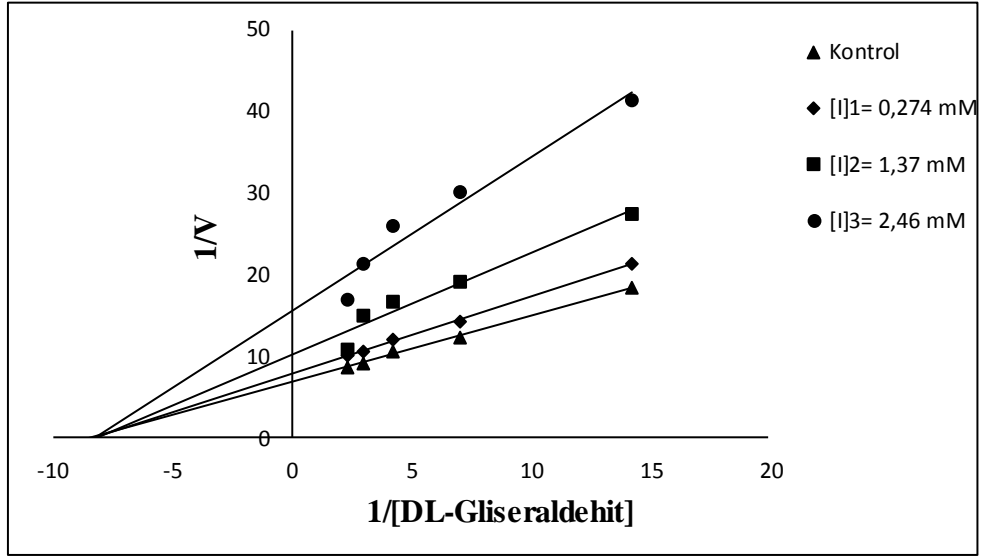
Şekil 4.41. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefazolin'in Lineweaver-Burk grafiği



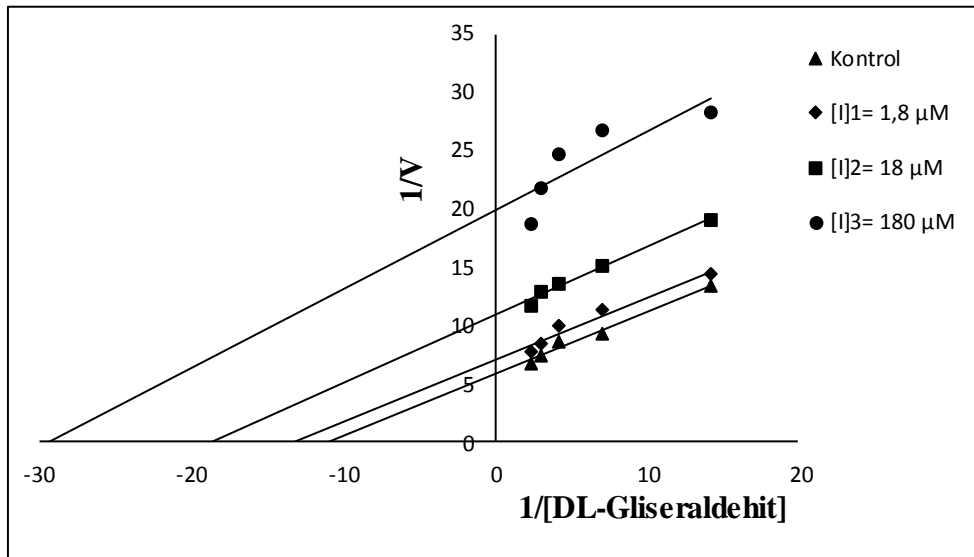
Şekil 4.42. Sığır böbrek AR enzimi üzerine gentamisin'in Lineweaver-Burk grafiği



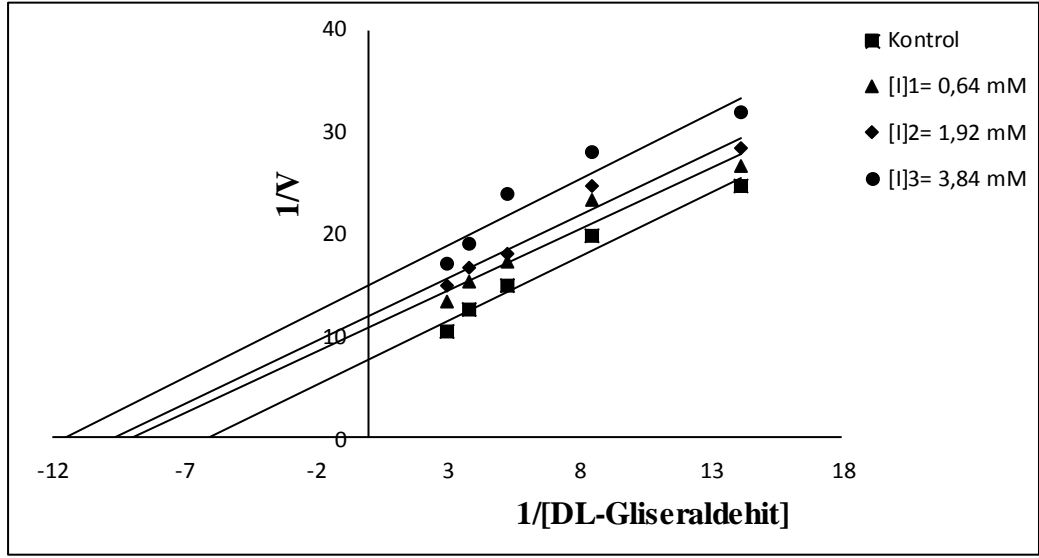
Şekil 4.43. Sığır böbrek AR enzimi üzerine amikasin sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği



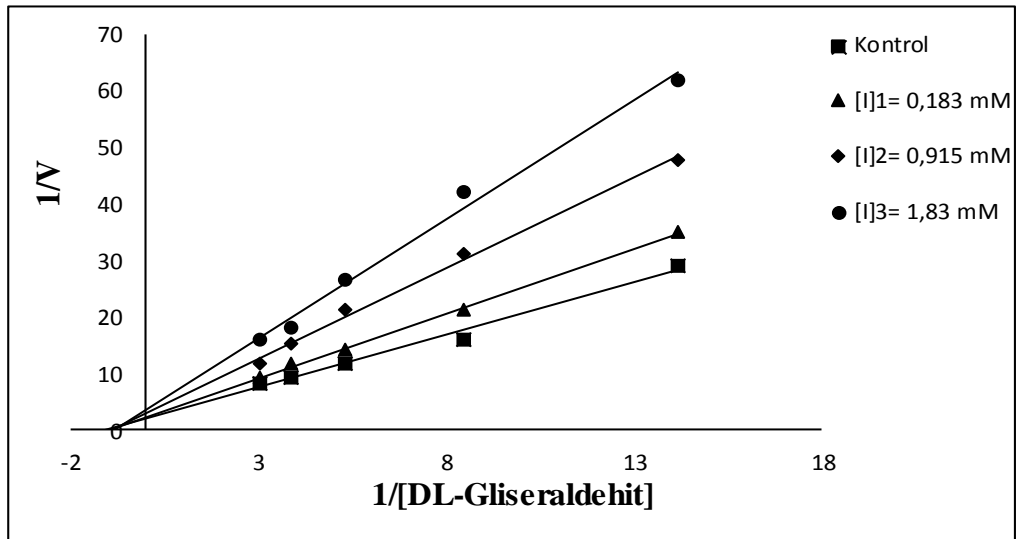
Şekil 4.44. Sığır böbrek AR enzimi üzerine sefotaksim'in Lineweaver-Burk grafiği



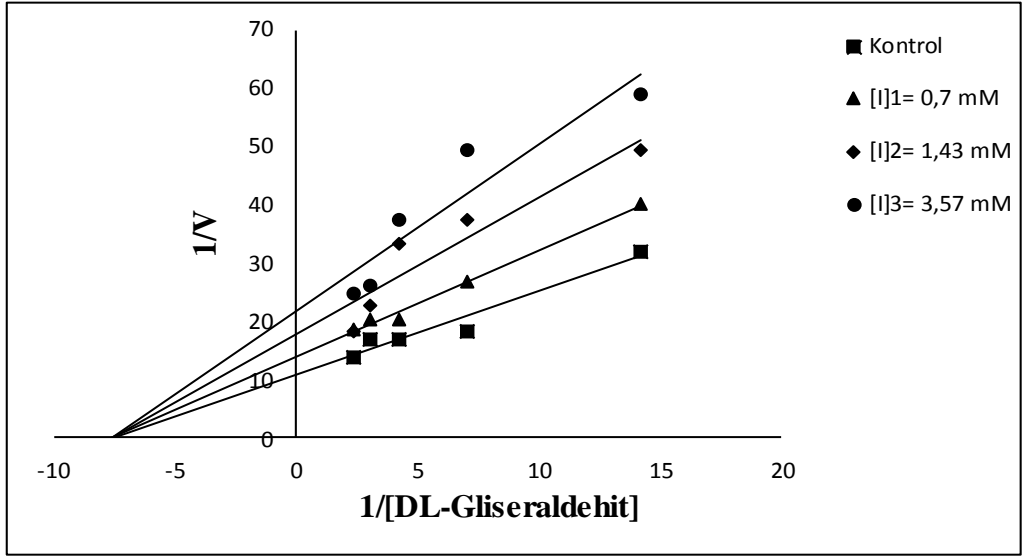
Şekil 4.45. Sığır böbrek AR enzimi üzerine seftriakson'un Lineweaver-Burk grafiği



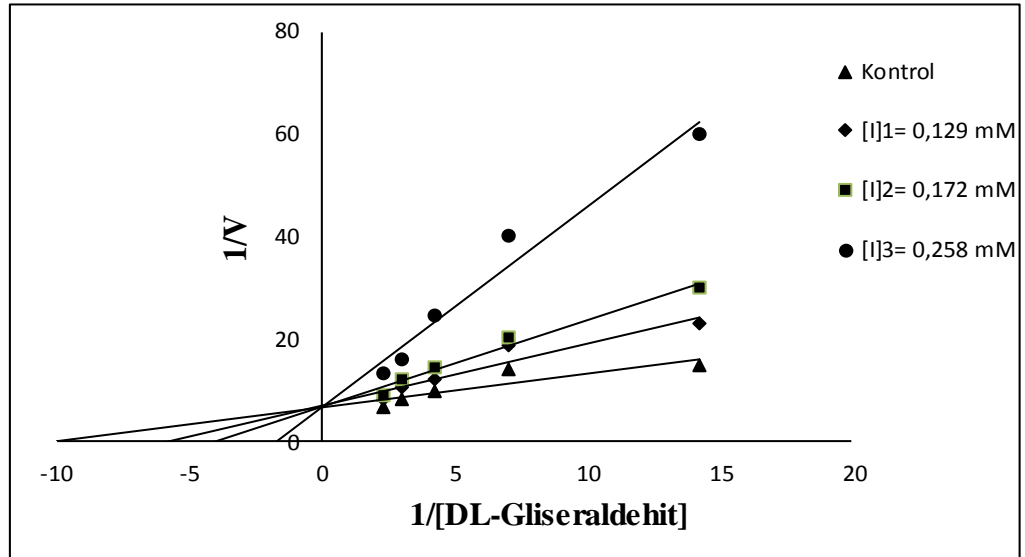
Şekil 4.46. Sığır böbrek AR enzimi üzerine kloramfenikol'un Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.47. Sığır böbrek AR enzimi üzerine seftazidim pentahidrat'ın Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.48. Sığır böbrek AR enzimi üzerine ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.49. Sığır böbrek AR enzimi üzerine vankomisin'in Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.23. Sığır böbrek AR enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

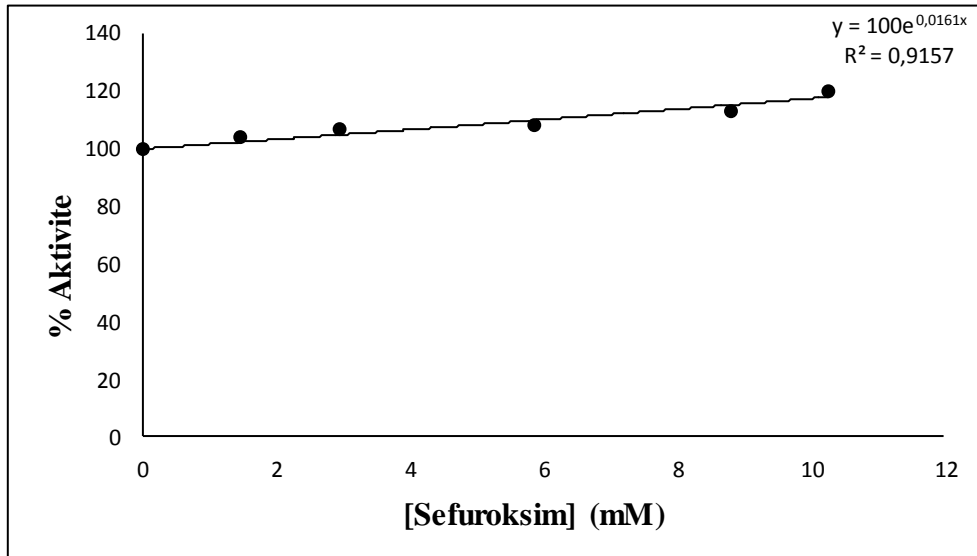
Antibiyotik Türü	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefazolin	14,74	6,112	15,38 ±4,86	Yarı yarışmalı
		16,17		
		23,78		
Seftriakson	28,75 (µM)	25,71	52,61 ± 11,3	Yarı yarışmalı
		32,14		
		100		
Sefuroksim	5,65	2,88	3,21 ± 0,28	Yarışmasız
		3,34		
		3,41		
Vankomisin	0,27	0,16	0,106 ± 0,01	Yarışmalı
		0,11		
		0,05		
Amikasin Sülfat	9,8	6,27	7,54 ± 1,26	Yarışmasız
		8,79		
		7,56		
Gentamisin	69	39,25	52,82 ± 12,68	Yarı yarışmalı
		55,08		
		64,34		
Sefotaksim	1,84	1,83	2 ± 0,23	Yarışmasız
		2,28		
		1,90		
Ampisilin	4,96	2,41	2,72 ± 0,71	Yarışmasız
		2,23		
		3,53		
Seftazidim	1,13	0,83	1,39 ± 0,11	Yarışmasız
		1,40		
		1,94		
Kloramfenikol	3,06	1,60	3,07 ± 1,31	Yarı yarışmalı
		3,55		
		4,08		
Linkomisin	345	-	-	-
Metronidazol	58,42 (µM)	-	-	-
Siprofloksasin	0,12	-	-	-
Tylosin	49,28 (µM)	-	-	-

4.7. Sığır Böbrek SDH Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.24. Sığır böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi

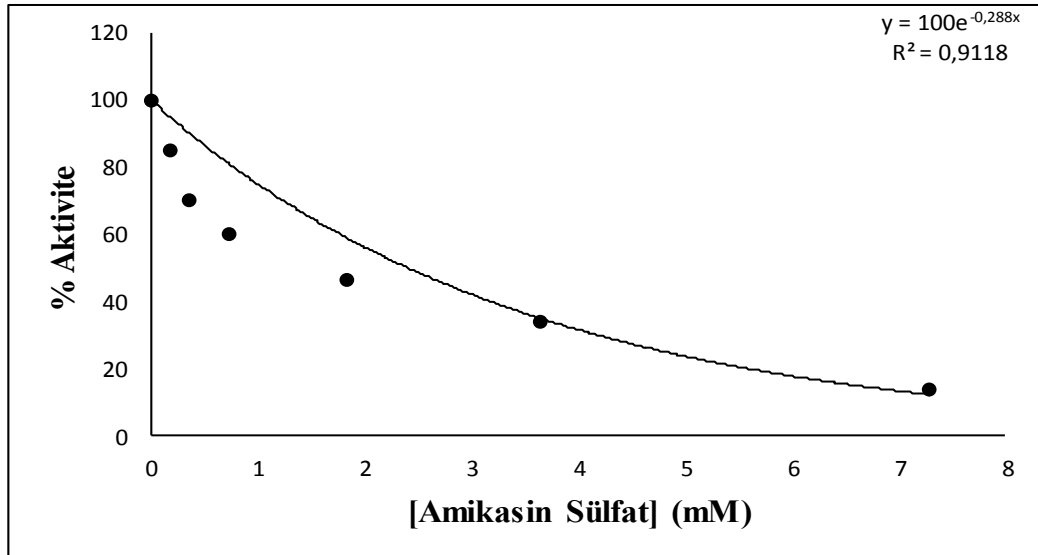
%Aktivite	[Sefuroksim Sodyum] mM
100	0
104,0	1,47
107,1	2,94
108,0	5,88
113,0	8,82
120,3	10,3



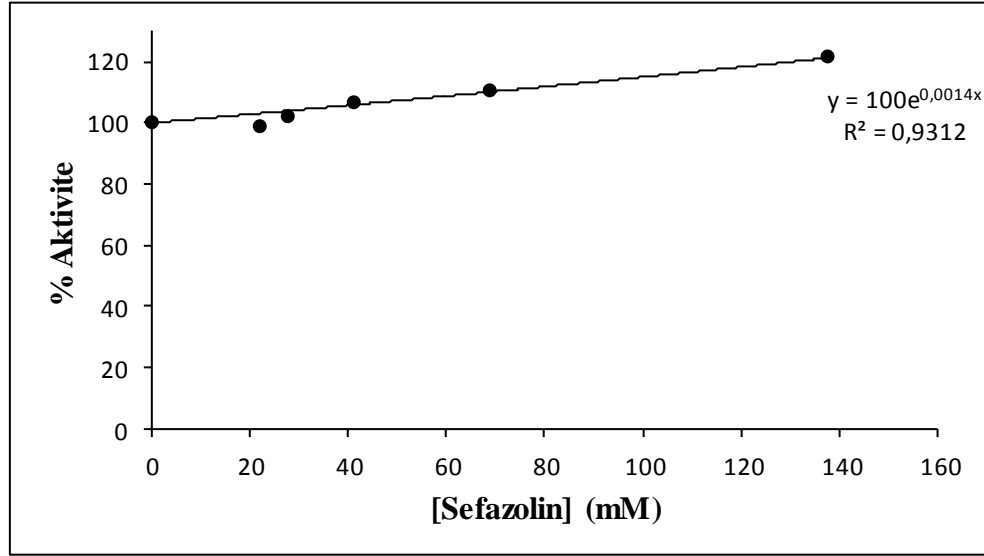
Şekil 4.50. Sefuroksim sodyum'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.25. Sığır böbreği SDH enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi

%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
81,1	0,180
70,0	0,365
60,0	0,730
46,4	1,825
34,0	3,650
13,8	7,300

**Şekil 4.51.** Amikasin sülfat'ın sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi**Çizelge 4.26.** Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi

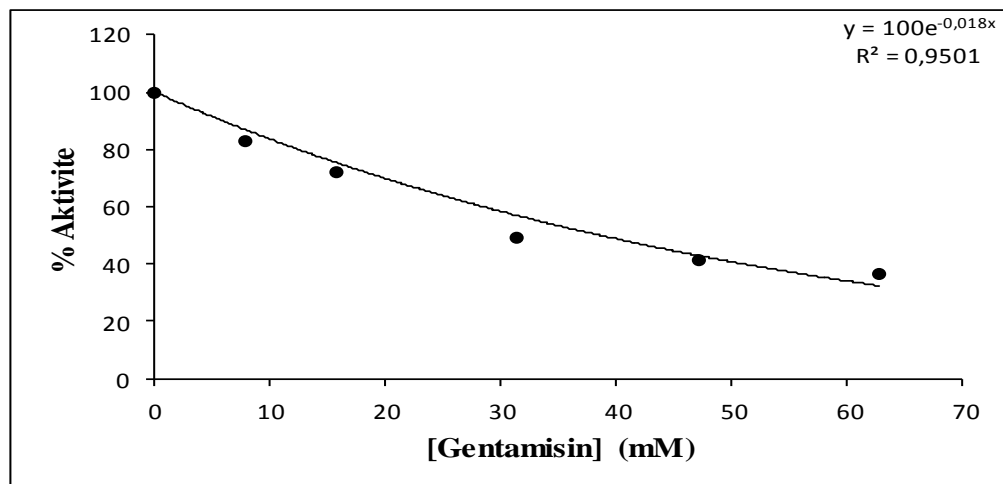
%Aktivite	[Sefazolin Sodyum] mM
100	0
100,5	1,375
102,0	2,750
106,5	4,125
110,9	5,500
121,8	6,875



Şekil 4.52. Sefazolin sodyum'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.27. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine gentamisin'in etkisi

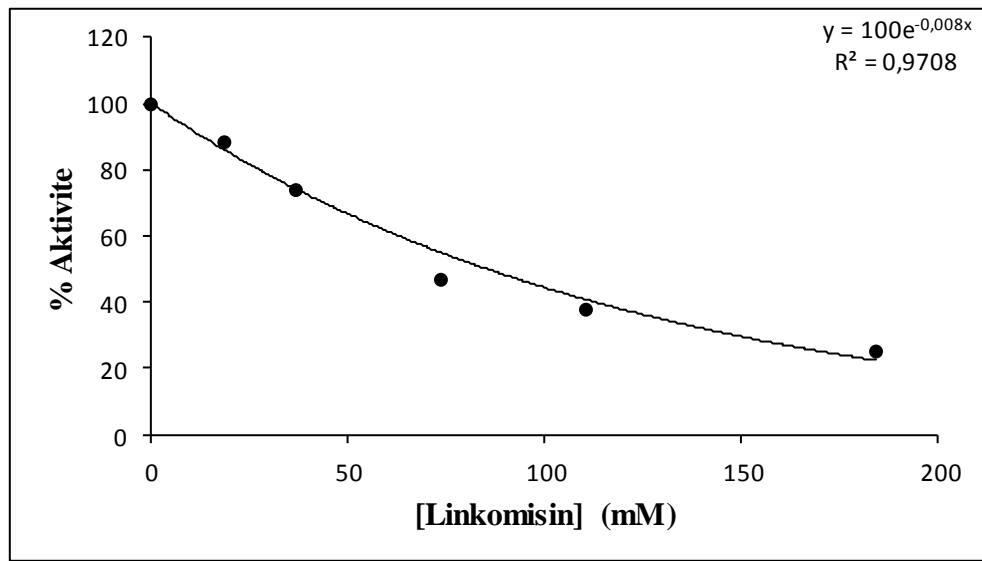
%Aktivite	[Gentamisin] mM
100	0
82,8	7,85
72,2	15,7
49,4	31,4
41,1	41,1
36,6	62,8



Şekil 4.53. Gentamisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.28. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine linkomisin'in etkisi

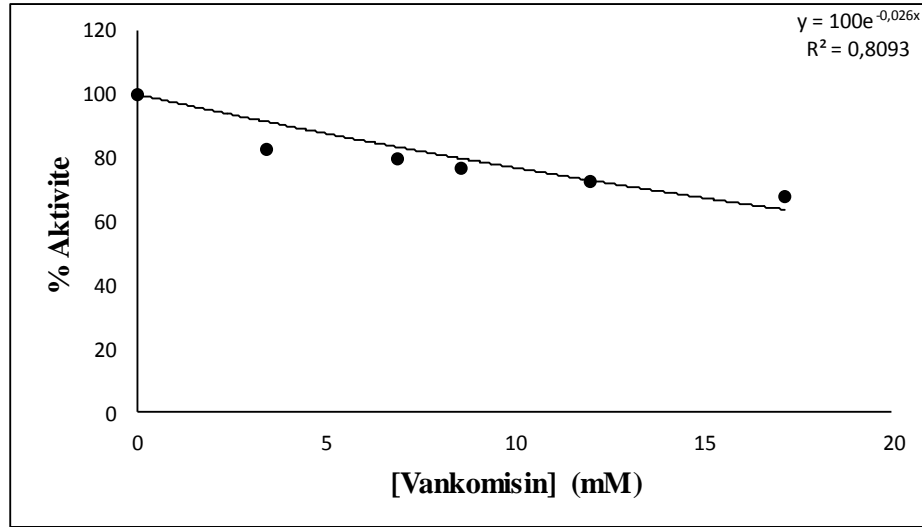
%Aktivite	[Linkomisin] mM
100	0
88,00	18,400
74,00	36,850
47,00	73,700
37,87	110,55
25,00	184,25



Şekil 4.54. Linkomisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.29. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine vankomisin'in etkisi

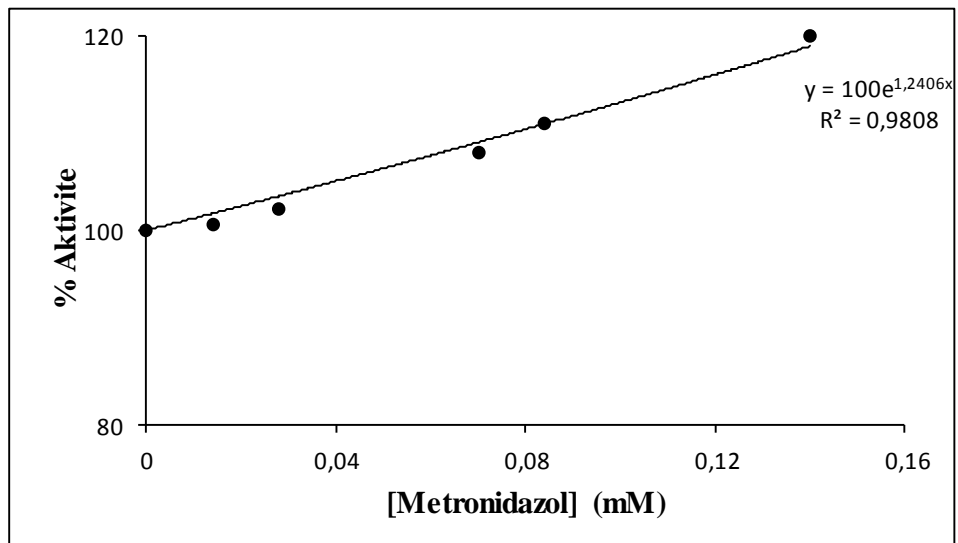
%Aktivite	[Vankomisin] mM
100	0
82,78	3,440
79,50	6,880
76,80	8,600
72,85	12,04
67,55	17,20



Şekil 4.55. Vankomisin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.30. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine metronidazol'un etkisi

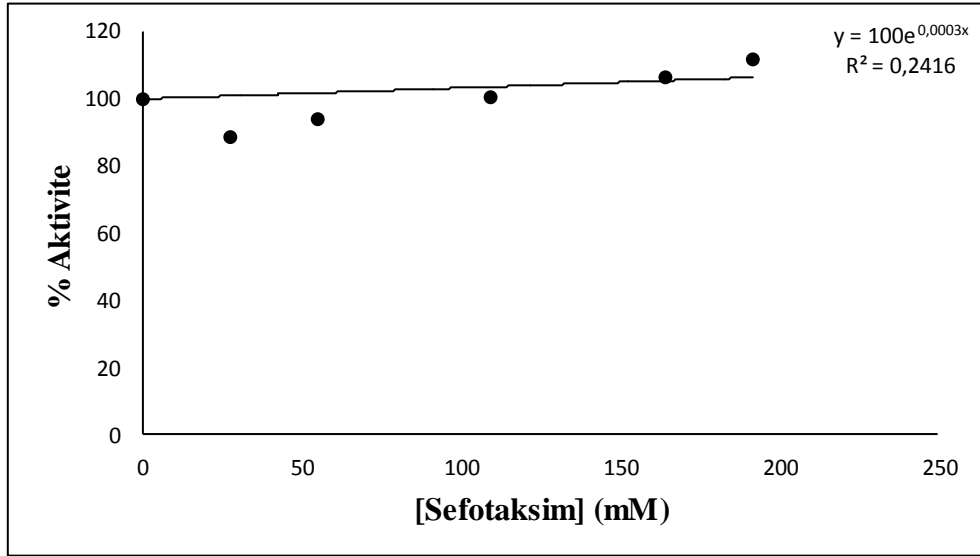
%Aktivite	[Metronidazol] mM
100	0
100,5	0,014
102,2	0,028
108,0	0,070
111,0	0,084
120,0	0,140



Şekil 4.56. Metronidazol'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.31. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine sefotaksim'in etkisi

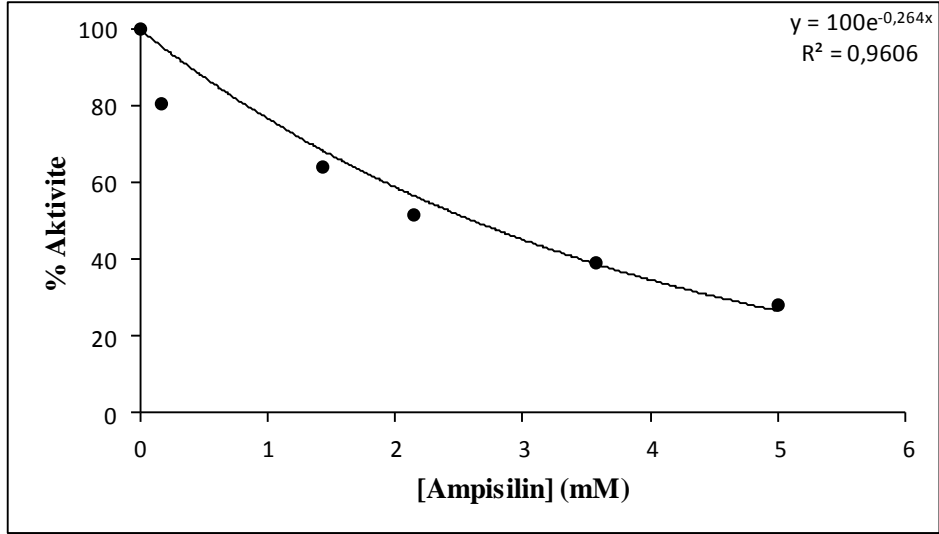
%Aktivite	[Sefotaksim] mM
100	0
88,890	27,40
93,890	54,80
100,50	109,6
106,67	164,4
111,67	191,8



Şekil 4.57. Sefotaksim'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.32. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine ampisilin'in etkisi

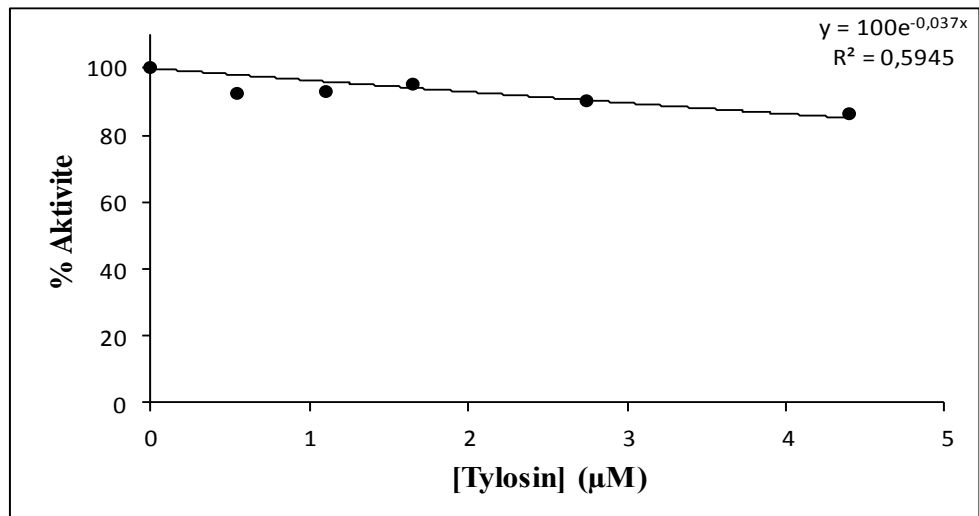
%Aktivite	[Ampisilin] mM
100	0
80,74	0,17
64,40	1,43
51,85	2,15
39,30	3,57
28,35	5,00



Şekil 4.58. Ampisilin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.33. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine tylosin'in etkisi

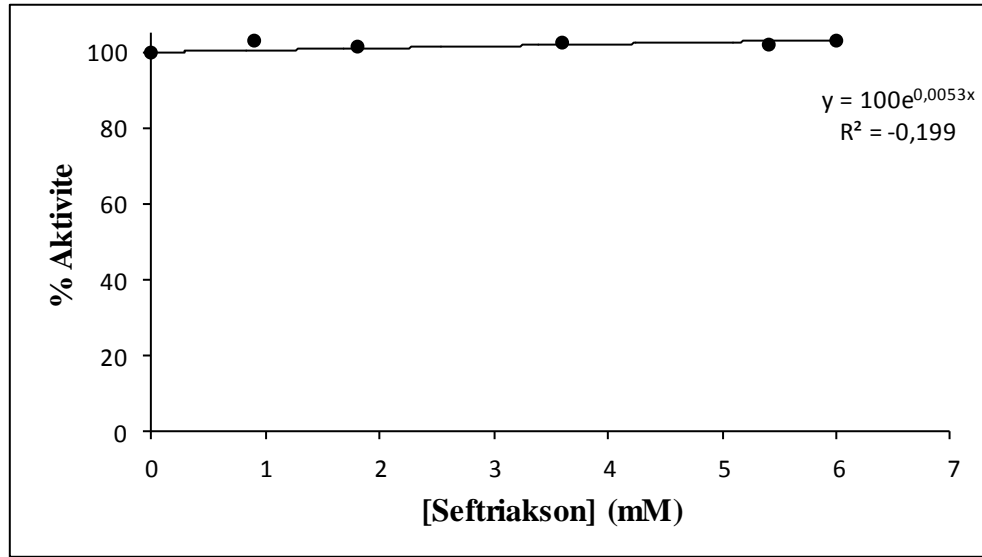
%Aktivite	[Tylosin] mM
100	0
92,35	0,55
92,90	1,10
95,08	1,65
90,17	2,75
86,34	4,40



Şekil 4.59. Tylosin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.34. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine seftriakson'un etkisi

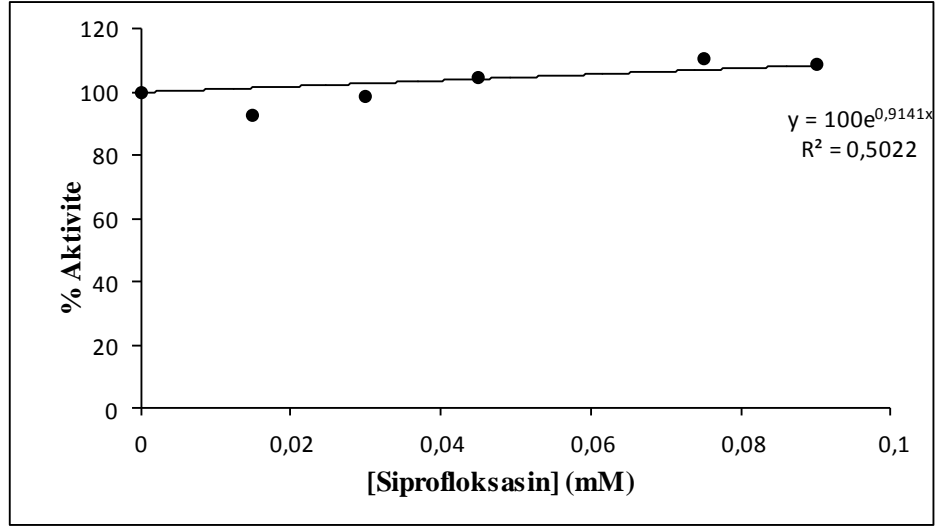
%Aktivite	[Seftriakson] mM
100	0
103,1	0,9
101,5	1,8
102,6	3,6
102,0	5,4
103,1	6,0



Şekil 4.60. Seftriakson'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.35. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi

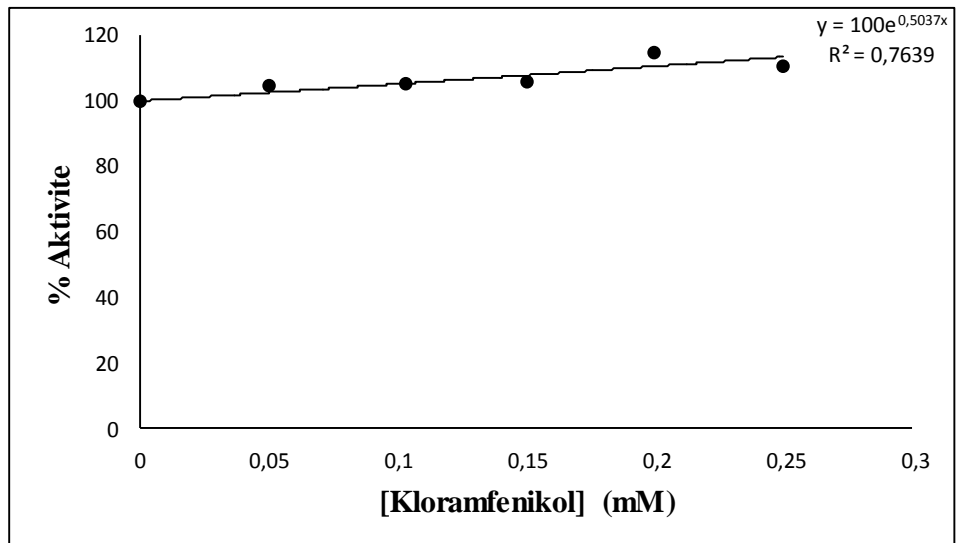
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
92,60	0,015
98,50	0,030
104,4	0,045
110,4	0,075
108,9	0,090



Şekil 4.61. Siprofloksasin'in sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.36. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine kloramfenikol'un etkisi

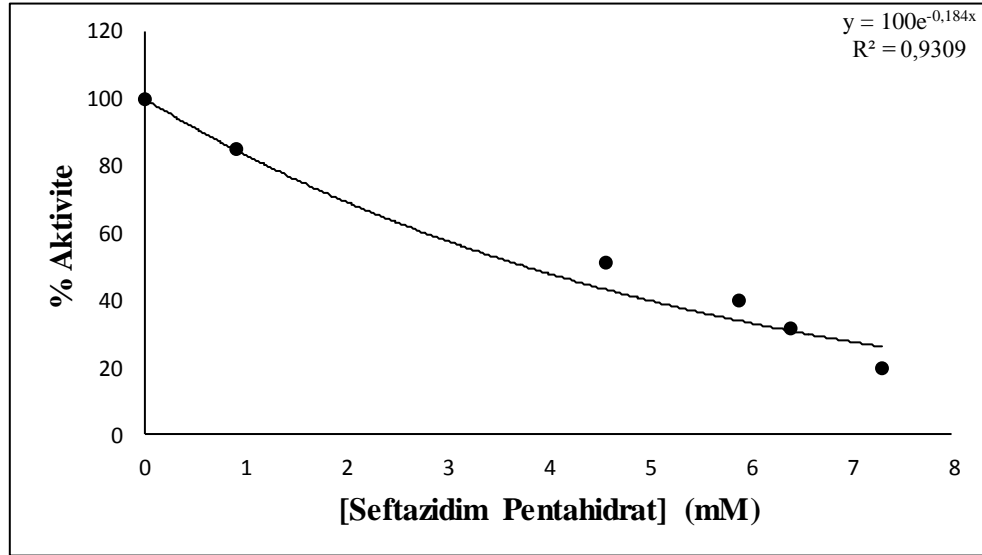
%Aktivite	[Kloramfenikol] mM
100	0
104,40	0,050
105,40	0,103
106,00	0,150
115,04	0,200
110,62	0,250



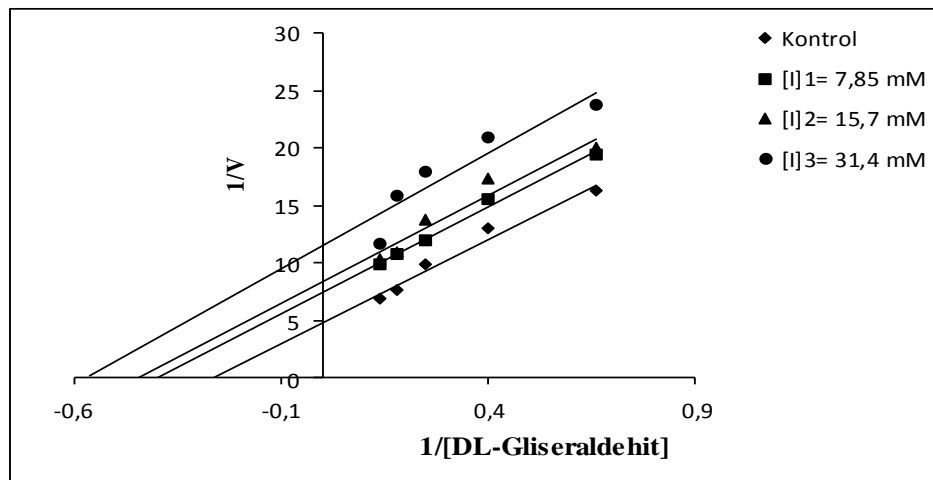
Şekil 4.62. Kloramfenikol'un sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.37. Sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine seftazidim'in etkisi

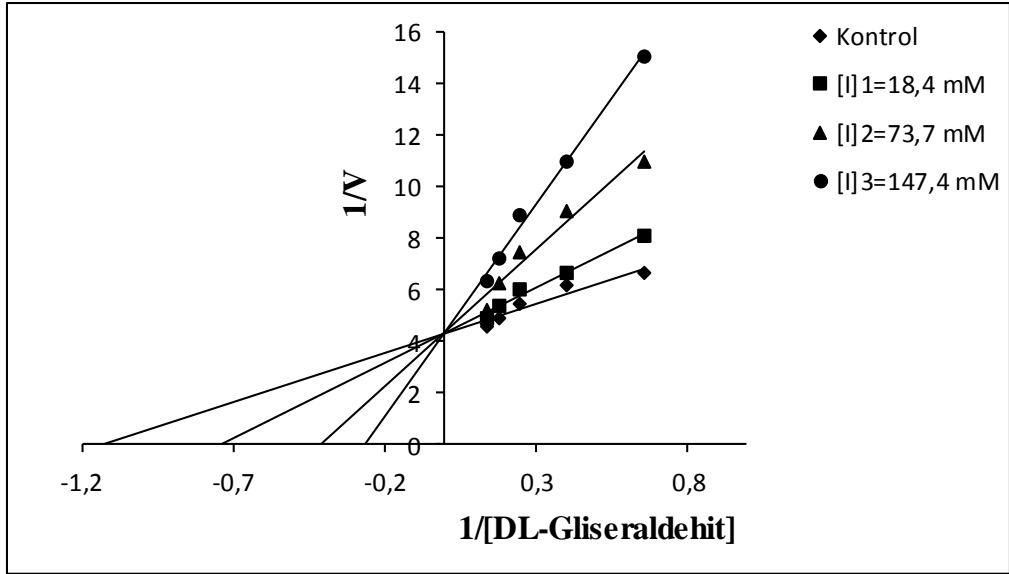
%Aktivite	[Seftazidim Pentahidrat] mM
100	0
100,5	0,014
102,2	0,028
108,0	0,070
111,0	0,084
120,0	0,140



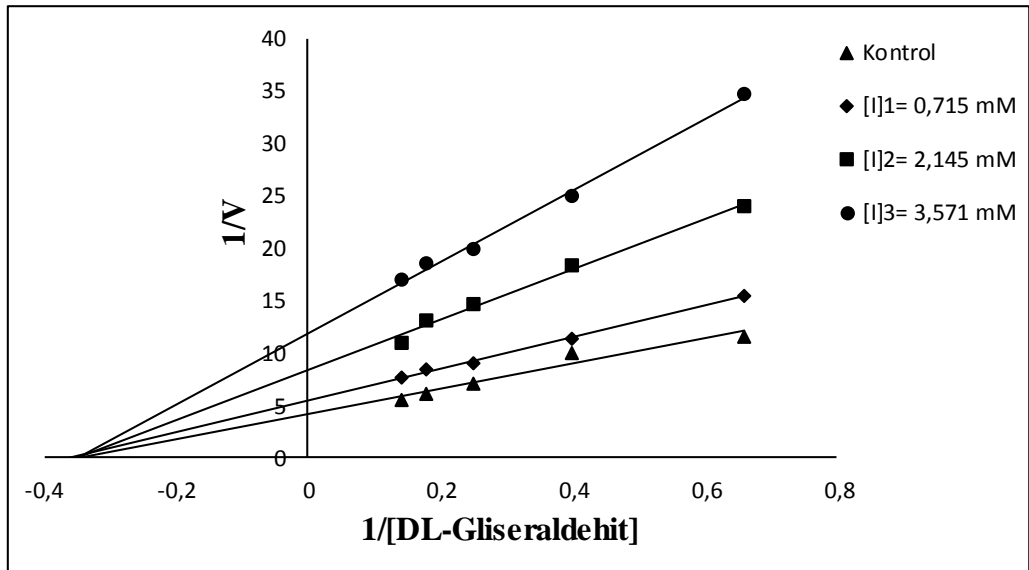
Şekil 4.63. Seftazidim pentahidrat'ın sığır böbrek SDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



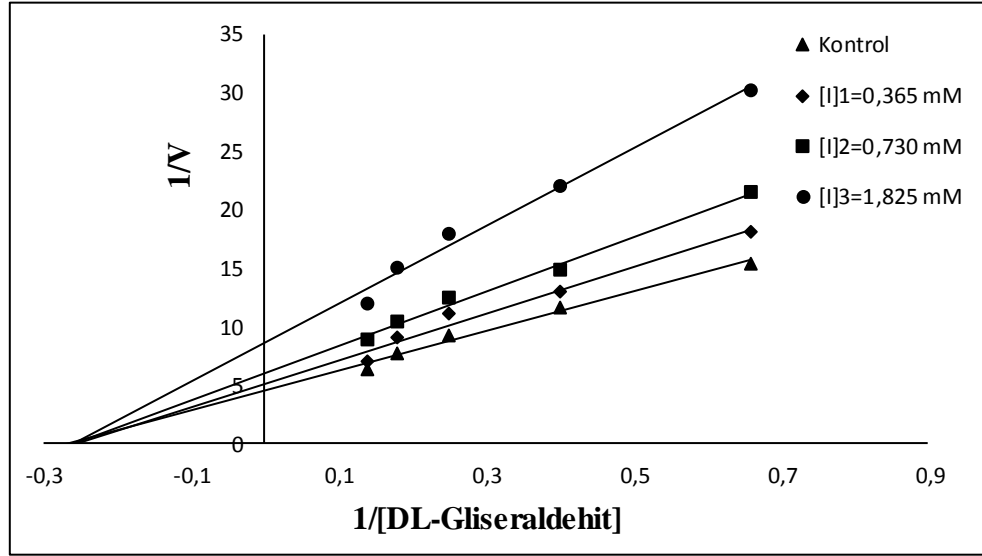
Şekil 4.64. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine gentamisin'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.65. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine linkomisin'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.66. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine ampisilin'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.67. Sığır böbrek SDH enzimi üzerine amikasin sülfat'ın Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.38. Sığır böbrek SDH enzimi için bulunan IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik İsmi	IC_{50} (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Gentamisin	38,5	14,92	19,91 ±4,35	Yarı yarışmalı
		21,90		
		22,92		
Linkomisin	72	34,46	40,33 ±5,12	Yarışmalı
		42,12		
		44,40		
Ampisilin	2,625	2,25	2,06±0,196	Yarışmasız
		2,09		
		1,86		
Amikasin Sülfat	2,4	2,55	2,41±0,3	Yarışmasız
		2,14		
		1,96		
Seftazidim pentahidrat	3,76			
Sefotaksim	Aktivasyon			
Kloramfenikol	Aktivasyon			

Çizelge 4.38. (devam)

Sefuroksim	Aktivasyon			
Siprofloksasin	Aktivasyon			
Tylosin	Yeterli inhibisyon yok			
Sefazolin	Aktivasyon			
Sefriakson	Aktivasyon			
Metronidazol	Aktivasyon			
Vankomisin	Yeterli inhibisyon yok			

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabet, bilindiği üzere oldukça sık görülen metabolik bir sendromdur. Bu metabolik hastalık nöropati, nefropati, retinopati, katarakt ve ateroskleroza bağlı olarak artan miyokardiyal enfarktüs ve inme riski gibi bir çok dejeneratif komplikasyon ile ilişkilidir. Hem tip I hem de tip II diyabette bu patolojilere rastlamak mümkündür. Bu komplikasyonların önlenmesi ve kontrolü diyabetik hastaların yaşam kalitesi ve ölüm oranları açısından oldukça ciddi ve önemli bir terapötik problemdir. (Hanefeld *et al.* 1996; Viberti 2005).

Diyabette vasküler komplikasyonların gelişiminde temel risk faktörü hiperglisemidir. Hiperglisemi durumunda bazı metabolik yolların aktivitesi artar. Bu metabolik yolların aktif hale gelmesi sonucu oluşan oksidatif stres, endotel fonksiyon bozukluklarına neden olmakta ve bunun sonucunda pek çok vasküler komplikasyon oluşmaktadır. (Anonymous 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).

Uzun süreli hiperglisemik şartlar altında ikincil diyabetik komplikasyonların oluşumu artar. Bilindiği gibi bu patolojilerin moleküler mekanizmaları oldukça kompleks ve çeşitlidir. İleri glikasyon ürünleri, PKC yolunun aşırı miktarda aktivasyonu, poliol ve heksozamin yollarının aktivasyonu bunlardan bazılarıdır. Kan glukoz seviyesinin kontrolü sonucu bu zararlı etkiler geciktirilebilir veya azaltılabilir (Eastman *et al.* 1993; Hanefeld *et al.* 1996). Buna karşın, diyabetli hastaların kan glukoz düzeyleri sürekli normal düzeyde tutulamayacağından, uzun vadeli komplikasyonların oluşumunun önlenmesi olası değildir. Bununla birlikte; tip II diyabet teşhisi konulmuş hastalarda genellikle vasküler komplikasyonlar teşhis konulduğu sırada hali hazırda zaten bulunmaktadır (Viberti 2005).

Dokulara glukoz girişinin artması ile diyabete bağlı komplikasyonların oluşumundaki ilk mekanizma; sorbitol yoludur. Bu yolun hız kısıtlayıcı enzimi olan AR, glukozu sorbitole indirgerken, oluşan sorbitol, SDH enzimi tarafından fruktoza okside edilir.

AR, glukoz alımının GLUT-4 ve insulinden bağımsız olduğu sinir dokusu, retina, glomerul ve kan damarı duvarı gibi dokularda bulunur. AR'ın glukozu karşı K_M 'sinin yüksek olması nedeni ile bu yol normalde aktif değildir. Polioll yolu, hiperglisemi durumunda aktif hale gelerek, intrasellüler glukoz ile metilglioksal ve asetol gibi glukoz türevi maddelerin birikmesine neden olur. Hücre membranlarından kolayca geçemeyen sorbitolun indüklediği osmotik stres, dokularda hasara yol açabilir (Williams and Pickup 2004).

Yapılan çalışmalar, insülin tedavisi ile glukoz düzeyinin kontrolü sonucu, diyabetik komplikasyonların önlenildiğini veya gelişiminin geciktirilebildiğini göstermektedir. Fakat glisemik kontrolün sağlanabilmesi her durumda mümkün olmamakta, ayrıca hipergliseminin oluşma riski de bulunmaktadır. Bu nedenle diyabetik komplikasyonlar için alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, glisemik kontrol kaybı ile β -hücre fonksiyonunun azalması arasında doğrudan ilişki olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tedavinin 6. yılında β -hücre fonksiyonlarında belirgin kayıpların olduğu ortaya konmuştur (Anonymous 1997).

Diyabetin sebep olduğu makrovasküler komplikasyonlar, myokard enfarktüsü, inme ve periferik vasküler hastalıklar olup, retinopati, nefropati ve nöropati, mikrovasküler komplikasyonlar neticesinde meydana gelir. Bahsi geçen bu komplikasyonların patogenezi, henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, genetik predispozisyon (Petitt *et al.* 1990), hücrelerde hiperglisemi nedeniyle sorbitol yolundaki aşırı aktivasyon (Greene *et al.* 1987), ileri derecede glikozillenmiş son ürünlerin toksik etkileri (Vlassara 1992), glomerüler hiperfiltrasyon (Hostetter 1992), büyüme faktörlerinin fazla miktarda yapımı (Sharp 1995), endotel yapı ya da endotel fonksiyonlarındaki bozukluklar (Altan *et al.* 1989; Ozturk *et al.* 1996) ve aşırı oksidatif stres (Engerman 1989; Karasu 2000) bu mekanizmaların altında yatan nedenler arasında, sayılabilir.

Glukozdan kaynaklanan hasarın diğer bir mekanizmasının ise, gelişmiş glikozillenme son ürünlerinin (AGEs), intrasellüler formasyonunun artışı olduğu düşünülmektedir. Erken glikozillenme ürünleri geri dönüşümlü olmasına rağmen, nihayetinde çapraz

bağlanma yoluyla geriye dönüşümsüz değişikliklere uğrayarak hem proteinin yapısını hem de fonksiyonunu bozar. Hiperglisemi kaynaklı komplikasyonların son mekanizması da, glikozamin oluşumu ile sonuçlanan mekanizmadır (Williams and Pickup 2004).

Diabetes mellitus, nüfusun yaklaşık %5-7'sinde görülmektedir. Bu hastalığın neden olduğu makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların ekonomiye maliyeti oldukça yüksektir (Gugliucci 2000). 2002 yılındaki bir çalışmada, ABD'de sadece diyabet sonucu oluşan bu komplikasyonların sağlık sistemine maliyetinin yaklaşık 132 milyar dolar olduğu belirtilmiştir (Setter *et al.* 2003).

Türkiye'de ve dünyada ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı alan ve önemli bir sağlık sorunu olan diyabet, 2003 yılı itibarı ile dünyada 180 milyondan fazla insanı etkilemekteydi. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2003 verilerine göre (World Health Organization (WHO)), 2025 yılında diyabet görülme sıklığının hızla artarak diyabetik birey sayısının 300 milyon civarında olacağını öngörülmekteydi (Sicree *et al.* 2003).

AR enziminin poliol yolu dışında pek çok metabolik yolla ilişkisi bulunmaktadır. Bunlar; kardiyovasküler hastalıklar (Ramasamy *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2002), inflamasyon (Ramana *et al.* 2006), depresyon (Regenold *et al.* 2000; Renegold *et al.* 2004), renal yetmezlik (Jiang *et al.* 2006; Alexiou *et al.* 2009), over anomalileri (Meyer *et al.* 1992; Bery 1995) ve kanserdir (Lee *et al.* 2001; Saraswat *et al.* 2006). AR enziminin bu düzenleyici etkileri bu enzim üzerine yapılan inhibisyon çalışmalarının önemini bir kat daha arttırmaktadır. Örneğin, kolon kanseri tedavisi, romatoid artrit gibi pek çok hastalığın tedavisinde de AR inhibitörleri kullanılmaktadır (Srivastava *et al.* 2005; Ramana and Srivastava 2006; Tammali 2007).

Aldoz redüktaz inhibitörleri (ARI) karboksilik asit grubu taşıyanlar, siklik imid grubu taşıyanlar ve sülfonil nitrometan türevleri olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Rogniaux *et al.* 1999; Wang *et al.* 2007). İnhibitörlerin polar uçları ile aktif bölge kalıntıları arasındaki etkileşimler enzim-inhibitör kompleksinin kararlılığında önemli rol

oyunmaktadır. Siklik imid sınıfına dahil olan minalrestatin flor atomunun ve fidarestatin karbamoil grubunun karboksilat fonksiyonel grubu ile yerdeğiştirmesi sonucu enzim-inhibitor kompleksinin net bağlanma enerjisi artmaktadır (Darmanin *et al.* 2004).

Karboksilik asit sınıfından olan ponalrestatin ise, klinik açıdan önemli bir yan etki oluşturmadığı ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin de bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca, yine aynı sınıftan olan NZ-314 isimli ARI'nün motor sinir iletim hızını ve siyatik sinirlerdeki kan akışını arttırdığı bilinmektedir (Miyamoto 2002). Bununla beraber, diğer bir aldoz redüktaz inhibitörü olan fidarestat ile yapılan ęalıřmalar sinir kan akışını ve sinir hücrelerinde biriken sorbitol seviyesini normal düzeye getirdiğı bilinmektedir (Asano *et al.* 2002).

Ponalrestat, karboksilik asit grubu taşıyan bir ARI olup, klinik açıdan önemli bir yan etki oluşturmadığı halde anlamlı bir etkisinin de bulunmadığı görülmüştür (Miyamoto 2002). Fakat diyabetik sıçanların böbreklerinde yapılan bir ęalıřmada ise, belirgin bir şekilde böbreklerde artan AR aktivitesini, ponalrestatin düşürdüğü ifade edilmektedir (Soulis-Liparota *et al.* 1995).

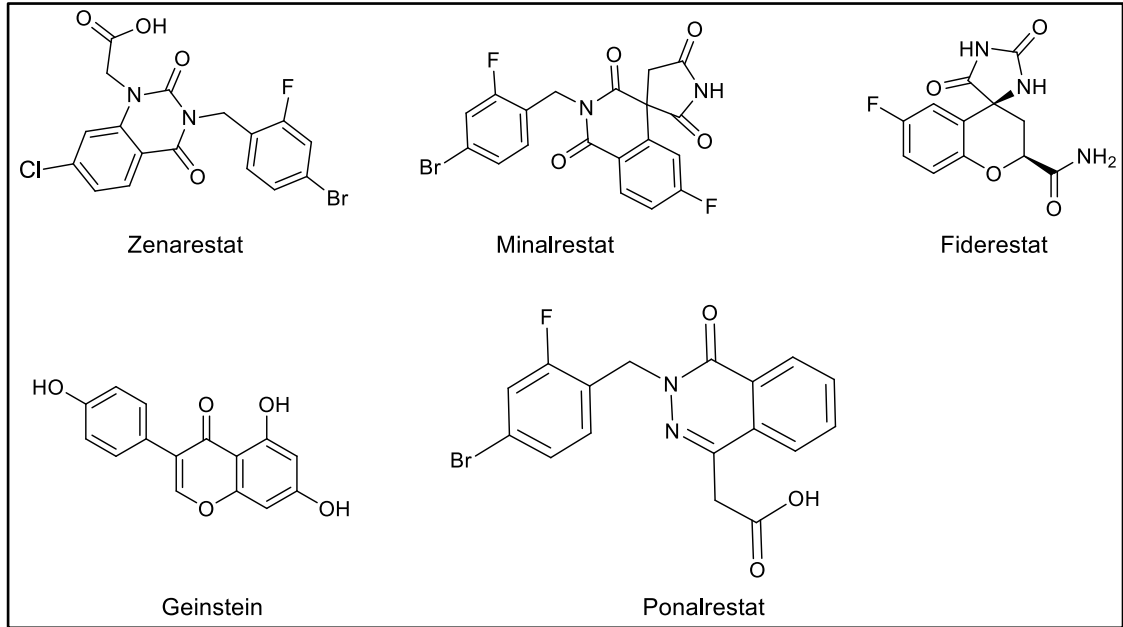
Siklik imid sınıfına dahil olan minalrestatin flor atomunun ve diğer bir ARI'ü olan fidarestatin karbamoil grubunun karboksilat fonksiyonel grubu ile yer değiştirmesi sonucu enzim-inhibitor kompleksinin net bağlanma enerjisi artmaktadır (Darmanin *et al.* 2004).

Bir başka ARI'ü olan fidarestat ile yapılan ęalıřmalar, sinir kan akışını ve sinir hücrelerinde biriken sorbitol seviyesini normal düzeye getirdiğı belirtilmektedir (Asano *et al.* 2002).

Diğer bir ARI'ü olan genistein, poliolsu yolağının neden olduğu oksidatif stresi engelleyerek, GSH düzeyinin artmasına neden olmakta ve lens proteinlerinin zarar görmesini engellediğı için katarakt oluşumunu da engellemektedir (Kim *et al.* 2008).

Ayrıca, başka bir ARI'ü olan zenarestat, sinir iletim hızını olumlu yönde etkilemektedir (Setter *et al.* 2003).

Ancak, ARI'lerinin rolleri bununla sınırlı değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ARI'lerinin, karaciğer, göğüs, ovaryum, serviks ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde de iyileştirici bir ajan olarak rol oynadığı da gösterilmiştir (Jin *et al.* 2006; Saraswat *et al.* 2006; Tammali 2006; Alexiou *et al.* 2009).



Şekil 5.1. En önemli aldoz redüktaz inhibitörlerinden bazıları

Sıçan karaciğer tümör hücreleri ile yapılan bir çalışmada, aldoz redüktazın, karbonil metabolitlerinin (3-DG, gliseraldehit) işlevini baskılayarak hücrede kontrolsüz bölünmenin devamını sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle karaciğer tümör oluşumunda aldoz redüktazın ekspresyonundaki artışın, kanser hücrelerinin yok edilememesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Jin *et al.* 2006). Buradan aldoz redüktaz inhibitörlerinin oldukça önemli olduğu sonucu çıkarılabilir.

Tez çalışmamızda, sığır böbrek AR enzimi beş basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (0-70%), DEAE Sephadex iyon değişim

kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerle AR enzimi sığır böbreğinden 2,53 EÜ/mg spesifik aktivite, %1,94 verimle yaklaşık 31 kat saflaştırılmıştır. Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4°C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi, spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Bu yöntemle numune içerisindeki safsızlıklar uzaklaştırılarak proteinler daha derişik halde elde edilmiş olurlar. Bu sebeple kromatografik işlemler öncesi amonyum sülfat çöktürmesi işlemi enzimin daha derişik hale getirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle yaptığımız çalışmada sığır böbrek AR enzimi için %0-70 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük moleköl kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Sığır böbrek AR enziminin saflaştırılması işlemlerinde DEAE Sephadex, Jel filtrasyon ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleriyle birlikte iyon değışim kromatografisi de kullanılmıştır. Bu kromatografik yöntem, proteinleri taşıdıkları net yüklere göre ayırır. Kolona pozitif (anyon değıştirici) veya negatif (katyon değıştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçine paketlenir. Protein karışımı düşük iyonik şiddetli bir tamponla kolon boyunca yürütölür. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını sağlayacak bir değere sahip olmalıdır. Eğer tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü pozitif olur ve bir katyon değıştirici ile bağlanır. Bunun tersine tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değıştirici ile bağlanarak kolona tutunur. Kolona tutunmayan proteinler, kolondan öncelikli olarak akarlar. İyonik gücü ya da pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilerek kolona bağlı proteinlerin yükü değıştirilerek kolondan ayrılması sağlanır. İyon değışim kromatografisinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonlu tamponlarda olması istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle

çalışmamızda kromatografik işlemler sırasında oldukça düşük tuz konsantrasyonlu tampon çözeltiler kullanıldı (Alım 2010).

Yaptığımız çalışmada, AR enzimi, önceden rapor edildiği şekliyle izoelektrik pH'sı ($pI=6,2$) (Bohren *et al.* 1991) göz önünde bulundurularak DEAE Sephadex kolonunda $pH=7,4$ 'da çalışıldı. $pH=7,4$ 'da AR enzimi DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve kolonu dengelemekte kullanılan tampon çözelti ile birlikte elüe oldu. AR enziminin $pH=7,4$ 'te DEAE Sephadex kolonuna bağlanmamasının sebebi, ortamda $pH=7,4$ 'da DEAE Sephadex kolonuna AR proteininden daha kuvvetle bağlanan proteinlerin olması olarak tahmin edildi. Böylece AR enzimi kolona bağlanan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. DEAE-Sephadex iyon değişim kolonundan elde edilen ve AR enzim aktivitesi görülen elüatlar jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Jel filtrasyon kolonunda protein büyüklüğü esasına göre ayırım sağlandı. Jel filtrasyon kolonundan elde edilen elüatlarda AR aktivitesi gösteren tüpler birleştirilerek 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kolonuna yüklendi. Enzim kolona tutundu. Tutunan enzimler elüe edilerek saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. SDS-PAGE'de tek bant gözlenmesi ile sığır böbreğinden elde edilen AR enziminin saf olduğu ispatlanmış oldu (Şekil 4.6).

Yaptığımız çalışmada sığır böbreğinden elde edilen AR enziminin alt birim molekül kütlelerinin belirlenmesinde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.6'da verildiği gibi sığır böbreğinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de yürütüldü. $\log M_A-R_f$ standart grafiği çizildi ve Şekil 4.7'de verildi. Daha sonra sığır böbrek dokusundan elde edilen enzim numunesinin R_f değeri hesaplanarak standart grafikten sığır böbrek AR enziminin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. Yaptığımız çalışmada AR enziminin alt birim molekül kütlesi 37,50 kDa olarak belirlendi.

Her enzimin birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir. Sığır böbreğinden saflaştırılan AR enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla

dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve sığır böbrek AR enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Sığır böbrek AR enzimi için optimum pH çalışması farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak 200 mM Na-fosfat pH=5,5 tamponu olarak belirlendi. Ayrıca sığır böbrek AR enzimi için optimum iyonik şiddet, Na-fosfat tamponundan farklı konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılarak 200 mM olarak belirlendi. Sığır böbrek AR enziminin stabil pH'sı ise, değişik pH'larda Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak pH=5,5 (Na-fosfat) olarak tespit edildi.

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

Yukarıda da belirtildiği gibi polioll yolu canlı metabolizmasında oldukça önemli bir yer işgal etmektedir. Dolayısıyla AR ve SDH enzimleri üzerine yapılan çalışmalar bu enzimler özelinde sebep oldukları diyabetik komplikasyonların önlenmesi ve/veya geciktirilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu durum, yaptığımız çalışmanın önemini ortaya koyan ciddi bir göstergedir. Özellikle polioll yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan AR için inhibisyon çalışmaları oldukça önemlidir.

Enzim saflaştırma çalışmaları oldukça zor işlemlerdir. Protein yapısındaki enzimler şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Dolayısıyla bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar ve bazen amino asitler, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir.

AR enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve inhibisyonu çalışmalarının yanı sıra çeşitli kaynaklardan SDH enzimi de saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve inhibisyon çalışmaları da yapılmıştır. Sorbitol dehidrogenaz enzimi ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmış (Brakley 1951), daha sonraki yıllarda enzim çeşitli memeli dokularından (Smith 1962; Reng and Torack 1977; Bailey *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983; Wiesinger and Hamprecht 1987; Maret and Auld 1988; Marini *et al.* 1997) ve bazı bitki kaynaklarından (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Sorbitol dehidrogenaz enzimini memeli dokularından saflaştırılması oldukça zor bir prostestir. sorbitol dehidrogenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmaması bunda en büyük etkidir. Enzimin bu özelliği saflaştırma işleminin yapıldığı pek çok çalışmada gözlemlenmiştir (Smith 1962; Rehg and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1983; Karacaoğlan and Özer 2005).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında bugüne kadar çok değişik kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Örneğin sığır lensinden sorbitol dehidrogenaz enzimi, DE-52, amonyum sülfat çöktürmesi, Affi Blue, 2.DE-52, S-200, Bio Sil Sec 250 yöntemleri kullanılarak altı basamaklı bir prosesle %16 verimle, 30000 kat saflaştırılabilmıştır ve sığır lensi SDH enziminin her bir alt biriminin molekül kütlesi 39 kDa, enzimin aktif formunun molekül kütlesi ise 156 kDa olarak bulunmuştur (Marini *et al.* 1997).

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

Bir çalışmada, insan beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimi, protamin sülfat çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz, CM-Selüloz, Matrex Red A-gel, ultrafiltrasyon teknikleri ile toplam 6 basamakta %5,5 verimle 690 kat kısmen saflaştırılmıştır. Bu çalışmada insan beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin özellikle

sulu solüsyonda (1 mL'de 1 mg'dan daha az protein olduğunda) stabilitesinin olmadığı bu nedenle saflaştırma işlemlerinin mümkün olduğunca hızlı tamamlanması gerektiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1983).

Yaptığımız çalışmada sığır böbrek dokusundan SDH enzimi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.12'de gösterildiği şekilde saflaştırılmıştır.

Çalışmamızda, sığır böbrek SDH enzimi dört basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (40-70%) (Karacaoğlan ve Özer), DEAE Sephadex iyon değişim kromatografisi CM-selüloz iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerle SDH enzimi sığır böbreğinden 2,5 EÜ/mg spesifik aktivite, %2,34 verimle yaklaşık 17 kat saflaştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmada sığır böbrek SDH enzimi için %40-70 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Sığır böbrek SDH enziminin saflaştırılması işlemlerinde DEAE Sephadex, CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri birlikte kullanılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin molekül büyüklüklerine göre sabit fazda yürüme hızlarına göre ayrılmalarını sağlayan kromatografik bir yöntemdir.

Yaptığımız çalışmada, SDH enzimi, önceden rapor edildiği şekliyle izoelektrik pH'sı (pI=7,3) (Lindstad and McKinley-Mckee 1996) ve stabil pH aralığı (pH 5,0-9,0) (Reiersen *et al.* 1992) göz önünde bulundurularak DEAE Sephadex kolonunda pH=7,9'da çalışıldı. pH=7,9'da SDH enzimi DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve kolonu dengelemekte kullanılan tampon çözelti ile birlikte elüe oldu. SDH enziminin pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna bağlanmamasının sebebi, ortamda PH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna SDH proteininden daha kuvvetle bağlanan proteinlerin

olması olarak tahmin edildi. Böylece SDH enzimi kolona bağlanan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. DEAE-Sephadex iyon değişim kolonundan elde edilen ve SDH enzim aktivitesi görülen elüatlar CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklendi ve SDH enzimi bu kolona tutundu. Tutunan enzimler elüe edildikten sonra jel filtrasyon kolonuna uygulandı ve elüatların saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. SDS-PAGE’de tek bant gözlenmesi ile sığır böbreğinden elde edilen SDH enziminin saf olduğu kanıtlanmış oldu (Şekil 4.12) Enzimin düşük verimle saflaştırılmasının sebebi, kolon kromatografisi işlemleri esnasında enzimin hızlı bir şekilde aktivite kaybına uğramasıdır.

Yaptığımız çalışmada sığır böbreğinden elde edilen SDH enziminin alt birim molekül kütlesinin belirlenmesinde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.12’de verildiği gibi sığır böbreğinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE’de birlikte yürütüldü. Log M_A -Rf standart grafiği çizildi ve Şekil 4.13’de verildi. Daha sonra sığır böbrek dokusundan elde edilen enzim numunesinin Rf değeri hesaplanarak standart grafikten sığır böbrek SDH enziminin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. Yaptığımız çalışmada SDH enziminin alt birim molekül kütlesini 37,56 kDa olarak belirlendi.

Sığır böbreğinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve sığır böbrek SDH enzimi için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Sığır böbrek SDH enzimi için optimum pH çalışması farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak 25 mM Glisin/NaOH pH=9,5 tamponu olarak belirlendi. Ayrıca sığır böbrek SDH enzimi için optimum iyonik şiddet, Glisin/NaOH tamponundan farklı konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılarak 25 mM olarak belirlendi. Sığır böbrek SDH enziminin stabil pH’sı ise, değişik pH’larda NaH_2PO_4 , Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak pH=8,0 (Fosfat) olarak tespit edildi.

AR enzimi üzerine yaptığımız inhibisyon çalışmaları IC_{50} değerleri hesaplanarak belirlendi. Çalışmamızda en yüksek inhibisyonu IC_{50} değeri 0,0287 mM olan seftriakson antibiyotiği göstermiştir. Seftriakson bileşiğinden yola çıkılarak daha güçlü AR inhibitörleri sentezlenebilir. Bu bileşiği IC_{50} değerleri sırasıyla 0,049 ve 0,058 mM olan tylosin ve metronidazol bileşikleri izlemektedir. AR enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin inhibisyon büyüklükleri büyükten küçüğe doğru sıralaması; seftriakson > tylosin > metronidazol > siprofloksasin > vankomisin > seftazidim > sefotaksim > kloramfenikol > ampisilin > sefuroksim > amikasin sülfat > sefazolin > gentamisin > linkomisin şeklindedir.

AR enzimi aktivitesi üzerine çalışılan tüm inhibitörler SDH enzimi aktivitesi üzerine de çalışıldı. Poliol yolunun iki enzimi üzerine de inhibisyon etkisi gösteren gentamisin, linkomisin, ampisilin ve amikasin sülfat bileşikleri arasında en iyi inhibisyon etkisini amikasin sülfat bileşiği göstermiştir (AR için IC_{50} değeri 9,8 mM ve SDH için IC_{50} değeri 2,4 mM). Amikasin sülfat bileşiği referans alınarak ve bu bileşik üzerinde bazı modifikasyonlar denenerek poliol yolunun tamamını inhibe eden inhibitörler sentezlenebileceği düşünülmektedir. SDH enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin inhibisyon büyüklükleri büyükten küçüğe; amikasin sülfat > ampisilin > seftazidim pentahidrat > gentamisin > linkomisin şeklinde sıralanmaktadır. Buradan amikasin sülfat bileşiğinin güçlü bir SDH inhibitörü olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çizelge 5.1. Sığır böbreğinden AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

AR enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar	
Spesifik Aktivite EÜ/mL	2,53
Saflaştırma Katsayısı	31,6
Verim	%1,94
Molekül kütlesi tayini (SDS-PAGE metodu ile) (kDa)	37,50
K_M (mM)	0,089
V_{max} (EU/mL)	0,07
Optimum pH	6,0
Optimum iyonik şiddet (mM)	250
Optimum sıcaklık (°C)	40
Stabil pH	5,5

Çizelge 5.2. Sığır böbreğinden SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar	
Spesifik Aktivite EÜ/mL	2,50
Saflaştırma Katsayısı	17,9
Verim	%2,34
molekül kütlesi tayini (SDS-PAGE metodu ile) (kDa)	37,56
K_M (mM)	1,25
V_{max} (EU/mL)	0,351
Optimum pH	10,0
Optimum iyonik şiddet(mM)	25
Optimum sıcaklık(°C)	50
Stabil pH	8,0

Çizelge 5.3. Sığır böbrek AR enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik Türü	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Sefazolin	14,74	6,112	15,38 ±4,86	Yarı yarışmalı
		16,17		
		23,78		
Seftriakson	28,75 (µM)	25,71	52,61 ± 11,3	Yarı yarışmalı
		32,14		
		100		
Sefuroksim	5,65	2,88	3,21 ± 0,28	Yarışmasız
		3,34		
		3,41		
Vankomisin	0,27	0,16	0,106 ± 0,01	Yarışmalı
		0,11		
		0,05		
Amikasin Sülfat	9,8	6,27	7,54 ± 1,26	Yarışmasız
		8,79		
		7,56		
Gentamisin	69	39,25	52,82 ± 12,68	Yarı yarışmalı
		55,08		
		64,34		
Sefotaksim	1,84	1,83	2 ± 0,23	Yarışmasız
		2,28		
		1,9		
Ampisilin	4,96	2,41	2,72 ± 0,71	Yarışmasız
		2,23		
		3,53		
Seftazidim	1,13	0,83	1,39 ± 0,11	Yarışmasız
		1,4		
		1,94		
Kloramfenikol	3,06	1,6	3,07 ± 1,31	Yarı yarışmalı
		3,55		
		4,08		
Linkomisin	345	-	-	-
Metronidazol	58,42 (µM)	-	-	-
Siprofloksasin	0,12	-	-	-
Tylosin	49,28 (µM)	-	-	-

Çizelge 5.4. Sığır böbrek SDH enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik İsmi	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Gentamisin	38,5	14,92	19,91 ±4,35	Yarı yarışmalı
		21,90		
		22,92		
Linkomisin	72	34,46	40,33 ±5,12	Yarışmalı
		42,12		
		44,40		
Ampisilin	2,625	2,25	2,06±0,196	Yarışmasız
		2,09		
		1,86		
Amikasin Sülfat	2,4	2,55	2,41±0,3	Yarışmasız
		2,14		
		1,96		
Seftazidim pentahidrat	3,76		K _i çalışılmadı	
Sefotaksim	Aktivasyon			
Kloramfenikol	Aktivasyon			
Sefuroksim	Aktivasyon			
Siprofloksasin	Aktivasyon			
Tylosin	Yeterli inhibisyon yok			
Sefazolin	Aktivasyon			
Sefriakson	Aktivasyon			
Metronidazol	Aktivasyon			
Vankomisin	Yeterli inhibisyon yok			

KAYNAKLAR

- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., Demopoulos, V. J., 2009. aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century. *Current Medicinal Chemistry*, 16(6), 734-752.
- Alım, Z. and Beydemir, Ş., 2012. Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol Dehydrogenase. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118(5), 244-252
- Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C., 2006. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(2), 51-56.
- Anonymous, 1997. American Diabetes Association. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20(1), 1183-1897.
- Anonymous, 1998. UKPDS Research Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS). *Lancet*, 352, 837-853.
- Anonymous, 1999. World Health Organization. Department of noncommunicable disease surveillance: definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation, WHO Publications, Geneva, 1-59.
- Anonymous, 2003. Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26, 3160-3167.
- Anonymous, 2004a. American Diabetes Association. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27(1), 11-14.
- Anonymous, 2004b. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27(1), 88-89.
- Anonymous, 2005. The royal college of ophthalmologists publications home page. *Guidelines For Diabetic Retinopathy*, 26(7), 519-522.
- Anonymous, 2010a. Textbook of Diabetes. 4th edition. Editors: Holt, R.I.G., Cockram, C., Flyvbjerg, A. and Goldstein B.J., 3-5.
- Anonymous, 2010b. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33, 62-69.
- Anonymous, 2013. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas 6th edition*, 12-13.
- Asano, T., Saito, Y., Kawakami, M. and Yamada, N., 2002. Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 16, 133-138.
- Atkinson, M.A. and Maclaren, N.K., 1994. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 331, 1428–1436.
- Bailey, J.P., Renz, C. and McGuinness, E.T., 1981. Sorbitol dehydrogenase from horse liver: purification, characterization and comparative properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69, 909-914.

- Barisani, D., Meneveri, R., Ginelli, E., Cassani, C. and Conte, D., 2000. Iron overload and gene expression in HepG2 cells: analysis by differential display FEBS Letter, 10, 208-212.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A., 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40, 553–624.
- Bery, G.T., 1995. The role of polyols in the pathophysiology of hypergalactosemia. *European Journal of Pediatrics*, 154, 53-64.
- Bohren, K.M., Brownlee, J.M., Milne, C.A., Gabbaya, K.H. and Harrison, D.H.T., 2005. The structure of Apo R268A human aldose reductase: Hinges and latches that control the kinetic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1748(2), 201-212.
- Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B. And Gabbay, K.H., 1989. The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 9547-9551.
- Bohren, K.M., Page, J.L., Shankar, R., Henry, S.P. and Gabbay, K.H., 1991. Expression of human aldose and aldehyde reductases. Site-directed mutagenesis of a critical lysine 262. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 24031-24037.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brakley, R.L., 1951. The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol; Sorbitol dehydrogenase. *The Biochemical Journal*, 49(3), 257-271.
- Brownlee, J.M., Carlson, E., Milne, A.C., Pape, E. and Harrison, D.H.T., 2006. Structural and thermodynamic studies of simple aldose reductase-inhibitor complexes. *Bioorganic Chemistry*, 34(6), 424–444.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–820
- Brownlee, M., Viassara, H., Cerami, A., 1984. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of Internal Medicine*, 101(4), 527-537.
- C. Yabe-Nishimura, 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications, *Pharmacological Reviews*, 50(1), 21–34
- Cameron, N.E. And Cotter, M.A., 1996. Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism*, 45, 1147–1152.
- Carrozza, J.P., Kuntz, R.E., Fishman, R.F., Baim, D.S., 1993. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 118, 344-349.
- Cerelli, K.J., Curtis, D.L., Dunn, J.P., Nelson, P.H., Peak, T.M. and Waterbury, L.D., 1986. Antiinflammatory and aldose reductase inhibitory activity of sometricyclic arylacetic acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 2347-2351.

- Chao, C.Y., Mong, M.C., Chan, K.C., Yin, M.C., 2010. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(3), 388-95.
- Chappey, O., Dosquet, C., Wautier, M.P. and Wautier, J.L., 1997. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation*, 27, 97-108.
- Cheung, A.K., Fung, M.K., Lo, A.C., Lam, T.T., So, K.F., Chung, S.S., Chung S.K., 2005. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes*, 54(11), 3119-3125.
- Chung, S.S., Ho, E.C., Lam, K.S. and Chung, S.K., 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, 233-236.
- Dan, Q., Wong, R.L.C., Yin, S., Chung, S.K., Chung, S.S.M. and Lam, K.S., 2004. Interaction between the polyol pathway and non-enzymatic glycation on mesangial cell gene expression. *Nephron Experimental Nephrology*, 98, 89-99.
- Darmanin, C., Chevreux, G., Potier, N., Dorselaer, A.V., Hazemann, I., Podjarnyc, A. and El-Kabbani, O., 2004. Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 3797-3806.
- De-Fronzo, R., Deibert, D., Hendler, R. and Felig, P., 1979. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 63, 939-946.
- Del Corso, A., Costantino, L., Rastelli, G., Buono, F. and Mura, U., 2000. Aldose reductase does catalyse the reduction of glyceraldehyde through a stoichiometric oxidation of NADPH. *Experimental Eye Research*, 71, 515-521.
- Demir, H., Beydemir, S., Ciftci, M., 2009. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Polygonum cognatum* Meissn Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 21, 517-527.
- Derubertis, F.R., Craven, P.A., 1994. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*, 43, 1-8.
- Dixit, B., Balendiran, G.K., Watowich, S.J., Srivastava, S., Ramana, K.V., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., 2000. Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of aldose reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21587-21595.
- Dixon, D.G., Hodson P.V., Kaiser K.L.E., 1987. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6, 685-696.
- Djoubissie, P.O., Snirc, V., Sotnikova, R., Zurova, J., Kyselova, Z., Skalska, S., Gajdosik, A., Javorkova, V., Vlkovicova, J., Vrbjar, N. and Stefek, M., 2006. In vitro inhibition of lens aldose reductase by (2-Benzyl-2,3,4,5-Tetrahydro-1 H-Pyrido[4,3-b] Indole-8-yl)-acetic acid in enzyme preparations isolated from diabetic rats. *General Physiology and Biophysics*, 25, 415-425.
- Dobson, M., 1776. Experiments and observations on the urine in diabetes. *Medical Observations and Inquiries*, 5, 298-316

- Doehlert, D.C., 1987. Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiology*, 84, 830-834.
- Donkin, S.S., Bertics, S.J. and Armentano, L.E., 1997. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. *Journal of Animal Science*, 75(11), 3082-3087.
- Donkor, I.O., Abdel-Ghany, Y.S., Kador, P.F., Mizoguchic, T., Bartoszko-Malik, A., Miller, D.D., 1999. Synthesis and biological activity of aldose reductase inhibitors with Michael acceptor substituents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 235–243
- Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M., 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 12222–12226.
- Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58, 3–12.
- Eastman, R.C., Siebert, C.W., Harris, M., Golden, P.J., 1993. Clinical review 51: Implications of the diabetes control and complications trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 77(5), 1105-1107.
- El-Kabbani, O., Ruiz, F., Darmanin, C. and Chung, R.P.T., 2004. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61, 750-762.
- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, M. and Quioco, F.A., 1998. Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Molecular Vision*, 4, 19.
- Engerman, R.L., 1989. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 38, 1203-1206.
- Estonius, M., Danielsson, O., Karlsson, C., Persson, H., Jörnvall, H., Höög, J.O., 1993. Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues. *European Journal of Biochemistry*, 215, 497-503.
- Fain, J.A., 2009. Understanding diabetes mellitus and kidney disease. *Nephrology Nursing Journal*, 36, 465–470.
- Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M.A., Oleggini, M., Graziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L., Bevilacqua, S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 317(6), 350-357.
- Flynn, T.G., Shires, J. And Walton, D.J., 1975. Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent aldehyde reductase from pig kidney: amino acid composition, reactivity of cysteinyl residues, and stereochemistry of D-glyceraldehyde reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 2933–2940.
- Gabbay, K.H., 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 288, 831–836.
- Gabbay, K.H., 1975. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annual Review of Medicine*, 26, 521-536.
- Garcia Soriano, F., Virág, L., Jagtap, P., Szabó, E., Mabley, J.G., Liaudet, L., Marton, A., Hoyt, D.G., Murthy, K.G., Salzman, A.L., Southan, G.J., Szabó, C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Medicine*, 7, 108–113.

- Gilligan, J.P., Spector, S., 1984. Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*, 6(3), 11144-11149.
- Giugliano, D., Paolisso G., Ceriello A., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19(3), 257-267.
- Gleissner, C.A., Galkina, E., Nadler, J.L. and Ley, K., 2007. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4 (3), 131-140.
- Graier, W.F., Grubenthal, I., Dittrich, P., Wascher, T.C., Kostner, G.M., 1995. Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *European Journal of Pharmacology*, 294, 221–229
- Greene, D.A., Lattimer, S.A., Sima, A.A., 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium- ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine*, 316(10), 599-606.
- Gugliucci, A., Bendayan, M., 1997. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia*, 39, 149–160.
- Hanefeld, M., Fischer, S., Julius, U., Schulze, J., Schwanebeck, U., Schmechel, H., Ziegelasch, H.J., Lindner, J., 1996. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: The diabetes intervention study, 11-year follow-up. *Diabetologia*, 39, 1577.
- Harris, M., Zimmet, P., 1997. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Second Edition. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 9-23
- Harrison, D.H., Bohren, K.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Gabbay, K.H., 1994. An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate, *Biochemistry*. 33, 2011–2020.
- Hers, H.G., 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22(1), 202-203.
- Hollenbeck, C., Reaven, G.M., 1987. Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64, 1169-73.
- Hoshi, A., Takahashi M., Fujii J., Myint T., Kaneto H., Suzuki K., Yamasaki Y., Kamada T., Taniguchi N., 1996. Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats. *Biochemical Journal*, 318, 119-123.
- Hostetter, T.H., 1992. Diabetic nephropathy, metabolic versus hemodynamic considerations. *Diabetes Care*, 15, 1075-1078.
- Huang, S.P., Palla, S., Ruzycski, P., Varma, R.A., Harter, T., Reddy, G.B., Petrash, J.M., 2010. Aldo-keto reductases in the eye. *Journal of Ophthalmology*, 2010, 521204.
- Hwang, Y.C., Sato, S., Tsai, J.Y., Yan, S., Bakr, S., Zhan, H., Oates, P.J., Ramasamy, R., 2002. Aldo reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *FASEB Journal*, 16, 243-245.
- Iwata, K., Nishinaka, T., Matsuno, K., Kakehi, T., Katsuyama, M., Ibi, M. and Yabe-Nishimura, C., 2007. The activity of aldose reductase is elevated in diabetic mouse heart. *Journal Pharmacological Sciences*, 103, 408-416.
- Jakuš, V., Rietbrock, N., 2004. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiological Research*, 53, 131-142.

- Jeffery, J., Jornvall, H., 1988. Sorbitol dehydrogenase. *Advances in. Enzymology*, 61, 47-106.
- Jerums, G., Panagiotopoulos, S., Forbes, J., Osicka, T. and Cooper, M., 2003. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419, 55–62.
- Jiang, T., Che, C., Lin, Y., Li, L., Zhang, N., 2006. Aldose reductase regulates TGF- β 1-induced production of fibronectin and type IV collagen in cultured rat mesangial cells. *Nephrology*, 11, 105-112.
- Jin, J., Krishack, P. and Cao, D., 2006. Role of aldo-keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2767-2773.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jornvall, H., Eklund, H., Hoog, J.O., 2001. Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, 130, 351-358.
- Jörnvall, J.H., Hedlund, T., Bergman, U., Oppermann, B., 2010. Persson, Superfamilies SDR and DR: from early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 125–130.
- Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Jeon, S.M., 2006. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(2), 476–483.
- Kador, P.F., 1988. The role of aldose reductase in the development of diabetic complications. *Medicinal Research Reviews*, 8, 325–352
- Kador, P.F., Kinoshita, J.H., Stribling, D., Brittain, D.R., Mirrless, D.J., Sennitt, C.M., 1987. Rat lens aldose reductase and poliol production. *Biochemical Journal*, 247, 495-496.
- Kang, E.S., Kim, H.J., Paek, K.S., Jang, H.S., Chang, K.C., Lee, J.H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. and Seo, H.G., 2005. Phorbol ester up-regulates aldose reductase expression in A549 cells: A potential role for aldose reductase in cell cycle modulation. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 62, 1146-1155.
- Karacaoğlan, V., Özer, I., 2005. Steady-state kinetic properties of sorbitol dehydrogenase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, 309-312.
- Karasu, C., 2000. Time course of changes in endothelium-dependent and independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species. *European Journal of Pharmacology*, 392, 163-173.
- Kim, Y.S., Kim, N.H., Jung, D.H., Jang, D.S., Lee, Y.M., Jong, M.K. and Kim, J.S., 2008. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF- β 2 expression in human lens epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 594, 18–25.
- Kinoshita, J.H., 1965. Cataracts in galactosemia. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 4(5), 786-790.
- Kinoshita, J.H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology*, 13(10), 713-724.
- Koya, D., King, G.L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47, 859–866;

- Kumar, P.A. and Reddy, G.B., 2007. Focus on molecules: Aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 85(6), 739-740.
- Laasko, M., 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48, 937-42.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Larkins, R.G. and Dunlop, M.E., 1992. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 35, 499-504.
- Lee, A.Y., Chung S.S, 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb Journal*, 13, 23-30.
- Lee, A.Y., Chung, S.K., Chung, S.S., 1995. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 2780.
- Lee, K.W., Ko, B.C., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S.S., 2001. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs*, 12, 129-132.
- Lindstad, R.I., McKinley-McKee, J.S., 1997. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by the antidiabetogenic drug 2-hydroxymethyl-4-(4-N,N-dimethylaminosulfonyl-1-piperazino) pyrimidine. *FEBS Letters*, 408, 57-61.
- Lindstad, R.I., Teigen, K., Skjeldal, L., 1992. Inhibition of sorbitol dehydrogenase by nucleosides and nucleotides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, 202-208.
- Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15, 203-210.
- Lorenzi, M., 2007. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research*, 61038, 1-10.
- Maekawa, K., Tanimoto, T., Okada, S., Suzuki, T., 2001. Expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase genes in Schwann cells isolated from rat: effects of high glucose and osmotic stress. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 87, 251-256.
- Maret, W., Auld, D.S., 1988. Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. *Biochemistry*, 27, 1622-1628.
- Marini, I., Bucchioni, L., Borella, P., Del Corsa, A., Mura, U., 1997. Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340, 383-391.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants, Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 4-38.
- Meyer, W.R., Doyle, M.B., Grifo, J.A., Lipetz, K.J., Oates, P.J., Decherney, A.H., Diamond, M.P., 1992. Aldose reductase inhibition prevents galactose-induced ovarian dysfunction in the Sprague-Dawley rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167, 1837-43.
- Miyamoto, S., 2002. Molecular modeling and structure-based drug discovery studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2(3), 74-85.

- Mizisin, A.P., Li, L., Perello, M., Freshwater, J.D., Kalichman, M.W., Roux, L., Calcutt, N.A., 1996. Polyol pathway and osmoregulation in JS1 Schwann cells grown in hyperglycemic and hyperosmotic conditions. *The American journal of physiology*, 270, 90–97.
- Morre, D.M., Lenaz, G., Morre, D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation imaging. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 1513-1521.
- Morrisey, K., Steadman, R., Williams, J.D. and Phillips, A.O., 1999. Renal proximal tubular cell fibronectin accumulation in response to glucose is polyol pathway dependent. *Kidney International*, 55, 160-167.
- Nakamura, J., Kasuya, Y., Hamada, Y., Nakashima, E., Naruse, K., Yasuda, Y., Kato, K. and Hotta, N., 2001. Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity. *Diabetologica*, 44, 480–487.
- Nakano, T., Petrash, J.M., 1996 Kinetic and spectroscopic evidence for active site inhibition of human aldose reductase. *Biochemistry*, 35, 11196–11202
- Negm, F.B., Loescher, W.H., 1979. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiology*, 64, 69-73.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Brownlee, M., 2000. The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*, 58(77), 26-30.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787–790
- Nishimura, C., 1998. Aldose Reductase in Glucose Toxicity, A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacological Reviews*, 50, 21.
- Nishimura, C., Matsuura, Y., Kokai, Y., Akera, T., Carper, D., Morjana, N., 1990. Cloning and expression of human aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 9788-9792.
- O'Brien, M.M., Schofield, P.J., Edwards, M.R., 1983. Polyol pathway enzymes of human brain. Partial purification and properties of sorbitol dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 211, 81-90.
- Oates, P. (2002). Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *J.Int Rev.Neurobiol.* 50, 325.
- Oates, P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Current Drug Targets*, 9, 14.
- Olefsky, J.M., Kolterman, O.G. and Scarlett, J.A., 1982. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *The American Journal of Physiology*, 243, 15–30.
- Ostenson, C.G., 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171, 241-247.
- Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K., Yamaki, S., 2000. Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 54, 567-572.
- Oyama, T., Miyasita, Y., Watanabe, H. and Shirai, K. 2006. The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73, 227–234.

- Ozturk, Y., Altan, V.M., Yıldızoğlu-Arı, N., 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, 48, 69-112.
- Patricia, I., Kirsti, H., Vesa, O., Kirsi, A.V., Jukka, K., Olof, S., Ele, F., Juhani, K., Pirjo, N., 2003. Insulin-mediated hepatic glucose uptake is impaired in type 2 diabetes: Evidence for a relationship with glycemic control. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88 (5), 2055-2060.
- Pauly, T.A., Ekstrom, J.L., Beebe, D.A., Chrnyk, B., Cunningham, D., Griffor, M., Kamath, A., Lee, S.E., Madura, R., McGuire, D., Subashi, T., Wasilko, D., Watts, P., Mylari, B.L., Oates, P.J., Adams, P.D., Rath, V.L., 2003. X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11, 1071-1085.
- Petitt, D.J., Saad, M.F., Bennett, P.M., Nelson, R.G., Knowler, W.C., 1990. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 33, 438-43.
- Petrova, T., Steuber, H., Hazemann, I., Siah, A.C., Mitschler, A., Chung, R., Oka, M., Klebe, G., Kabbani, O.E., Joachimiak, A., Podjarny, A., 2005. Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant leu300Pro-fidarestat complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 5659–5665
- Podwall, D. and Gooch, C., 2004. Diabetic neuropathy: Clinical features, etiology and therapy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 4, 55–61.
- Rakowitz, D., Gmeiner, A., Schröder, N. and Matuszczak, B., 2006. Synthesis of novel phenylacetic acid derivatives with halogenated benzyl subunit and evaluation as aldose reductase inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 188-193.
- Ramana, K.V, Srivastava, S.K., 2006. Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine*, 36, 115.
- Ramana, K.V., Chandra, D., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Aggarwal, B.B. And Srivastava, S.K., 2002. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 32063-32070.
- Ramasamy, R., Liu, P.J., Oates, S.S., 1999. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. *Cardiovascular Research*, 42, 130-139.
- Reaven, G.M., Bernstein, R., Davis, B. and Olefsky, J.M., 1976. Nonketotic diabetes mellitus: Insulin deficiency or insulin resistance? *The American Journal of Medicine*, 60(1), 80–88.
- Reddy, G.B., Satyanarayana, A., Balakrishna, N., Ayyagari, R., Padma, M., Viswanath, K., Petrash, J.M., 2008. Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, 14, 593.
- Regenold, W.T., Kling, M.A., 2000. Hauser P. Elevated sorbitol concentration in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 593- 606.
- Rehg, J.E. and Torack, R.M., 1977. Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 28(3), 655–660.

- Rehg, J.E., Torack, R.M., 1977. Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 28, 655-660.
- Reiersen, H., Lindstad, R.I., Mckinley-Mckee, J.S., 1994. The inactivation of sheep liver sorbitol dehydrogenase by pyrophosphate and some analogous metal chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311, 450-456.
- Renegold, W.T., Phatak, P., Kling, M.A., Hauser, P., 2004. Post-mortern evidence from human brain tissue of distributed glucose metabolism in mood and psychotic disorders. *Molecular Psychiatry*, 9, 731-733.
- Rhodes, C.J., 2005. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death. *Science*, 307 (5708), 380-384.
- Rittner, H.L., Hafner, V., Klimiuk, P.A., Szweda, L.I., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M., 1999. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 1007-1013.
- Rogniaux, H., Dorsselaer, A.V., Barth, P., Biellmann, J.F., Barbanton, J., Zandt, M.V., Chevrier, B., Howard, E., Mitschler, A., Potier, N., Urzhumtseva, L., Moras, D. and Podjarny, A., 1999. Binding of aldose reductase inhibitors: Correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 10, 635-647.
- Rollo, J., 1797. An account of two cases of the diabetes mellitus, with remarks as they arose during the progress of the cure. London, 306, England.
- Ruef, J., Liu, S.Q., Bode, C., Tocchi, M., Srivastava, S., Runge, M.S. and Bhatnagar, A. 2000. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20; 1745-1752.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P.U., Suneetha, A., Rao, T.S., Srinivasulu, M., Reddy, B., 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Medical Science Monitor*, 12, 525-529.
- Sato, S. and Kador, P.F., 1989. Rat lens aldehyde reductase. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(7), 1618-1622.
- Sato, S., 1992. Rat kidney aldose reductase and aldehyde reductase and polyol production in rat kidney. *American Journal of Physiology*, 263, 799.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, 213.
- Setter, S.M., Campbell, R.K. and Cahoon, C.J., 2003. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, 37, 1858-1866.
- Shinmura, K., Tang, X.L., Wang, Y., Xuan, Y.T., Liu, S.Q., Takano, H., Bhatnagar, A. and Bolli, R., 2000. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 10197-10202.
- Shinohara, M., Thornalley, P.J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S.R., Onorato, J., Brownlee, M., 1998. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1142-1147.

- Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-idoitol dehydrogenase of sheep liver. *Biochemical Journal*, 83, 135-144.
- Soulis-Liparota, T., Cooper, M.E., Dunlop, M. and Jerums, G., 1995. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*, 38, 387-394.
- Soyut, H., Beydemir, S., Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biological Trace Element Research*, 123, 179-190.
- Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition. *Protein and Peptide Letters*, 15(5), 528-535.
- Srivastava, S., Liu, S.Q., Conklin, D.J., Zacarias, A., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A., 2001. Involvement of aldose reductase in the metabolism of atherogenic aldehydes. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132(1-3), 563- 571.
- Srivastava, S., Watowich, S.J., Petrash, J.M., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A., 1999. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry*, 38, 42-54
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V. and Bhatnagar, A., 2005. Role of Aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26(3), 380-392.
- Sturm, K., Levstika, L., Demopoulos, V.J. and Kristl, A., 2006. Permeability characteristics of novel aldose reductase inhibitors using rat jejunum in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 128-133.
- Sun, G., Ma, Y., Gao, X., König, S., Fales, H.M. and Kador, P.F., 2004. Method for isolating tight-binding inhibitors of rat lens aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 79, 919-926.
- Suzuki, L.A., Poot, M., Gerrity, R.G. and Bornfeldt, K.E., 2001. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis. Lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*, 50, 851-860.
- Takahashi, M., Fujii, J., Teshima, T., Suzuki, K., Shiba, T., Taniguchi, N., 1993. Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene*, 127, 249-253.
- Tammali, R., Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S. and Srivastava, S.K., 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 66(19), 9705-9713.
- Tammali, R., Ramana, K.V., Srivastava, K., 2007. Aldose reductase regulates TNF- α -induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Letter*, 252, 299-306.
- Tanimoto, T., Maekawa, K., Okada, S., Yabe Nishimura, C., 1998. Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta*, 365, 285-292.
- Temelkova-Kurktschiev, T.S., Koehler, C., Henkel, E., Leonhardt, W., Fuecker, K., Hanefeld, M., 2000. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. *Diabetes Care*, 12, 1830-1834.

- Tesfamariam, B., 1994. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 383-391.
- Tomlinson, D.R., Stevens, E.J., Diemel, L.T., 1994. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15, 293-297
- Tsukushi, S., Katsuzaki, T., Aoyama, I., Takayama, F., Miyazaki, T., Shimokata, K. And Niwa, T., 1999. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: Role of the polyol pathway. *Kidney International*, 55, 1970-1976.
- Turgut, K. Ok M., 1997. Veteriner Gastroenteroloji-Semptomdan Teşhisi. Bahçivanlar Basım San. A.Ş., Konya.
- Turner, R.C., Holman, R.R., Matthews, D., Hockaday, T.D.R. and Peto, J., 1979. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism*, 28, 1086-1096.
- Van Heyningen, R., 1959. Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature*, 468, 194-195.
- Varma, S.D., Mizuno, A., Kinoshita, J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, 195(4274), 205-206.
- Viberti, G.J., 2005. Thiazolidinediones-benefits on microvascular complications of type 2 diabetes. *Diabetes Complications*, 19, 168.
- Vlassara, H., 1992. Receptor-mediated interaction of advanced glycosylation end products with cellular components within diabetic tissues. *Diabetes*, 41(2), 52-56.
- Wang, S.J., Yan, J.F., Hao, D., Niu, X.W. and Cheng, M.S., 2007. Synthesis and activity of a new series of (Z)-3-Phenyl-2-benzoylpropenoic acid derivatives as aldose reductase inhibitors. *Molecules*, 12, 885-895.
- Wang, Z., Ling, B., Zhang, R., Suo, Y., Liu, Y., Yu, Z. and Liu, C., 2009. Docking and molecular dynamics studies toward the binding of new natural phenolic marine inhibitors and aldose reductase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 5881, 1-8.
- Wermuth, B., Bürgisser, H., Bohren, K., von Wartburg, J.P., 1982. Purification and characterization of human-brain aldose reductase. *European Journal of Biochemistry*, 127(2), 279-284.
- Wermuth, B., Munch, J.D. and Von Wartburg, J.P., 1977. Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 3821-3828.
- Wiesinger, H., Hamprecht, B., 1987. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. *Journal of Neurochemistry*, 48, 147.
- Williams, G. and Pickup, J.C., 2004. *Handbook of Diabetes*. 3.th edition. Blackwell Publishing Company. Oxford.
- Wilson, D., Bohren, K.M., Gabbay, K.H., Quioco, F.A., 1992. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science*, 257, 81-84.
- Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. and Quioco, F.A., 1992. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science*, 257, 81-84.

- Yamagishi, S., Takeuchi, M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Medical Hypotheses*, 63, 135-137.
- Yamaguchi, H., Kanayama, Y., Yamaki S., 1994. Purification and properties of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant and Cell Physiology*, 35, 887-892.
- Yang, J., Moravec, C.S., Sussman, M.A., Dipaola, N.R., Fu, D., Hawthorn, L., Mitchell, C.A., Young, J.B., Francis, G.S., Mccarthy, P.M. and Bond, M., 2000. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*, 102, 3046-3052.
- Yeh, L.A., Ashton M.A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. *Metabolism*, 39, 619-622.
- Yenigün, M., Altuntaş Y., 2001. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. *Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati*, 315-375.
- Yennawar, M.H., Møller, R., Gillian, N., 2011. X-ray crystal structure and small angle X-ray scattering of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67, 440-446.
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M., and Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782-787.
- Ziyadeh, F.N., Mogyrosi, A., Kalluri, R., 1997. Early and advanced non-enzymatic glycation products in the pathogenesis of diabetic kidney disease. *Experimental Nephrology*, 5, 2-9.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2004 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda 2008 yılında başladığı yüksek lisansa 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora eğitimine başladı. Doktora eğitimini 2015 yılında tamamladı.